

## **BAB II**

### **TINJAUAN PUSTAKA**

#### **A. Tinjauan Teori**

##### **1. Tinjauan Kerusakan Gigi**

Plak adalah lapisan tipis, transparan, dan mengandung bakteri yang melekat pada permukaan gigi. Plak dapat terbentuk kapan saja, bahkan segera setelah proses penyikatan gigi selesai. Keberadaannya berperan dalam meningkatkan risiko patogenisitas penyakit seperti karies dan periodontitis, dengan karies gigi menjadi salah satu penyakit gigi yang paling umum. Gigi sendiri merupakan jaringan tubuh paling keras, terdiri dari beberapa lapisan, yaitu enamel (lapisan terluar), dentin (lapisan tengah), dan pulpa, yang mengandung pembuluh darah serta saraf. Gigi yang sehat ditandai dengan tidak adanya rasa nyeri akibat peradangan gusi, ketiadaan karies atau lubang pada gigi, serta tidak ada rasa sakit saat mengunyah. Ciri lainnya adalah leher gigi yang tidak terlihat, gigi tidak goyang, bebas plak dan karang gigi, warna gigi putih kekuningan alami, serta mahkota gigi yang utuh (Napitupulu, 2023).

Karies gigi merupakan suatu kondisi patologis yang ditandai dengan kerusakan progresif pada jaringan keras gigi, terutama enamel, akibat aktivitas metabolisme bakteri yang menghasilkan asam dari fermentasi karbohidrat. Proses ini bermula ketika plak, lapisan lengket yang terdiri dari sisa makanan, bakteri, dan zat lain,

menempel pada permukaan gigi dan mulai berkembang, terutama di area yang sulit dijangkau oleh sikat gigi. Bakteri dalam plak, seperti *Streptococcus mutans* dan *Lactobacillus*, memanfaatkan gula dari makanan untuk menghasilkan asam yang bersifat merusak, menyebabkan demineralisasi enamel secara bertahap. Jika tidak diatasi, proses ini akan terus berlanjut hingga lapisan enamel melemah dan terbentuk lubang kecil yang berkembang menjadi lesi karies. Seiring waktu, kerusakan dapat mencapai dentin dan bahkan pulpa gigi, menyebabkan rasa nyeri dan infeksi yang lebih serius. Oleh karena itu, pencegahan karies sangat bergantung pada kebiasaan menjaga kebersihan mulut yang baik, seperti menyikat gigi dengan teknik yang benar, menggunakan pasta gigi berfluoride, serta membatasi konsumsi makanan dan minuman manis yang dapat mempercepat pembentukan plak dan produksi asam oleh bakteri (Utami, 2022).

Pengetahuan tentang kesehatan gigi dan mulut merupakan aspek fundamental dalam menjaga kesehatan secara keseluruhan, karena gigi dan mulut yang sehat tidak hanya berpengaruh pada fungsi pencernaan tetapi juga berkaitan dengan kesehatan sistemik, seperti penyakit jantung dan diabetes yang dapat dipicu oleh infeksi kronis pada rongga mulut. Pemahaman yang baik mengenai cara merawat gigi dengan benar, termasuk kebiasaan menyikat gigi secara teratur dengan teknik yang tepat, penggunaan benang gigi,

serta berkumur dengan larutan antiseptik, dapat mencegah berbagai masalah seperti karies, penyakit gusi, dan bau mulut yang tidak sedap. Selain itu, edukasi tentang pola makan yang sehat, khususnya dengan mengurangi konsumsi makanan dan minuman yang tinggi gula serta menghindari kebiasaan buruk seperti merokok dan mengunyah makanan keras, juga berperan dalam menjaga kekuatan enamel gigi dan kesehatan jaringan penyangga gigi. Pemeriksaan rutin ke dokter gigi setiap enam bulan sangat dianjurkan untuk mendeteksi dan menangani masalah sejak dini sebelum berkembang menjadi kondisi yang lebih serius. Dengan memiliki pengetahuan yang cukup tentang kesehatan gigi dan mulut, individu dapat menerapkan kebiasaan perawatan yang optimal, sehingga kesehatan gigi tetap terjaga sepanjang hidup dan terhindar dari risiko penyakit gigi yang lebih kompleks di kemudian hari (Utami, 2022).

Upaya peningkatan kesehatan gigi dan mulut mencakup empat aspek utama, yaitu upaya promotif (meningkatkan kesehatan secara menyeluruh), preventif (pencegahan penyakit), kuratif (pengobatan penyakit), dan rehabilitatif (pemulihian kesehatan pasca penyakit). Keberhasilan upaya ini memerlukan partisipasi aktif dari seluruh lapisan masyarakat. Salah satu langkah pencegahan yang paling sederhana namun efektif adalah menyikat gigi dua kali sehari dengan teknik yang tepat. Penyikatan gigi yang benar melibatkan penggunaan metode menyikat yang sesuai, frekuensi yang teratur,

serta didukung oleh pola makan yang sehat. Dengan demikian, strategi ini dapat membantu mencegah penyakit gigi dan mulut secara optimal (Arini & Ratmini, 2022).

## 2. Tinjauan Koloni Rongga Mulut

Komunitas bakteri di rongga mulut terdiri dari berbagai jenis mikroorganisme yang beragam, kompleks, dan hidup di permukaan serta bagian-bagian rongga mulut. Komunitas ini meliputi bakteri flora normal dan bakteri patogen. Bakteri flora normal merupakan bakteri yang secara alami hadir pada individu sehat dan berperan penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem rongga mulut. Salah satu fungsinya adalah mencegah pertumbuhan bakteri patogen dengan menguasai ruang dan nutrisi yang tersedia. Sebaliknya, bakteri patogen memiliki potensi untuk menyebabkan infeksi dan berbagai penyakit, terutama ketika mereka berpindah dari habitat alaminya ke lokasi yang memungkinkan terjadinya kolonisasi yang berbahaya. Mukosa mulut yang sering bersentuhan dalam waktu lama dengan permukaan bagian dalam dasar gigi tiruan merupakan tempat yang tepat bagi pembentukan plak gigi tiruan, yang menyebabkan pertumbuhan mikroba dan peradangan pada rongga mulut sehingga dapat menyebabkan peradangan gigi tiruan (Purba *et al.*, 2023).

