

PERBANDINGAN PERTUMBUHAN *Streptococcus mutans* INA99 PADA BERBAGAI MEDIA PERBENIHAN PADAT

Yayuk Yuliarsi*, Takarsyah M Putra*, Boedi Oe. Roeslan**

*Staf Pengajar Mikrobiologi
**Staf Pengajar Biokimia
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Trisakti

Yayuk Yuliarsi, Takarsyah M Putra, Boedi Oe. Roeslan: Perbandingan Pertumbuhan *Streptococcus mutans* INA99 pada Berbagai Media Perbenihan Padat. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. 2003;10 (Edisi Khusus): 329-334

Abstract

Previous study shows that *tryptone-yeast extract-cystine-sucrose* is choice of the culture media for isolating and growing *S. mutans* serotype *c*, but the effectiveness in stepping up the recovery growth of the bacteria has never been compared with that of the blood agar added to yeast extract and sucrose. This study was come to find out the growth of *S. mutans* serotype *c* with blood agar-yeast extract-sucrose. *S. mutans* INA99 serotype *c* is identified, sliced, and cultured into blood agar-yeast extract-sucrose, *brucella* agar blood-yeast extract-sucrose, blood agar and *tryptone-yeast extract-cystine-sucrose*. each 4 slices. The average amount of blood agar colonies that grows after an incubation of 2x24 hours in an anaerob condition of 37 C, diluted by 40 time is 4.890. In blood agar-yeast extract-sucrose the average colony is 145.600, diluted 1.600 time. In *brucella* agar blood-yeast extract-sucrose, the average colony is 103.500, diluted 40 times. In *tryptone-yeast extract-cystine-sucrose* the average colony is 2.430, diluted 40 time. Statistical result shows that, there are significant difference ($p = 0.000$) between the total colonies of *S. mutans* INA99 serotype *c* which grows on the different types of culture media. The largest amount of colony is present on blood agar-yeast extract-sucrose, then followed by *brucella* agar blood-yeast extract-sucrose, blood agar and *tryptone-yeast extract-cystine-sucrose*. Conclusion: blood agar which added yeast extract and sucrose is the best culture media for *S. mutans* INA99 serotype *c* growth.

Key words: Recovery, growth; *S. mutans* INA99; culture media.

Pendahuluan

Streptococcus mutans dikenal sebagai streptokoki rongga mulut yang paling kariogenik karena kemampuannya membentuk polisakarida ekstraseluler dan lebih asidurik dari pada streptokoki lain. Polisakarida ekstraseluler yang diproduksi *S. mutans* merupakan prekursor plak gigi

sehingga kuman ini dapat membentuk agregat sel pada permukaan email yang licin.¹ Asam yang dibentuk merupakan campuran asam dengan pH sekitar 4.²

Dalam studi epidemiologi dan etiologi karies gigi, sering timbul kesulitan dalam mengisolasi pertumbuhan *S. mutans* karena proporsinya di dalam plak gigi dan air liur sangat kecil sekali dibandingkan

strptokoki rongga mulut lainnya. Sehubungan dengan itu telah dikembangkan media perbenihan padat untuk mengisolasi dan menumbuhkan *S. mutans* seperti agar mitis-salivarius-sukrosa-basitrasin (MSB),³ agar manitol-sorbitol-fukhsin-azida (MSFA), agar glukosa telurit basitrasin (GTSB). Penambahan sukrosa dan basitrasin pada agar mitis salivarius bertujuan untuk meningkatkan rekoveri pertumbuhan kuman ini.⁴ Pada 1969, de Stopelaar dan kawan-kawannya memperkenalkan *tryptone- yeast extract-cystine* (TYC) yang merupakan media padat khusus untuk kuman pembentuk glukan. Media ini dianggap selektif untuk membedakan *S. mutans* dengan streptokoki rongga mulut lain. Adanya ekstrak ragi pada media ini, dapat mempercepat pertumbuhan kuman ini. Media ini kemudian dimodifikasi dengan menambahkan sukrosa sampai kadar akhir 20 % dan 0.1 unit/ml basitrasin pada TYC (TYCSB). Pada media TYCSB ini terlihat adanya peningkatan rekoveri pertumbuhan *S. mutans* terbaik dari pada media pertumbuhan lainnya. Hasil yang sama juga diperlihatkan oleh Schaeken dan kawan-kawannya yang membandingkan pertumbuhan *S. mutans* serotipe *c* pada MSB, MSFA, GTSB, TYC dan TYCSB.⁵

Agar darah juga dapat digunakan untuk mengisolasi dan menumbuhkan *S. mutans*.⁶ *S. mutans* serotipe *c* sudah dapat diisolasi dari plak gigi Subjek Indonesia menggunakan agar darah ditambah ekstrak ragi dan sukrosa dan diberi nama *Streptococcus mutans* INA99.⁷ Namun rekoveri *Streptococcus mutans* INA99 pada media ini belum pernah diteliti.

