

Research Report

## Uji sensitivitas antibodi monoklonal *Streptococcus mutans* 1(c) 67 kDa (Sensitivity test of monoclonal antibodies *Streptococcus mutans* 1(c) 67 kDa)

Rizki Purnamasari Nugraheni<sup>1</sup>, Indah Listiana Kriswandini<sup>2</sup>, Anis Irmawati<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Mahasiswa S1 Pendidikan Dokter Gigi

<sup>2</sup> Staf Pengajar Departemen Biologi Oral

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga

Surabaya- Indonesia

### ABSTRACT

**Background:** Based on SKRT 2004, dental caries prevalence rate in Indonesia reached 90,05%. Local passive immunization with monoclonal antibodies is a new alternative in caries prevention. Monoclonal antibodies *S.mutans* are specific antibodies against epitope antigen *S.mutans* 67 kDa protein. Antibody and antigen bonding will inactivate epitope antigen so that the attachment of *S.mutans* can be inhibited and the number of colonies decreased. Monoclonal antibodies used in this research is a monoclonal antibody *S.mutans* 1 serotype (c) 67 kDa subclass IgA, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub> that have been made in Pusvetma, Surabaya. **Purpose:** The aim of this research is to determine whether monoclonal antibodies sensitivity against epitope antigen *S.mutans* derived from stock culture and ATCC MT8148 serotype c. **Method:** The sensitivity test of monoclonal antibodies *S.mutans* used immunodiffusion technique Ouchterlony (IDT) and single radial immunodiffusion technique (RID). The measurement sensitivity of monoclonal antibodies when there is a line or ring precipitation in agarose plate by IDT and RID technique. **Result:** There was no line or ring precipitation in IDT and RID test. This condition may be caused by several things that can damage protein molecule of monoclonal antibodies, one of the storage method is less precise. **Conclusion:** Monoclonal antibodies *S.mutans* 1 serotype (c) 67 kDa subclass IgA, IgG<sub>1</sub> and IgG<sub>3</sub> have no possess the power of sensitivity in identifying epitope antigen of *S.mutans*.

**Key words:** *S.mutans*, monoclonal antibodies *S.mutans*, epitope antigen, sensitivity.

Korespondensi (correspondence): Indah Listiana Kriswandini, Laboratorium Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga. Jl. Mayjend. Prof. Dr. Moestopo no. 47 Surabaya 60132, Indonesia.

### PENDAHULUAN

Salah satu penyakit yang paling sering terjadi di rongga mulut adalah karies gigi.<sup>1</sup> Karies gigi merupakan penyakit infeksi kronis yang disebabkan oleh flora normal rongga mulut. Karies merupakan hasil demineralisasi dari enamel maupun dentin oleh karena produksi asam yang dihasilkan *Streptococcus mutans* (*S.mutans*).<sup>2</sup> Data menunjukkan sekitar 80% penduduk Indonesia memiliki masalah pada rongga mulut, dalam hal ini yang paling banyak ditemui adalah karies gigi. Pada hampir setiap rongga mulut orang Indonesia akan ditemukan dua hingga tiga gigi berlubang.<sup>3</sup> Hasil Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) pada tahun 2004 menunjukkan bahwa tingkat prevalensi karies gigi di Indonesia mencapai 90,05%.<sup>1</sup>

Tindakan imunisasi pasif secara lokal akhir-akhir ini muncul sebagai alternatif dalam usaha pencegahan karies gigi. Salah satunya adalah dengan menggunakan antibodi monoklonal. Imunisasi pasif

secara lokal dengan antibodi monoklonal akan mengeliminasi *S.mutans* dalam waktu yang lama di dalam rongga mulut. Metode ini merupakan metode yang aman guna pencegahan kolonisasi *S.mutans* di dalam rongga mulut.<sup>4</sup>