## 1) Klasifikasi Bakteri Rongga Mulut

Lesi karies gigi merupakan ekosistem kompleks yang menjadi tempat berkembangnya berbagai jenis mikroorganisme patogen, terutama bakteri dan jamur, yang berkontribusi terhadap proses demineralisasi dan perusakan jaringan keras gigi. Mikroorganisme yang ditemukan pada lesi karies terdiri dari beberapa kelompok utama, yakni bakteri kokus Gram positif, bakteri batang Gram positif, bakteri kokus Gram negatif, bakteri batang Gram negatif, serta jamur yang memiliki peran dalam mempercepat atau memperburuk kondisi karies. Bakteri kokus Gram positif, seperti *Streptococcus mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius*, dan *S. intermedius*, dikenal sebagai bakteri utama dalam pembentukan plak dan produksi asam yang menyebabkan erosi enamel, sedangkan bakteri batang Gram positif, seperti *Lactobacillus fermentum*, *L. acidophilus*, dan *Actinomyces odontolyticus*, berkontribusi dalam memperparah demineralisasi pada tahap lanjut karies. Selain itu, keberadaan bakteri Gram negatif, baik dalam bentuk kokus seperti *Veillonella parvula* maupun batang seperti *Fusobacterium necrophorum* dan *Klebsiella pneumoniae*, sering dikaitkan dengan infeksi sekunder serta kondisi yang lebih agresif akibat produksi enzim proteolitik dan endotoksin yang merusak jaringan. Tidak hanya bakteri, jamur seperti *Candida albicans*, *C. tropicalis*, dan *C.*

*glabrata* juga ditemukan dalam lesi karies dan berkontribusi dalam proses fermentasi karbohidrat, meningkatkan produksi asam, serta memfasilitasi adhesi bakteri lain, yang semakin mempercepat kerusakan gigi. Oleh karena itu, pemahaman tentang mikroorganisme penyebab karies gigi sangat penting dalam pengembangan strategi pencegahan dan pengobatan, termasuk dalam pemilihan agen antimikroba yang efektif serta penerapan kebiasaan menjaga kebersihan mulut yang optimal (Satrio *et al.*, 2023).

*Streptococcus mutans* adalah bakteri utama yang terlibat dalam pembentukan koloni plak gigi pada tahap awal. Proses karies dimulai dengan demineralisasi pada jaringan keras gigi, yang kemudian diikuti dengan kerusakan pada komponen organik gigi. Demineralisasi ini terjadi akibat aktivitas metabolismik bakteri yang menghasilkan asam dari fermentasi karbohidrat, menyebabkan hilangnya mineral pada enamel gigi dan berlanjut dengan kerusakan lebih lanjut. *Streptococcus mutans* mengfermentasi sukrosa menjadi asam, yang menurunkan pH sekitar permukaan gigi dan mempercepat pembentukan plak. Ketika pH lingkungan gigi turun ke tingkat kritis antara 5,2 hingga 5,5, mineral dalam enamel gigi mulai larut, yang kemudian mengarah pada terjadinya karies. Proses demineralisasi ini memungkinkan bakteri menginvasi jaringan

gigi yang lebih dalam, seperti dentin, hingga mencapai jaringan pulpa. Kerusakan pada pulpa dapat menyebabkan inflamasi dan infeksi, yang kemudian menyebar ke jaringan periapikal di sekitar akar gigi, menimbulkan gejala klinis berupa rasa sakit yang tajam atau nyeri berdenyut (Hasanuddin & Salnus, 2020).

Bakteri Gram positif lain yang termasuk dalam mikrobioma normal dan paling banyak ditemukan di rongga mulut pasien pengguna gigi tiruan yaitu koloni *Staphylococcus aureus*. Jika tubuh mengalami penurunan imunitas atau terjadi ketidakseimbangan mikroorganisme akibat perubahan jumlah dan jenis flora normal di rongga mulut, maka kondisi ini dapat memicu berbagai penyakit, seperti denture stomatitis, angular stomatitis, abses, dan gingivitis. Untuk mencegah penumpukan bakteri, menjaga kebersihan gigi tiruan yang digunakan sangat penting. Secara umum, pembersihan gigi tiruan dapat dilakukan dengan dua metode, yaitu pembersihan mekanis (menyikat gigi tiruan) dan pembersihan kimiawi (merendam gigi tiruan dalam larutan pembersih yang mengandung disinfektan). Metode yang disarankan adalah melepas gigi tiruan sebelum tidur dan merendamnya dalam larutan pembersih. Langkah ini efektif untuk membersihkan area yang sulit dijangkau oleh sikat gigi, sehingga membantu mencegah timbulnya infeksi dan penyakit pada rongga mulut (Purba *et al.*, 2023). Menurut hasil penelitian

sebelumnya, pengguna gigi tiruan yang mengalami denture stomatitis pada membran mukosanya menunjukkan adanya kolonisasi mikroorganisme patogen. *Candida albicans* ditemukan pada 66,7% kasus, sedangkan *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus mutans* masing-masing terdeteksi pada 49,5% kasus. Keberadaan mikroorganisme ini berkontribusi signifikan terhadap perkembangan *denture stomatitis*, terutama melalui interaksi antara jamur dan bakteri patogen yang memicu peradangan pada membran mukosa mulut (Ayu & Pintadi, 2020).

