

BAB 6

BAB 6

PEMBAHASAN

Hasil dari suatu penelitian hanya dapat dikatakan kredibel bila metode yang dipakai di dalam penelitian tersebut mempunyai kredibilitas yang tinggi, maka sebelum membahas inti dari penelitian ini, terlebih dahulu dibahas mengenai kredibilitas dari metode yang dipakai untuk mencapai hasil penelitian tersebut. Oleh karena itu pembahasan dari hasil penelitian akan difokuskan pada dua pokok pembahasan sebagai berikut :

- 6.1. Kredibilitas dari metode dalam penelitian ini.
- 6.2. Prevalensi serotipe yang dominan dari *S.mutans* strain Indonesia yang diperoleh dalam penelitian ini.

6.1. Kredibilitas dari metode dalam penelitian ini

Seperti dalam bab 4 metode penelitian dan bab 5 hasil penelitian, bahwa penentuan serotipe yang dominan dari *S. mutans* meliputi tahap-tahap berikut.

6.1.1. Isolasi *S.mutans* sebagai sumber antigen sampel

Pada penelitian ini *S.mutans* yang akan ditentukan serotipenya diisolasi dari lesi karies, karena *S.mutans* selalu dan banyak didapatkan pada gigi yang karies (Slot, 1992). Untuk identifikasinya ditentukan dari

sifat pertumbuhannya pada media TYC, pemeriksaan mikroskopik dan reaksi biokimia. Media TYC yang dipilih sebagai media pertumbuhannya merupakan media selektif.

Seperti dikemukakan pada hasil penelitian ini, kuman yang diisolasi dari karies gigi tersebut, baik bentuk makroskopiknya, adanya hemolisa alfa pada media agar darah, bentuk mikroskopiknya, dan hasil tes biokimianya yaitu memberikan fermentasi terhadap sukrosa, manitol, sorbitol dan esculin yang khas untuk *S. mutans*.

6.1.2 Pembuatan ekstrak antigen

Pembuatan ekstrak antigen whole cell dalam penelitian ini didasarkan pada metode baku (Estoepangestie 1994) dan untuk ekstrak antigen membran cell menurut metode baku PAU UGM 1996. Dalam tahap ini *S. mutans* sampel, *S. mutans* serotipe c (Ingbritt) dan d (Sobrinus) yang diperoleh dari Universitas Hiroshima Jepang, dilakukan ekstraksi untuk mendapatkan antigen polisakarida yang berada dalam membran sel tersebut, sebagai antigen yang bertanggung jawab dalam menentukan serotipe, hal ini sesuai dengan pernyataan dari Lehner (1992).

S. mutans untuk keperluan ekstraksi, sebaiknya dipanen pada awal dari fase stasioner atau akhir fase eksponensial yang dalam penelitian ini dicapai dalam waktu 18 jam. Hal ini sesuai dengan yang dianjurkan oleh Scopes (1994), yang menyatakan bahwa waktu untuk memanen bakteri untuk

keperluan ekstraksi protein bakteri, sebaiknya dilakukan pada fase eksponensial. Dengan demikian dari segi waktu memanen bakteri, telah memenuhi syarat-syarat untuk memperoleh ekstrak antigen yang optimal.

Dalam pembuatan ekstrak antigen whole cell dari *S. mutans* serotipe c dan d untuk imunisasi hewan coba berbeda dengan cara pembuatan ekstrak antigen *S. mutans* sampel, untuk uji serologi. Hal ini sesuai pernyataan dari Estoepangestie (1994), bahwa hasil ekstrak antigen untuk imunisasi pada hewan coba, diperlukan sifat biologi secara keseluruhan dari sel bakteri tersebut, (pelet dan supernatan), maka dalam inaktivasi, untuk menghindari kerusakan yang mendadak dipakai pemanasan dengan suhu 80°C selama 1jam ; dengan waterbath. Sedangkan ekstrak antigen untuk uji serologi memakai pemanasan 120°C, selama 20 menit dengan autoklave.

Dalam pembuatan antigen whole cell dan sel membran dilakukan sentrifus dengan kecepatan 12.000 x g dan 15.000 x g, pada suhu - 4°C, hal ini sesuai dengan pernyataan dari Garvey (1977) bahwa lemak/lipid sering mengganggu reaksi antigen antibodi. Untuk membersihkan lipid dalam ekstraksi antigen, harus menggunakan sentrifus dengan kecepatan tinggi dan dingin, sehingga lipid akan berbentuk solid diatas supernatan, dan harus cepat-cepat dibuang.