Berdasarkan uraian tadi, maka apakah terdapat perbedaan pertumbuhan *Streptococcus mutans* INA99 pada media padat agar darah, agar darah-ekstrak ragi-glukosa, agar brucella-darah-ekstrak ragi-sukrosa, dan agar *trypton-yeast extract-cystine-sucrose*? Oleh karena itu tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui media padat yang terbaik untuk menumbuhkan *Streptococcus mutans* INA99, khususnya media padat agar darah, agar darah-ekstrak ragi-glukosa, agar

brucella-darah-ekstrak ragi sukrosa, dan agar *trypton-yeast extract-cystine-sucrose*.

Bahan dan Cara Kerja

Dipersiapkan media perbenihan padat agar darah, agar darah-ekstrak ragi-sukrosa, agar *brucella-darah-ekstrak ragi* sukrosa, dan agar *trypton-yeast extract-cystine-sucrose* pada lempeng petri. *Streptococcus mutans* INA99 dari stok ditumbuhkan pada perbenihan cair *Brain Heart Infusion* ditambah *yeast extract* (ekstrak ragi) 0,5 % (BHIY) di dalam sungkup anaerob pada 37°C. Setelah diinkubasi selama 24 jam, biakan *S. mutans* INA99 diidentifikasi berdasarkan pewarnaan Gram, morfologi koloni, dan uji biokimia memakai larutan arginin, eskulin, sukrosa, laktosa, manitol, sorbitol, inulin, rafinosa dan melibiosa, masing-masing kadar 1%.

Biakan *S. mutans* INA99 di dalam media cair BHIY ditipiskan 1/40, 1/400, 1/800 dan 1/1600, kemudian disebar pada empat jenis perbenihan yang sudah dipersiapkan. Biakan kuman pada empat jenis perbenihan diinkubasi di dalam sungkup anaerob pada 37°C. Setelah diinkubasi selama 24 jam, koloni yang tumbuh pada setiap perbenihan dihitung jumlahnya. Hasil perhitungan diuji statistik dengan analisis varians satu jalan. Untuk mengetahui perbedaan antar kelompok, selanjutnya diuji dengan menggunakan uji perbandingan multipel dengan prosedur Tuckey *Honestly Significant Difference*.⁸

Hasil

Hasil identifikasi stok *S. mutans* INA99 berdasarkan pewarnaan Gram, morfologi koloni, dan uji biokimia, menunjukkan bahwa kuman stok mempunyai karakteristik sesuai dengan sifat-sifat *S. mutans* serotipe *c*. Hasil identifikasi, dapat dilihat pada lampiran A Tabel 2.

Hasil penghitungan jumlah koloni *S. mutans* INA99 dalam berbagai perbenihan setelah diinkubasi 2x24 jam di dalam sungkup anaerob pada 37°C sebagai berikut. Rata-rata jumlah koloni pada perbenihan agar darah sebanyak 4.890 koloni pada penipisan 40 kali, pada agar darah-ekstrak ragi-sukrosa rata-ratanya 145.600 koloni pada penipisan 1600 kali, pada *brucella* darah-ekstrak ragi-sukrosa rata-ratanya 103.500 koloni pada penipisan 1600 kali dan pada *tryptone-yeast extract-cystine-sucrose* (TYCS) sebanyak 2.430 koloni pada penipisan 40 kali (Tabel 1). Hasil lengkap penghitungan jumlah koloni dapat dilihat pada lampiran B Tabel 3.