## 2) Morfologi Bakteri Rongga Mulut

Mikrobioma oral merupakan kumpulan genom dari berbagai mikroorganisme yang hidup di rongga mulut, mencakup bakteri, jamur, virus, dan archaea yang secara bersama-sama membentuk ekosistem kompleks dan berperan penting dalam menjaga keseimbangan kesehatan mulut maupun berkontribusi terhadap perkembangan penyakit. Lingkungan oral yang unik dengan kondisi kelembapan tinggi, ketersediaan nutrisi dari sisa makanan, serta variasi tingkat oksigen menciptakan habitat ideal bagi berbagai jenis mikroorganisme, termasuk bakteri aerob yang bergantung pada oksigen dan bakteri anaerob yang dapat bertahan tanpa oksigen. Mikroorganisme ini hidup dalam komunitas yang disebut biofilm, yakni lapisan lengket yang

melekat pada permukaan gigi, gusi, dan jaringan lunak rongga mulut, yang tidak hanya melindungi bakteri dari faktor eksternal tetapi juga memungkinkan interaksi kompleks antarspesies. Salah satu karakteristik utama mikrobioma oral adalah kemampuannya untuk berkembang melalui mekanisme pembelahan biner, dengan ukuran sel bakteri yang sangat kecil dan bervariasi antara 0,2 hingga 5,0  $\mu\text{m}$ , sehingga sulit diamati tanpa bantuan mikroskop. Meskipun ukurannya lebih besar dibandingkan virus, struktur bakteri tetap membutuhkan teknik khusus untuk dianalisis secara detail, terutama dalam mengidentifikasi spesies patogenik yang dapat menyebabkan berbagai gangguan kesehatan mulut seperti karies gigi, periodontitis, dan infeksi oral lainnya. Oleh karena itu, pemahaman mendalam tentang mikrobioma oral menjadi kunci dalam upaya pencegahan, diagnosis, dan pengobatan penyakit gigi dan mulut, serta dalam mengungkap hubungan potensial antara mikroorganisme rongga mulut dengan penyakit sistemik lainnya, seperti diabetes dan penyakit kardiovaskular (Adrianto *et al.*, 2022).

a) Bentuk Morfologi Bakteri

Bakteri memiliki beragam bentuk morfologi, di antaranya bulat (kokus), batang (basil), dan spiral. Bakteri berbentuk batang atau basil (*Bacillus*) dapat dikelompokkan menjadi

beberapa jenis sel, antara lain monobasil (batang tunggal), yang terdiri dari satu sel batang tunggal; diplobasil, di mana sel-sel bakteri batang terkelompok dua-dua atau berpasangan; serta streptobasil, yang memiliki penataan sel bakteri batang membentuk rantai panjang. Keberagaman bentuk morfologi ini mempengaruhi cara bakteri beradaptasi dan berkembang dalam lingkungan tertentu (Adrianto *et al.*, 2022).

Bakteri berbentuk bulat (kokus) dikelompokkan menjadi beberapa jenis berdasarkan susunan selnya. Diantaranya, monokokus yang terdiri dari satu sel bulat tunggal, diplokokus (*diplococci*) yang terdiri dari dua sel bulat yang bergandengan, sarkina yang berbentuk bulat dan berkelompok dalam jumlah 8 sel atau lebih sehingga membentuk struktur yang mirip dengan kubus, streptokokus yang terdiri dari sel-sel bulat yang membentuk rantai panjang atau pendek, serta stafilocokus yang terdiri dari sel bulat yang berkoloni dan membentuk kelompok sel yang tidak teratur, menyerupai kumpulan buah anggur. Keberagaman susunan ini mempengaruhi pola pertumbuhan dan cara bakteri berinteraksi dalam lingkungan mereka (Adrianto *et al.*, 2022).

Bakteri bentuk spiral terdiri dari 3 jenis, diantaranya spiral yang bentuknya seperti sulur batang/spiral utuh, vibrio berbentuk spiral tak sempurna, dan spiroseta yang berbentuk sama namun bersifat lentur juga dapat memanjang dan mengkerut saat bergerak, bentuk ini memungkinkan bakteri untuk melakukan pergerakan yang lebih fleksibel, memudahkan mereka untuk berpindah melalui media atau lingkungan yang mereka huni. (Adrianto *et al.*, 2022).

b) Struktur Morfologi Bakteri

Bakteri memiliki dua jenis struktur utama, yaitu struktur dasar yang terdapat pada hampir semua bakteri, seperti dinding sel, membran plasma, sitoplasma, ribosom, dan DNA, serta struktur tambahan yang hanya dimiliki oleh beberapa jenis bakteri, seperti kapsul, flagellum, pilus, fimbria, volutin, dan endospora (Adrianto *et al.*, 2022).

3) Metode Pemeriksaan Bakteri Rongga Mulut

Pemeriksaan keberadaan bakteri dalam suatu sampel dilakukan di laboratorium dengan berbagai tujuan, salah satunya adalah untuk diagnosis penyakit. Hal ini bertujuan untuk mengidentifikasi penyakit serta mikroba penyebabnya. Untuk keperluan diagnosis, pemeriksaan mikroba dapat dilakukan menggunakan berbagai metode yang sesuai, antara lain pemeriksaan makroskopis, pemeriksaan mikroskopis, kultur

bakteri, pemeriksaan molekuler, uji biokimia, dan tes serologi (Pratiwi *et al.*, 2023).