Pada proses selanjutnya dalam tahap ekstraksi antigen ditambahkan PMSF(*phenyl methyl sulfonyl fluoride*), TPCK/TLCK (*tosil phenyl methyl sulfonyl flaxyd*) yang berfungsi sebagai inhibitor protease. Penambahan

bahan ini penting dilakukan untuk mencegah rusaknya protein, karena protein mudah sekali mengalami proses degradasi yang disebabkan oleh aktivitas enzim protease. Selain bahan-bahan tersebut diatas, dalam ekstrak antigen juga ditambahkan bahan *naphthol-40* (NP-40 5%), dengan maksud untuk menghancurkan atau menghilangkan sisa lipid yang masih terjebak didalam.

Dari hasil pembahasan tersebut diatas, maka dapat disimpulkan bahwa dari segi media yang dipakai, waktu untuk memanen, cara sentrifus, penggunaan inhibitor protease yang dipakai dalam penelitian ini telah memenuhi persyaratan yang dibutuhkan untuk pembuatan antigen sel membran yang baik.

6.1.3 Imunisasi pada hewan coba

Dipilihnya hewan coba kelinci karena merupakan pilihan terbaik untuk pembuatan antibodi poliklonal, antibodi yang didapatkan cukup banyak dan mempunyai karakteristik khusus. Umur kelinci kurang lebih 4 bulan, karena menurut Garvey et al., 1977, kematangan respons imun kelinci adalah 12 minggu setelah lahir. Hasil ekstrak antigen whole cell diimunisasikan pada hewan coba kelinci secara intra vena, tanpa penambahan adjuvan, dengan interval 7 hari. Hal ini sesuai dengan pernyataan dari Harlow and lane (1988), bahwa imunisasi melalui intra vena tidak boleh ditambahkan adjuvan, karena akan menyebabkan multipel granuloma dan kematian.

Imunisasi ekstrak antigen membran cell secara sub cutan dengan penambahan adjuvan. interval penyuntikan adalah 14 hari. Interval 7 atau 14 hari sesuai dengan penelitian Garvey et al 1977 dan penelitian pendahuluan di PAU UGM, bahwa antibodi terbentuk pada hari ke 5 dan mencapai puncak antara hari ke 10 sampai ke 14.

Dosis yang diberikan harus tepat untuk menghindari terjadinya imunotoleran (bila dosis terlalu kecil) atau imunosupresif (bila dosis terlalu besar). Oleh karena itu dilakukan pengukuran kosentrasi dari ekstrak antigen dengan spektrofotometer, untuk pemberian dosis yang tepat.

Sebelum diimunisasi dilakukan pengambilan darah untuk mengetahui antibodi prakekebalan dan swab pada rongga mulutnya untuk mengetahui macam flora rongga mulut dari hewan coba (Kresno, 1984).

Dari pembahasan tersebut diatas, bila ditinjau dari prosedur dalam penelitian ini dari tahap isolasi *S.mutans* sampai dengan tahap pembuatan antigen dan antiserum, telah memenuhi persyaratan kualitas yang diperlukan.

6.1.4. Produksi antibodi poliklonal

Produksi antibodi poliklonal dari antigen whole cell menunjukkan kenaikan titer secara bertahap, sedangkan untuk antigen membran cell dengan penambahan adjuvan menunjukkan kenaikan yang tajam pada booster ketiga, hal ini sesuai dengan pernyataan dari Garvey et al., 1977 yang menyatakan bahwa bila adjuvan dicampur dengan antigen dalam injeksi, akan

mempertinggi produksi antibodi (tabel 5.1, 5.2). pada tabel tersebut juga diketahui bahwa titer pra kekebalan (sebelum imunisasi) dengan antigen whole cell maupun membran cell adalah positif. menurut Tizzard (1987) titer pra kekebalan 1/64 masih dapat dikatakan negatif, tetapi titer pra kekebalan lebih dari 1/64 dianggap positif. Tabel 5.2 untuk hewan coba dengan titer antibodi dalam serum darah hewan coba pada imunisasi 1,2,3 dan 4, dan hasil titer antibodi poliklonalnya dianggap benar-benar hasil dari imunisasi antigen membran cell *S.mutans* serotipe c dan d.

Setelah dilakukan uji bakteriologi dari flora rongga mulut sebelum imunisasi maka, 7 ekor hasilnya negatif dan 1 ekor positif. Sesudah imunisasi hasilnya adalah positif semua. hal ini tidak sesuai dengan pernyataan Devijanti dkk (1996), bahwa tidak ditemukan *S.mutans* pada flora rongga mulut hewan coba kelinci. Perbedaan ini dimungkinkan karena perbedaan spesies antara kelinci lokal dan New Zealand, sehingga mempunyai perbedaan dalam HLA, atau karena perbedaan pola makan saat dilakukan penelitian.