Hasil uji statistik dengan analisa varians 1 jalan antara jenis perbenihan dan pertumbuhan *S. mutans* INA99, menunjukkan adanya perbedaan yang sangat bermakna ($F=8,5$; $p=0,000$). Rangkuman hasil perhitungan analisis varians satu jalan dapat dilihat pada lampiran B Tabel 4. Berdasarkan hasil analisis varians 1 jalan, diperoleh *multiplier* sebesar 4,20 dan hasil perhitungan untuk mendapat nilai pembeda pada uji beda nyata jujur (*Honestly Significant Difference*) Tuckey, diperoleh nilai pembeda sebesar 0,0131 (Lampiran B). Dengan nilai pembesar 0,0131, terlihat adanya perbedaan antara rata-rata jumlah koloni yang tumbuh pada semua jenis perbenihan (Lampiran B Tabel 5). Secara berurutan jumlah koloni yang tumbuh dari yang terbanyak adalah pada media padat agar darah-ekstrak ragi-sukrosa, agar *brucella*-darah-ekstrak ragi-sukrosa, agar darah, dan yang paling sedikit pada media perbenihan pada *tryptone-yeast extract-cystine-sucrose*.

Pembahasan

Penelitian ini bertujuan untuk mencari media perbenihan yang paling efektif dan efisien untuk pertumbuhan *Streptococcus mutans* INA99 serotipe c isolat plak gigi subjek Indonesia. Hasilnya menunjukkan bahwa agar darah cukup baik untuk menumbuhkan kuman.⁷ Sehubungan

dengan itu, media yang dicoba digunakan untuk menumbuhkan *S. mutans* INA99 pada penelitian ini adalah media padat yang mengandung darah.

Ekstrak ragi yang ditambahkan pada media perbenihan padat *tryptone-yeast extract-cystine-sucrose*¹ dapat digunakan untuk menumbuhkan *S. mutans* langsung dari plak gigi dan air liur. Penambahan sukrosa 20% dan basitrasin 0,2 unit/mL pada media perbenihan ini, memberikan rekoveri pertumbuhan *S. mutans* yang lebih baik dari pada agar mitis-salivarius-basitrasin.⁴ Berdasarkan hal tersebut diatas, pada penelitian ini juga dipergunakan media padat agar darah yang ditambah ekstrak ragi 0,5% dan sukrosa 20% tanpa basitrasin, karena antibiotika ini hanya untuk mematikan kuman lain, sedangkan pada penelitian ini digunakan isolat murni.

Isolasi dan pertumbuhan *S. mutans* pernah dilakukan dengan menggunakan media padat agar *brucella*-darah.⁹ Hasilnya menunjukkan bahwa media ini juga dapat digunakan untuk mengisolasi dan menumbuhkan kuman ini.

Hasil penelitian ini (Tabel 1) menunjukkan bahwa pertumbuhan *S. mutans* INA99 pada media yang mengandung ekstrak ragi 0,5% dan sukrosa 20%, seperti yang ditunjukkan pada agar darah-ekstrak ragi-sukrosa dan agar *brucella*-darah-ekstrak-ragi-sukrosa, memerlukan penipisan sampai 1600 kali baru dapat dilakukan penghitungan jumlah koloni. Pada dua media padat lainnya, yaitu agar darah dan *tryptone-yeast extract-cystine-sucrose*, jumlah koloni sudah dapat dihitung pada penipisan 40 kali.

Uji statistik dengan menggunakan analisis varians satu jalan antara perbenihan dan jumlah koloni *S. mutans* INA99, terlihat adanya perbedaan yang sangat bermakna ($p=0,0000$). Hasil uji beda nyata jujur menurut prosedur Tuckey, menunjukkan adanya perbedaan antara rata-rata jumlah koloni yang tumbuh pada semua jenis perbenihan. Pertumbuhan *S. mutans* INA99 terbanyak pada media padat agar darah-ekstrak ragi-sukrosa, menyusul agar *brucella*-darah-ekstrak-ragi-sukrosa, agar darah, dan yang paling sedikit pada media perbenihan padat *tryptone-yeast*

extract-cystine-sucrose. Hasil ini sesuai dengan hipotesis penelitian ini yang menyebutkan bahwa terdapat perbedaan pertumbuhan *Streptococcus mutans* INA99 pada media padat agar darah, agar darah-ekstrak ragi-sukrosa, agar *brucella*-darah-ekstrak-ragi-sukrosa, dan agar *tryptone-yeast extract-cystine-sucrose*.

