

ANTIBODI MONOKLONAL STREPTOKOKUS MUTANS 1(c) 67 kDa DALAM PASTA GIGI BAHAN DASAR UNTUK MENGHAMBAT PERTUMBUHAN STREPTOKOKUS MUTANS

Rini Devijanti R. Retno Indrawati R

Laboratorium Ilmu Biologi Mulut
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

Rini Devijanti R. Retno Indrawati R : Antibodi monoklonal streptokokus mutans 1 (c) 67 kDa dalam pasta gigi bahan dasar untuk menghambat pertumbuhan streptokokus mutans. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. 2003: 10 (Edisi Khusus) : 852-858

Abstract

Prevention of dental caries is still continuing, because the prevalency caries is high. There was many methods to prevent dental caries etc. dental education, oral hygiene, special method on tooth brushing, water fluoridation, fissure sealant and later on the passive immunization with monoclonal antibodies. The purpose of this study was to investigate about monoclonal antibodies IgA, IgG₁ and IgG₃ against *Streptococcus mutans* 1 (c) in basic paste for inhibiting the growth *Streptococcus mutans*. The monoclonal antibodies were IgA Ab, IgG₁ Ab and IgG₃ Ab. Formula basic paste from PT "X" contained Aqua, Sorbitol, Nipagin, Dicalcium Phosphat, Titanium Dioxid, Sodium Carboxyl Methyl Sel, Sodium Lauryl Sulfate and Sacarin. Basic paste was mixed with monoclonal antibodies IgA, IgG₁ and IgG₃ in room temperature (27°C), then to investigate zone of inhibition from these tooth paste with Wistreich and Lechtman methods. The data obtained in this study was analyzed with one way Anova and LSD. The result showed that there was a significant differences between basic paste with or without monoclonal antibodies. From the data analyzed in this study it can be concluded that monoclonal antibodies against *S. mutans* 1 (c) could be formulation with basic paste.

Keywords : *Streptococcus mutans*; monoclonal antibodies; basic paste; zone of inhibition.

Pendahuluan

Karies gigi merupakan penyakit infeksi pada jaringan karies gigi yang bersifat lokal, progresif, menyebabkan kehancuran struktur gigi dan bersifat kronis.¹ Etiologi karies gigi bersifat multifaktorial, karena banyak hal yang saling berkaitan meliputi inang, diet dan bakteri.² Dari faktor bakteri telah

dilaporkan bahwa *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) merupakan bakteri penyebab utama karies gigi.³ *S. mutans* dianggap sebagai bakteri atau gen mulut yang paling penting yang terlibat pada proses karies.⁴ Dikemukakan bahwa karies terjadi karena interaksi antara gigi, bakteri dan gula. Selain tiga faktor tersebut sebenarnya terdapat satu faktor penghambat karies dalam saliva, yaitu antibodi.⁵

Sampai saat ini karies masih merupakan masalah di seluruh dunia. Walaupun berbagai langkah pencegahan sudah dilakukan, akan tetapi prevalensi masih cukup tinggi. Adapun di negara berkembang prevalensi karies mencapai 90%. Rata-rata karies gigi di negara yang sedang berkembang meningkat, karena lebih dari 80% anak-anak di negara tersebut terkena karies.⁶

Hasil penelitian Soewelo pada tahun 1988 di Jakarta menunjukkan bahwa 85.17% anak-anak prasekolah menderita karies (dikutip dari Nuraini), sedangkan 92.1% anak TK di Surabaya menderita karies.⁷ Keadaan ini menunjukkan bahwa prevalensi karies masih tinggi. Oleh karena itu maka langkah-langkah pencegahan masih terus harus dilakukan dan dikembangkan.

