

Studi Awal: Identifikasi Keragaman Bakteri Saliva Wanita Usia Lanjut Menggunakan Teknologi 16S rRNA *Sequencing Oxford Nanopore*

Chris Adhiyanto^{1,2*}, Laifa A. Hendarmin^{1,3}, Zeti Harriyati^{1,3}, Erike A. Suwarsono^{1,4}, Auliyani Andam Suri^{1,5}, Yudhi Nugraha⁶, Dwirini Retno Gunarti⁷

¹ Molecular Diagnostics and Research Center (MDRC) – Fakultas Kedokteran UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

² Departemen Biokimia Molekuler, Fakultas Kedokteran UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

³ Departemen Biologi Kedokteran, Fakultas Kedokteran UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

⁴ Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

⁵ Departemen Fisiologi, Fakultas Kedokteran UIN Syarif Hidayatullah Jakarta

⁶ Eijkman Research Center for Molecular Biology, Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN)

⁷ Departemen Biokimia, Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia

*Corresponding author: chrisbiomed@uinjkt.ac.id

Received: 25 May 2025; Accepted: 28 June 2025

Abstract: The elderly are a population particularly susceptible to diseases resulting from the decline in immune system function. The mouth is one of the areas of the body that is the entry point for microorganisms into the body. It is known that the oral microbiome greatly affects oral and systemic health. The oral bacterial profile is important to understand its role in maintaining health and causing disease. Therefore, maintaining oral health is very important, especially in our study of the elderly. Utilizing advanced sequencing techniques such as Oxford Nanopore Technology (ONT) offers the opportunity to reveal bacterial diversity comprehensively. This study aims to identify the oral microbiome in a group of elderly women. Knowledge of the oral microbiota profile could help spread awareness of the benefits of maintaining good dental hygiene, especially in older adults. Methods: Seven elderly housewives had their unstimulated saliva samples taken in the morning and kept at -80°C. The phenol-chloroform technique was used to isolate the DNA, and a Qubit Fluorometer was used to measure purity and concentration. By employing ONT for 16S rRNA sequencing and Epi2Me software for analysis, taxonomic mapping of the bacterial diversity was accomplished. Results: According to the taxonomic analysis, *Streptococcus* and *Veillonella* were the most common genera in the samples. It was common to find species like *Veillonella parvula*, *Veillonella atypica*, *Streptococcus mitis*, and *Streptococcus rubneri*. These genera contributed to the dynamics of oral biofilms by exhibiting complex ecological interactions. With advanced sequencing technologies, this work highlights the diversity of oral bacteria in elderly women in Indonesia while providing a new perspective. Notwithstanding a few limitations, these findings provide insight into the ecological dynamics of the oral microbiota, potentially leading to clinical applications in the treatment and prevention of disease.

Keywords: 16S rRNA, Epi2Me, ONT, oral bacteria, elderly woman, human saliva

Abstrak: Lansia merupakan kelompok yang rentan terhadap penyakit akibat penurunan fungsi sistem imun. Rongga mulut sebagai pintu masuk utama mikroorganisme memainkan peranan penting dalam kesehatan oral dan sistemik. Profil bakteri oral penting untuk memahami peranannya dalam menjaga kesehatan dan mencegah penyakit. Teknologi sekuensing canggih seperti *Oxford Nanopore Technology* (ONT) memungkinkan pemetaan keragaman bakteri secara komprehensif. Studi awal ini bertujuan mengidentifikasi komposisi mikrobiota oral pada wanita lansia. Pemahaman mikrobiota oral dapat mendukung strategi pencegahan penyakit sistemik pada populasi lansia. Sampel saliva tanpa stimulasi (10 mL) dikumpulkan pada pagi hari dari tujuh ibu rumah tangga lansia (>60 tahun) dan disimpan pada -80°C. DNA genomik diekstraksi menggunakan metode fenol-kloroform dan diukur konsentrasinya dengan Qubit Fluorometer. Sekuensing gen 16S rRNA dilakukan menggunakan *Rapid Amplicon 16S Barcoding Kit* (SQK-16S024, Oxford Nanopore Technologies) dan dianalisis dengan perangkat lunak Epi2Me. Profil taksonomi menunjukkan *Streptococcus* dan *Veillonella* sebagai genus dominan. Spesies yang banyak terdeteksi meliputi *Veillonella parvula*, *Veillonella atypica*, *Streptococcus mitis*, dan *Streptococcus rubneri*. Interaksi mutualistik antara bakteri ini berperan penting dalam homeostasis biofilm oral, di mana *Streptococcus* memproduksi asam laktat dari metabolisme karbohidrat yang kemudian dimanfaatkan *Veillonella* sebagai sumber energi. Studi ini menunjukkan potensi teknologi ONT dalam pemetaan mikrobiota oral melalui sekuensing 16S rRNA, dengan penekanan pada peran ekologis *Streptococcus* dan *Veillonella*. Berfokus pada wanita lanjut usia di Indonesia, penelitian ini memberikan wawasan baru terkait dinamika mikrobioma oral dan

implikasinya terhadap inflamasi sistemik yang berkaitan dengan penyakit kardiovaskular, diabetes, serta gangguan pernapasan.

Kata kunci: 16S rRNA, Epi2Me, ONT, bakteri oral, wanita lansia, saliva manusia

DOI: 10.15408/pbsj.v7i1.49111

1. PENDAHULUAN

Rongga mulut manusia dihuni oleh beragam mikroorganisme seperti bakteri, jamur, virus, dan protozoa yang membentuk ekosistem dinamis dan kompleks (Deo & Deshmukh, 2019; Sedghi et al., 2021). Keberadaan bakteri sangat berperan dalam pembentukan biofilm serta proses metabolisme yang penting untuk kesehatan oral.

