



## Determinasi Jumlah Bakteri *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277 pada Saliva Anak Stunting

### Determination of the number of *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277 in Saliva of Stunted Children

Nadhifah Salsabila,<sup>1</sup> Nila Kasuma,<sup>2</sup> Eti Yerizel<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Program Magister Ilmu Biomedis Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Indonesia

<sup>2</sup>Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Andalas, Padang, Indonesia

<sup>3</sup>Departemen Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Andalas, Padang, Indonesia

Email: [dhifa\\_salsa22@yahoo.co.id](mailto:dhifa_salsa22@yahoo.co.id)

Received: May 4, 2023; Accepted: July 31, 2023; Published online: August 5, 2023

**Abstract:** Nutrition affects the immune system and the development of oral health, including periodontal tissue health. Stunted children experience decreased salivary flow rate causing the growth of microorganisms that cause periodontal disease. *Porphyromonas gingivalis* is referred to one of the keystone pathogens in the development of periodontal disease. This study aimed to identify the number of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 bacteria in stunted child saliva. This was a descriptive study with a cross sectional design. Prior to collection, subjects were instructed to rinse their mouth for 30 seconds using distilled water, saliva was collected with draining method, then 2 mL of saliva was taken, and DNA was isolated from *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. DNA amplification and DNA calculation of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 were performed by using Real-time PCR. The results obtained 23 stunted children age 6-12 years as subjects. The average number of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 bacteria in stunting child saliva was  $230.8 \times 10^6 \pm 320.1 \times 10^6$  CFU/ml. In conclusion, the number of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 is higher in stunted children saliva than in normal child saliva.

**Keywords:** stunted children; *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 bacteria; periodontal diseases

**Abstrak:** Gizi memengaruhi sistem pertahanan dan perkembangan kesehatan rongga mulut termasuk kesehatan jaringan periodontal. Anak stunting mengalami penurunan laju alir saliva yang menyebabkan pertumbuhan mikroorganisme penyebab penyakit periodontal, antara lain *Porphyromonas gingivalis* sebagai salah satu *keystone pathogens* dalam perkembangan penyakit periodontal. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 pada saliva anak stunting. Jenis penelitian ialah deskriptif dengan desain potong lintang. Sebelum pengambilan saliva, subjek diinstruksikan berkumur selama 30 detik menggunakan akuades. Pengambilan saliva dengan metode draining selama 10 menit, saliva terkumpul sebanyak 2 mL, dan dilakukan isolasi DNA bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Amplifikasi DNA dan perhitungan jumlah DNA bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 dilakukan menggunakan *Real-time PCR*. Hasil penelitian mendapatkan 23 anak stunting dengan usia 6-12 tahun. Rerata jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 pada saliva anak stunting  $230,8 \times 10^6 \pm 320,1 \times 10^6$  CFU/ml yang lebih tinggi daripada anak sehat yaitu  $180,8 \times 10^6 \pm 201,8 \times 10^6$  CFU/mL Simpulan penelitian ini ialah rerata jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 pada saliva anak stunting lebih tinggi daripada saliva anak normal.

**Kata kunci:** anak stunting; bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277; penyakit periodontal

## PENDAHULUAN

Kegagalan pertumbuhan dikenal dengan istilah stunting, merupakan pertumbuhan linear yang buruk pada tahun awal kehidupan, yang berakibat kegagalan perkembangan tinggi badan pada usia dewasa.<sup>1</sup> Stunting merupakan kumpulan dari gejala gangguan pertumbuhan, keterlambatan perkembangan, gangguan kognitif, dan gangguan metabolik, yang dapat meningkatkan morbiditas dan mortalitas pada anak.<sup>2</sup> *World Health Organization* (WHO) memprediksi bahwa satu dari lima anak akan mengalami stunting pada tahun 2020.<sup>1</sup> Data WHO pada tahun 2017, menunjukkan 150.8 juta anak di dunia yang mengalami stunting.<sup>3</sup>

Permasalahan terhadap kegagalan proses pertumbuhan dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti genetik, kesehatan neuroendokrin pada tulang, keterlambatan pertumbuhan intrauterin, pemberian air susu ibu (ASI) yang tidak eksklusif, infeksi maternal, gangguan gastrointestinal, serta adanya inflamasi dan gangguan sistem imunitas.<sup>4</sup> Mikrobiota berperan langsung dalam pencernaan melalui metabolisme nutrisi pada usus. Tanpa sinyal dari mikrobiota, perkembangan imunitas mukosa pencernaan akan terganggu, dan sebaliknya, sinyal dari respon imun akan membentuk komposisi mikrobiota dan skema respon imun anak stunting.<sup>5</sup>

