

Ceramah ilmiah rutin

F.K.G. UNAIR

Sabtu, 2 Februari 1985.

R
616.01 Microbiology
Soe
P.

PENELITIAN IN VITRO PERBEDAAN pH LACTOBACILLUS SP.
DAN STREPTOCOCCUS MUTANS YANG BERASAL DARI GIGI KARIES
DALAM MEDIA DENGAN SUKROSE.

Oleh:

Tien Soesmiati Soerodjo

Lab. Mikrobiologi Mulut

Jurusan Ilmu Kedokteran Gigi

Dasar, F.K.G. UNAIR.

MILIK
PERPUSTAKAAN
"UNIVERSITAS AIRLANGGA"
SURABAYA

100/H/85

PENDAHULUAN

Karies gigi ialah penyakit dari jaringan keras gigi yang terjadi pada bagian tertentu dari gigi, misalnya pada fisura, permukaan oklusal atau labial, bukal dan lingual. Berbagai teori mengenai proses karies gigi telah dikemukakan, akan tetapi teori "acid decalcification" dari Miller (1890) hingga sekarang masih populer. Pada karies mula-mula terjadi "acid decalcification" - atas enamel yang kemudian dapat menjalar sampai ke jaringan dentin yang merupakan matrix organik melalui proses proteolitik. Penurunan pH menjadi 5,6 oleh beberapa macam kuman "acidigenic" dan "aciduric" menyebabkan hidrolisis dari fosfoprotein enamel oleh fosfoprotein fosfatase, yang dapat mempercepat proses pelarutan enamel.

Semula *Lactobacillus* (1930) diduga bakteri penyebabnya, tetapi kemudian dikatakan bahwa *Streptococcus mutans* lebih bersifat - "cariogenic" (Orland 1955, Krasse, 1966 dll.).

Telah diketahui bahwa karies gigi ialah penyakit yang mempunyai berbagai penyebab ("multifactorial"), dimana tiga faktor terpenting ialah adanya kuman yang "cariogenic", substrat hidrat arang terutama sukrose dan kepekaan host. Walaupun pengaruh fermentasi karbohidrat lain seperti glukose, arabinose, laktose dll. - tidak dapat diabaikan.

KUMAN YANG PALING BERPERAN PADA KARIES GIGI

Teori terdahulu mengatakan, bahwa karies gigi ialah suatu penyakit infeksi yang tidak spesifik penyebabnya dan pH kritis - mungkin disebabkan oleh beberapa species kuman-kuman "acidogenic" dan "aciduric" dalam rongga mulut. Disebutkan bahwa *Lactobacillus* sp. lebih terlibat dalam kelanjutan lesi karies, sedangkan *Streptococcus mutans* terlibat dalam permulaan terjadinya karies (Krasse & Newbrun, 1982).

Lactobacilli telah dapat diasingkan 24x dari 25 gigi-gigi dengan karies dentin, dengan menggunakan media non-selektif dan melakukan penanaman sampel lesi karies dentin (Shovlin and Gillis, 1969).

MILIK
PERPUSTAKAAN
"UNIVERSITAS AIRLANGGA"
SURABAYA

Salah satu species *Lactobacillus* yang disebutkan "cariogenic" ialah *L.casei* (Marsh, 1982).

Beberapa peneliti mengatakan bahwa *Streptococcus mutans* lebih cariogenic dari pada *Lactobacillus* sp. (Orland, 1955 ; Fitzgerald dan Keyes, 1960 ; Krasse, 1960 ; Murchison et al, 1982). *Streptococcus mutans* dikatakan juga bersifat paling "cariogenic" (Clarke, 1924) walaupun eksperimen pada binatang yang bebas kuman, baru dikerjakan pada tahun 1950 dan 1960.

METODE DAN CARA KERJA

Isolasi kuman : untuk mempercepat pengasingan kuman perlu digunakan media selektip dan disamping itu masih dibutuhkan media penunjang untuk kepastian identifikasi. Media selektip yang dipilih untuk *Lactobacillus* ialah Kulp's tomato juice agar dari Oxoid (1973).

Media selektip yang dipilih untuk *Streptococcus mutans* ialah media dari Stoppelaar, yang menunjukkan koloni *Streptococcus mutans* yang berkonsistensi keras, yang mudah dapat dibedakan dengan koloni *Streptococcus* lain yang lunak.

SIFAT BAKTERI YANG BERHUBUNGAN DENGAN IDENTIFIKASI

Lactobacillus disebutkan sebagai batang yang gram positif, tidak bergerak, tidak membuat spora, tidak tahan asam, "aerobic" dan "facultatively anaerobic", catalase negatif, tumbuh baik pada suhu pH 6 dan fermentasi gula-gula (Cowan and Steel's , 1977).