Perubahan komposisi mikrobiota oral berkaitan dengan timbulnya penyakit gigi serta gangguan sistemik seperti penyakit kardiovaskular, diabetes melitus, dan infeksi saluran pernapasan, yang sebagian besar dimediasi oleh inflamasi sistemik kronis dan disfungsi endotel akibat translokasi bakteri oral ke sirkulasi darah (Lu et al., 2019; Wang et al., 2022; Schwarz et al., 2023; Pisano et al., 2023). Mikrobiota oral berperan penting dalam menjaga keseimbangan ekosistem mikroba sistemik, termasuk paru dan usus sehingga pemahaman mengenai dinamika mikrobiota ini berpotensi mendukung strategi pencegahan penyakit melalui intervensi komprehensif seperti berbasis diet dan probiotik. (Santacrose et al., 2023; Benn et al., 2018).

Berbagai metode identifikasi bakteri telah dikembangkan, mulai dari kultur konvensional hingga deteksi berbasis asam nukleat seperti PCR dan mikroarray. Kedua metode ini menawarkan kecepatan dan efisiensi dalam mendeteksi target genetik yang telah diketahui, namun tetap memiliki keterbatasan dalam sensitivitas, cakupan, serta kemampuan mendeteksi mikroorganisme yang tidak terkarakterisasi sebelumnya (Miller & Tang, 2009; Goodwin et al., 2016). Teknologi sekuensing DNA, khususnya gen 16S rRNA, memungkinkan karakterisasi komunitas bakteri secara menyeluruh (Pathak et al., 2021; Rajasekaran et al., 2024; Willis & Gabaldon, 2020; Morrison et al., 2023). *Oxford Nanopore Technology* sebagai platform generasi ketiga dan keempat, menawarkan keunggulan pembacaan real-time serta long-read yang memungkinkan identifikasi penuh gen 16S rRNA (Oxford Nanopore Technologies, 2023; Heng & Staton, 2019).

Penelitian mikrobioma oral pada populasi Indonesia, khususnya wanita lanjut usia (lansia), masih terbatas. Pemilihan sampel wanita tidak pada pria dengan alasan kebiasaan merokok pada pria yang mungkin dilakukan sejak remaja akan mempengaruhi kondisi mikrobioma mulut pada sampel (Hendrawan, 2024; N/A, 2025). Populasi lansia termasuk kelompok yang rentan namun jarang diteliti (Widyarman, 2021). Penelitian ini bertujuan mengeksplorasi keragaman bakteri saliva pada wanita lansia Indonesia menggunakan ONT berbasis 16S rRNA, dengan meninjau relevansi klinisnya terkait pembentukan biofilm dan potensi implikasi sistemik.

2. METODE

2.1 Pengumpulan Sampel dan Etika

Penelitian ini merupakan studi eksploratori awal yang bertujuan mengevaluasi kelayakan metodologi WGS menggunakan platform ONT berbasis analisis 16S rRNA untuk mengidentifikasi keragaman bakteri. Sampel yang digunakan adalah saliva tanpa stimulasi sebanyak 10 mL, diambil pada pagi hari dari tujuh ibu rumah tangga lansia (>60 tahun) sebelum melakukan aktivitas kebersihan mulut, dengan tujuan meminimalkan pengaruh faktor eksternal terhadap ekosistem mikrobiota oral (Lu, 2022). Peserta dipilih berdasarkan kebiasaan gaya hidup sehat (tidak merokok, tidak mengunyah sirih atau siwak, menyikat gigi minimal 2x sehari, serta tidak mengonsumsi antibiotik dalam waktu dekat). Sampel disimpan pada suhu -80°C. Penelitian ini mendapat persetujuan etik dari Komite Etik Fakultas

Kedokteran UIN Syarif Hidayatullah Jakarta (B-077/F12/KEPK/TL.00/11/2022).

2.2 Ekstraksi DNA dan Sekuensing

DNA diekstraksi dengan metode fenol-kloroform (Adhiyanto et al., 2020), 300 mL sampel disentrifuse dan dibuang supernatnya. Endapan dibilas dengan buffer fosfat saline (PBS), dilakukan sentrifuse kembali. Sel dilisis dengan buffer lisis dan proteinase K (PK). Pemberian fenol-kloroform akan memisahkan fase DNA, protein dan senyawa organik lainnya. DNA diendapkan dari fase DNA/genom dalam larutan etanol pekat kondisi dingin. Endapan genom dilarutkan dalam pelarut genom (bufer TE) kemudian diukur konsentrasinya menggunakan Qubit Fluorometer. Sampel hasil isolasi kemudian dilanjutkan diproses dengan *Rapid Amplicon 16S Barcoding Kit* (SQK-16S024, Oxford Nanopore Technologies). Data sekuensing dianalisis menggunakan perangkat lunak *Epi2Me*.

3. HASIL DAN DISKUSI

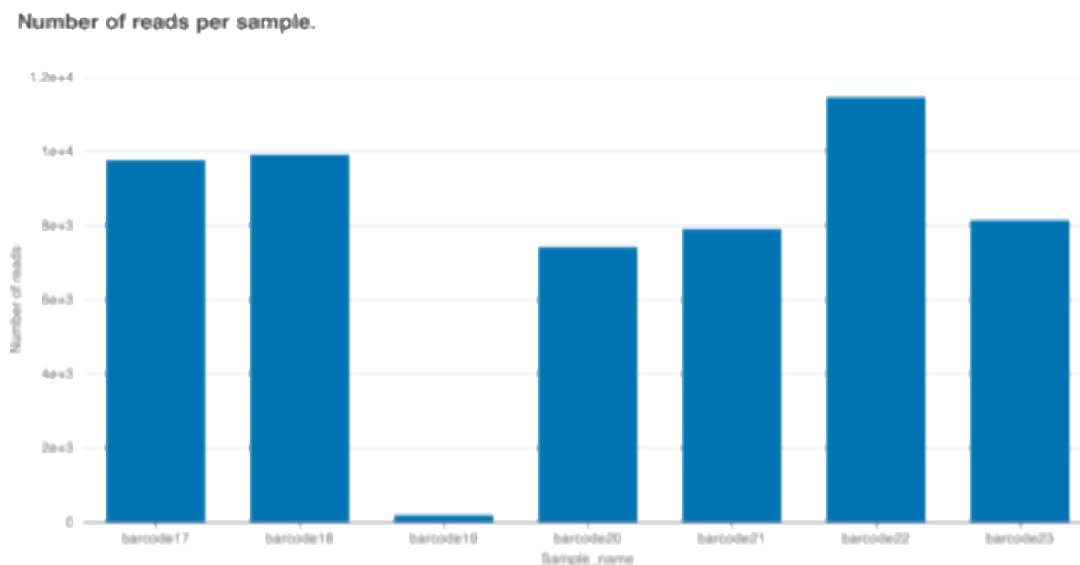
Mikrobiota oral merupakan ekosistem mikroba paling kompleks kedua setelah usus (Deo & Deshmukh, 2019), dengan relung seperti mukosa, gigi, lidah, dan saliva yang memungkinkan kolonisasi mikroba beragam (Santacroce et al., 2023; Willis & Gabaldon, 2020; Morrison et al., 2023).

