

BAB 4

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1. Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian observasional analitik dengan pendekatan cross sectional. Data pada penelitian ini merupakan data primer (Zainudin, 1988).

4.2. Populasi, Sampel, Unit analisis dan Besar sampel

Populasi penelitian adalah seluruh anak T.K di Surabaya.

Sampel penelitian adalah anak TK di Surabaya dengan kriteria sebagai berikut:

1. Anak laki/perempuan dengan karies gigi
2. Umur 4-6 tahun dengan jumlah gigi sulung lengkap
3. Sehat dan tidak sedang mendapat pengobatan antibiotika dalam 1 minggu terakhir
4. OHI (*Oral Higiene Indeks*), sedang

Unit analisis penelitian adalah *S.mutans* dalam plak anak T.K yang karies

Besar sampel

Oleh karena jumlah unit populasinya diketahui (*finitive*), dan yang diduga adalah proporsi kejadian, maka untuk mengetahui besarnya sampel, menggunakan rumus harga proporsi sebagai berikut :

$$n = \frac{N \cdot Z \cdot p \cdot q}{d \cdot (N - 1) + Z \cdot p \cdot q}$$

p = Estimator populasi 70 : 30

q = 1 - p

Z = Harga standard normal, tergantung dari harga alfa yang digunakan memakai alfa= 0,05, maka Z = 1,976

d = Penyimpangan yang ditolerir (ditentukan peneliti=10%)

N = Jumlah unit populasi (jumlah anak TK se Surabaya = 58080).

Dari harga-harga ini didapatkan n = 80 (Zaiunuddin 1988)

4.3.VARIABEL SAMPEL

4.3.1.Klasifikasi variabel

Variabel yang diteliti : Macam serotipe *S.mutans*

Variabel kendali : a. Usia

b. Tidak minum antibiotik 1 minggu sebelum pemeriksaan

c. OHI-S

4.3.2. Definisi operasional variabel :

Prevalensi serotipe *S.mutans* yang dominan adalah prevalensi untuk *S.mutans* serotipe c dan d, untuk 6 serotipe yang lain (a, b, c, f, d, g) tidak digunakan sebagai uji serologi dalam penelitian ini, karena hanya *S.mutans* serotipe c serta d sebagai penyebab karies gigi pada manusia. Dan dari hasil



penelitian di Inggris, Swedia, Amerika serta Jepang, *S.mutans* serotipe c dan d merupakan serotipe yang dominan sebagai penyebab karies gigi.

Indeks karies gigi untuk gigi sulung dinyatakan dengan def-t (*decayed, exfoliated, filled-tooth*) = d + e + f

d = Jumlah gigi karies yang tidak atau belum ditambah

e = Jumlah gigi karies yang sudah / seharusnya dicabut tetapi gigi permanen penggantinya masih lama tumbuh

f = Jumlah gigi yang sudah ditambah

Pada anak-anak, hilangnya gigi sulung secara alamiah, karena trauma atau perawatan ortodonti, bisa diabaikan dari perhitungan indeks dan hanya karena gigi karies serta ditambah yang diperhitungkan (Kidd & Joyston 1987).

Penggolongan karies berdasarkan keparahan, menurut klasifikasi WHO (Sutadi, 1990) :

def-t karies sangat rendah	0,0 - 1,1
def-t karies rendah	1,2 - 2,6
def-t sedang	2,7 - 4,4
def-t tinggi	4,5 - 6,5
def-t sangat tinggi	6,6 - lebih

Indeks kebersihan rongga mulut (*ral hygiene Indeks Simplified / OHI-S*) ditentukan dengan perhitungan sebagai berikut : OHI-S = DIS + CIS (*Oral Health Surveys-WHO 1971 cit Kusumaningsih 1997*).