Antibodi monoklonal *S.mutans* merupakan antibodi spesifik terhadap epitope tertentu dari antigen *S.mutans*. Prinsip kerja dari antibodi monoklonal *S.mutans* adalah dengan mengenali epitope antigen *S.mutans*.<sup>5</sup> Antigen yang spesifik akan menimbulkan interaksi dengan antibodi monoklonal, sehingga terjadi ikatan antigen dan antibodi. Adanya ikatan antara epitope *S.mutans* dan antibodi monoklonal *S.mutans* akan menginaktivasi antigen *S.mutans* yang spesifik terhadap antibodi monoklonal tersebut.<sup>4</sup> Antigen yang terinaktivasi akan menghambat perlekatan *S.mutans* ke permukaan gigi, sehingga kolonisasinya terhambat dan berefek pada penurunan jumlah *S.mutans* dalam plak gigi maupun saliva.<sup>6</sup>

Antibodi monoklonal yang digunakan dalam penelitian ini merupakan antibodi monoklonal *S.mutans* 1 serotipe (c) 67 kDa subklas IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> yang telah dibuat di Pusvetma, Surabaya oleh Soerodjo dkk pada tahun 2001. Antibodi monoklonal *S.mutans* ini kemudian disimpan di Pusvetma dari awal pembuatan hingga bulan Agustus 2010. Guna mengetahui apakah antibodi monoklonal *S.mutans* 1 serotipe (c) 67 kDa subklas IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> masih mampu mengenali epitope antigen *S.mutans*, maka dilakukan uji sensitivitas terhadap antibodi monoklonal *S.mutans* 1 serotipe (c) 67 kDa subklas IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub>. Uji sensitivitas dilakukan dengan dua cara, yaitu imunodifusi metode Ouchterlony (IDT) dan imunodifusi radial tunggal (RID).

## BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian observasional, dengan sampel penelitian berupa antibodi monoklonal *S.mutans* 1 serotipe (c) 67 kDa IgA, IgG<sub>1</sub> dan IgG<sub>3</sub> yang diproduksi di Pusvetma Surabaya dengan titer masing-masing berurutan 2,198; 2,736 dan 2,363. Penelitian ini dilakukan di lab.tuberculosis ITD Unair dan lab.mikrobiologi FKG Unair. Uji sensitivitas antibodi monoklonal dilakukan dengan dua metode yaitu IDT dan RID, dengan cara mengontakkan antibodi dengan antigen *S.mutans* stok dan ATCC MT8148 serotipe c.

Antigen *S.mutans* dapat diperoleh dari supernatan *whole cell* maupun dengan teknik sonikasi. Antigen supernatan *whole cell* diperoleh dari 5 ml kultur cair *S.mutans* yang dimasukkan kedalam tabung *sentrifuge*, kemudian dilakukan pemusingan dengan kecepatan 6000 rpm selama 10 menit. Cairan bening yang berada diatas endapan dapat digunakan sebagai antigen. Antigen *S.mutans* juga dapat diperoleh dengan memasukkan koloni *S.mutans* yang telah ditumbuhkan pada media TYC kedalam *microtube* dengan ukuran 1,5 cc dan ditambahkan larutan PBS (*Phosphat Buffer Saline*) dengan perbandingan 1:1, kemudian dilakukan sonikasi dengan kecepatan getar 30 getar/detik selama 10 menit sehingga menghasilkan suspensi *S.mutans* yang agak keruh. Suspensi ini dilakukan pemusingan dengan kecepatan 7000 rpm selama 10 menit. Cairan bening yang

berada diatas endapan merupakan supernatan dari *S.mutans* bersifat imunogenik dan dapat digunakan sebagai antigen.<sup>7</sup>

Uji IDT digunakan untuk mengetahui sensitivitas antibodi monoklonal dalam mengenali dan berikatan dengan epitope antigen *S.mutans*. Dibuat empat sumuran pada plate agarose steril, satu sumuran di tengah dan sisanya mengelilingi sumuran yang ditengah tersebut.<sup>8</sup> Sumuran yang berada ditengan diisi 30µl antigen dan ketiga sumuran lainnya diisi 30µl dari masing-masing subklas antibodi monoklonal. Plate agarose tersebut kemudian dimasukkan kedalam kotak lembab kemudian diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam.<sup>9</sup> Bila Nampak adanya garis presipitasi berbentuk tapal kuda antara sumuran antigen dan antibodi monoklonal, maka bisa dikatakan antibodi monoklonal mampu mengenali epitope antigen dan membentuk suatu ikatan imun.<sup>2</sup>