Translokasi bakteri oral atau produk metabolitnya ke sirkulasi sistemik dapat memicu inflamasi kronis, disfungsi endotel, dan peningkatan risiko penyakit kardiovaskular maupun metabolik (Rajasekaran et al., 2024; Kilian et al., 2016; Schwarz et al., 2023). Oleh karena itu, profil mikrobiota oral pada lansia dapat memberikan indikator risiko kesehatan sistemik di usia lanjut. Studi ini meletakkan dasar untuk mengintegrasikan penelitian mikrobioma ke dalam praktik klinis dan menyoroti perlunya eksplorasi lebih lanjut pada populasi yang beragam.

Meskipun beberapa penelitian telah meneliti mikrobiota oral secara global, hanya sedikit yang berfokus pada populasi Indonesia. Penelitian yang ada hanya melaporkan sampel dari populasi Eropa, di mana faktor makanan dan lingkungan berbeda (Widyarman et al., 2021). Meskipun beberapa investigasi telah mengeksplorasi profil mikroba pada anak-anak Indonesia, penelitian ini adalah salah satu yang pertama berfokus pada wanita lanjut usia, memberikan perspektif unik tentang keragaman mikrobioma dalam demografi ini.

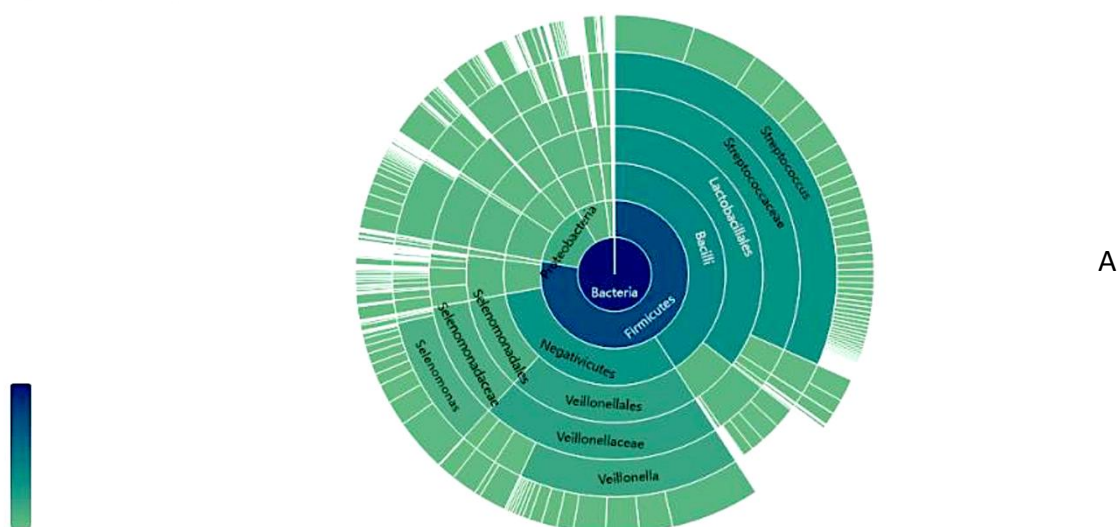
Sejak tahun 2014 hingga 2019, pemanfaatan *whole genome sequencing* (WGS) *Oxford Nanopore Technology* (ONT) semakin populer. Penggunaan ONT di Indonesia diawali dengan merebaknya *COVID-19* yang disebabkan oleh virus *SARS-CoV-2*. Penurunan kasus *COVID-19* di seluruh dunia, termasuk di Indonesia, telah mengubah penggunaan ONT untuk mengidentifikasi WGS spesies lain (Adhiyanto et al., 2021; Adhiyanto et al., 2022). Penggunaan *Oxford Nanopore Technology* (ONT) memberikan keuntungan metodologis WGS dengan memungkinkan pembacaan fragmen DNA yang lebih panjang, yang kurang umum dalam platform lain (Oxford Nanopore, 2023; Kilian et al., 2016; Heng & Staton, 2019; Buetas et al., 2024; Maheshwari et al., 2024; Satam et al., 2023).