Tinjauan Pustaka

Pencegahan karies dapat dilakukan melalui peningkatan resistensi dari inang (fluoridasi, *fissure sealant* dan imunisasi), penurunan jumlah bakteri kariogenik yang kontak dengan gigi (kontrol plak), modifikasi substrat dengan makanan non kariogenik serta mengurangi waktu lamanya substrat di dalam mulut.⁹

Seiring dengan perkembangan teknologi dan biologi molekuler menambah strategi dalam pencegahan karies gigi. Salah satu cara adalah dengan imunisasi yang telah dilakukan penelitian sejak 50 tahun yang lalu, baik secara aktif maupun pasif. Imunisasi aktif ini dapat dilakukan dengan beberapa cara, yaitu: penggunaan peptida sintetik *S. mutans*, perangkain antigen *S. mutans* dengan *toxin cholera*, penggabungan gen *S. mutans* dengan *Salmonella avirulent* dan *liposome delivery systems*.⁷

Beberapa penelitian ke arah tindakan imunisasi pasif dilakukan untuk pencegahan karies yang meliputi penggunaan antibodi monoklonal secara topikal, pemberian kekebalan pada susu sapi dan minuman semacam yoghurt,

pemberian kuning telur yang mengandung antibodi dan antibodi dari tanaman.⁷

Preparat antibodi monoklonal IgG dapat mencegah atau dengan nyata mengurangi kolonisasi *S. mutans*, mengurangi terjadinya karies gigi dan tidak membutuhkan imunisasi aktif dengan antigen yang bersifat reaktif pada jaringan.⁶

Penelitian tentang pencegahan terhadap kolonisasi bakteri *S. mutans* dengan aplikasi topikal dari antibodi monoklonal pada manusia. Hasil penelitiannya menunjukkan bahwa dengan pemberian antibodi monoklonal kelas IgG terhadap antigen permukaan sel (SA I/II) sebanyak 10 µl yang diaplikasikan pada permukaan bukal, lingual dan fisura gigi, mampu menyebabkan penurunan kolonisasi bakteri *S. mutans* dari permukaan gigi.¹⁰

Telah ditemukan antibodi poliklonal dengan protein yang dominan dan imunogenik yang terdapat pada dinding sel *S. mutans* 1 (c) lokal yaitu protein dengan berat molekul 67 kDa. Pada uji secara in vitro diperoleh hasil bahwa potensi dari produk antibodi poliklonal tersebut dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri *S. mutans* 1 (c) lokal. Sedangkan peneliti lain telah melakukan pembuatan antibodi monoklonal (IgG₁ Ab, IgG₂ Ab dan IgA Ab) dari protein *S. mutans* 1 (c) lokal dengan berat molekul 67 kDa. Dari hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan secara in vitro diperoleh hasil bahwa antibodi monoklonal tersebut dapat menurunkan jumlah koloni bakteri *S. mutans* 1 (c) lokal.¹²

Sampai saat ini pencegahan terhadap karies gigi terus dikembangkan karena merupakan suatu cara efektif untuk dapat menurunkan prevalensi karies gigi yang masih banyak terjadi. Pencegahan karies gigi ini dapat dilakukan dengan berbagai cara, salah satunya adalah dengan menyikat gigi menggunakan pasta gigi secara teratur. Penggunaan sikat dan pasta gigi ini merupakan suatu cara pencegahan karies gigi yang mudah dan aman pada semua orang baik anak-anak maupun dewasa, sehingga akan terus dikembangkan seiring dengan kemajuan ilmu pengetahuan dan teknologi.

Pengembangan bentuk sikat gigi dan komposisi pasta gigi terus dilakukan untuk mendapatkan suatu bentuk dan komposisi pasta gigi yang efektif untuk pencegahan karies gigi.

Dengan telah diproduksinya antibodi monoclonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa maka akan dibuat formulasi antibodi monoclonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa dalam pasta gigi. karena dengan penambahan antibodi monoclonal dalam pasta gigi diharapkan pada pemakaiannya akan terjadi perlekatan dari antibodi monoclonal pada permukaan gigi khususnya pada pelikel saliva, sehingga dengan adanya perlekatan tersebut maka bakteri *S. mutans* dapat dicegah untuk berkolonisasi. Karena antibodi monoclonal yang melekat pada pelikel saliva di permukaan gigi akan mengikat *S. mutans* sehingga *S. mutans* akan diopsonisasi oleh antibodi monoclonal tersebut.¹⁵ Oleh karena itulah maka formulasi antibodi monoclonal dalam pasta gigi bahan dasar diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui daya hambat antibodi monoclonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa yang terkandung di dalam pasta gigi bahan dasar terhadap pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

Bahan dan Cara Kerja

Jenis penelitian adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan percobaan *The post test only control group design*.