Kesehatan gigi dan mulut merupakan bagian dari kesehatan tubuh, yang berarti kesehatan tubuh tidak dapat dipisahkan dari kesehatan gigi dan mulut.<sup>6</sup> Kondisi kesehatan rongga mulut, asupan makanan, status gizi, dan status kesehatan umum merupakan faktor yang saling terkait satu sama lain.<sup>7</sup> Hipofungsi kelenjar saliva dilaporkan terdapat pada pasien malnutrisi termasuk anak stunting, sehingga menyebabkan penurunan laju alir saliva, kapasitas *buffer*, dan kandungan saliva, terutama protein.<sup>8</sup> Penurunan laju alir saliva menyebabkan IgA sekretorik berkurang, sehingga mengganggu kolonisasi mikroflora normal dalam rongga mulut.<sup>9</sup>

Protein saliva yang rendah pada anak stunting dibandingkan anak normal dapat meningkatkan jumlah bakteri dalam saliva, serta memicu berbagai penyakit pada rongga mulut terutama karies dan penyakit periodontal.<sup>10</sup> Penyakit periodontal merupakan polimikrobia, multifaktor, dan melibatkan berbagai faktor kerentanan pejamu (*host*) terhadap suatu penyakit.<sup>10</sup> Penyakit periodontal sering terjadi pada anak dan dewasa muda; 70% didapatkan pada anak usia 7 tahun.<sup>11</sup>

Bakteri yang terdapat pada plak anak dengan penyakit periodontal terdiri dari 68% *Porphyromonas gingivalis* dan 20% *Tannerella forsythia*. *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri yang dikaitkan erat dengan perkembangan penyakit periodontal pada anak sehat,<sup>12-14</sup> dan disebut sebagai *keystone pathogens* karena keterlibatannya dalam perkembangan penyakit periodontal sangat dominan.<sup>15</sup> Penelitian Bengtsson et al<sup>16</sup> menyatakan bahwa seluruh strain *Porphyromonas gingivalis* ditemukan dalam perkembangan biofilm, namun strain ATCC 33277 lebih efisien dibandingkan dengan strain lainnya, serta perkembangannya dapat dilihat dengan jelas. Hal ini didukung oleh penelitian Romero-Lastra et al<sup>17</sup> yang membuktikan bahwa dalam perkembangan biofilm, bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 memiliki ekspresi gen paling banyak. Strain ATCC 33277 merupakan jenis strain pada bakteri *Porphyromonas gingivalis* dan umum digunakan untuk menentukan gambaran patofisiologi pada mikroorganisme tersebut. Anak stunting memiliki kondisi rongga mulut dengan laju alir saliva yang rendah sehingga mendukung perkembangbiakan mikroorganisme rongga mulut, termasuk bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Oleh karena itu peneliti ingin mengetahui jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 pada saliva anak stunting untuk mengurangi tingkat keparahan penyakit periodontal yang dialami anak stunting.

## METODE PENELITIAN

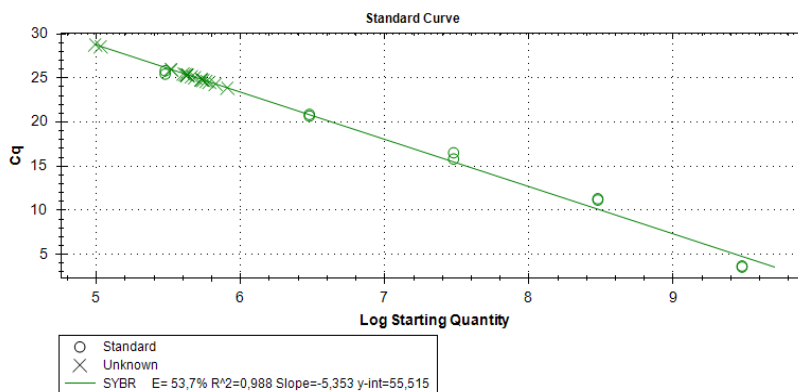
Penelitian ini merupakan studi deskriptif dengan desain potong lintang, dilakukan pada bulan Februari 2020 sampai Oktober 2021 di Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Andalas. Data anak stunting didapatkan dari data sekunder di Wilayah Kerja Puskesmas Andalas. Subjek penelitian ini ialah anak stunting yang berusia 6-12 tahun dengan gigi molar pertama permanen erupsi sempurna. Kriteria inklusi penelitian ini ialah orangtua anak mengisi *informed consent*, sedangkan kriteria eksklusi ialah anak stunting dengan penyakit sistemik dan