Streptococcus disebutkan sebagai coccus yang gram positif, tidak bergerak, "aerobic" atau "facultatively anaerobic", fermentasi beberapa karbohidrat tanpa pembentukan gas.

Sejak tahun 1920 dikenal pembagian *Streptococcus* dalam alpha, beta, dan gama, sesuai dengan sifat hemolisis dalam media darah. *Streptococcus* dalam jalan pernafasan bagian atas rongga mulut sebagian besar termasuk *Streptococcus viridans* (Cowan and Steel's, 1977).

Pertama-tama dilakukan pengasingan kedua species *Streptococcus*

dan *Lactobacillus* dari gigi dengan karies media, yang setelah pengambilan bahan, langsung ditanam dalam Brain heart infusion broth (B.H.I).

Beberapa jam kemudian dilakukan penanaman pada media selektip. Untuk *Lactobacillus* dipakai Kulp's tomato juice agar sesuai formula Oxoid.

Untuk mengasingkan *Streptococcus mutans* digunakan media dari Stoppelaar dan perbenihan agar darah. Cara inkubasi dilakukan dalam "anaerobic jar" dengan gaspak B.B.L. dan indikator. Waktu inkubasi memerlukan 2 x 24 jam sampai 3 x 24 jam, untuk dapat membedakan morfologi koloni yang khas. Kemudian dilakukan pemurnian kultur secara tanam ulang beberapa kali, sampai memperoleh kultur yang sungguh murni.

Disamping pemeriksaan koloni yang sama, juga dilakukan pemeriksaan mikroskopik melalui preparat Gram.

Setelah memperoleh kultur murni dari masing-masing *Lactobacillus* sp. dan *Streptococcus mutans*, penanaman dilakukan untuk keduanya dalam B.H.I. selama 2 x 24 jam, 37°C secara "anaerobic" dengan gaspak dan indikator. Kultur tersebut digunakan untuk pengukuran derajat asam dari kedua "micro-organisms" dalam media yang mengandung sukrose.

Media tersebut dipersiapkan dengan pH 7,2 dengan indikator phenolred. Dipersiapkan satu seri dari 15 tabung à 5 cc media dengan sukrose, yang masing-masing ditanami dengan 100^uL *Lactobacillus* sp. Juga dipersiapkan seri kedua dari 15 tabung a 15 cc media dengan sukrose, yang masing-masing ditanami dengan *Streptococcus mutans*.

Penilaian pH maupun cara pertumbuhan kuman dinilai setelah masa inkubasi 1 x 24 jam, 2 x 24 jam dan 3 x 24 jam dengan penanaman secara "anaerobic", sesuai dengan cara yang telah disebutkan di atas.

Praeparat Gram menggambarkan *Lactobacillus* sp. sebagai batang tebal, ukuran sedang, mempunyai susunan seperti palisade dan bersifat Gram positif. *Streptococcus mutans* terlihat sebagai cocci yang bulat lonjong, tersusun dalam rantai dan bersifat Gram positif.

Untuk media fermentasi sukrose, dilakukan penambahan pada media lazimnya dengan "yeast extract" menurut de Stoppelaar, untuk mempercepat proses fermentasi.

Pada hari ke-2, hari ke-3 dan hari ke-4, pH diukur dan cara pengukuran dilakukan dengan meneteskan 15^uL kultur atas kertas indikator.

Pengamatan dilakukan beberapa menit setelah penetésan dengan bahan kultur, setelah dalam keadaan kering yang disesuaikan dengan standar.

Kertas pH yang digunakan ialah dari Merck Spezial Indikator, dengan ukuran pH 4,0 - 7,0 dan pH 5,2 - 7,2 .

H A S I L

Pengamatan setelah masa inkubasi tertentu pada suhu 37°C, dilakukan sebagai berikut :

pH permulaan dari media steril : 7,2

	24 jam	48 jam	72 jam inkubasi
pH Lact.	: 7,0	pH Lact. : 7,0	pH Lact. : 7,0
pH Strep.	: 5,3	pH Strep. : 4,3	pH Strep. : 4,3

Hasil tes fermentasi *Lactobacillus* sp. atas sukrose pada 15 tabung reaksi semuanya sama (n : 15, \bar{x} : 7,0). pH terminal *Lactobacillus* sp. : 7,0 setelah 2 x 24 jam. Keadaan pH : 7,0 terlihat pada inkubasi 1 x 24 jam. Hasil tes fermentasi *Streptococcus mutans* atas sukrose pada 15 tabung reaksi semuanya sama (n : 15, \bar{x} : 5,3 dan \bar{x} : 4,3).

