

Uji biokimiawi sistem API 20 A mendeteksi *Porphyromonas gingivalis* isolat klinik dari plak subgingiva pasien periodontitis kronis

(Biochemical detection of *Porphyromonas gingivalis* clinical isolate from subgingival plaque of chronic periodontitis patients using API 20A)

Banun Kusumawardani, Peni Pujiastuti, dan Desi Sandra Sari

Bagian Periodonsia
Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember
Jember-Indonesia

Correspondence: Banun Kusumawardani, Bagian Periodonsia, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember, Jl. Kalimantan 37 Jember-Indonesia. E-mail: kusumawardani_banun@yahoo.co.id

ABSTRACT

Background: *Porphyromonas gingivalis*, a black-pigmented Gram-negative anaerobe, is widely implicated as an important etiological agent in the pathogenesis of periodontal disease. Identification of *P. gingivalis* clinical isolate will advantage in research efforts aimed at developing oral intervention methods against this bacterial species, and thus for prevention and treatment of periodontal disease. **Purpose:** This study was to evaluate the ability of API 20A to identify *P. gingivalis* clinical isolate. **Methods:** The methods were anaerobic culture and identification of *P. gingivalis* from bacteria Black-pigmented Gram-negative anaerobes obtained from subgingival plaque of patients with chronic periodontitis, which based on API 20A system, Gram staining, colony and microscopic morphology. **Results:** API 20A system detected *P. gingivalis* (*P. asaccharolytica*) clinical isolate obtained from subgingival plaque with probing depth ≥ 3 mm. Colony and microscopic morphology showed that these bacteria were Gram-negative strict anaerobic coco-bacilli dark brown-black pigmented. They grew in culture media forming convex, smooth glossy colonies of 1-2 mm diameter. There were not differences when *P. gingivalis* clinical isolate were compared with *P. gingivalis* ATCC 33277. **Conclusion:** The API 20A appears to be a promising method for identification of *P. gingivalis* clinical isolate.

Key words: *Porphyromonas gingivalis*, periodontal disease, API 20A

PENDAHULUAN

Penyakit periodontal destruktif adalah kondisi inflamatori kronik yang dikarakterisasi dengan adanya destruksi jaringan ikat dan tulang alveolar, selanjutnya menyebabkan kehilangan gigi. Sejumlah publikasi telah melaporkan bahwa mikroorganisme dari mikrobiota subgingiva, terutama anaerob Gram-negatif adalah faktor penyebab utama periodontitis kronis dan agresif.¹ Walaupun lingkungan mikro subgingiva dikarakterisasi diversitasnya secara luas, dengan lebih dari 300 spesies yang telah diisolasi dari individu dan area yang berbeda pula, namun hanya

sedikit spesies telah dihubungkan dengan penyakit ini.² Selain sulit dalam mengidentifikasi semua anggota mikrobiota oral, tapi terdapat penelitian yang telah mengidentifikasi beberapa pathogen periodontal, salah satunya adalah *Porphyromonas gingivalis*.³

Porphyromonas gingivalis merupakan bakteri melanogenik, nonsakarolitik, dan bagian dari koloni bakteri Black-pigmented Gram-negative anaerobes. Bakteri *P. gingivalis* banyak ditemukan dalam plak gigi dan bakteri tersebut menyebabkan perubahan patologi jaringan periodontal dengan pengaktifan respons imun dan inflamatori inang, dan secara langsung

mempengaruhi sel-sel periodonsium. *P. gingivalis* memproduksi berbagai faktor virulensi patogenik, seperti lipopolisakarida dan hidrogen sulfida, yang dapat menginduksi inang untuk melepaskan IL-1 dan TNF- α .⁴

Porphyromonas gingivalis tumbuh dalam media kultur membentuk koloni berdiameter 1-2 mm, konveks, halus dan mengkilat, yang bagian tengahnya menunjukkan gambaran lebih gelap karena produksi protoheme, yaitu suatu substansi yang bertanggung jawab terhadap warna khas koloni ini.⁵ Identifikasi *P. gingivalis* isolat lokal ini akan memberi peluang besar untuk dikembangkannya suatu metode intervensi oral yang digunakan untuk melawan spesies bakteri ini, dan selanjutnya berguna untuk pencegahan dan perawatan penyakit periodontal. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi kemampuan metode API 20A untuk identifikasi *P. gingivalis* isolat klinik.