mengonsumsi antibiotik dalam enam bulan terakhir. Pengambilan sampel saliva pada subjek penelitian dilakukan pada jam 7 pagi secara bersamaan. Sebelum pengambilan saliva subjek diminta berkumur menggunakan akuades selama 30 detik, dan pengambilan saliva menggunakan *draining method* ke dalam *microtube* 2 ml selama 10 menit. Sampel saliva dimasukkan kedalam *coolbox* yang berisi *dry ice*, selanjutnya dilakukan isolasi dan pemurnian DNA bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 menggunakan kit *Invitrogen*<sup>TM</sup> serta amplifikasi DNA dengan mesin *Real-time PCR* menggunakan kit *Power SYBR*<sup>®</sup> *green*.

**HASIL PENELITIAN**

Selama periode penelitian didapatkan 23 anak stunting yang memenuhi kriteria inklusi dan eksklusi di wilayah kerja Puskesmas Andalas Kota Padang, terdiri dari 12 anak laki-laki (52,17%) dan 11 anak perempuan (47,82%).

Perhitungan absolut dilakukan untuk menghitung jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 pada saliva anak stunting. Gambar 1 digunakan untuk mengonversi hasil yang didapatkan dari mesin *Real-time PCR* menjadi jumlah dalam satuan CFU, maka dilakukan pembuatan kurva standar (Gambar 1).



**Gambar 1.** Kurva standar untuk analisis kuantifikasi DNA bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Tabel 1 memperlihatkan hasil pemeriksaan terhadap 23 anak stunting untuk mendapatkan kondisi penyakit periodontal pada rongga mulut anak dengan pemeriksaan indeks gingiva serta jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Berdasarkan status gizi anak stunting didapatkan indeks gingiva kategori ringan sebesar 17,40%; kategori sedang sebesar 56,52%; dan kategori parah sebesar 26,08%. Rerata jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 pada saliva anak stunting sebanyak 230,86x10<sup>6</sup> dengan standar deviasi 320,18x10<sup>6</sup>.

**Tabel 1.** Hasil pemeriksaan penyakit periodontal dan jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 (CFU/mL x 10<sup>6</sup>) anak stunting

Kategori indeks gingiva	n	%	Rerata jumlah <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 (CFU/mL x 10 <sup>6</sup> ) x̄ ± SD
Ringan	4	17,40	24,33 ± 5,71
Sedang	13	56,52	164,99 ± 248,54
Parah	6	26,08	511,27 ± 403,78
Rerata	23	100	230,86 ± 320,18

**BAHASAN**

Hasil penelitian menunjukkan rerata jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 sebesar 230,8x10<sup>6</sup>±320,1x10<sup>6</sup> CFU/ml pada saliva anak stunting. Bakteri *Porphyromonas*

*gingivalis* ATCC 33277 merupakan strain yang memiliki ekspresi gen paling banyak dalam pembentukan plak dan mampu berkolonisasi dalam rongga mulut dengan jumlah besar.<sup>18</sup> Hal ini didukung oleh penelitian Al-Ghuitaimel et al<sup>19</sup> yaitu kondisi anak stunting yang mengalami defisien mineral dan hipovitaminosis rentan terhadap penyakit periodontal yang diakibatkan oleh peningkatan jumlah patogen.

Jumlah bakteri pada jaringan periodontal sehat berkisar  $10^2$  di dalam saliva,  $10^3$  pada area subgingiva, dan  $10^8$  pada poket periodontal yang dalam; dan bila lebih dari jumlah normal maka bakteri dikatakan bersifat periodontopatik.<sup>20</sup> Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 pada saliva anak sehat berkisar  $180,8 \times 10^6 \pm 201,8 \times 10^6$  CFU/mL

Berdasarkan hasil penelitian ini, semakin banyak jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 maka semakin buruk kondisi penyakit periodontal (Tabel 1). Penyakit periodontal merupakan inflamasi yang diawali oleh infeksi bakteri, penyimpangan respon pejamu, dan kerusakan jaringan periodontal.<sup>21</sup> Jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 yang tinggi pada saliva anak stunting juga dipicu oleh kondisi defisiensi vitamin C yang memiliki efek anti-oksidan, penangkal radikal bebas, dan bertindak sebagai kofaktor enzim pada sel. Vitamin C juga dapat mengurangi aktivitas sitotoksik dan apoptosis bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada sel ligamen periodontal dan fibroblas gingiva.<sup>21</sup> Hasil penelitian ini juga didukung oleh penelitian Olsen dan Yamazaki<sup>22</sup> yaitu anak stunting mengalami defisiensi vitamin A dan *protein energy malnutrition* (PEM) terkait dengan penurunan perkembangan kelenjar saliva.