Persiapan Pasta Gigi

Pasta gigi yang dipakai adalah pasta gigi bahan dasar dari PT X Surabaya dengan formula sebagai berikut: Aqua (13.75%), Sorbitol (37%), Nipagin (0.1%), Dicalcium Phosphat (45%), Titanium Dioxid (0.1%), Sodium Carboxyl Methyl Sel (2%), Sodium Lauryl Sulfate (2%), Sacarin (0.25%) dan pH 7.94. Sebanyak 2mg pasta gigi ditambahkan antibodi monoclonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa

sebanyak 10 µl. sehingga untuk formula ini digunakan pasta gigi sebanyak 100mg dan antibodi monoclonal sebanyak 500µl.

Pencampuran pasta gigi dengan antibodi monoclonal dilakukan dengan cara pengadukan (*mixing*) sehingga bercampur menjadi satu berupa emulsi pada suhu kamar (27°C). dengan waktu pengadukan selama 5 menit.

Isolasi *Streptococcus mutans*

S. mutans diambil dari lesi karies. spesimen dari lesi karies ditanam pada media BHIB, dimasukkan anaerobic jar dan diinkubasi selama 24 jam, 37°C.¹ Setelah ada pertumbuhan, kultur diinokulasi pada media padat TYC, diinkubasi 2 x 24 jam. anacrob. pada suhu 37°C. Koloni yang tumbuh pada media TYC diperiksa pada mikroskop dengan pengecatan Gram.

Bila tampak gambaran *Streptococcus* Gram positif, dilanjutkan dengan pemeriksaan biokimia, yaitu ditanam pada media gula-gula: manitol, maltosa, sukrosa, laktosa, sorbitol dan hidrolisa terhadap arginin dan inulin. Selain itu *Streptococcus* ditanam pada media agar darah untuk mengetahui adanya hemolisis dan pada media yang mengandung bacitrasin untuk mengetahui resistensinya terhadap antibiotik tersebut. Bakteri adalah *S. mutans* apabila dengan agar darah menunjukkan hemolisis alfa atau gama, sedangkan pada pemeriksaan biokimia menunjukkan adanya fermentasi terhadap manitol, maltosa, sukrosa, sorbitol, laktosa dan tidak menghidrolisis arginin.²

Pengukuran Diameter Zona Hambatan

Pengukuran dilakukan pada lempeng agar TYC dengan ketebalan 3-5mm. Lempeng agar TYC (*poured plate*) tersebut dibuat sumuran dengan diameter ± 3-5mm dan diisi dengan pasta gigi yang telah mengandung antibodi monoclonal maupun yang tidak sebanyak 2mg. Kemudian diinkubasikan di dalam jar dengan *Gas Generating Kit* pada suhu 37°C, selama 2 x 24 jam. Setelah itu dilakukan pembacaan lebar zona¹⁴.

Adapun caranya adalah sebagai berikut: dibuat agar TYC pada cawan petri, kemudian ditambah kultur *S. mutans* yang berusia 18-24 jam sebanyak 3ml, diratakan dengan *spreader* hingga merata. Lempeng agar tersebut dibuat sumuran dengan diameter $\pm 3-5$ mm, pada lubang sumuran tersebut diisi dengan pasta gigi yang mengandung antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃ sebanyak 2mg. Kemudian lempeng diinkubasikan pada suasana *anaerob* pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam.

Bila di sekitar sumuran tidak ditumbuhi bakteri *S. mutans* (zona jernih) berarti antibodi monoklonal dalam pasta gigi tersebut efektif untuk mencegah pertumbuhan *S. mutans*.

Daerah jernih di sekeliling sumuran yang berisi pasta gigi uji, merupakan zona hambatan pertumbuhan *S. mutans*. Cara mengukur dilakukan dengan membalik lempeng petri sehingga bagian bawah menghadap ke atas dan diletakkan di atas lampu agar seluruh daerah yang jernih di sekeliling sumuran yang berisi pasta gigi uji dapat dilihat dengan jelas. Pengukuran dilakukan pada dua bagian, yaitu bagian yang mempunyai garis tengah terpanjang dan bagian yang mempunyai garis tengah terpendek. Pengukuran daya hambatan ini, dilakukan dengan menggunakan kaliper. Hasil pengukuran pada kedua bagian ini, kemudian diambil rata-ratanya.