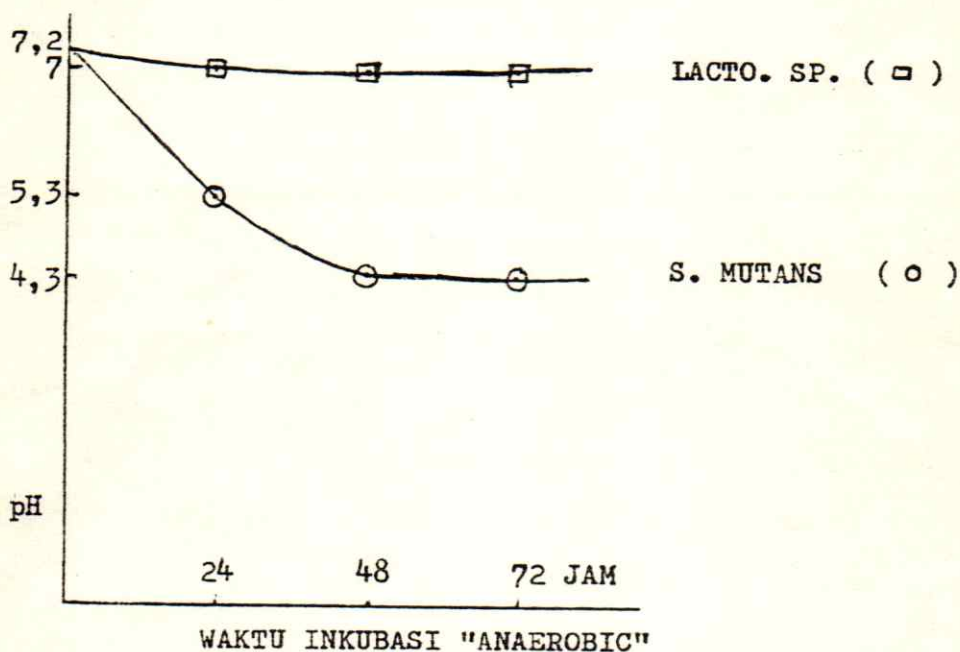
pH terminal *Streptococcus mutans* 4,3 , setelah 2 x 24 jam dan terlihat pH 5,3 pada inkubasi 1 x 24 jam.

GAMBARAN MIKROSKOPIK

Lactobacillus sp. setelah hari ke-3 mengalami mutasi morfologi sel sebagai filamen yang gram positif. *Streptococcus mutans* setelah hari ke-3 mengalami perubahan hanya dalam susunan rantai yang lebih pendek, misalnya hanya terlihat berdua. Morfologi sel tetap seperti coccus bulat lonjong yang gram positif.

Gambar 1 :

GRAFIK pH DAN WAKTU INKUBASI



Lactobacillus sp. dengan pH (\bar{x}) = 7,0 , 1 x 24 jam dengan kriteria : $p > 0,10$

Lactobacillus sp. dengan pH terminal (\bar{x}) = 7,0 , 2 x 24 jam - dengan kriteria : $p > 0,10$.

Streptococcus mutans dengan pH (\bar{x}) : 5,3 , 1 x 24 jam dengan kriteria : $p < 0,01$

Streptococcus mutans dengan pH terminal (\bar{x}) : 4,3 , 2 x 24 jam dengan kriteria : $p < 0,01$.

DISKUSI

Lactobacillus sp. dan Streptococcus mutans telah dibedakan dalam sifat fermentasi sukrose, sehubungan dengan penyakit karies gigi.

Uraianya ialah sebagai berikut :

A. Setelah waktu inkubasi 24 jam terlihat perbedaan pH :

1. Pada Streptococcus mutans, beda antara 7,2 - 5,3 = 26%
2. Pada Lactobacillus sp. , beda antara 7,2 - 7,0 = 2,7%
3. Beda antara Streptococcus sp. - Lactobacillus sp. :
(26 - 2,7)% = 23,3%

$$p \ll 0,01$$

B. Setelah waktu inkubasi 48 jam terlihat perbedaan pH :

1. Pada Streptococcus mutans, beda antara 7,2 - 4,3 = 40%
2. Pada Lactobacillus sp. , beda antara 7,2 - 7,0 = 2,7%
3. Beda antara Streptococcus sp. - Lactobacillus sp. :
(40 - 2,7)% = 37,3%

$$p \ll 0,01$$

Sesuai dengan keadaan tersebut diatas, maka dapat diambil kesimpulan bahwa perubahan pH dalam waktu inkubasi 24 dan 48 jam untuk Lactobacillus sp. dikatakan tidak bermakna ($\alpha = 0,10$). Perubahan pH dalam waktu inkubasi 24 jam dan 48 jam untuk Streptococcus mutans sangat bermakna ($\alpha = 0,01$).

Untuk penilaian perbedaan pH antara Streptococcus mutans dan Lactobacillus sp. juga bermakna.