Rerata jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 yang tinggi pada anak stunting dikarenakan bakteri tersebut mampu mengatur fungsi pertahanan imunitas alami pejamu (*host*) melalui sekresi IL-8, aktivasi komplemen, dan aktivasi TLR4, sehingga mengganggu kemampuan pejamu untuk melakukan perlawanan terhadap bakteri dalam jumlah besar, yang mengakibatkan perubahan komposisi flora rongga mulut, kemudian terjadi respon inflamasi pada jaringan periodontal.<sup>18</sup> Defisiensi nutrisi pada anak stunting menyebabkan sistem imunitas rongga mulut menurun melalui penurunan sekresi dan kandungan saliva, seperti musin yang merupakan protein saliva. Mucin menyebabkan agregasi bakteri sehingga mencegah perlekatan bakteri pada permukaan gigi atau sel epitel, serta mengeliminasi bakteri saat proses penelanan.<sup>23</sup>

Penurunan laju aliran saliva pada anak stunting menyebabkan depitelisasi pada mukosa rongga mulut termasuk sel epitel gingiva.<sup>22,24</sup> Sel-sel epitel pada anak malnutrisi mengalami perubahan sitokin, penurunan aktivitas regenerasi, apoptosis sel, serta penurunan ekspresi *protein barrier*.<sup>25</sup> Bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 yang telah berada di intrasel mengganggu keseimbangan fungsi seluler, serta dapat masuk ke dalam fibroblas gingiva dan osteoblas.<sup>26</sup>

Penelitian ini menggunakan saliva sebagai sampel untuk mengetahui jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277. Saliva sebagai media mikroorganisme untuk kelangsungan hidupnya karena saliva menjadi sumber nutrisi dan pemberi sinyal terhadap mikrobiota rongga mulut.<sup>27</sup> Jumlah mikroorganisme pada saliva dapat mencapai  $10^8$  atau  $10^9$  sel/ml saliva. Darout et al<sup>28</sup> menunjukkan bahwa jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* secara bermakna terdapat pada saliva dan plak subgingiva dengan tingkat akurasi yang tinggi, sehingga pemeriksaan jumlah bakteri pada rongga mulut dapat dilakukan dengan menggunakan sampel saliva dan plak subgingiva.

## SIMPULAN

Rerata jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 pada saliva anak stunting yang mengalami penyakit periodontal lebih tinggi dibandingkan dengan anak sehat yang juga mengalami penyakit periodontal. Semakin buruk kondisi penyakit periodontal anak stunting maka jumlah bakteri *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 semakin tinggi.