Data yang diperoleh ditabulasi, kemudian dilakukan analisis statistik menggunakan Anova satu arah dan dilanjutkan dengan uji LSD (*Least Significant Difference*).

Hasil

Hasil pengukuran diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri *S. mutans* oleh pasta gigi bahan dasar dengan antibodi monoklonal Ig, IgG₁ dan IgG₃ dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil rerata pengukuran diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri *S. mutans* oleh pasta gigi bahan dasar dengan antibodi monoklonal IgA, IgG₁, IgG₃ dan tanpa antibodi monoklonal.

No	Pasta Gigi	N	x	SB
1	Pasta gigi bahan dasar (mm)	15	24,78	2,544
2.	Pasta gigi bahan dasar + 10 µl IgA (mm)	15	29,174	4,998
3	Pasta gigi bahan dasar - 10 µl IgG ₁ (mm)	15	29,96	3,018
4.	Pasta gigi bahan dasar - 10 µl IgG ₃ (mm)	15	27,94	2,056

Dari hasil pengukuran diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri *S. mutans* oleh pasta gigi bahan dasar dengan antibodi monoklonal IgA, IgG₁, IgG₃ diperoleh hasil semuanya mempunyai diameter zona hambatan, rerata untuk pasta gigi tanpa antibodi monoklonal 24,75mm, rerata untuk pasta gigi dengan antibodi monoklonal IgA 29,174 mm, rerata 29,96mm (IgG₁) dan rerata 27,94mm (IgG₃).

Untuk menganalisis beda zona hambatan oleh pasta gigi bahan dasar dengan dan tanpa antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃ digunakan uji statistik dengan uji Anova satu arah dan uji LSD (*Least Significant Difference*).

Penentuan adanya perbedaan antar kelompok sampel, dilakukan uji statistik Anova satu arah dengan $\alpha = 0,05$ yang hasilnya dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil uji Anova satu arah untuk beda zona hambatan oleh pasta gigi bahan dasar dengan dan tanpa antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃.

Sumber Keragaman	JK	db	Jkt	F hitung	p
Antar Perlakuan	233,802	3	77,937	6,960	0,009
Dalam Perlakuan	627,067	56	11,198		
Jumlah	860,869	59			

Keterangan :

JK = Jumlah kuadrat Jkt = Jumlah kuadrat total
db = derajat bebas p = probabilitas

Hasil analisis Anova satu arah didapatkan $p = 0,000$ yang menunjukkan adanya perbedaan bermakna ($p < 0,05$) pada pasta gigi bahan dasar dengan dan tanpa antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃. Untuk menentukan antibodi monoklonal mana yang memberikan perbedaan bermakna, dilakukan uji LSD dan hasilnya dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil uji LSD antar kelompok pasta gigi bahan dasar tanpa antibodi monoklonal dan dengan antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃ ($p = 0,05$).

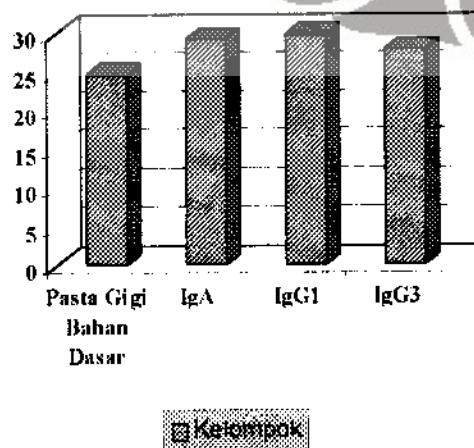
Kelompok	Tanpa antibodi monoklonal	+ IgA	+ IgG ₁	+ IgG ₃
Tanpa antibodi monoklonal	-	0,001*	0,012*	0,000*
+ IgA	0,001*	-	0,315	0,523
+ IgG ₁	0,012*	0,523	-	0,103
+ IgG ₃	0,000*	-	-	-

* = Bermakna

Hasil pada Tabel 3, menunjukkan bahwa :

- Terdapat perbedaan zona hambatan yang bermakna oleh pasta gigi bahan dasar antara kelompok tanpa penambahan antibodi monoklonal dan dengan penambahan antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃.
- Tidak terdapat perbedaan zona hambatan yang bermakna oleh pasta gigi bahan dasar antara kelompok pasta gigi bahan dasar dengan penambahan antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃.