a) Metode Pemeriksaan Makroskopis

Isolat bakteri yang diperoleh melalui proses pemurnian kemudian dikarakterisasi secara makroskopis (morfologi), yang meliputi bentuk koloni, tepian koloni, elevasi koloni, dan warna koloni. Uji makroskopis ini dapat dilakukan menggunakan kaca pembesar atau bahkan tanpa alat bantu, tergantung pada kebutuhan pengamatan (Pratiwi *et al.*, 2023).

b) Metode Pemeriksaan Mikroskopis

Karakterisasi bakteri secara mikroskopis dilakukan melalui pewarnaan gram dan pewarnaan spora. Pewarnaan gram bertujuan untuk menentukan apakah bakteri termasuk gram positif atau gram negatif serta untuk mengamati bentuk morfologi sel bakteri. Pewarnaan gram menggunakan kristal violet sebagai zat pewarna, yang akan menghasilkan warna biru pada bakteri gram positif dan ungu pada bakteri gram negatif. Sementara itu, pewarnaan spora dilakukan untuk mengetahui apakah bakteri, terutama yang berbentuk basil, memiliki spora. Pada bakteri yang memiliki spora, sel vegetatif akan berwarna merah, sedangkan spora akan

berwarna hijau. Pewarnaan spora tidak dilakukan pada bakteri berbentuk kokus (Pratiwi *et al.*, 2023).

c) Metode Kultur Bakteri

Pembibakan mikroorganisme di laboratorium memerlukan media yang mengandung zat hara sebagai sumber karbon, yang dikenal sebagai kultur bakteri. Biakan ini biasanya mengandung berbagai komponen, seperti air, sumber energi, nitrogen, sulfur, fosfat, oksigen, hidrogen, serta unsur-unsur lainnya. Selain itu, dalam bahan dasar media, dapat ditambahkan faktor pertumbuhan seperti asam amino, vitamin, atau nukleotida untuk mendukung pertumbuhan mikroorganisme. Lingkungan pertumbuhan yang sesuai juga sangat penting agar mikroorganisme dapat berkembang dengan optimal (Febyayuningrum *et al.*, 2021).

d) Metode Pemeriksaan Molekuler

Tidak adanya mikroba dalam sampel bisa diketahui menggunakan pemeriksaan molekuler. Berbeda dengan metode lainnya, metode ini menggunakan material genetik mikroba, yaitu DNA atau RNA. Prinsip kerja dari metode ini adalah perbanyakkan material genetik mikroba tersebut. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk pemeriksaan ini adalah *Polymerase Chain Reaction* (PCR), yang

memungkinkan amplifikasi DNA atau RNA untuk identifikasi lebih lanjut (Koentjoro *et al.*, 2021).

e) Metode Uji Biokimia

Uji pelengkap untuk mengidentifikasi bakteri tertentu dapat dilakukan dengan berbagai uji biokimia untuk diagnosis penyakit. Hal ini dikarenakan beberapa bakteri dapat menghasilkan enzim-enzim tertentu yang berbeda satu sama lain. Jenis uji biokimia untuk pemeriksaan mikroba di laboratorium sangat beragam dan dapat dipilih sesuai kebutuhan. Beberapa di antaranya termasuk uji katalase, uji fermentasi gula, uji koagulase, uji oksidase, dan masih banyak lagi. Uji-uji ini digunakan untuk mengidentifikasi sifat-sifat biokimia mikroba yang membantu dalam menentukan spesies atau kelompok mikroorganisme tertentu (Koentjoro *et al.*, 2021).

f) Metode Tes Serologi

Uji tes serologi digunakan untuk menilai respons imun tubuh terhadap masuknya bakteri, yang memicu produksi antibodi IgM dan IgG. Pemeriksaan serologi berfungsi untuk mendeteksi infeksi sekunder secara dini, yang memiliki prevalensi lebih tinggi dibandingkan infeksi primer. Uji serologi berbeda dengan uji konvensional karena memiliki sensitivitas yang lebih tinggi. Namun, uji serologi tidak

dapat memberikan diagnosis yang pasti, karena hasilnya bisa negatif pada fase akut, dan tubuh membutuhkan waktu lebih dari dua minggu untuk membentuk antibodi yang dapat terdeteksi melalui uji serologi (Koentjoro *et al.*, 2021).

### **3. Tinjauan Metode Pemeriksaan Molekuler**

Teknik analisis biologi molekuler merupakan alat yang sangat penting dalam memahami dogma sentral biologi. Melalui teknik ini, kita dapat memperdalam pemahaman tentang berbagai proses vital dalam biologi, seperti replikasi, transkripsi, translasi, serta mekanisme lainnya yang mendasari fungsi seluler. Dengan pendekatan ini, kita dapat mempelajari organisme hingga ke tingkat molekuler, termasuk pada level DNA, RNA, asam amino, dan protein. Pemahaman yang mendalam tentang aspek-aspek molekuler ini menjadi dasar untuk mengungkap berbagai fenomena biologis yang terjadi di dalam sel (Noer, 2021).

Gen yang mengkode rRNA digunakan secara luas dalam menentukan taksonomi bakteri, menganalisis filogeni (hubungan evolusi antar organisme), serta memperkirakan tingkat keanekaragaman dan divergensi spesies. Dengan menganalisis urutan gen rRNA, kita dapat mengidentifikasi hubungan evolusi antar spesies bakteri dan memahami bagaimana spesies tersebut berdivergensi seiring waktu. Metode ini memberikan wawasan yang lebih mendalam mengenai struktur dan evolusi mikroorganisme,