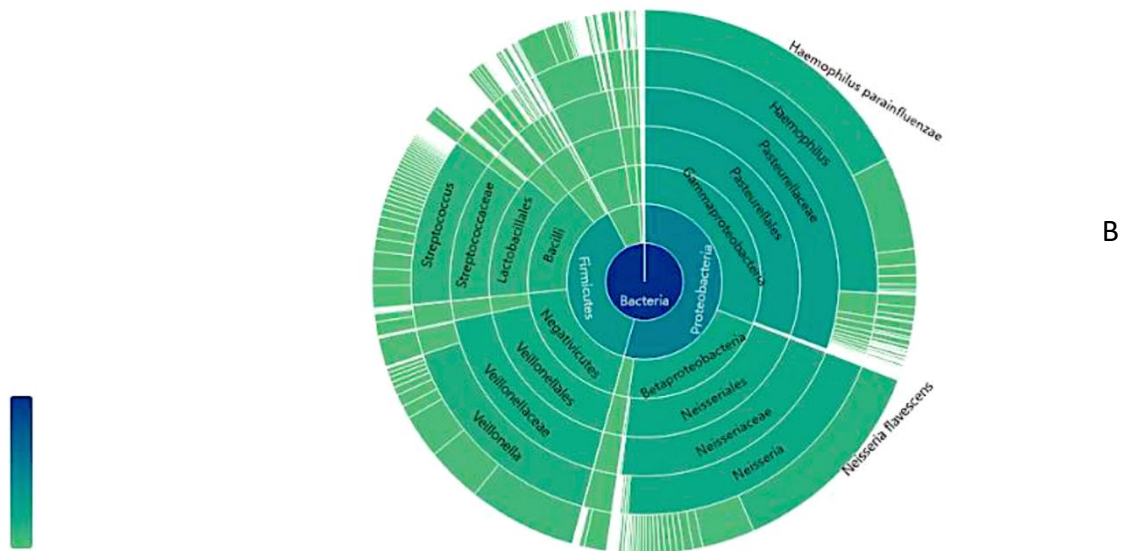
Hasil analisis menunjukkan dominasi genus *Streptococcus* dan *Veillonella* dengan spesies dominan meliputi *Streptococcus mitis*, *Streptococcus rubneri*, *Veillonella parvula*, dan *Veillonella atypica*. Interaksi mutualistik keduanya terbentuk melalui produksi asam laktat dari fermentasi karbohidrat oleh *Streptococcus*, yang selanjutnya dimanfaatkan *Veillonella* sebagai sumber energi (Abranches et al., 2018; Giacomini et al., 2023; Willenborg, 2016). Interaksi ini menjaga keseimbangan biofilm oral, namun perubahan komposisi dapat menyebabkan disbiosis yang berdampak sistemik.



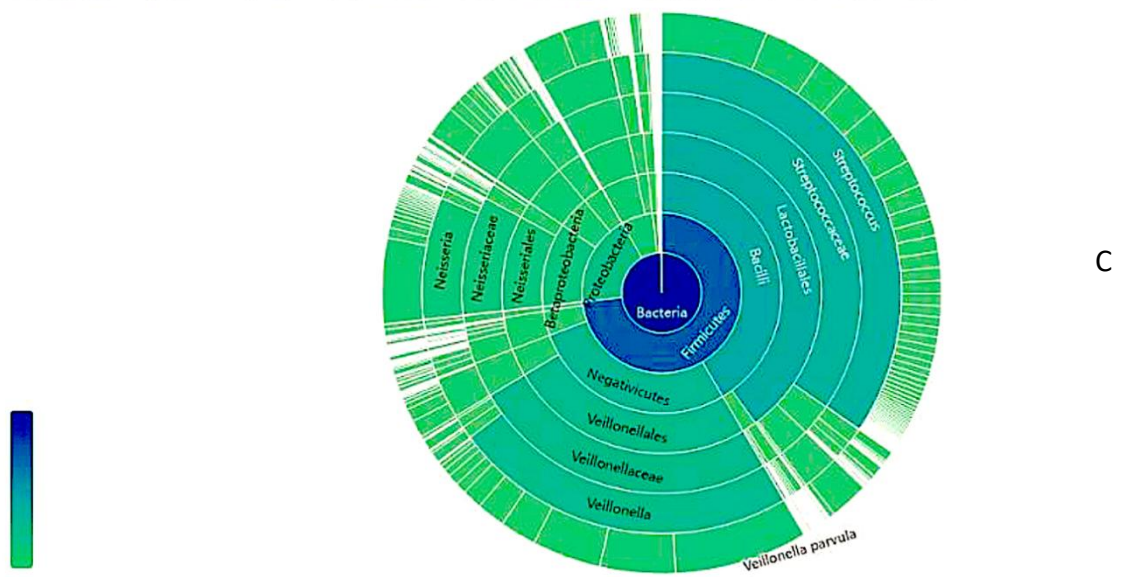
Gambar 1. Grafik sampel angka yang dibaca menggunakan Analisis Perangkat Lunak Epi2Me. Barcode 17 dan 18 adalah sampel A dan B; barcode 20 dan 22 adalah C dan D untuk angka representatif.

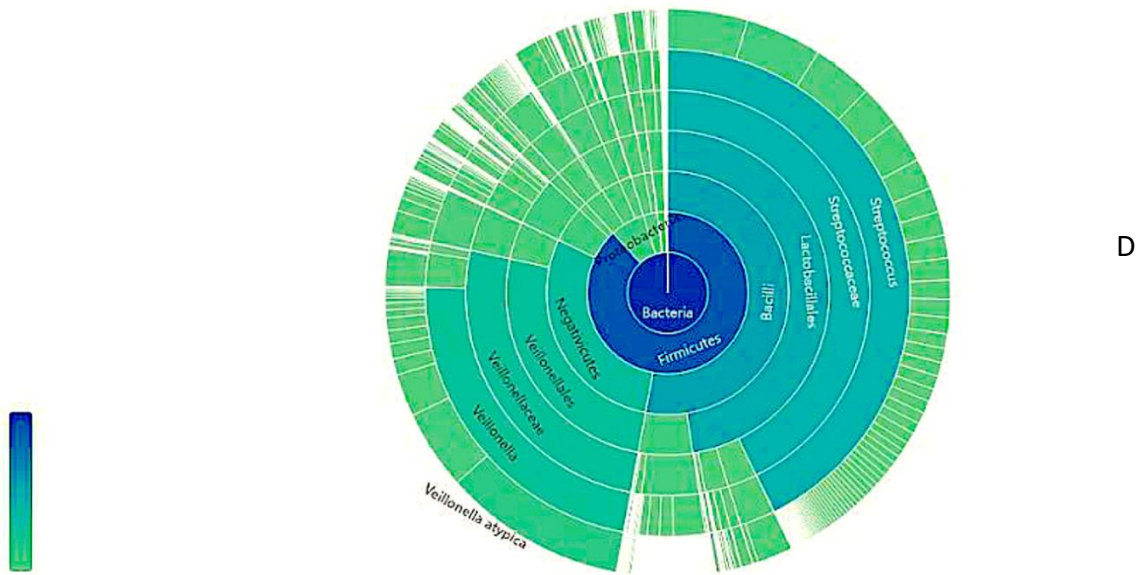
Gambar 1 mengilustrasikan hasil pengurutan untuk setiap kode batang setelah analisis bioinformatika oleh Epi2Me. Jumlah pembacaan mencerminkan total pembacaan genom bakteri saat melintasi pori biologis sel aliran ONT. Barcode 19 menunjukkan bahwa hasil pembacaan sampel tidak baik, hal ini ada kemungkinan kegagalan di langkah pre-sekuensing yang meliputi ekstraksi DNA/RNA sampel; saat PCR ataupun saat melakukan tahapan kepustakaan sekuensing. Oleh karena itu barcode 19 dianulir.