Untuk memperjelas hasil yang didapat, dapat dilihat pada grafik pada Gambar 1.



Gambar 1. Grafik perbedaan rata-rata zona hambatan pertumbuhan bakteri *S. mutans* oleh pasta gigi bahan dasar dengan penambahan antibodi monoklonal IgA, IgG₁, IgG₃ dan tanpa penambahan antibodi monoklonal.

Pembahasan

Dalam penelitian penentuan zona hambatan pasta gigi bahan dasar dengan dan tanpa antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃ diperoleh hasil bahwa pada pasta gigi bahan dasar tanpa penambahan antibodi monoklonal sudah menunjukkan adanya zona hambatan (Tabel 1). Hal ini disebabkan karena pada pasta gigi bahan dasar mengandung Sodium Lauryl Sulfate (2% berat/berat) yang merupakan deterjen yang dapat merusak dinding sel. Bakteri Gram positif peka sekali terhadap deterjen^{15,16}.

Deterjen pada pasta gigi akan menurunkan tegangan permukaan dan melalui pengaruh emulsi dan berbusa, maka bahan-bahan tersebut akan menambah daya pembersih.¹⁷ Sehingga dengan adanya Sodium Lauryl Sulfat inilah yang menunjukkan adanya zona hambatan dari pasta gigi bahan dasar. Pada pasta gigi bahan dasar dengan penambahan antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃ sebanyak 10µl (10µl dalam 2mg pasta gigi) diperoleh hasil diameter zona hambatan lebih besar dibandingkan dengan diameter zona hambatan tanpa penambahan antibodi monoklonal (Tabel 1) dan terdapat perbedaan bermakna. Hal ini menunjukkan bahwa dengan penambahan antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃ akan meningkatkan daya antibakteri dari pasta gigi bahan dasar tersebut. Peningkatan daya antibakteri ini disebabkan karena antibodi monoklonal merupakan protein yang dikenal dengan imunoglobulin yang dibentuk oleh sel plasma yang berasal dari proliferasi sel B akibat adanya kontak dengan antigen. Antibodi yang terbentuk secara spesifik ini (imunoglobulin) akan mengikat antigen baru lainnya yang sejenis.¹⁸

Antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃ ini merupakan antibodi yang

spesifik terhadap *S. mutans* 1 (c) sehingga dengan adanya antigen yang sejenis yaitu bakteri *S. mutans* 1 (c) maka akan terjadi interaksi dan ikatan antara antigen antibodi yang akan menginaktivasi aktivitas dari antigen tersebut, sehingga dengan terjadinya inaktivasi dari bakteri *S. mutans* 1 (c) akan dapat meningkatkan daya antibakteri dari pasta gigi bahan dasar dengan adanya penambahan antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃ terhadap bakteri *S. mutans* 1 (c).

Penambahan antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃ pada pasta gigi bahan dasar memberikan hasil diameter zona hambatan yang berbeda-beda tetapi tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara pasta gigi bahan dasar dengan penambahan antibodi monoklonal IgA, IgG₁ dan IgG₃. Hal ini sesuai dengan peneliti terdahulu tentang imunisasi pasif lokal dengan antibodi monoklonal spesifik *S. mutans* yaitu antibodi monoklonal antigen I/H 185 kD dan mengatakan bahwa antibodi subkelas bukanlah faktor yang penting karena kedua antibodi monoklonal Guy's 1 dan 13 mencegah kolonisasi *S. mutans* walaupun Guy's 1 adalah antibodi kelas IgG₃ dan Guy's 13 merupakan antibodi kelas IgG₁.⁹