memungkinkan pengklasifikasian spesies secara lebih akurat dalam taksonomi mikrobiologi. Secara tradisional, identifikasi bakteri di laboratorium mikrobiologi klinis telah dilakukan dengan menggunakan uji fenotipik seperti uji fisiologis, Gram, dan biokimia, serta pengujian kultur dan pola pertumbuhan, namun, metode identifikasi ini memiliki banyak keterbatasan. Pertama, terkadang ditemukan organisme dengan karakteristik biokimia yang berbeda dari genera atau spesies yang sudah dikenal. Kedua, metode ini tidak dapat diterapkan pada organisme yang tidak dapat dibiakkan. Ketiga, identifikasi beberapa kelompok bakteri tertentu, seperti bakteri anaerob dan mycobacteria, memerlukan peralatan tambahan dan keahlian khusus yang tidak tersedia di laboratorium dasar pada umumnya. Namun, dengan menggunakan teknik sekuensing 16S rRNA, masalah ini dapat diatasi dengan satu teknologi yang juga memungkinkan penemuan genus dan spesies baru. Di banyak wilayah genom lainnya, analisis digunakan untuk menguji hubungan filogenetik antar bakteri. Meskipun analisis genom secara luas telah dicoba, hal ini tetap sulit dilakukan karena ukuran genom yang bervariasi dan fakta bahwa gen sering mengalami berbagai perubahan seperti duplikasi gen, transfer gen, penghapusan gen, fusi gen, dan fisiologi gen (Noer, 2021).

Perbandingan rangkaian gen 16s rRNA bakteri telah menjadi metode genetik yang lebih disukai daripada identifikasi fenotipik

bakteri berdasarkan morfologi sel, reaksi gram, morfologi koloni, uji katalase, uji sporulasi, produksi gas dari glukosa, dan lainnya. Wilayah gen 16S rRNA memiliki tingkat keragaman yang tinggi dan berbeda antara satu spesies bakteri dengan spesies bakteri lainnya. Gen 16S rRNA, sebagai alat penelitian, memainkan peran yang sangat penting dalam identifikasi spesies bakteri secara akurat. Penggunaannya dalam berbagai studi di Indonesia memberikan kontribusi yang signifikan dalam memperdalam pemahaman tentang keberagaman bakteri, serta membantu dalam pengklasifikasian dan analisis filogenetik bakteri di tingkat molekuler. Selain dapat digunakan untuk identifikasi, gen 16S rRNA juga berfungsi sebagai pedoman untuk memahami potensi bakteri tersebut, baik dalam konteks patogenisitas, kegunaan terapeutik, maupun aplikasi lainnya (Jumrah et al., 2024).

### 1) Ekstraksi DNA (*Deoxyribonucleic Acid*)

DNA, atau disebut asam deoksiribonukleat, adalah material genetik yang tersusun dari tiga komponen utama: molekul gula pentosa (deoksiribosa), gugus fosfat, maupun basa nitrogen. Pada organisme tingkat tinggi seperti manusia, hewan, dan tumbuhan, DNA dapat ditemukan di dalam inti sel (DNA inti), mitokondria (DNA mitokondria), dan kloroplas (DNA kloroplas). DNA kromosomal terdapat di dalam inti sel, sementara DNA ekstrakromosomal ditemukan di luar inti. DNA

dari berbagai sumber tersebut dapat diisolasi dan dimurnikan secara *in vitro* dengan menggunakan teknik-teknik tertentu. Proses ini merupakan tahap awal dalam berbagai teknologi analisis DNA. Pemilihan teknik yang tepat untuk mengisolasi dan memurnikan DNA sangat penting, karena hal ini akan menghasilkan DNA dalam kondisi murni, bebas dari komponen seluler lainnya seperti RNA, protein, karbohidrat, dan zat lainnya (Nur'aini *et al*, 2019).

## 2) PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik amplifikasi nukleotida melalui proses enzimatik yang dilakukan secara *in vitro*. Keberhasilan teknik ini sangat bergantung pada kemampuan untuk mengamplifikasi urutan DNA target secara spesifik, serta meminimalkan amplifikasi DNA non-target. Salah satu faktor penting dalam keberhasilan PCR adalah pemilihan suhu yang tepat pada setiap tahap prosesnya, mulai dari denaturasi, annealing, hingga ekstensi, yang memungkinkan amplifikasi DNA target secara efisien. PCR melibatkan tiga siklus suhu yang berurutan, yaitu: pertama, denaturasi template pada suhu 94–95°C, di mana heliks ganda DNA terpisah menjadi dua untai. Kedua, proses annealing (penempelan) terjadi pada suhu 50–60°C, di mana pasangan primer mengikat pada untai DNA target. Ketiga, pemanjangan atau ekstensi pada suhu 72°C,

di mana enzim DNA polimerase memperpanjang urutan DNA dengan menambahkan nukleotida sesuai dengan template. Proses ini diakhiri dengan ekstensi akhir untuk memastikan bahwa semua produk amplifikasi telah sepenuhnya dipanjangkan. Replikasi DNA terjadi pada setiap siklus/tahap replikasi, dengan tahap replikasi (siklus) dimulai dari tahap denaturasi hingga tahap pemanjangan. Reaksi PCR akan berulang mulai dari tahap denaturasi hingga tahap ekstensi, dan pengulangan ini dapat dilakukan sebanyak 40 kali (siklus) hingga menghasilkan molekul DNA untai ganda baru di akhir siklus. Hasil PCR (amplikon) dapat langsung ditransfer ke proses selanjutnya, elektroforesis, atau disimpan pada suhu 4°C hingga proses elektroforesis dapat dilakukan (Audini *et al*, 2024). Berikut merupakan tabel dari komponen utama yang digunakan dalam proses PCR.