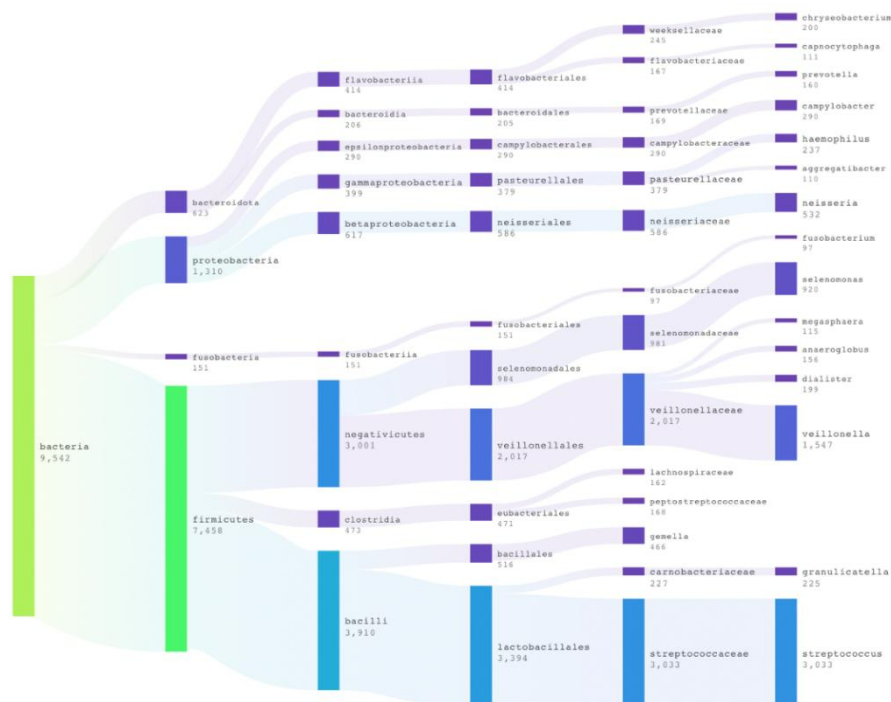
Gambar 2. Taksonomi keanekaragaman hayati bakteri antara sampel A (barcode 17) dan B (barcode 18). Tata nama spesies mencakup informasi tentang lingkaran terluar cakram. Barcode 17 dan 18 adalah sampel A dan B; barcode 20 dan 22 adalah C dan D untuk gambar representatif.





Gambar 3. Taksonomi keanekaragaman hayati bakteri antara sampel C (barcode 20) dan D (barcode 22). Tepi luar cakram dijelaskan dalam nomenklatur spesies. Barcode 17 dan 18 adalah sampel A dan B; barcode 20 dan 22 adalah C dan D untuk gambar representatif.

Visualisasi pada gambar 2 dan 3 dapat membantu mengeksplorasi sampel secara interaktif. Visualisasi ini menunjukkan data hierarkis: setiap lapisan mewakili peringkat taksonomi. Warna menunjukkan kelimpahan takson dibandingkan dengan jumlah total bacaan. Gradien warna pada cakram—dari bagian dalam ke bagian luar—mewakili klasifikasi organisme dari kingdom ke spesies. Pada Gambar B, di mana *Haemophilus parainfluenzae* dominan, namanya ditampilkan di bagian terluar cakram karena persentasenya tertinggi. Sebaliknya, Gambar A tidak memiliki keragaman bakteri yang cukup untuk menampilkan nama spesies di cakram terluarnya. Gambar C sebagian besar menampilkan *Veillonella parvula*, sedangkan Gambar D menampilkan *Veillonella atypica*.