Uji RID digunakan untuk mengetahui daya sensitivitas dari antibodi monoklonal. Daya sensitivitas merupakan besarnya daya ikatan antara antibodi monoklonal dengan epitope antigen *S.mutans*. Pertama-tama dibuat tiga sumuran pada plate agarose yang telah mengandung antigen *S.mutans* sebanyak 450µl. Masing-masing sumuran diisi 30µl dari tiap subklas antibodi monoklonal, kemudian plate agarose dimasukkan kedalam kotak lembab kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.<sup>9</sup> Setelah diinkubasi diamati adanya cincin presipitasi di sekitar sumuran, kemudian diukur besarnya diameter cincin presipitasi tersebut dengan bantuan kaliper. Diameter cincin presipitasi menunjukkan konsentrasi antibodi monoklonal yang telah membentuk kompleks imun dengan antigen *S.mutans*.<sup>10</sup> Semakin besar diameter, maka semakin besar pula daya sensitivitas antibodi monoklonal.

## HASIL

Berikut adalah table hasil dari uji sensitivitas antibodi monoklonal terhadap antigen *S.mutans* :

**Tabel 1.** Hasil penelitian uji sensitivitas antibodi monoklonal *S.mutans* 1 (c) 67 kDa terhadap antigen *S.mutans* stok (laboratorium mikrobiologi FKG Unair).

No	Metode	Media	Antigen	Antibodi	Hasil
1	RID	Agarose	Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	IgA 2,198	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
2	IDT	Agarose	Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	IgA 2,198	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
3	IDT	Agarose	Error! Not a valid link.	IgA 2,198	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 1 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 1 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
4	IDT	Agarose	Supernatan <i>whole cell</i> 2 Mc.F	IgA 2,198	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 2 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 2 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
5	IDT	Agarose	Supernatan <i>S.mutans</i> 0,5 Mc.F (sonikasi)	IgA 2,198	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>S.mutans</i> 0,5 Mc.F (sonikasi)	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>S.mutans</i> 0,5 Mc.F (sonikasi)	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
6	Difusi sederhana	TYC	<i>S.mutans</i> 0,5 Mc.Farland (teknik <i>stricked</i> )	IgA 2,198	Zona hambat (-)
			<i>S.mutans</i> 0,5 Mc.Farland (teknik <i>stricked</i> )	Error! Not a valid link.	Zona hambat (-)
			<b><i>S.mutans</i> 0,5 Mc.Farland (teknik <i>stricked</i>)</b>	<b>Error! Not a valid link.</b>	<b>Zona hambat (-)</b>

**Tabel 2.** Hasil penelitian uji sensitivitas antibodi monoklonal *S.mutans* 1 (c) 67 kDa terhadap antigen *S.mutans* ATCC MT8148 serotype c.

No	Metode	Media	Antigen	Antibodi	Hasil
1	RID	Agarose	Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	IgA 2,198	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
2	IDT	Agarose	Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	IgA 2,198	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 0,5 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
3	IDT	Agarose	Error! Not a valid link.	IgA 2,198	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 1 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 1 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
4	IDT	Agarose	Supernatan <i>whole cell</i> 2 Mc.F	IgA 2,198	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 2 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>whole cell</i> 2 Mc.F	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
5	IDT	Agarose	Supernatan <i>S.mutans</i> 0,5 Mc.F (sonikasi)	IgA 2,198	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>S.mutans</i> 0,5 Mc.F (sonikasi)	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
			Supernatan <i>S.mutans</i> 0,5 Mc.F (sonikasi)	Error! Not a valid link.	Presipitasi (-)
6	Difusi sederhana	TYC	<i>S.mutans</i> 0,5 Mc.Farland (teknik <i>stricked</i> )	IgA 2,198	Zona hambat (-)
			<i>S.mutans</i> 0,5 Mc.Farland (teknik <i>stricked</i> )	Error! Not a valid link.	Zona hambat (-)
			<b><i>S.mutans</i> 0,5 Mc.Farland (teknik <i>stricked</i>)</b>	<b>Error! Not a valid link.</b>	<b>Zona hambat (-)</b>