Tabel 2. 1 Komponen PCR

Komponen PCR	Keterangan
<b>DNA Template</b>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kualitas dan kemurnian DNA harus baik.</li><li>• Kemurnian DNA yang baik ditandai dengan rasio A260/A280 antara 1,7–2,0.</li><li>• DNA yang digunakan dalam amplifikasi PCR sebaiknya berkisar antara 1 ng hingga 1 µg per 50 µl reaksi.</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adanya kontaminasi dalam DNA dapat mengurangi efisiensi amplifikasi PCR.</li> </ul>
<b>DNA Polimerase</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enzim yang sering digunakan dalam proses PCR adalah Taq DNA Polimerase.</li> <li>• Taq DNA Polimerase digunakan dengan jumlah 0,5–2 U per 50 µL reaksi.</li> <li>• Suhu optimal untuk aktivitas Taq DNA Polimerase adalah 75°C.</li> <li>• Penambahan magnesium diperlukan sebagai ko-faktor untuk mendukung aktivitas Taq DNA Polimerase.</li> </ul>
<b>Primer DNA</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Panjang primer berkisar antara 20–30 nukleotida.</li> <li>• Konten GC pada primer harus berada dalam kisaran 40–60%.</li> <li>• Suhu pencairan (Tm) primer sebaiknya antara 42–65°C, dan perbedaan Tm antara primer tidak boleh lebih dari 5°C.</li> </ul>
<b>dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTT)</b>	Konsentrasi setiap dNTP (deoksiribonukleotida triphosphate) dalam campuran reaksi PCR harus setara, yaitu dalam jumlah yang seimbang untuk memastikan amplifikasi yang efisien dan akurat dari segmen DNA target.

PCR (*Polymerase Chain Reaction*) terdiri dari empat bagian utama, yaitu DNA cetakan (*template DNA*), oligonukleotida primer, deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP), dan DNA polimerase. Proses PCR dimulai dengan penggunaan template DNA, yang berfungsi sebagai cetakan untuk membentuk salinan molekul DNA yang identik. Selanjutnya, digunakan oligonukleotida primer yang terdiri dari urutan pendek (sekitar 15 hingga 25 basa nukleotida) yang

bertindak sebagai titik awal untuk sintesis rantai DNA. Deoksiribonukleotida trifosfat (dNTP) yang terdiri dari dATP, dCTP, dGTP, dan dTTP, menyediakan bahan dasar untuk membentuk molekul nukleotida yang akan menyusun rantai DNA. Terakhir, DNA polimerase, yaitu enzim yang mengkatalisis reaksi sintesis rantai DNA, berperan penting dalam membangun rantai baru berdasarkan template yang ada.

Proses PCR terdiri dari tiga tahap utama, yaitu denaturasi, *annealing* (penempelan primer), dan ekstensi (pemanjangan primer). Tahap pertama, denaturasi, adalah proses pemisahan rantai ganda DNA menjadi dua rantai tunggal, yang memungkinkan enzim polimerase untuk mengakses dan memulai sintesis. Pada tahap annealing, primer akan menempel pada rantai tunggal DNA yang terpisah, biasanya berlangsung selama 30 hingga 45 detik. Tahap ekstensi terjadi ketika enzim polimerase memperpanjang rantai DNA baru mulai dari ujung 3' primer, dengan suhu yang digunakan pada tahap ini biasanya sekitar 72°C (Khairunnisa & Lestari, 2024).

Pengurangan reagen dalam reaksi PCR terjadi dengan kecepatan yang bervariasi karena laju reaksi dipengaruhi oleh berbagai faktor kinetika yang berbeda di setiap tabung PCR, termasuk efisiensi enzim DNA polimerase, konsentrasi primer, jumlah DNA template, serta suhu dan kondisi termal yang diterapkan selama siklus reaksi. Tingkat pengurangan reagen ini

tidak berlangsung secara seragam, sehingga setiap sampel dapat mengalami titik penghentian reaksi pada waktu yang berbeda-beda tergantung pada ketersediaan komponen reaksi dan efisiensi amplifikasi yang terjadi. Sebagai contoh, DNA template dalam setiap tabung akan mengalami deplesi pada fase plateau dengan jumlah salinan yang berbeda, meskipun awalnya dimulai dengan jumlah yang sama, karena faktor seperti efisiensi polimerase dan kemungkinan degradasi selama siklus berlangsung. Dalam analisis data PCR, fase eksponensial menjadi tahap yang paling penting karena pada fase ini amplifikasi DNA berlangsung secara optimal, menghasilkan data yang lebih akurat dan berkualitas tinggi untuk analisis kuantitatif. Sebaliknya, metode PCR konvensional umumnya mengukur hasil amplifikasi dari fase linier dan fase plateau, yang cenderung menghasilkan data semi-kuantitatif karena tingkat amplifikasi sudah mulai melambat atau bahkan berhenti akibat keterbatasan reagen dan aktivitas enzim. Oleh karena itu, PCR kuantitatif lebih disukai dalam studi yang memerlukan perhitungan presisi terhadap jumlah salinan DNA target pada setiap siklus reaksi, dibandingkan dengan PCR konvensional yang lebih terbatas dalam memberikan informasi kuantitatif yang akurat (Hidayat, 2020).

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) adalah teknik untuk memperbanyak DNA secara spesifik dan cepat. Keberhasilannya

dipengaruhi oleh beberapa faktor penting, seperti kualitas dan konsentrasi DNA template, pemilihan primer yang tepat, konsentrasi MgCl<sub>2</sub>, enzim polimerase yang digunakan, serta jumlah siklus PCR yang sesuai. Selain itu, komposisi buffer dan konsentrasi dNTP juga berperan dalam efisiensi amplifikasi. Untuk hasil optimal, parameter PCR perlu dioptimalkan, seperti suhu dan waktu siklus. Setelah amplifikasi, produk PCR dianalisis dengan elektroforesis gel agarosa, dan band yang tebal serta sesuai ukuran target menunjukkan keberhasilan PCR (Setyawati & Zubaidah, 2021).