Peneliti lain juga mengatakan bahwa serotipe dan epitope yang spesifik dari antibodi monoklonal IgG adalah penting, tetapi subkelas IgG tidaklah penting, karena Guy's 1 yang merupakan antibodi kelas IgG_{2a} yang merupakan determinan karbohidrat dan Guy's 13 yang merupakan antibodi kelas IgG₁ yang merupakan determinan protein keduanya dapat mencegah kolonisasi dari bakteri *S. mutans*.¹²

Kesimpulan

Dari hasil penelitian eksperimental laboratoris antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1 (c) dalam pasta gigi untuk menghambat pertumbuhan *Streptococcus mutans* dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

- a. Antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA, IgG₁ dan IgG₃ dapat diformulasikan dalam pasta gigi bahan dasar
- b. Penambahan antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa IgA, IgG₁ dan IgG₃ sebanyak 10 µl dalam 2 mg pasta gigi bahan dasar dapat menghambat pertumbuhan bakteri *S. mutans*.

Daftar Pustaka

1. Slot J, Taubman MA. 1992. *Contemporary oral microbiology and immunology*. Mosby Year Book. 366-369, 377-414, 524-569.
2. Rosen S, Willet HP, White RR. *Dental caries in essential dental microbiology*. Appleton and Lange, A Publishing Division of Prentice Hall. 1991: 341-355.
3. Amerongen AV, Michels LFE, Roukema PA dan Verma ECL. 1991. *Lidah dan kelenjar ludah arti bagi kesehatan gigi*. Penerjemah Abyono R. Penyunting Surya S. Yogyakarta: Gajah Mada University Press. 23-94.
4. Lehner T. *Immunology of dental caries*. In: Lehner T. *Immunology of oral disease*. 3rd Ed. London: Blackwell Scientific Publications. 1993: 68-79.
5. Lehner T. 1992. *Immunology of oral disease. Immunologi pada penyakit mulut*. Diterjemahkan oleh Farida R. Suryadhana HG-EGC. 8-25, 61-68.
6. Cirino SM, Scantlebury S. 1998. *Dental caries in developing Countries, preventive and restorative approaches to treatment*. *Pediatric Dentistry*. NYSDJ. 32-38.
7. Nuraini P. *Prevalensi karies gigi anak usia 4-6 tahun di Kotamadya Surabaya*. Surabaya : Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. 1993: 15.
8. Mandel I. *Current concept of caries etiology*. In: Newburn E. *Cariology*. 3rd Ed. Chicago: Quintessence Publishing Co. Inc. 1989: 29-30.
9. Ma JKC, Lehner T. Prevention of colonization of streptococcus mutans by Topical Application of monoclonal antibodies in human subjects. *Archives Oral Biol* 1990; 35 : 1155-1225.
10. Kriswandini IL. *Pembuatan antibodi poliklonal terhadap komponen protein spesifik streptococcus mutans 1 serotipe c pada kelinci*. Tesis Surabaya: Universitas Airlangga. 2000

11. Soerodjo TS. *Pembuatan dan pemurnian antibodi monoklonal terhadap protein 67 kDa streptococcus mutans 1 (c)* (dalam penulisan). 2001
12. Lehner T, Caldwell J, Smith R. Local passive immunization by monoclonal antibodies against streptococcal antigen I/II in the prevention of dental caries infection and immunity. 1985; 50:796-799.
13. Soerodjo TS. *Respon imun humoral terhadap streptococcus mutans sehubungan dengan penyakit karies gigi*. Disertasi. Surabaya: Universitas Airlangga. 1989.
14. Wistreich GA, and Lechtman MD. *Laboratory exercise in microbiology*. 4th ed. London: Glencoe Publishing Co. Inc. Encino, California Collier Mac Millan Publishers. 1980: 185-187.
15. Dwidjoseputro D. *Dasar-dasar microbiology*. Jakarta: Djembatan. 1981: 51-54, 87-89, 91
16. Kidd EAM, Bechal SJ. *Dasar-dasar karies. Penyakit dan penanggulangannya*. Alih Bahasa Sumawinata N dan Faruk S. Jakarta: EGC. 1991: 99-111, 119, 153-167.
17. Tan HH. *Kesehatan mulut dalam ilmu kedokteran gigi pencegahan*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gajah Mada: Gajah Mada University Press. 1993: 275-309.
18. Baratawijaya KG. *Imunologi dasar*. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. 2000:22-33.