Dari perlakuan ke-1 hingga ke-5 dengan teknik IDT maupun RID, baik pada *S.mutans* stok maupun *S.mutans* ATCC MT8148 serotype c tidak menunjukkan adanya presipitasi. Kemudian dilakukan perlakuan ke-6 yaitu dengan menggunakan metode difusi sederhana. Pada perlakuan ke-6 ini antibodi dikontakkan langsung dengan koloni *S.mutans*, kemudian dilihat apakah antibodi masih mampu mengenali epitope antigen

*S.mutans* yang ada di sekitar dinding sel. Bila antibodi dapat mengenali epitope antigen sehingga terbentuk suatu ikatan imun, maka dapat akan didapatkan zona hambat pada plate TYC disekitar *paper disc* antibodi. Pada perlakuan ke-6 juga tidak menunjukkan hasil yang dapat menunjang hipotesis penelitian, yaitu tidak didapatkan adanya zona hambat satupun disekitar *paper disc* antibodi.

## PEMBAHASAN

Uji sensitivitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa dilakukan dengan menggunakan dua cara, yaitu dengan Imunodifusi radial tunggal (RID) serta teknik teknik Imunodifusi metode Ouchterlony (IDT). Teknik imunodifusi radial tunggal (RID) digunakan untuk mengetahui perbandingan daya sensitivitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa antar subklas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub>. Daya sensitivitas antibodi monoklonal pada imunodifusi radial tunggal dilihat dari besarnya diameter cincin presipitasi yang dihasilkan.<sup>10</sup> Teknik imunodifusi metode Ouchterlony (IDT) digunakan untuk mengetahui apakah antibodi monoklonal *S. mutans* memiliki keidentikan dengan antigen *S. mutans*.

Pada uji sensitivitas antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa subklas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> yang telah dilakukan, baik dengan teknik Imunodifusi metode Ouchterlony (IDT) maupun Imunodifusi radial tunggal (RID) tidak didapatkan adanya garis atau cincin presipitasi pada plate. Hal ini menunjukkan bahwa antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa subklas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> tidak memiliki kemampuan untuk mengenali epitope antigen *S. mutans* yang ada, sehingga dapat dikatakan antibodi monoklonal *S. mutans* 1 (c) 67 kDa subklas IgA, IgG<sub>1</sub>, dan IgG<sub>3</sub> tidak memiliki daya sensitivitas sama sekali dalam mengenali epitope antigen *S. mutans*.

Penelitian sebelumnya yang telah dilakukan oleh Devijanti dkk<sup>4</sup>, diantara ketiga subklas antibodi monoklonal, hanya IgG<sub>3</sub> yang telah dicampur dengan pasta gigi tanpa deterjen yang memiliki zona hambat terhadap *S. mutans*. Zona hambat antibodi monoklonal subklas IgG<sub>3</sub> terhadap *S. mutans* menunjukkan bahwa antibodi monoklonal subklas IgG<sub>3</sub> mampu mengenali epitope antigen dan berinteraksi sehingga antigen *S. mutans* menjadi inaktif. Inaktivasi antigen oleh antibodi akan menghambat perlekatan dari *S. mutans* sehingga berefek pada jumlah kolonisasinya yang menurun.<sup>6</sup> Jumlah kolonisasi yang menurun ini dapat dilihat dari adanya zona hambat di sekitar sumuran antibodi. Terbentuknya zona hambat tersebut selain dikarenakan daya sensitivitas yang dimiliki oleh antibodi monoklonal subklas IgG<sub>3</sub>, kemungkinan juga dikarenakan oleh efek sinergis dari pasta gigi yang digunakan dalam penelitian. Pasta gigi tersebut mengandung suatu enzim yang dapat membantu mengendalikan pertumbuhan bakteri di dalam rongga mulut.<sup>4</sup>