Indeks Debris (DIS) yaitu pemeriksaan debris pada permukaan gigi 6 kanan, 6 kiri rahang atas; 6 kanan 6 kiri rahang bawah; 1 kanan rahang atas; 1 kiri rahang bawah dengan kriteria skor debris sebagai berikut :

- 0 = Tidak ada debris atau stain
- 1 = Debris lunak menutupi kurang lebih 1/3 permukaan gigi atau terdapat stain tanpa debris.
- 2 = Debris menutupi lebih dari 1/3 tetapi kurang dari 2/3 permukaan gigi
- 3 = Debris menutupi lebih dari 2/3 permukaan gigi

DIS = Jumlah skor dibagi 6

Indeks Calculus (CIS) yaitu pemeriksaan kalkulus pada gigi 6 kanan 6 kiri rahang atas; 6 kanan 6 kiri rahang bawah, 1 kanan rahang atas; 1 kiri rahang bawah dengan kriteria skor kalkulus sebagai berikut :

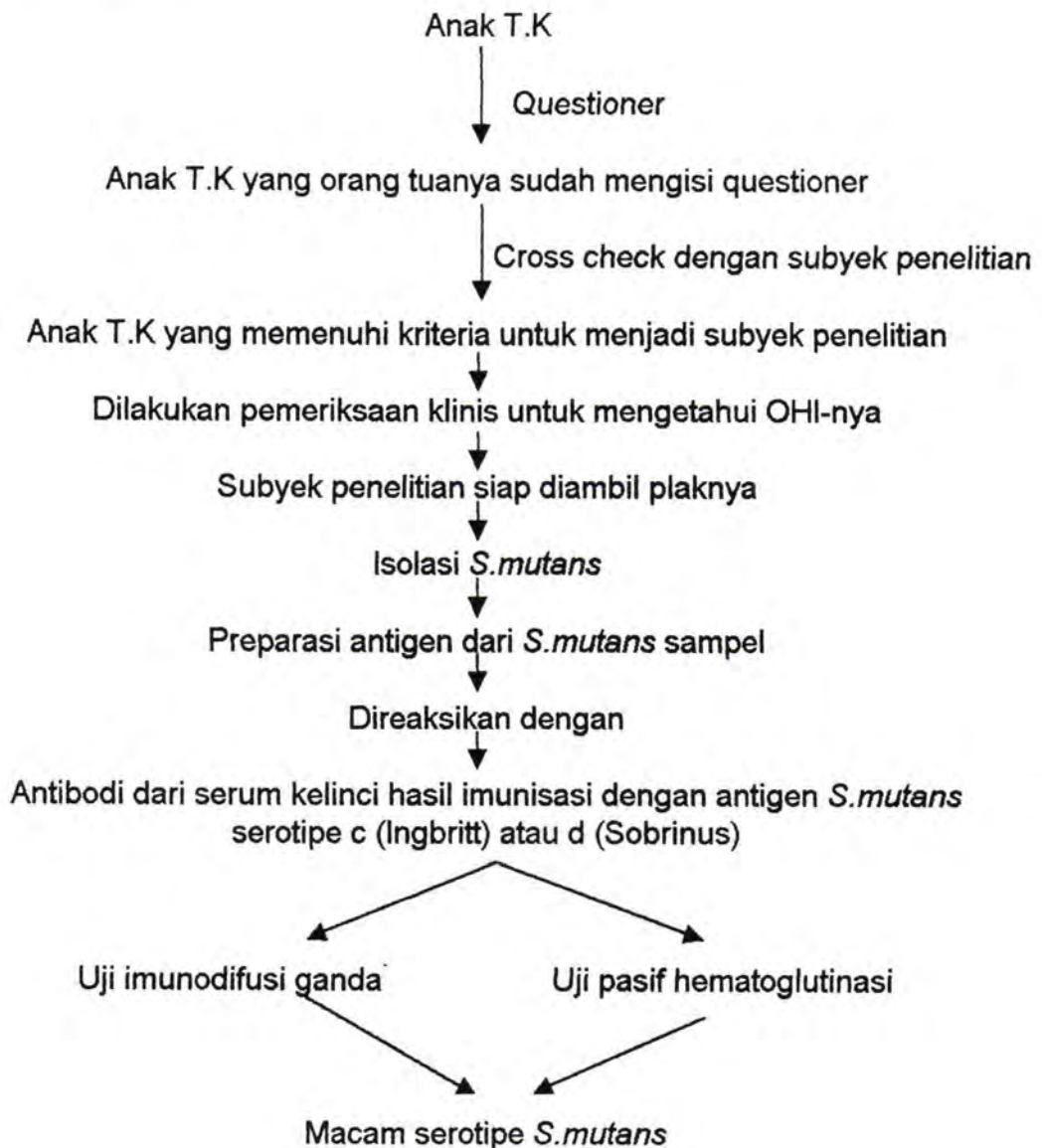
- 0 = Tidak ada kalkulus atau stain
- 1 = Kalkulus supragingival kurang 1/3 permukaan gigi
- 2 = Kalkulus supragingival menutupi lebih dari 1/3 tetapi kurang dari 2/3 permukaan gigi.
- 3 = Kalkulus supragingival menutupi lebih dari 2/3 permukaan gigi.