Berdasarkan hasil penelitian ini, terlihat bahwa rekoveri pertumbuhan *S. mutans* INA99 pada media perbenihan padat yang mengandung ekstrak ragi 0,5% dan sukrosa 20% jauh lebih baik daripada media perbenihan tanpa kedua bahan tadi. Secara teoritis dapat dijelaskan bahwa ekstrak ragi merupakan media yang baik untuk pertumbuhan kuman ini mengingat sifat *S. mutans* INA99 yang asidogenik.¹⁰ Sedangkan sukrosa yang ditambahkan di media perbenihan akan meningkatkan pertumbuhan *S. mutans* INA99.

Berbeda dengan penambahan ekstrak ragi dan sukrosa pada media agar darah dan agar *brucella*-darah, adanya ekstrak ragi dan sukrosa pada media *tryptone-yeast extract-cystine-sucrose* ternyata tidak meningkatkan rekoveri pertumbuhan *S. mutans* INA99 dengan baik. Agar darah tanpa ekstrak ragi dan sukrosa, juga tidak meningkatkan rekoveri pertumbuhan kuman ini dengan baik. Berarti darah sendiri atau kombinasi ekstrak ragi dan sukrosa sendiri, tidak meningkatkan pertumbuhan *S. mutans* INA99. Hal ini mungkin terjadi karena peningkatan pertumbuhan *S. mutans* INA99 disebabkan oleh adanya interaksi antara darah, ekstrak ragi, dan sukrosa. Namun bagaimana mekanismenya perlu dilakukan penelitian tersendiri.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa terdapat perbedaan yang sangat bermakna ($p=0.0000$) antara pertumbuhan *Streptococcus mutans* INA99 serotipe *c* pada media padat agar darah, agar darah-ekstrak ragi-sukrosa, agar *brucella*-darah-ekstrak ragi sukrosa, dan agar *tryptone-yeast*

extract-cystine-sucrose, secara berurutan jumlah koloni yang tumbuh dari yang terbanyak adalah agar darah-ekstrak ragi-sukrosa, *brucella*-darah-ekstrak ragi sukrosa, agar darah, dan yang paling sedikit pada media perbenihan padat *tryptone-yeast extract-cystine-sucrose*. Dengan demikian, media agar darah yang ditambah ekstrak ragi 0,5% dan sukrosa 20%, merupakan media yang paling baik untuk menumbuhkan *Streptococcus mutans* INA99 serotipe *c*.

Daftar Pustaka

1. De Stopelaar, J.D. *Streptococcus mutans, Streptococcus Sanguis, and Dental Caries*. Rijksuniversiteit, Utrecht. Disertasi Doktor. 1971.
2. Michalek, S.M., McGhee, J.R., Mesteckey, J., Arnold, R.R., dan Bozzo L. 1976. Ingestion of *Streptococcus mutans* induces secretory immunoglobulin A and caries immunity. *Science* 192: 1238-40.
3. Gold, O.G., Jordan, H.V., van Houte, J. A selective medium for *Streptococcus mutans*. *Archs Oral Biol* 1973. 18:1357-64.
4. Wade, W.G., Aldred, M.J., dan Walker, D.M. An improved medium for isolation of *Streptococcus mutans*. *J Med Microbiol* 1986. 22: 319-23.
5. Schaeken, M.J.M., van der Hoeven, J.S., dan Franken, H.C.M. Comparative recovery of *Streptococcus mutans* on five isolation media including a new simple selective medium. *J Dent Res* 1986. 65: 906-8.
6. Rundegren, J. Calcium-dependent salivary agglutinin with reactivity to various oral bacterial species. *Infect Immun* 1986. 53: 173-8.
7. Roeslan, B. Oe., Putra, T.M., Yuliansi, Y. Isolasi *Streptococcus mutans* serotipe *c* dari plak gigi orang Indonesia. *M.I. Ceril FKG UGM ke 40* 2001: 52-6.
8. Dawson-Saunders, B., dan Trapp, R.G. *Basic and Clinical Biostatistic*. Prentice Hall Int., London. 1990 : 124-34.