Dua antibodi monoklonal pada subklas lainnya, yaitu IgA dan IgG<sub>1</sub> tidak didapatkan zona hambat terhadap *S. mutans* seperti yang ada pada subklas IgG<sub>3</sub>. Tidak adanya zona hambat tersebut menunjukkan bahwa antibodi monoklonal subklas IgA dan IgG<sub>1</sub> tidak mampu mengenali epitope antigen *S. mutans* dan membentuk suatu ikatan imun. Hal ini semakin memperkuat dugaan bahwa antibodi monoklonal subklas IgA dan IgG<sub>1</sub> memang tidak memiliki daya sensitivitas terhadap antigen *S. mutans*.

Dari uraian di atas, maka seharusnya pada antibodi monoklonal subklas IgG<sub>3</sub> masih memiliki daya sensitivitas dalam mengenali epitope antigen. Akan tetapi, pada uji sensitivitas yang telah dilakukan menunjukkan bahwa antibodi monoklonal subklas IgG<sub>3</sub> juga tidak memiliki daya sensitivitas seperti yang ditunjukkan pada subklas IgA dan IgG<sub>1</sub>. Tidak adanya daya sensitivitas dari antibodi monoklonal subklas IgG<sub>3</sub> dalam mengenali epitope antigen *S. mutans* dapat dikarenakan oleh beberapa hal yang dapat mengakibatkan protein dalam antibodi monoklonal rusak. Hal ini akan mempengaruhi aktifitas biologis dari antibodi monoklonal itu sendiri.

Hal yang perlu diperhatikan dalam mempertahankan aktifitas biologis dari antibodi monoklonal adalah cara penyimpanan antibodi monoklonal, sehingga protein dalam antibodi masih tetap stabil dan tidak terjadi kontaminasi. Antibodi monoklonal seharusnya disimpan dalam pendingin dalam bentuk aliquot-aliquot kecil, untuk kondisi penyimpanan yang optimal dan dikemas dalam *microtube*. Pengemasan dalam bentuk aliquot juga meminimalisir kontaminasi oleh mikropipet saat antibodi digunakan kembali dalam penelitian. Volume antibodi monoklonal yang disimpan dalam *microtube* idealnya tidak lebih kecil dari 10µl atau menyesuaikan dengan kebutuhan pada waktu penelitian.<sup>11</sup>

Untuk menghindari kontaminasi dengan bakteri lain, antibodi monoklonal ditambahkan dengan sodium azide sebanyak 0,02% hingga 0,05% dari konsentrasi antibodi monoklonal. Alternatif lainnya selain menggunakan sodium azide adalah dengan menggunakan thimerosal 0,01%.<sup>11</sup> Antibodi monoklonal yang telah dikemas dalam *microtube* diletakkan dalam wadah kedap cahaya, karena hampir semua antibodi tidak stabil terhadap cahaya. Untuk penyimpanan jangka panjang (> 5 tahun) antibodi monoklonal seharusnya disimpan pada suhu -80°C. Efek dari penyimpanan jangka panjang ini adalah penurunan aktifitas biologis dari antibodi

sebanyak 50% dari awalnya. Penyimpanan pada suhu -20°C dalam jangka waktu yang lama akan meningkatkan resiko terjadinya penurunan aktifitas biologis antibodi monoklonal karena telah terjadi denaturasi pada proteinnya.<sup>12</sup>

Antibodi monoklonal sebaiknya tidak dilakukan pembekuan secara berulang kali, hal tersebut akan menyebabkan denaturasi protein pada antibodi oleh karena pembentukan agregat yang akan menurunkan *binding capacity* antibodi. Dengan alasan yang sama seperti di atas, sebaiknya antibodi disimpan dalam lemari pendingin yang memiliki fluktuasi perubahan suhu minimal, karena pada dasarnya protein sangat sensitif terhadap perubahan suhu.<sup>13</sup>