## Konflik Kepentingan

Penulis menyatakan tidak terdapat konflik kepentingan pada studi ini.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Vilcins D, Sly PD, Jagals P. Environmental risk factors associated with child stunting: A systematic review of the literature. *Ann Glob Heal*. 2018;84(4):551–62. Doi: 10.29024/aogh.2361
2. Sjarif DR, Yuliarti K, Iskandar WJ. Daily consumption of growing-up milk is associated with less stunting among Indonesian toddlers. *Med J Indones*. 2019;28(1):70–6. Doi: 10.13181/mji.v28i1.2607
3. Yustisia Y, Anmaru R, Laksono B. The influencing factor analysis of stunting incidence in children aged 24–59 months at Kedung Jati Village. *Public Heal Perspect J*. 2019;4(2):116–21. Available from: <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/phpj>.
4. Raiten DJ, Bremer AA. Exploring the nutritional ecology of stunting: new approaches to an old problem. *Nutrients*. 2020;12(2):371. Doi: 10.3390/nu12020371.
5. Bourke CD, Berkley JA, Prendergast AJ. Immune dysfunction as a cause and consequence of malnutrition. *Trends Immunol*. 2016;37(6):386–98. Doi: 10.1016/j.it.2016.04.003.
6. Akbar HF, Pratiwi R, Hardiana SNAN. Oral hygiene and oral health related quality of life of children with stunting in Indonesia. *Int J Dent Oral Sci (IJDOS)*. 2020;7(1):711–7. Doi: 10.19070/2377-8075-20000140.
7. Madhusudhan KS, Madhusudhan PMR. Malnutrition -a risk for oral health. *International J Sci Res*. 2019;8(4):74-6. Doi: 10.13140/RG.2.2.24176.10249
8. Hashem DS, El-Bayoumy SY, Fahmy WA, El Malt MA. Effect of childhood malnutrition on salivary flow and pH. *ADJ-for Grils*. 2016;3(2):141–5.
9. Rytter MJH, Kolte L, Briend A, Friis H, Christensen VB. The immune system in children with malnutrition - a systematic review. *PLoS One*. 2014;9(8):e105017. Doi: 10.1371/journal.pone.0105017
10. Popova C, Dosseva-Panova V, Panov V. Microbiology of periodontal diseases. A review. *Biotechnol Biotechnol Equip*. 2013;27(3):3754–9. Doi: 10.5504/BBEQ.2013.0027
11. Reddy S. *Essentials of Clinical Periodontology and Periodontics*. 2018. New Delhi: The Health Sciences Publisher. Doi:10.5005/jp/books/18042.
12. Newman MG, Takei H, Klokkevold PR, Carranza FA. *Newman and Carranza's Clinical Periodontology* (13th ed). Elsevier Inc.; 2017.
13. Nakano K, Ooshima T, Amano A. *Periodontal Diseases in Children and Adolescents*. New York: Nova Science Publisher; 2011
14. Lakshmi A, Rekha V, Sharmin D, Annamalai S, Baghkomeh PN. Periodontal diseases in children – a literature review. *Int J Curr Res*. 2017;9(5):51269–75.
15. Aydin K, Ekinci FY, Korachi M. Expression profiles of TGF- $\beta$  and TLR pathways in porphyromonas gingivalis and prevotella intermedia challenged osteoblasts. *Jundishapur J Microbiol*. 2015;8(4):0–7. Doi: 10.5812/jjm.8(4)2015.17920.
16. Bengtsson T, Khalaf A, Khalaf H. Secreted gingipains from Porphyromonas gingivalis colonies exert potent immunomodulatory effects on human gingival fibroblasts. *Microbiol Res*. 2015;178:18–26. Doi: 10.1016/j.micres.2015.05.008.
17. Romero-Lastra P, Sánchez MC, Llama-Palacios A, Figuero E, Herrera D, Sanz M. Gene expression of Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 when growing in an in vitro multispecies biofilm. *PLoS One*. 2019;14(8):1–18. Doi: 10.1371/journal.pone.0221234
18. Tribble GD, Kerr JE, Wang BY. Genetic diversity in the oral pathogen Porphyromonas gingivalis: Molecular mechanisms and biological consequences. *Future Microbiol*. 2013;8(5):607–20. Doi: 10.2217/fmb.13.30.
19. Al-Ghuitaimel H, Riba H, Al-Kahtani S, Al-Duhaimi S. Common Periodontal diseases of children and adolescents. *Int J Dent*. 2014;2014:850674. Doi: 10.1155/2014/850674
20. Reddy S. *Essentials of Clinical Periodontology and Periodontics*; 2011. Jaypee Brothers Medical Publishers Pvt. Doi: 10.5005/jp/books/11392
21. Tada A, Miura H. The relationship between vitamin C and periodontal diseases: A systematic review. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(14):2472. Doi: 10.3390/ijerph16142472.
22. Olsen I, Yamazaki K. Can oral bacteria affect the microbiome of the gut? *J Oral Microbiol*. 2019;11(1):1586422. Doi: 10.1080/20002297.2019.1586422.
23. Kato T, Yamazaki K, Nakajima M, Date Y, Kikuchi J, Hase K. Oral administration of Porphyromonas gingivalis alters the gut microbiome and serum metabolome. *mSphere*. 2018;3(5):e00460-18. Doi: 10.1128/msphere.00460-18.

24. Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunol Lett.* 2014;162(2):22–38. Doi: 10.1016/j.imlet.2014.08.017.
25. Bourke CD, Jones KDJ, Prendergast AJ. Current understanding of innate immune cell dysfunction in childhood undernutrition. *Front Immunol.* 2019;10(July):1728. Doi: 10.3389/fimmu.2019.01728.
26. Sakanaka A, Takeuchi H, Kuboniwa M, Amano A. Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells. *Microb Pathog.* 2016;94:42–7. Doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.003.
27. Cornejo Ulloa P, van der Veen MH, Krom BP. Review: modulation of the oral microbiome by the host to promote ecological balance. *Odontology.* 2019;107(4):437–48. Doi: 10.1007/s10266-019-00413-x.
28. Darout IA, Albandar JM, Skaug N. Correlations between bacterial levels in autologous subgingival plaque and saliva of adult Sudanese. *Clin Oral Investig.* 2002;6(4):210–6. Doi:10.1007/s00784-002-0177-0.