### 3) Elektroferesis

Elektroforesis adalah proses pergerakan molekul bermuatan dalam medan listrik, di mana molekul tersebut bergerak dari kutub negatif menuju kutub positif saat ditempatkan dalam gel yang direndam dalam larutan penyangga. Teknik elektroforesis dapat menggunakan berbagai jenis gel, di antaranya *Agarose Gel Electrophoresis* (AGE) yang sering digunakan dengan visualisasi menggunakan ethidium bromide, serta *Polyacrylamide Gel Electrophoresis* (PAGE) yang memanfaatkan silver staining untuk visualisasi. Kedua teknik ini sering digunakan untuk analisis molekuler seperti pemisahan DNA, RNA, dan protein. Prinsip dasar dari elektroforesis terbagi menjadi dua jenis alat, yaitu horizontal dan vertikal. Pada

elektroforesis horizontal, gel ditempatkan secara horizontal dan molekul-molekul akan bergerak melalui gel menuju kutub positif saat dikenai arus listrik. Sementara itu, pada elektroforesis vertikal, gel diposisikan secara vertikal dan sering digunakan untuk analisis protein dan asam nukleat dengan tingkat resolusi yang lebih tinggi. Kedua jenis alat ini digunakan untuk memisahkan molekul berdasarkan ukuran dan muatannya, dengan memanfaatkan perbedaan laju pergerakan molekul dalam medan listrik (Santoso *et al.*, 2021).

Suatu teknik eksperimental yang digunakan untuk mengkarakterisasi nanopartikel, khususnya nanopartikel silika biasa merupakan fungsi lain dari elektroforesis. Banyak penelitian sebelumnya yang menggunakan teknik elektroforesis ini untuk mengkarakterisasi ukuran nanopartikel seperti titik kuantum, nanopartikel emas, dan nanopartikel logam tertentu seperti hematit dan silika. Namun, elektroforesis memiliki keterbatasan seperti waktu yang dibutuhkan untuk menyiapkan peralatan dan biaya yang relatif mahal (Santoso *et al.*, 2021).

Elektroforesis adalah teknik pemisahan partikel/ion atau partikel koloid berdasarkan kemampuan partikel ionik untuk bergerak melalui media konduktif, biasanya larutan buffer, sebagai respons terhadap medan listrik. Secara teknis, elektroforesis adalah istilah yang digunakan untuk mengamati

pergerakan partikel bermuatan akibat arus searah atau DC (*direct current*). Metode elektroforesis umumnya digunakan untuk menentukan muatan partikel, khususnya pada koloid. Ketika partikel-partikel tersebut dilarutkan dalam pelarut, mereka menjadi ion yang bermuatan, baik ion polar maupun kovalen. Dalam medan listrik, partikel-partikel ini akan bergerak menuju kutub dengan muatan berlawanan. Elektroforesis memungkinkan analisis pergerakan partikel berdasarkan muatannya, yang dapat digunakan untuk berbagai aplikasi, seperti analisis protein, DNA, atau koloid dalam penelitian ilmiah. Jika dalam koloid, arus kontinu dimasukkan oleh elektroda, partikel-partikel dimuat secara positif akan masuk ke elektroda negatif dan / atau sebaliknya. Selama percobaan, metode elektroforesis akan mengukur perubahan dalam posisi nanopartikel yang melakukan elektroforesis dalam interval waktu tertentu, sehingga data ini dapat menentukan kecepatan pergerakan partikel dalam larutan (Santoso *et al.*, 2021).

Elektroforesis merupakan teknik pemisahan dan pemurnian molekul yang memanfaatkan perbedaan laju migrasi molekul dalam medan listrik berdasarkan ukuran, muatan, dan sifat fisiknya. Tujuan utama dari teknik ini adalah untuk mengevaluasi kualitas DNA hasil PCR. Proses elektroforesis dilakukan dengan menggunakan gel agarosa berkonsentrasi 1%

yang dilarutkan dalam larutan penyanga *Tris Acetate EDTA* (TAE) serta ditambahkan pewarna DNA *Gel Red* sebanyak 2  $\mu$ L. Elektroforesis dijalankan pada tegangan 100 V dan arus listrik sebesar 400 mA selama 25 menit. Hasil elektroforesis kemudian divisualisasikan menggunakan perangkat *Gel Doc*. Produk PCR yang optimal ditandai dengan munculnya pita DNA yang jelas, dengan ukuran produk berkisar antara 500 hingga 700 pasangan basa (base pairs) (Triandiza *et al.*, 2024).

#### **4. Tinjauan Pemeriksaan Sekuens DNA (Deoxyribonucleic Acid)**

Saat ini, berbagai pendekatan biologi molekuler telah berkembang dan diterapkan untuk mengidentifikasi bakteri, salah satunya adalah melalui sekuensing gen DNA. Dalam bidang kedokteran, sekuens DNA berfungsi untuk mengidentifikasi, mendiagnosis, serta mengembangkan pengobatan untuk penyakit genetik. Dalam proses sekuensing genom, molekul DNA harus dipotong menjadi fragmen-fragmen kecil agar dapat dianalisis oleh alat tersebut. Setelah data urutan DNA diperoleh, penyusunan kembali dilakukan dengan bantuan perangkat lunak komputer untuk merekonstruksi urutan lengkap DNA dalam inti sel.

Untuk mendapatkan sekuens DNA yang akurat, dilakukan proses perakitan (*assembly*) dengan tahapan pemilihan, pengurutan, dan penggabungan fragmen DNA yang saling tumpang tindih sesuai urutan yang benar. Proses ini bertujuan untuk memastikan

rekonstruksi urutan genom secara tepat dan menyeluruh, sehingga memungkinkan analisis mendalam terhadap struktur dan organisasi genom. Data sekuensi yang dihasilkan berupa urutan basa nitrogen heterosiklik yang membentuk untaian nukleotida penyusun DNA. Basa nitrogen tersebut terdiri atas adenin (A), guanin (G), sitosin (C), dan timin (T). Adenin dan guanin merupakan basa purin dengan struktur cincin ganda, sedangkan sitosin dan timin termasuk golongan pirimidin dengan struktur cincin tunggal.