CIS = jumlah skor dibagi 6

Kategori OHI-S sebagai berikut :

- 0,1 - 1,2 = kategori 1 yaitu kebersihan mulut baik
- 1,3 - 3,0 = kategori 2 yaitu kebersihan mulut sedang
- 3,1 - 6,0 = kategori 3 yaitu kebersihan mulut jelek

4.4. Cara Kerja



Gambar 4.1 : Cara kerja

4.5. Bahan dan Alat

4.5.1. Bahan pemeriksaan klinik dan pengambilan sampel :

Kapas, catton roll, alkohol 70%, media transport Buffered Glycerol Saline Solution (BGSS).

4.5.2. Bahan untuk pemeriksaan Laboratorium :

Media transport Buffered Glycerol Saline Solution (BGSS), media Brain Hearth Infusion Broth (BHI) (Oxoid), media agar darah, media Trypton Yeast Cystine (TYC), media Todd Hewitt, media agar Difco, media gula-2 (manitol, sorbitol, Raffinosa, inulin, melibiose, arginin, esculin), bahan pengecatan gram, Gas generating kids (Oxoid), hewan coba kelinci New Zealand, Phospat Buffer Salin (PBS), 1M, pH :7,4, Salin, Phenol red , NaOH 1mol/l, NaCl 0,15 mol/L, Buffer phospat pH 7,5; Phenyl methyl sulfonyl fluoride (PMSF)(Sigma), Tosil Phenyl Sulfinil Flaxid (TPCK) (Sigma), Naphthol-40 (NP-40) 5%, Dymethyl Formamid (zigma), protein C, comasie blue, albumin standart 4,2.

4.5.3. Alat untuk pemeriksaan klinik dan pengambilan sampel

Kaca mulut, pinset, sonde, eksavator, brander.

4.5.4. Alat yang dipakai untuk pekerjaan laboratorium :

Inkubator, anaerobic jar, water bath, ultrasentrifuge, autoklav, sonikator, spektrofotometer, SDS-PAGE Mini Gel (Biorad), Fibrator, plat mikrotiter berdasar datar (Nucc), cawan petri steril, tabung reaksi, rak tabung reaksi, aliquot, lampu spirtus, jarum suntik.

4.6. Lokasi dan Waktu

Pekerjaan laboratorium dilakukan di laboratorium mikrobiologi FKG, laboratorium virologi FKH, laboratorium TDC Universitas Airlangga dan Laboratorium Biokimia PAU-Universitas Gajah Mada; pada bulan Agustus 1998 sampai dengan Juli 1999. Yang dipakai sebagai sampel penelitian adalah anak T.K di Surabaya Selatan, Utara, Timur dan Barat yang oleh peneliti dianggap memenuhi kriteria sebagai sampel dan mewakili anak TK di Surabaya, atau dengan kata lain sampelnya cukup homogen, dilihat dari segi umur, suku bangsa, pendidikan orang tua, sosial ekonomi, kebudayaan, kesehatan gigi dan mulut serta nutrisinya; yang kesemuanya itu merupakan faktor predisposisi karies gigi.