6.2 Prevalensi serotipe *S.mutans* strain Indonesia yang dominan pada anak-anak TK dengan karies gigi di Surabaya

6.2.1 Pemeriksaan klinis

Penelitian ini dilakukan pada anak-anak TK, suku Jawa, dipilih dari TK dengan tingkat sosial ekonomi menengah, dengan harapan dari segi ras, budaya, pendidikan, pekerjaan orang tua murid serta kesehatan gigi, dan faktor nutrisi dari murid TK tersebut adalah homogen.

Pemilihan subyek, anak TK dengan umur 4-6 tahun, dengan harapan ; yang pertama adalah semua gigi sulung sudah tumbuh sempurna. Kedua, karena gigi sulung merupakan penunjang status kesehatan anak, dimana pada gigi sulung yang sehat diharapkan anak juga mempunyai status kesehatan yang baik.

Pada pemeriksaan klinis, terlihat keadaan hygiene mulut, dengan rata-rata OHI = 1,72 (katagori kebersihan mulut sedang). Dan rata-rata def = 9,36 termasuk sangat tinggi, hal ini dikarenakan ternyata gigi sulung jarang sekali mendapatkan perhatian dan perawatan gigi dengan tumpatan, (f = filled pada def rata-rata = 0) (tabel 5.4). Mereka baru dibawa ke dokter gigi jika sudah sakit, karena *pulpitis*, *abses yang berasal dari gigi yang gangraen atau dari akar gigi*.

Hygiene mulut merupakan faktor yang penting, karena jumlah plak yang melekat pada permukaan gigi merupakan tempat pertumbuhan yang subur bagi bakteri. Oleh karena itu dari 300 anak TK yang memenuhi kriteria

sampel, setelah dilakukan pemeriksaan klinis OHI-nya, maka diperoleh 80 anak yang dapat dipilih sebagai subyek penelitian.

6.2.2. Pemeriksaan bakteriologi

Dari 80 anak TK sebagai subyek penelitian, dilakukan pengambilan plak gigi dari beberapa bagian permukaan gigi yang karies, dengan ekskavator 1,5 mm.

Dalam pemeriksaan morfologi, mikroskopik, sifat hemolisis alpha pada media agar darah, dan hasil test biokimiawi maka, ditemukan dua varian *S.mutans* yaitu *S.mutans 1 (S.m.1)* dan *S.mutans 3 (S.m.3)*. Hal ini sesuai dengan penelitian Soerodjo (1989), yang menyatakan bahwa dua dari enam varian *S.mutans* yang ditemukan yaitu *S.mutans 1* dan *S.mutans 3* mempunyai hubungan yang erat sebagai penyebab karies gigi pada anak umur 5 tahun.

Dari perhitungan jumlah koloni pada media selektif TYC, diperoleh rata-rata untuk *S.mutans 1* = 45,57 dan *S.mutans 3* = 46,81 (tabel 5.3), hal ini sesuai dengan penelitian Soerodjo (1989) yang menyatakan bahwa *S.mutans 3* mempunyai frekwensi paling banyak (61%) ditemukan pada lesi karies positif pada anak usia 5 tahun, sedangkan *S.mutans 1* mempunyai frekwensi paling banyak (93%) ditemukan pada lesi karies positif pada anak usia 15 tahun.

Dalam penelitian ini ternyata pada individu dengan kebersihan mulut (OHI) yang jelek, selalu ditemukan jumlah koloni *S.mutans* yang tinggi, tetapi jumlah koloni *S.mutans* yang tinggi tidak diikuti dengan indeks karies (def) yang tinggi maupun d (decayed) yang tinggi pula. Hal ini tidak sesuai dengan hasil penelitian Soerodjo (1989), bahwa individu dengan karies yang tinggi (decayed), diikuti dengan indeks kebersihan mulut yang jelek dan ditemukan jumlah populasi *S.mutans* yang tinggi.

Seperti diketahui, penyebab karies sangat kompleks yang merupakan interaksi antara *host* dan gigi, mikroorganisme, substrat serta waktu (Sumawinata dan faruk, 1992).