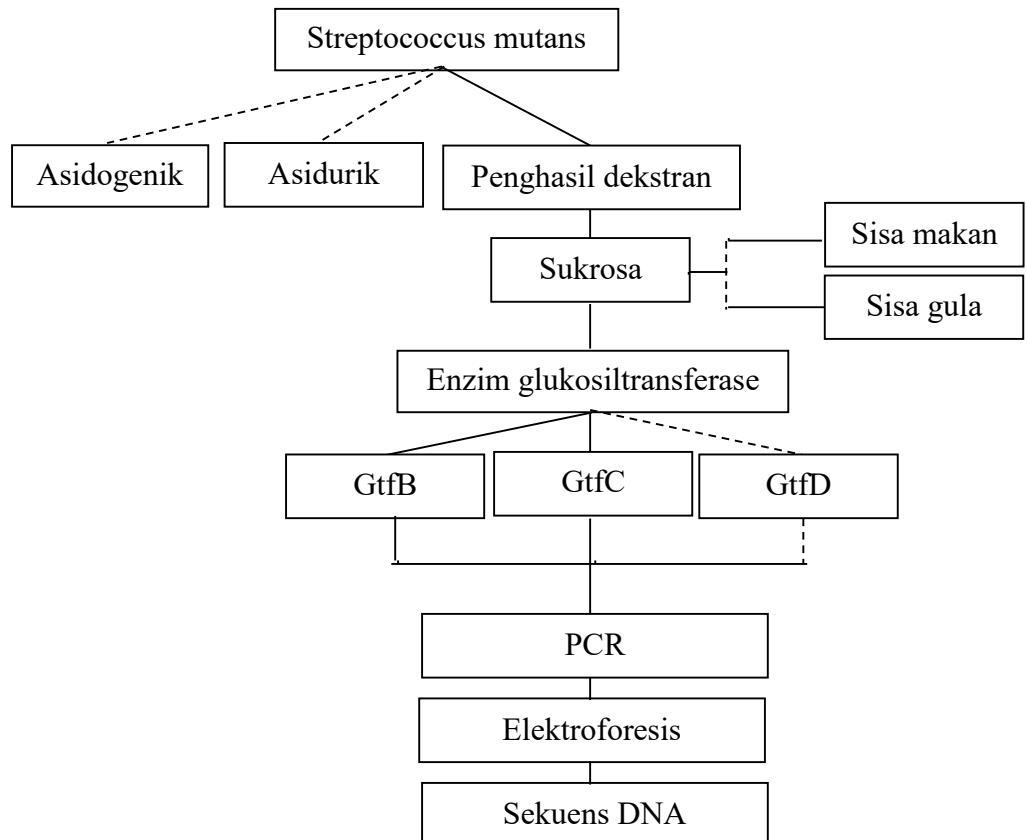
Analisis sekuensi DNA menggunakan BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) merupakan metode penting untuk membandingkan urutan DNA yang diperoleh, seperti dari isolat fungi endofit, dengan urutan yang telah tercatat dalam database NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Proses ini memungkinkan identifikasi kesamaan urutan dan menentukan kekerabatan filogenetik antara sekuensi yang dianalisis dengan sekuensi-sekuensi yang sudah ada, sehingga dapat membantu dalam penentuan spesies atau kelompok taksonomi tertentu.

BLAST menawarkan beberapa jenis pencarian yang disesuaikan dengan tujuan analisis, di antaranya adalah BLASTn, yang digunakan untuk membandingkan urutan nukleotida dengan database nukleotida, serta BLASTp, yang membandingkan urutan protein dengan database urutan protein. Untuk kasus di mana urutan nukleotida perlu diterjemahkan ke dalam bentuk protein, digunakan

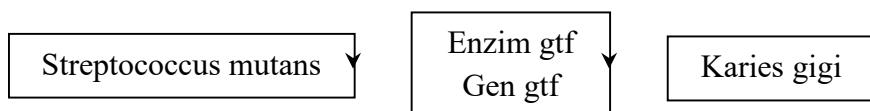
BLASTx, yang menganalisis urutan nukleotida yang diterjemahkan menjadi protein dan membandingkannya dengan database protein. Selain itu, ada juga tBLASTn, yang digunakan untuk membandingkan urutan protein dengan database nukleotida yang diterjemahkan menjadi urutan protein, serta tBLASTx, yang membandingkan urutan nukleotida yang telah diterjemahkan menjadi urutan protein dengan database nukleotida terjemahan lainnya.

Setelah sekuens genomik diperoleh, langkah selanjutnya adalah melakukan anotasi genom untuk mengidentifikasi dan menentukan fungsi dari gen-gen yang terkandung dalam genom tersebut. Proses ini melibatkan perbandingan dengan database referensi yang ada serta penerapan alat-alat bioinformatika untuk mengidentifikasi gen-gen yang ada. Setelah perakitan dan anotasi genom selesai, data sekuens yang diperoleh dapat digunakan untuk analisis filogenetik, yang bertujuan untuk mempelajari hubungan evolusi atau kekerabatan antar organisme berdasarkan urutan genetik mereka (Jamaluddin *et al.*, 2024).

## B. Kerangka Teori



## C. Kerangka Konsep



## D. Hipotesis

Hipotesis yang diharapkan terdapat variasi tipe gen glukosiltransferase pada fragmen DNA yang diperoleh dari sampel karies gigi pasien di RSGM Universitas Muhammadiyah Semarang.