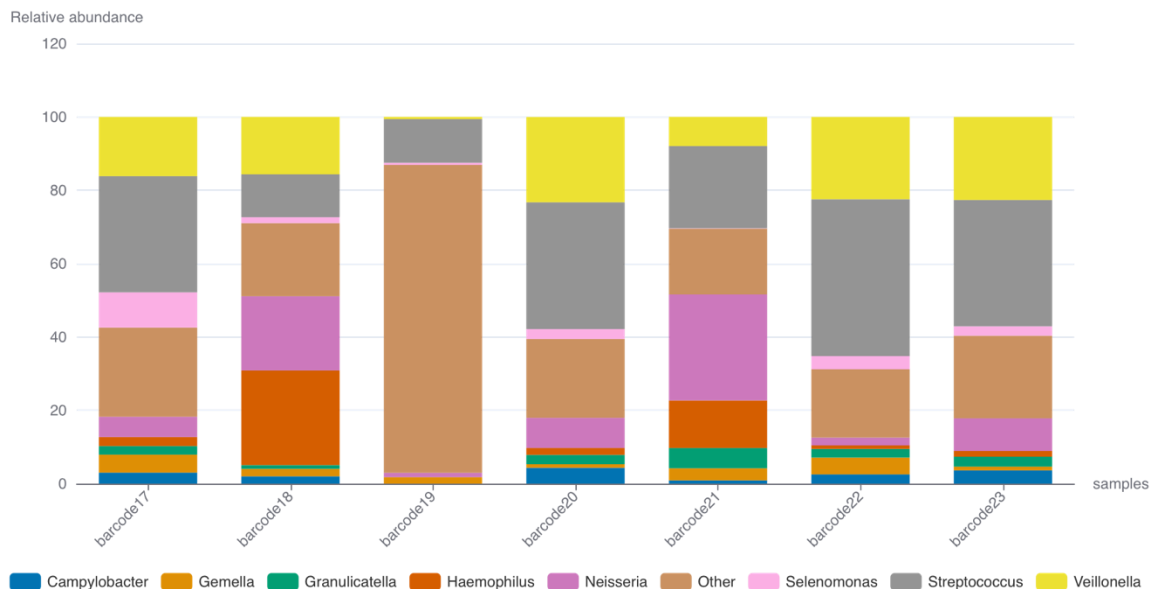
Gambar 4. Garis keturunan genus (Genus lineage of bacteria) bakteri sampel A untuk gambar representatif.

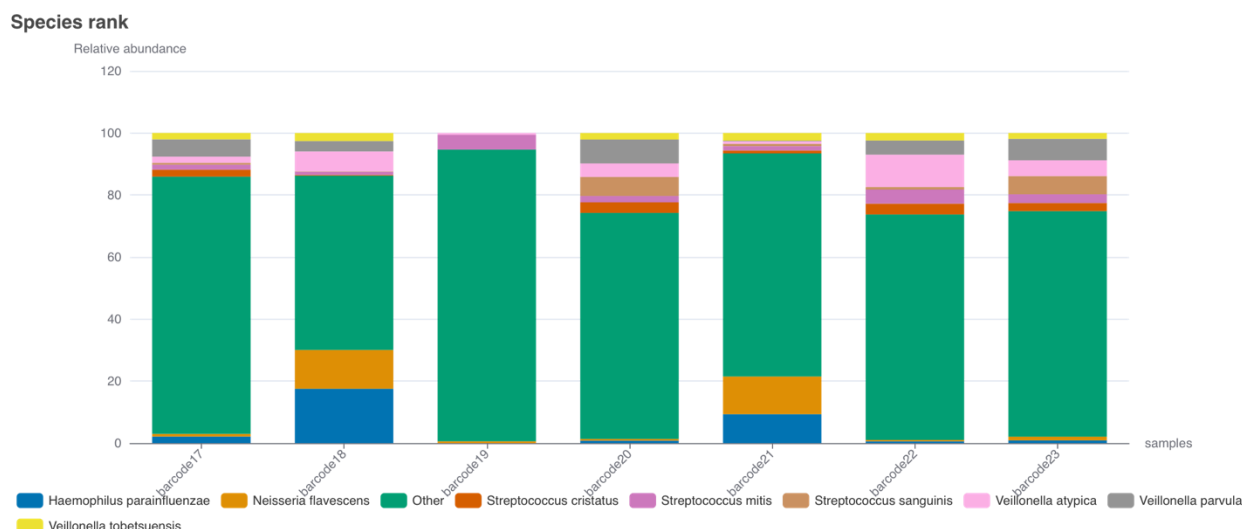


Gambar 5. Garis keturunan genus bakteri sampel D untuk gambar representatif

Gambar 4 dan 5 menyajikan contoh garis keturunan bakteri dari sampel A dan D. Dilakukan perbandingan pada kedua sampel ini untuk menggambarkan keberagaman mikroorganisme, khususnya bakteri, yang ditemukan dalam air liur manusia. Gambar-gambar tersebut menunjukkan bahwa setiap individu memiliki distribusi mikroba yang unik, dengan variasi dalam jumlah dan jenis bakteri.

Genus rank





Gambar 6. Taksonomi pada tingkat genus dan spesies dianalisis. Barcode 17 dan 18 masing-masing mewakili sampel A dan B, sedangkan barcode 20 dan 22 sesuai dengan sampel C dan D.

Grafik batang dari delapan taksa paling melimpah pada peringkat genus dan spesies. Taksa yang tersisa telah diringkas di bawah kategori 'Lainnya' untuk memudahkan visualisasi. Sumbu y menunjukkan kelimpahan relatif setiap takson dalam persentase untuk setiap sampel. Analisis profil taksonomi mengungkapkan bahwa *Streptococcus* dan *Veillonella* adalah genus yang dominan. *Streptococcus mitis*, *Streptococcus rubneri*, *Veillonella parvula*, dan *Veillonella atypica* sering terdeteksi di antara spesies yang teridentifikasi.

Hubungan mutualistik antara *Streptococcus* dan *Veillonella* terbukti, dengan yang terakhir menggunakan laktat yang diproduksi oleh *Streptococcus*. Interaksi ini penting dalam menjaga homeostasis biofilm oral. Hubungan dinamis ini berkaitan dengan *Veillonella* membantu pemanfaatan laktat, dan *Streptococcus* membantu metabolisme glukosa (Giacomini et al., 2023; Abranches et al., 2018).

Temuan yang kami dapatkan sejalan dengan literatur yang ada yang menekankan peran mendasar *Streptococcus* dalam pembentukan biofilm oral dan kolonisasi awal di rongga mulut dalam menjaga homeostasis mikroba oral.

Selanjutnya, kedua bakteri tersebut menunjukkan hubungan sinergis dalam ekosistem mikrobiota oral. *Streptococcus* memainkan peran penting dalam metabolisme karbohidrat, sering kali menghasilkan asam laktat melalui glikolisis, yang mengasamkan lingkungan dan memengaruhi struktur komunitas mikroba. *Veillonella* akan memanfaatkan laktat hasil metabolisme karbohidrat sebagai sumber energinya. Interaksi tersebut menggarisbawahi dinamika kompleks mikrobiota mulut dan kontribusinya terhadap kesehatan (Giacomini et al., 2023; Abranches, 2018; Willenborg, 2016).