BAHAN DAN METODE

Subyek penelitian adalah pasien dengan penyakit periodontal kronis. Setiap pasien diwawancarai tentang riwayat kesehatan umum, penggunaan antibiotik, dan kebiasaan merokok. Selanjutnya subyek dikategorikan mempunyai penyakit periodontal yang aktif, jika hasil pemeriksaan menunjukkan adanya kedalaman probing 5 mm atau lebih, perdarahan saat probing, kemerahan atau supurasi. Pemeriksaan dilakukan pada 4 area yaitu mesial, distal, bukal/labial, lingual/palatal pada setiap gigi, kecuali gigi molar ketiga.

Area pengambilan sampel diisolasi dengan *cotton roll* steril. Plak supragingiva pada permukaan bukal gigi dihilangkan terlebih dulu dengan *cotton pellet* sebelum pengambilan sampel bakteri plak subgingiva, kemudian dikering-anginkan. Plak subgingiva dikoleksi dengan 2 *paper point* steril yang diinsersikan dalam setiap area subgingiva dan didiamkan selama 30 detik. Ujung *paper point* dipotong dengan gunting steril dan langsung dimasukkan dalam *plastic tube* yang berisi 3 ml media transport (37 g *brain heart infusion*, 0,5 ml 0,1 *resazurin solution*, 1 g agar, 0,5 g *L-cystein HCl*, 4 g Na_2CO_3 dalam 1000 ml *distilled water*) dan diberi label. Dalam 1 jam, sampel harus sudah dikultur. Sampel tidak dikumpulkan dulu untuk semua subyek, tapi langsung diproses secara individual.

Sampel dalam media transport digetarkan dengan *vortex mixer* selama 30 detik, kemudian 1 ml sampel diencerkan dengan 9 ml *dilution buffer* dan dibuat 5 kali pengenceran. Larutan sampel yang telah diencerkan sebanyak 0,5 ml ditanam dalam media *blood agar* yang terdiri dari 2 ml *brucella broth* ditambahkan 0,4 $\mu\text{l/ml}$ vitamin K_1 dan 5 $\mu\text{l/ml}$ hemin kemudian diberi 10% *sheep blood*. Penanaman dilakukan menggunakan *swab* steril dan dioleskan pada permukaan media agar. Media dan bakteri dimasukkan dalam *anaerobic jars* serta diinkubasi dalam udara yang mengandung 80% N_2 , 10% H_2 dan 10% CO_2 menggunakan *GasPack CO₂ generating sachet* dengan suhu 37°C selama 7-14 hari.

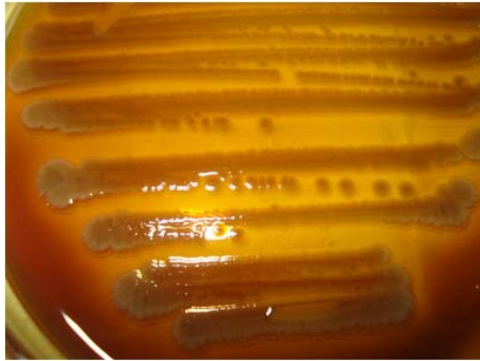
Setiap spesimen diambil 10 koloni bakteri *Black-pigmented Gram-negative Anaerobes* untuk isolasi *P. gingivalis*. Selanjutnya dilakukan subkultur sampai ditemukan koloni bakteri *Black-pigmented Gram-negative Anaerobes* murni yang berwarna hitam kehijauan atau kecoklatan. Setelah itu diidentifikasi secara biokimiawi menggunakan sistem API 20A, pengecatan Gram, morfologi koloni dan mikroskopik. Sebagai kontrol digunakan bakteri *P. gingivalis* strain ATCC 33277.