Penambahan cryoprotectant seperti gliserol atau etilen glikol sebanyak 25%-50% dari konsentrasi antibodi monoklonal dapat membantu mencegah terbentuknya kristal es pada antibodi selama penyimpanan. Kristal es yang terbentuk akan mempengaruhi kestabilan dari antibodi monoklonal, karena akan merusak struktur protein itu sendiri.<sup>14</sup> Penambahan gliserol ke dalam antibodi monoklonal harus dilakukan dengan hati-hati dan prosedur yang aseptis, karena gliserol sendiri rentan terhadap kontaminasi mikroorganisme.<sup>11</sup>

Selain faktor-faktor tersebut di atas, kemungkinan lain yang menyebabkan tidak adanya daya sensitivitas pada antibodi monoklonal adalah konsentrasi dari antibodi monoklonal yang digunakan terlalu kecil. Atau tidak ada keseimbangan proporsi antara antibodi monoklonal dan antigen *S.mutans*.

#### DAFTAR PUSTAKA

1. BSMI. 2008. BSMI Jakarta Pusat – YDSF Gelar Kartini Sehat. Sumber: <http://bsmi-surabaya.or.id>. Akses 10 Mei 2010, 23.51 WIB.
2. Arora DR. Textbook of microbiology for dental student. Singapore: Alkem Co. (s) Pte, Ltd; 2009.p.101,362-3.
3. Kawuryan U. 2008. Hubungan pengetahuan tentang kesehatan gigi dan mulut dengan kejadian karies gigi anak SDN Kleco II kelas V dan VI Kecamatan Laweyansurakarta. Sumber: <http://etd.eprints.ums.ac.id> Akses 18 Juni 2010 , 19.24 WIB.
4. Devijanti R, Budi M, Indrawati R. 2005. Antibodi monoklonal streptococcus mutans dalam pasta gigi tanpa deterjen sebagai penghambat pertumbuhan Streptococcus mutans. Laporan Penelitian DIPA PNBPN UNAIR th.2005.
5. Russell MW, Harrington DJ and Russell Roy RB. Identity of Streptococcus mutans surface protein antigen III and wall associated protein antigen. Infection and Immunity 1995;733-5.
6. Soerodjo, Tien S, Devijanti R, Qomarjiah N, Andayani S, Artama. Antibodi monoklonal IgA, IgG terhadap S. mutans (1,c) Indonesia untuk prevalensi karies gigi. Usulan Hak Paten2001.
7. Kriswandini IL. Protein spesifik Streptococcus mutans 1 (c) lokal sebagai protein imunogenik. Dental Journal 2000;33:4:129-32.
8. Imgenex India PVT. 2010. Single radial immunodiffusion kit contains standart reagents and protocol. Available from: <http://www.imgenexindia.com/admin/uploads/IMI-KIT-1011a-b-c.pdf> Accessed May 29, 2010.
9. Lab 5. 2010. Precipitation. Available from: <http://www.life.umd.edu>. Accessed May 8, 2010.
10. Mayer G. 2009. Immunoglobulins-antigen-antibody reactions and selected test. Sumber: Microbiology and Immunology On-line University of South Carolina School of Medicine. Available from: <http://pathmicro.med.sc.edu>. Accessed May 28, 2010.
11. Abcam. 2010. Antibody storage guide – guidelines for the storage of different types of antibody, avoiding contamination or damage. Abcam, plc Technic. Available from: <http://www.abcam.com>. Accessed Nov 18, 2010.
12. Aves Labs Inc. 2010. Antibody storage recommendations. Available from: <http://www.aveslab.com>. Accessed Nov 18,2010.
13. Pacific Immunology. 2010. Antibody storage. Pacific Immunology, California. Available from: <http://www.pacificimmunology.com> Accessed Nov 19, 2010.
14. Pierce Biotechnology, 2010. Protein stability and storage. In: Thermo Scientific Pierce Biotechnology. Available from: <http://www.piercenet.com>. Accessed Nov 18, 2010.