Streptococcus adalah bakteri pertama yang hidup di rongga mulut dan diperoleh segera setelah lahir, bakteri ini penting bagi mikrobiota oral (Peng et al., 2022; Abranches et al., 2018). *Streptococci* terkenal karena toleransinya yang meningkat terhadap pH asam dan kapasitas untuk memecah karbohidrat melalui glikolisis. Jika jumlah karbohidrat yang tinggi dan oksigen yang tidak mencukupi, maka *Streptococcus* akan melakukan fermentasi homolaktat, yang mengubah piruvat menjadi asam laktat dan menghasilkan NAD dari NADH. Akibatnya, pengasaman lingkungan terjadi dengan cepat karena pembentukan asam laktat (Giacomini et al., 2023; Abranches et al., 2018).

Teknologi ONT memberikan keunggulan metodologis melalui kemampuan pembacaan real-time dan pembacaan untai panjang, berbeda dengan platform short-read seperti *Illumina* atau *Ion Torrent*.

Walaupun studi ini tidak membandingkan langsung antar-platform, pembacaan penuh gen 16S yang dimungkinkan ONT memberikan resolusi taksonomi tinggi.

Keterbatasan penelitian ini meliputi jumlah sampel yang kecil dan ketiadaan kelompok kontrol. Namun demikian, penelitian ini menjadi dasar awal penting untuk penelitian lanjutan dengan cakupan populasi yang lebih luas dan integrasi pendekatan multi-omik guna memahami hubungan mikrobiota oral dengan kesehatan sistemik pada lansia.

4. KESIMPULAN

Penelitian ini menggarisbawahi manfaat pengurutan 16S rRNA berbasis ONT dalam pembuatan profil mikrobiota oral, dengan menekankan peran ekologis *Streptococcus* dan *Veillonella*. Selanjutnya dengan berfokus pada wanita lanjut usia di Indonesia, penelitian ini menambahkan perspektif tambahan geografis baru pada penelitian mikrobioma oral.

Rekomendasi

Meskipun penelitian ini memiliki keterbatasan dalam jumlah sampel yang relatif kecil, hasil yang diperoleh tetap memberikan gambaran awal yang berharga mengenai komposisi mikrobiota oral pada wanita lanjut usia. Oleh karena itu, kami merekomendasikan agar penelitian lanjutan dilakukan dengan jumlah sampel yang lebih besar dan melibatkan kelompok pembanding dari berbagai rentang usia dan latar belakang gaya hidup. Pendekatan ini akan memperkuat validitas hasil serta memungkinkan eksplorasi hubungan yang lebih luas antara keragaman mikrobiota oral dengan faktor klinis dan sistemik.

5. UCAPAN TERIMA KASIH

Kami sangat berterima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Negeri (UIN) Syarif Hidayatullah Jakarta, dan Medical Diagnostic and Research Center (MDRC) atas dukungannya terhadap penelitian ini.

6. REFERENSI

- Abranches, J., Zeng, L et al. (2018). Biology of Oral Streptococci. *Microbiology spectrum*, 6(5):10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0042-2018>
- Adhiyanto, C., Hendarmin, L. A., Puspitaningrum, R. Pengenalan Dasar Teknik Bio-Molekuler (Hendarto H, ed.). Sleman. Deepublish Press, 2020. ISBN. 978-623-02-1505-6
- Baker, J. L., Mark Welch, J. L et al. (2023). The oral microbiome: diversity, biogeography and human health. *Nature reviews. Microbiology*, 22: 89- 104. Advanced online publication. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00963-6>
- Benn, A., Heng, N et al. (2018). Studying the human oral microbiome: Challenges and the evolution of solutions. *Australian Dental Journal*, 63(1): 14-24. <https://doi.org/10.1111/adj.12565>
- Buetas, E., Jordán-López, M., López-Roldán, A., Martínez-Priego, L., Marco, G. D., Carda-Diéguez, M., Mira, A. (2024). Full-length 16S rRNA gene sequencing by PacBio improves taxonomic resolution in human microbiome samples. *BMC Genomics*, 25, 310. <https://doi.org/10.1186/s12864-024-10213-5>
- Deo, P.N., Deshmukh, R. (2019). Oral microbiome: Unveiling the fundamentals. *Journal of oral and maxillofacial pathology. Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 23(1):122–128. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_304_18
- Di Giulio, M., di Giacomo, V et al. (2013). Saliva improves *Streptococcus mitis* protective effect on human gingival fibroblasts in presence of 2-hydroxyethyl-methacrylate. *Journal of materials science. Materials in medicine*, 24(8):1977–1983. <https://doi.org/10.1007/s10856-013-4949-7>