HASIL

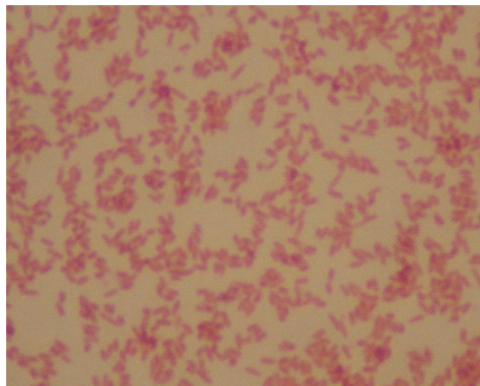
Semua sampel berjumlah 10 yang terdiri dari 1 sampel kontrol dan 10 sampel yang berasal dari poket periodontal dengan kedalaman *probing* ≥ 3 mm. Sampel kontrol adalah *P. gingivalis* ATCC 33277 yang digunakan sebagai standar identifikasi bakteri pada uji API 20A, pengecatan Gram, morfologi koloni dan mikroskopik. Semua hasil API 20A terangkum pada tabel 1, dan gambaran morfologi koloni dan mikroskopik dapat dilihat pada Gambar 1-4.



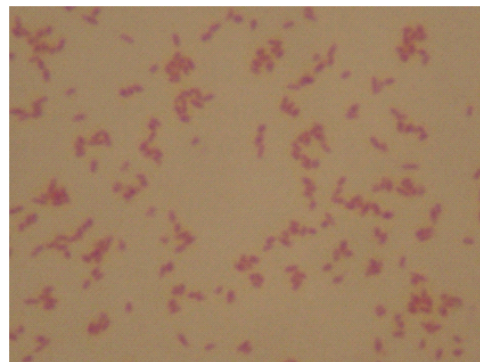
Gambar 1. Morfologi koloni *P. gingivalis* ATCC 33277.



Gambar 2. Morfologi koloni *P. gingivalis* isolat klinik.



Gambar 3. Morfologi mikroskopik *P. gingivalis* ATCC 33277.



Gambar 4. Morfologi mikroskopik *P. gingivalis* isolat klinik.

PEMBAHASAN

Sistem API 20A memungkinkan 21 uji dilakukan secara cepat dan mudah untuk identifikasi biokimiawi bakteri anaerob. Suspensi (densitas ≥ 3 McFarland) sel bakteri dimasukkan dalam media basal anaerob API 20A. Panel

diinokulasi dan diinkubasi pada 35°C dalam *anaerobe jar* selama 24 jam, selanjutnya ditambahkan reagen dan reaksinya diinterpretasi.⁶ Pada penelitian ini, strain *P. gingivalis* lebih mudah diidentifikasi setelah inkubasi 48 jam karena pertumbuhan bakteri ini lambat.

Tujuh profil dihasilkan untuk menentukan identifikasi setiap isolat. Identifikasi diklasifikasikan ke dalam salah satu dari empat kategori yaitu tepat untuk level spesies, tepat hanya untuk level genus, tidak tepat dan tidak teridentifikasi. Identifikasi tepat hanya untuk level genus jika isolat tidak teridentifikasi di seluruh level genus atau jika penentuan spesies tidak tepat pada genus yang tepat. Suatu identifikasi tidak tepat jika isolat ditentukan pada genus yang salah.⁶

API 20A terdiri panel plastik dengan 20 tabung mikro (*cupule*) mengandung berbagai substrat terdehidrasi untuk determinasi 21 reaksi biokimiawi, yaitu uji untuk *indole*, *urease*, *catalase*, *gelatin liquefaction*, *esculin hydrolysis*, dan *fermentation of glucose, mannitol, lactose, sucrose, maltose, salicin, xylose, arabinose, glycerol, cellobiose, mannose, melezitose, raffinose, sorbitol, rhamnose, dan trehalose*. Reaksi fermentasi gula, terutama *cellobiose*, sulit untuk dibaca.⁶ Namun, pada penelitian ini perbandingan reaksi gula (coklat, coklat keunguan) menjadi reaksi positif (kuning) atau negatif (ungu) pada strip yang sama secara total lebih mudah dideteksi. Sedangkan reaksi *indole* secara keseluruhan mudah diinterpretasi, ketika dibaca dalam waktu 5 menit setelah penambahan *Ehrlich's reagent* untuk menghindari reaksi positif semu.