Sehubungan dengan hasil tersebut diatas, mungkin Lactobacillus sp. lebih sukar menyesuaikan pada pH : 7,2 , sehingga pertumbuhannya sangat lambat yang menyebabkan penurunan pH yang sedikit. Sedangkan Streptococcus mutans dengan cepat mengadakan fermentasi sukrose, sehingga menurunkan pH : 5,3 dalam waktu 1 x 24 jam, kemudian turun lagi menjadi 4,3 setelah waktu inkubasi 2 x 24 jam.

Dikatakan bahwa Streptococcus mutans ialah sebagai penyebab "initial lesion", dan Lactobacillus sp. sebagai "secondary invader" pada penyakit karies gigi.

Akan tetapi masih perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai sifat fermentasi karbohidrat lain, atau suatu pengamatan melalui pH permulaan yang berbeda.

RINGKASAN

Telah dilakukan percobaan untuk mengetahui apakah ada perbedaan pH yang ditimbulkan oleh *Lactobacillus* sp. dan *Streptococcus mutans*, dalam media dengan sukrose. pH permulaan ialah 7,2 yang sangat sesuai dengan situasi didalam rongga mulut.

Hasilnya menunjukkan bahwa :

Lactobacillus sp.

1. Pertumbuhan lebih lambat
2. pH 7,2 bukan optimum
3. pH terminal (\bar{x}) : 7,0
4. Penurunan pH tidak bermakna

Streptococcus mutans

1. Pertumbuhan lebih cepat
2. pH 7,2 pertumbuhan baik
3. pH terminal (\bar{x}) : 4,3
4. Penurunan pH bermakna .

Penilaian perbedaan pH antara *Streptococcus mutans* dan *Lactobacillus* sp. juga bermakna.

Masih perlu diadakan percobaan lebih lanjut mengenai reaksi fermentasi dengan beberapa karbohidrat lain atau dengan pH permulaan yang berbeda.

SUMMARY

An experiment had been done to know whether there was some difference between the pH of *Lactobacillus* sp. and *Streptococcus mutans* using sukrose in the fermentation tests.

The experiment was done using a starting pH : 7,2 , as this would be near the situation in the oral cavity.

The result was as follows :

Lactobacillus sp.

1. Slow growth
2. pH : 7,2 Slow growth
3. terminal pH (\bar{x}) : 7,0
4. Non Significant decrease in pH.

Streptococcus mutans

1. Fast growth
2. pH : 7,2 Good growth
3. terminal pH (\bar{x}) : 4,3
4. Significant decrease in pH.

More experiments are still needed using other carbohydrates in the fermentation tests and taking in consideration of choosing the starting pH.

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih penulis sampaikan kepada :

Prof. dr. Soeharto Setokoesoemo

Prof. dr. Hoepoediono Soewondo, MPH

Dr. I Gusti Ngurah Rai

yang telah memberikan saran-saran yang berharga.

.....

PERPUSTAKAAN
"UNIVERSITAS AIRLANGGA"
SURABAYA

DAFTAR PUSTAKA

1. Cowan, S.T. and Steel's (1977) : Manual for the identification of Medical bacteria. Cambridge University press. Cambridge, New York, Melbourne. p.51-55, 60-61.
2. Fitzgerald, R.J. and Keyes, P.H. (1960) : Demonstration of the etiologic role of Streptococci in experimental caries in hamster. The journal of the American Dental Association, vol. 61.
3. Green, G.E. et al (1957) : Comparative microflora of developing dental plaque in caries-immune and susceptible individuals. J.D.Res. vol. 36 no.3 .
4. Krasse, B. and Newbrun, E. (1982) : Objective methods for evaluating caries activity and their application. In Stuart, R.E et al Pediatric Dentistry. The C.V. Mosby Company, St. Louis - Toronto - London. p. 610-615.
5. Marsh, P. (1982) : Oral Microbiology. Thomas and Sons Limited Surrey, England. p. 68-72.
6. Melville, T.H. & Slack, G.L. (1960) : Family Lactobacillaceae. The lactic acid bacteria. In Bacteriology for Dental students London, William Heinemann-Medical books L.T.D. p. 135-146.
7. Nolte, W.A. (1977) : Oral Microbiology with basic Immunology. The C.V. Mosby Company, Saint Louis. p. 515-532.
8. Oxoid Manual (1973) : Culture media. Ingredients and other Laboratory services. 3th edit., Oxoid Limited Southwark, Bridge Road, London. p. 234.
9. Shovlen, F.E. and Gills, R.E. (1969) : Biochemical and antigenic studies of Lactobacilli isolation from deep dentinal caries. J.Dent.Res. vol.48 no.3.
10. Snyder, M.L. et al (1956) : Evaluation of Laboratory tests - for the estimation of caries activity. J.Dent.Res. vol. 35 no. 3.

.....