- Djais, A.A., Theodorea, C. F et al. (2019). Identification and phylogenetic analysis of oral Veillonella species isolated from the saliva of Japanese children. *F1000Research*, 8:616. <https://doi.org/10.12688/f1000research.18506.5>
- Giacomini, J. J., Torres-Morales, J et al. (2023). Site Specialization of Human Oral Veillonella Species. *ASM Journal*, 11(1):1-16. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.04042-22>
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet*. 2016;17(6):333–351. doi:10.1038/nrg.2016.49
- Hendrawan, R.B. (2024). Efek Negatif Merokok terhadap Kesehatan Gigi dan Gusi. <https://fkg.ugm.ac.id/id/efek-negatif-merokok-terhadap-kesehatan-gigi-dan-gusi/> diakses: 24 Juni 2025
- Heng, N. C. K., Stanton, J. A. L. (2019). Next-generation DNA sequencing of oral microbes at the Sir John Walsh Research Institute: technologies, tools, and achievements. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 50(1), 91-107. <https://doi.org/10.1080/03036758.2019.1687530>
- Huch, M., De Bruyne, K et al. (2013). Streptococcus rubneri sp. nov., isolated from the human throat. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 63(11):4026–4032. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.048538-0>
- Kilian, M., Chapple, I. L et al. (2016). The oral microbiome – an update for oral healthcare professionals. *British Dental Journal*, 221(10): 657-666. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2016.865>
- Leake, S. L., Pagni, M et al. (2016). The salivary microbiome for differentiating individuals: Proof of principle. *Microbes and Infection*, 18(6): 399-405. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.03.011>
- Lu, M., Xuan, S., Wang, Z. (2019). Oral microbiota: A new view of body health. *Food Science and Human Wellness*, 8(1):8-15. <https://doi.org/10.1016/j.fshw.2018.12.001>
- Lu, Hongye, Peihui Zou, Yifei Zhang, Qian Zhang, Zhibin Chen, and Feng Chen. 2022. “ The Sampling Strategy of Oral Microbiome.” *iMeta* 1, e23. <https://doi.org/10.1002/imt2.23>
- Maheshwari, K., Musyuni, P., Moulick, A., Mishra, H., Ekielski, A., Mishra, P.K., Aggarwal, G. (2024). Unveiling the microbial symphony: Next-Gen sequencing and bioinformatics insights into the human gut microbiome. *Health Sciences Review*, 11, 100173. <https://doi.org/10.1016/j.hsr.2024.100173>
- Morrison, A.G., Sarkar, S., Umar, S., Lee, S.T., Thomas, S. M. (2023). The Contribution of the Human Oral Microbiome to Oral Disease: A Review. *Microorganisms*, 11(2), 318. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020318>
- Miller MB, Tang YW. Basic concepts of microarrays and potential applications in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(4):611–633. doi:10.1128/CMR.00019-09
- N/A- (2023). What does smoking do to oral bacteria? <https://www.dental-nursing.co.uk/news/what-does-smoking-do-to-oral-bacteria> diakses: 24 Juni 2025
- Oxford Nanopore Technology. https://community.nanoporetech.com/docs/prepare/library_prep_protocols/rapid-sequencing-DNA-16s-barcoding-kit-v14-sqk-16114-24/v/16s_9199_v114_reva_06dec2023
- Pathak JL, Yan Y, Zhang Q, Wang L, Ge L. (2021). The role of oral microbiome in respiratory health and diseases. *Respiratory Medicine*, 185. 106475. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2021.106475>
- Peng, X., Cheng, L et al. (2022). Oral microbiota in human systematic diseases. *International Journal of Oral Science*, 14(1): 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41368-022-00163-7>
- Pisano, Massimo et al. (2023). The Interaction between the Oral Microbiome and Systemic Diseases: A Narrative Review. *Microbiology Research*, 14(4): 1862-1878. <https://doi.org/10.3390/microbiolres14040127>
- Pozhitkov, A. E., Beikler, T., Flemmig, T., Noble, P.A. (2011). High-throughput methods for analysis of the human oral microbiome. *Periodontology* 2000, 55(1): 70–86. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0757.2010.00380.x>
- Rajasekaran, J. J., Krishnamurthy, H. K., Bosco, J., Jayaraman, V., Krishna, K., Wang, T., Bei, K. (2024). Oral Microbiome: A Review of Its Impact on Oral and Systemic Health. *Microorganisms*, 12(9): 1797. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091797>
- Santacroce, L, Passarelli et al. (2023). Oral microbiota in human health and disease: A perspective. *Experimental Biology and Medicine*, 248(15):1288-1301. <https://doi.org/10.1177/15353702231187645>

- Satam, H., Joshi, K., Mangrolia, U., Waghoo, S., Zaidi, G., Rawool, S., Thakare, R. P., Banday, S., Mishra, A.K., Das, G., Malonia, S.K. (2023). Next-Generation Sequencing Technology: Current Trends and Advancements. *Biology*, 12(7), 997. <https://doi.org/10.3390/biology12070997>
- Schwarz, C., Hajdu, A.I et al. (2023). Link between Oral Health, Periodontal Disease, Smoking, and Systemic Diseases in Romanian Patients. *Healthcare*, 11(16):2354 <https://doi.org/10.3390/healthcare11162354>
- Sedghi, L., DiMassa, V., Harrington, A., Lynch, S.V., Kapila, Y.L. (2021). The oral microbiome: Role of key organisms and complex networks in oral health and disease. *Periodontology 2000*, 87(1):107-131. <https://doi.org/10.1111/prd.12393>
- Wang, J., Feng, J et al. (2022). Diversity and Biogeography of Human Oral Saliva Microbial Communities Revealed by the Earth Microbiome Project. *Frontiers in Microbiology*, 13:931065. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.931065>
- Widyarman, A. S., Theodorea, C.F., Udawatte, N.S., Drestia, A.M., Bachtiar, E.W., Astoeti, T. E., Bachtiar, B.M. (2021). Diversity of Oral Microbiome of Women From Urban and Rural Areas of Indonesia: A Pilot Study. *Frontiers in Oral Health*, 2, 738306. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.738306>
- Willis, J. R., Gabaldón, T. (2020). The Human Oral Microbiome in Health and Disease: From Sequences to Ecosystems. *Microorganisms*, 8(2):308 <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020308>
- Willenborg, J., Goethe, R. (2016). Metabolic traits of pathogenic streptococci. *FEBS Letters*, 590(21): 3905-3919. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12317>
- Zhou, P., Liu, J et al. (2015). A YadA-like autotransporter, Hag1 in *Veillonella atypica* is a multivalent hemagglutinin involved in adherence to oral streptococci, *Porphyromonas gingivalis*, and human oral buccal cells. *Molecular oral microbiology*, 30(4): 269–279. <https://doi.org/10.1111/omi.12091>
- Zhou, P., Manoil, D et al. (2021). *Veillonellae*: Beyond Bridging Species in Oral Biofilm Ecology. *Frontiers in oral health*, 2:774115. <https://doi.org/10.3389/froh.2021.774115>