Semua hasil reaksi dibaca menurut *Reading Table*, selanjutnya identifikasi diperoleh berdasarkan *Analytical Profile Index* atau menggunakan *identification software*. API 20A pada penelitian ini mengidentifikasi 90% tepat pada level spesies dan 10% tidak dapat diidentifikasi (Tabel 1). Sebagai standar digunakan *P. gingivalis* ATCC 33277, namun *identification software* API 20A mengidentifikasi sebagai *Porphyromonas asaccharolitica* (99,8% ID) dengan kriteria identifikasi sangat bagus. Dalam hal ini ternyata *Analytical Profile Index* dan *identification software* API 20A yang kami gunakan hanya bisa membaca hasil reaksi sebagai *P. asaccharolytica*. Berdasarkan standar tersebut maka diperoleh hasil *P. gingivalis* (*P. asaccharolytica*) isolat klinik yang tepat pada level spesies yaitu pada sampel I (97,7%), II (7,0%), III (22,1%), IV (82,2%), V (97,7%), VII (99,5%), IX (97,7%) dan X (82,2%). Pada sampel I, V dan IX diperoleh kriteria identifikasi bagus, hal ini berbeda

dengan standar karena indole menghasilkan reaksi negatif. Sedangkan pada sampel VII meskipun mempunyai nilai ID 99,5% tapi kriteria profilnya meragukan karena *esculine* menghasilkan reaksi positif.

Porphyromonas gingivalis (sebelumnya disebut *Bacteroides gingivalis*) adalah bakteri Gram-negatif anaerob yang diklasifikasikan dalam genus *Porphyromonas*, famili *Porphyromonadaceae*, order *Bacteroidales*, klas *Bacteroides*, dan phylum *Bacteroidetes*.⁷ Bakteri yang sering ditemukan dalam poket periodontal yang dalam ini *asaccharolytic* dan sangat proteolitik.⁸ Pertumbuhan *asaccharolytic* tidak dipengaruhi oleh karbohidrat tapi sangat ditingkatkan oleh protein hydrolysates, seperti *pepton* atau *yeast extract*. Produk fermentasi mayornya berupa *n-butyric* dan *acetic acid*, sedangkan produk minornya terdiri dari *propionic*, *isobutyric*, *isovaleric*, dan kadang *phenilacetic acids*.⁷

Sebelumnya, Finegold dan Barnes⁹ menunjukkan secara jelas bahwa karakteristik biokimiawi dan genetik strain *saccharolytic* dan *asaccharolytic* cukup berbeda sehingga dapat digunakan sebagai dasar untuk meningkatkan subspecies *asaccharolytic* menjadi level spesies. Selanjutnya, Shah *et al*¹⁰ dan van Steenberg *et al*¹¹ dapat memisahkan spesies *B. melaninogenicus* oral dan nonoral berdasarkan heterogenitas genetiknya. Hal ini mendorong Coykendall *et al*¹² untuk mengajukan spesies baru *B.*

gingivalis untuk strain *black-pigmented Bacteroides* yang diisolasi dari area oral. Sedangkan *B. asaccharolytica* tetap sebagai *Bacteroides* sp. nonfermentatif yang diisolasi dari area non oral. Mayrand dan Holt⁸ menyatakan bahwa ada kesamaan karakterisasi biokimiawi, yaitu formasi *indole*, *esculin hydrolysis*, *starch hydrolysis* dan produksi *catalase* antara *B. gingivalis* dan *B. asaccharolytica*.

Walaupun API 20A mudah digunakan, namun reaksi fermentasi gula sering sulit interpretasinya. Dengan pengulangan uji API 20A sampai 3 kali, maka kendala tersebut menjadi lebih mudah untuk menentukan antara reaksi positif dan negatif, selain itu inokula yang digunakan harus terjaga viabilitas dan kemurniannya. Pengecatan Gram berguna untuk identifikasi strain ini. Selain itu juga perlu didukung uji lainnya seperti morfologi koloni dan mikroskopiknya untuk memperkuat dan melengkapi identifikasinya.

Hasil uji morfologi koloni dan mikroskopik pada penelitian ini sesuai dengan pendapat Sha dan Collins⁵ yaitu bakteri ini merupakan *coco-bacilli* Gram-negatif yang sangat anaerob, berpigmen hitam kecoklatan dan tumbuh dalam media kultur membentuk koloni yang konveks, halus mengkilat, dan berdiameter 1-2 mm. Koloni berwarna hitam kecoklatan. Warna gelap yang progresif pada pusatnya ini karena produksi protoheme, suatu substansi yang bertanggungjawab terhadap tipikal warna koloni ini (Gambar 1-4).