Selain itu kepekaan *host* terhadap terjadinya karies tergantung dari faktor-faktor berikut :

1. Komposisi gigi, termasuk komposisi mineral yang berpengaruh pada kualitas gigi. Mudah tidaknya gigi mengalami demineralisasi sebagai akibat dari hasil fermentasi *S.mutans* terhadap sukrosa, ditentukan oleh gigi itu sendiri.
2. Flow dan komposisi saliva, termasuk PH, bahan-bahan mineral dan antibakteri yang terkandung. flow saliva yang tinggi membantu *self cleansing*.
3. Faktor genetik (adanya HLADR w6 Positif)

4. Status imun, termasuk imunitas spesifik seperti antibodi saliva dan imunitas non spesifik seperti lisosim, peroksidase, laktoferin dan aglutinin saliva.

Melihat gambaran tersebut diatas tampak bahwa walaupun koloni *S.mutans* yang berada didalam rongga mulut individu berjumlah banyak, tetapi bisa tidak mengalami karies, bila faktor pertahanan lainnya saling menunjang. Misalnya secara genetik kualitas gigi baik, adanya HLADR W6 positif pada seseorang akan meningkatkan respons imun terhadap rangsangan antigen yang walaupun kecil, mampu memberikan respons antibodi yang cukup tinggi.

Selain itu perlekatan *S.mutans* pada gigi dapat diatasi oleh sistim imun non-spesifik. Berdasarkan pembahasan tersebut diatas dapat disimpulkan bahwa jumlah koloni *S.mutans* dalam plak, dalam kaitannya dengan karies gigi tidak mempunyai pola yang tetap.

Hasil uji serologi dari 80 sampel dengan metode RPHA dan IMG menunjukkan semua sampel adalah serotipe c (tabel 5.3), hal ini sesuai dengan pernyataan Nolte (1982) yang menyatakan bahwa serotipe d, e, f dan g dapat dideteksi dalam plak gigi dengan serotipe c paling dominan. Demikian pula dari hasil penelitian

Soerodjo (1989), dari 82 anak kelompok umur 5 tahun dan sejumlah 80 anak kelompok umur 15 tahun, semua strain *S.mutans* yang diisolasi dan

telah dilakukan serotyping di Guy's Hospital, London University, diidentifikasi sebagai serotipe c.

Hasil penelitian ini dan hasil penelitian Soerodjo (1989), dengan 100% adalah serotipe c, kemungkinan adanya persamaan dalam kriteria sampel terutama dari segi lokasi (Surabaya) dan ras (Jawa). Menurut Lehner (1992) hasil sampel *S.mutans* yang diisolasi dari berbagai lokasi dipenjuru dunia ditemukan 70% adalah serotipe c dan serotipe yang umum selanjutnya adalah serotipe d.

Bratthall (1976), menyatakan bahwa macam serotipe dari *S.mutans* juga dipengaruhi oleh faktor geografis.

6.2.3. uji serologi

Uji serologi Reverse Passif Agglutination (RPHA) dan Imunodifusi Ganda (IMG), merupakan uji pengikat sekunder, mengukur akibat pembentukan imunokompleks invitro, karena itu secara teoritis uji ini kurang peka.

Oleh karena itu dari hasil uji RPHA gambar 5.8 dan 5.9 dengan pengulangan dua kali, masih terlihat adanya 2 sumuran yang mempunyai gambaran aglutinasi pada kontrol negatif, dengan pembacaan 1+, demikian juga pada aglutinasi untuk antigen sampel dan antibodi *S.mutans* serotipe d, adanya gambaran aglutinasi yang samar-samar pada dasar mikroplate, yang oleh peneliti dianggap positif palsu (non reaktif).

Hasil uji imunodifusi ganda masih dilakukan pada 40 sampel, hal ini dikarenakan terbatasnya waktu dan beberapa kali terjadi kegagalan dalam memperoleh hasil yang maksimal. Banyak sekali faktor-faktor yang mempengaruhi terjadinya presipitasi dalam uji imunodifusi ganda, misalnya jarak sumuran, pH agar, volume, titer serta konsentrasi dari antigen dan antibodi. Dari gambar hasil imunodifusi didapatkan 1 garis presipitasi antara antibodi dalam sumuran ditengan dengan antigen sampel pada sumuran ditepi dengan penipisan $\frac{1}{2}$ dan $\frac{1}{4}$, hal ini menunjukkan adanya kesamaan antara antibodi dan antigen yang diperiksa.

Dari hasil penelitian ini dan yang telah dibahas dalam tesis, dapat disimpulkan bahwa hipotesis penelitian ini terbukti. Hasil serotyping *S. mutans* oleh Soerodjo (1989), masih relevan dengan hasil penelitian ini.