9. Roeslan, B. Oe.. Metode praktis isolasi *Streptococcus mutans* dari plak gigi. *M.I. Kedokt. Gigi* 1992.19: 4-14.

10. Roeslan, B. Oe. Karakteristik *Streptococcus mutans* penyebab karies gigi. *M I Kedokt Gigi* 1995. 29-30:4-14

LAMPIRAN A
HASIL IDENTIFIKASI *Streptococcus mutans* INA99 SEROTIPE c

Tabel 1. Rata-rata jumlah koloni *Streptococcus mutans* INA99 pada berbagai perbenihan

Perbenihan	Penipisan	Rata-rata ± satandar deviasi
Agar darah	40 kali	4.890 ± 76
Agar darah-ekstrak ragi-sukrosa	1600 kali	145.600 ± 2263
<i>Brucella</i> darah-ekstrak ragi-sukrosa	1600 kali	103.500 ± 1000
<i>Tryptone-yeast extract-cystine-sucrose</i>	40 kali	2.430 ± 38

Tabel 2. Hasil identifikasi *Streptococcus mutans* INA99

Identifikasi	Sifat-sifat <i>S. mutans</i> serotipe c*	<i>S. mutans</i> INA99#
Hemolisis Koloni	α/β tdk mengadakan hemolisis	tdk mengadakan hemolisis
* warna	putih	putih
* konsistensi	keras, lekat	keras, lekat
* diameter	0,5-5 mm	0,5 mm
Pewarnaan Gram	+	+
Morfologi	koki berpasangan atau berantai	koki berantai
Tes Biokimia		
* Arginin	-	-
* Eskulin	+	+
* Sukrosa	+	+
* Laktosa	+	+
* Manitol	+	+
* Sorbitol	+	+
* Inulin	+	+
* Rafinosa	+	+
* Melibiosa	+	+
* Glukan α (1→3)	+	+
* M.R.V.P	+	+
• pH	3,5 - 4,5	4.0

* Sumber : De Stopelaar, 1971. Finegold & Martin: 1983. Nolte, 1983; Schachtele, 1983; Newbrun, 1989.

Streptococcus mutans INA99 SEROTIPE c dari isolat plak gigi Indonesia (Roeslan, 2000).

M.R.V.P. : Methyl Red- Voges dan Proskauer. pH : derajat keasaman .

LAMPIRAN B
DATA LENGKAP DAN HASIL PERHITUNGAN STATISTIK

1. Hasil penghitungan

Tabel 3. Jumlah koloni pada pertumbuhan *S. mutans* INA99 pada berbagai pertumbuhan padat

Perbenihan	Sampel	Koloni	Penipisan	Jml koloni	Log. Jml koloni
Agar darah	1	121	40	4.840	3,68485
	2	125	40	5.000	3,69897
	3	121	40	4.840	3,68487
	4	122	40	4.880	3,68842
Agar darah-ekstrak ragi-sukrosa	1	92	1600	147.200	5,16791
	2	89	1600	142.400	5,15351
	3	92	1600	147.200	5,16791
	4	91	1600	145.600	5,16316
<i>Brucella</i> darah-ekstrak ragi-sukrosa	1	65	1600	104.000	5,01703
	2	64	1600	102.000	5,00860
	3	65	1600	104.000	5,01730
	4	65	1600	104.000	5,01730
<i>Tryptone-yeast extract-cystine-sucrosa</i>	1	62	40	2.480	3,39445
	2	61	40	2.440	3,38739
	3	60	40	2.400	3,38021
	4	60	40	2.400	3,38021

2. Hasil perhitungan analisis varians 1 jalan

Tabel 4. Rangkuman hasil perhitungan analisis varians satu jalan antara jenis perbenihan dan jumlah koloni *S. mutans* INA99

Sumber	Jumlah kuadrat	Derajat bebas	Rata-rata kuadrat	F	P
Perbenihan	9,858313	3	3,286104	8,5	0,000
Error	0,000465	12	0,000039		

3. Uji beda nyata jujur (HSD) Tuckey
Multiplier dari analisis varians 1 jalan sebesar 4,20

$$HSD = multiplier \sqrt{\frac{MSe}{n}} = 4,20 \sqrt{\frac{0,000039}{4}} = 0,0131$$

Tabel 5. Selisih jumlah koloni *S. mutans* INA99 dalam berbagai perbenihan

	Agar darah	Agar darah-ekstrak ragi-sukrosa	<i>Tryptone-yeast extract-cystine-sucrose</i>
Agar darah-ekstrak ragi-sukrosa	1,4738*		
<i>Tryptone-yeast extract-cystine-sucrose</i>	0,3037*	1,7775*	
<i>Brucella</i> darah ekstrak ragi sukrosa	1,3257*	0,1482*	1,6294*

*Berbeda