Tabel 1. Identifikasi bakteri isolat klinik dengan uji API 20 A

R` lokd	@OH1/@																	Hcdmshejrh										
	lmc	tqd	fkt	l`m	k`b	r`b	l`k	r`k	wk	`q`	fdk	drb	fkx	bxk	lmd	lky	q`e	rnq	qg`	spj	b`s	ron	f	q	l	bnb	S`w`	SHC
Kontrol	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>P. asaccharolitica</i>	99,8
I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>P. asaccharolitica</i>	97,7
II	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>P. asaccharolitica</i>	7,0
III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>P. asaccharolitica</i>	22,1
IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>P. asaccharolitica</i>	82,2
V	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>P. asaccharolitica</i>	97,7
VI	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>P. asaccharolitica</i>	—
VII	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>P. asaccharolitica</i>	99,5
VIII	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	<i>Propionibacterium</i>	83,8
IX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>P. asaccharolitica</i>	97,7
X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	<i>P. asaccharolitica</i>	82,2

Keterangan : ind : indole ure : urease glu : glucose man : mannitol
 lac : lactose sac : saccharose mal : maltose sal : salicin
 xyl : xylose ara : arabinose gel : gelatin esc : esculin
 gly : glycerol cel : cellobiose mne : mannose mlz : melezitose
 raf : raffinose sor : sorbitol rha : rhamnose tre : trehalose
 cat : catalase spo : spores grm : gram reaction coc : morphology

Dari hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa API 20A mampu mendeteksi *P. gingivalis* (*P. asaccharolytica*) isolat klinik yang berasal dari poket periodontal dengan kedalaman *probing* antara e^3 3 mm. Namun, masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk uji aktivitas enzimatis dan karakteristik genetiknya untuk membedakan *P. gingivalis* yang diisolasi dari area oral dan *P. asaccharolytica* yang diisolasi dari area non oral.

TERIMA KASIH

Artikel ini disusun berdasarkan hasil Penelitian Hibah Bersaing yang didanai oleh DIPA Universitas Jember Nomor: 0175.0/023-042/XV/2009 Tanggal 31 Desember 2008.

DAFTAR PUSTAKA

1. Newman HN. Plaque and chronic inflammatory periodontal disease. A question of ecology. *J Clin Periodontol* 1990; 67: 533-41.
2. Moore WE, Moore LV. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontology* 2000; 1994; p. 66-77.
3. Genco RJ. Current view of risk factors for periodontal disease. *J Periodontol* 1996; 1041-49.
4. Page R. The role of inflammatory mediators in the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodent Res* 1991; 230-42.
5. Sha HN, Collins MD. Proposal for reclassification of *Bacteroides asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis* and *Bacteroides endodontalis* in new genus, *Porphyromonas*. *Int J of Systematic Bacteriology* 1988; 128-31.
6. Karachewski NO, Busch EL, Wells CL. Comparison of PRAS II, RapID ANA, and API 20A systems for identification of anaerobic bacteria. *J Clin Microbiol.* 1985; 21: 122-26.
7. Boone DR, Castenholtz RW. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd Ed. Vol 1. New York: Springer-Verlag; 2002.
8. Mayrand D, Holt SC. Biology asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbial Rev.* 1988; 52: 134-52.
9. Finegold SM, Barnes EM. Report of ICSB Taxonomic Subcommittee on Gram-Negative Anaerobic Rods. Proposal that the saccharolytic and asaccharolytic strains at present classified in the species *Bacteroides melaninogenicus* (Oliver and Wherry) be classified in two species as *Bacteroides melaninogenicus* and *Bacteroides asaccharolyticus*. *Int J Syst Bacteriol* 1977; 27: 388-91.
10. Shah HN, Williams RAD, Bowden GD, Hardie JM. Comparison of the biochemical properties of *Bacteroides melaninogenicus* from human dental plaque and other sites. *J Appl Bacteriol* 1976; 41: 473-92.
11. van Steenberg TJM, de Soet JJ, de Graaff J. DNA base composition of various strains of *Bacteroides melaninogenicus*. *FEMS Microbiol Lett* 1979; 33: 127-30.
12. Coykendall AL, Kaczmarek FS, Slot J. Genetic heterogeneity in *Bacteroides asaccharolyticus* (Holdeman and Moore 1970) Finegold and Barnes 1977 (Approved Lists. 1980) and proposal of *Bacteroides gingivalis* sp. nov. and *Bacteroides macacae* (Slot and Genco) comb. nov. *Ind J Syst Bacteriol* 1980; 30: 559-64.