4.7. Cara Kerja

Penelitian ini terdiri dari tiga tahap yang meliputi :

1. Persiapan
2. Penelitian
3. Analisis statistik

4.7.1. Persiapan

Pada tahap persiapan meliputi :

a. Pemilihan subyek penelitian dan pengambilan sampel

1. Dari 1090 TK yang ada di Surabaya dibagi menurut 5 wilayah, sampel TK dipilih secara random sampling dari tiap-tiap wilayah, setelah didapatkan sampel TK yang memenuhi kriteria maka sampel murid-murud TK direndom kembali untuk menentukan unit sampel yang akan diambil plak-nya.
2. Anak TK yang memenuhi kriteria sampel, terlebih dahulu dibagikan questioner kepada orang tua, kemudian setelah diisi, dilakukan cross check oleh peneliti dengan cara menanyakan langsung dengan calon subyek penelitian.
3. Dari hasil jawaban questioner dan cross check kemudian ditentukan subyek penelitian sesuai kriteria sampel, dengan cara dilakukan pemeriksaan klinis dan dihitung OHI-S-nya, kemudian dirandom kembali, sebelum dipilih sebagai sampel untuk diambil plaknya.

4. Anak TK yang telah terpilih sebagai sampel dilakukan pengambilan plak dengan exavator 1,5 mm, digunakan untuk mendapatkan 2,4 mg bahan plak.

Plak diambil dari beberapa permukaan inisial gigi yang mengalami karies (paling sedikit terdapat 3 karies media dalam rongga mulut). Kemudian disimpan dalam media BHI gliserol cair, pada -20°C maksimum 6 bulan; sebagai unit analisis untuk identifikasi *S.mutans* dengan cara isolasi.

b. Isolasi *S.mutans* (Melville and Russel, 1981 cit Soerodjo.S 1989)

1. Plak gigi ditanam pada media transport Buffered Glycerol Saline Solution (BGSS) (maksimum 2 jam), kemudian dilakukan penipisan seri yang dimulai dari penipisan 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000 (hasil percobaan pendahuluan).
2. Diambil 100 ul dari penipisan 1/10.000, dilakukan penanaman (streak) pada media agar darah untuk melihat hemolisis alfa. Zone hijau terbentuk setelah inkubasi 48 jam pada 37°C dan hal ini merupakan tanda *Streptococcus grup viridan*.
3. Untuk mempermudah isolasi, digunakan media selektif *Trypton Yeast Cystine* (TYC), yang terutama menumbuhkan mikroorganisme pembentuk dektran dalam plak, kemudian dilakukan test biokimiawi dengan gula-gula. *S.mutans* mampu membentuk asam terhadap sukrosa, manitol, sorbitol dan aesculin setelah ditumbuhkan didalam jar

selama 48 jam, 37^o. Pembuatan asam terlihat dari perubahan indikator phenol red di-dalam media gula-gula dari warna merah menjadi kuning.

4. Untuk memperjelas hasil, dapat dibuat preparat dengan pengecatan gram, guna identifikasi secara mikroskopik.

c. Pembuatan antigen whole cell dari *S.mutans* serotipe c dan d untuk produksi antiserum

1. Pengambilan koloni *S.mutans* serotipe c dan d masing-masing didapat dari stok dari media TYC, ditanam pada media Todd Hewitt Broth 25 ml.
2. Setelah berumur 18 jam dilihat OD-nya dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 550 nm, jumlah kuman setara dengan Mc Farlan 1, adalah sebesar 3×10^8 bakteri/ml.
3. Sentrifus dengan ultrasentrifus dengan kecepatan 15.000 x g, pada 4^oC selama 10 menit. Supernatan dibuang, endapan dilarutkan dengan 0,2 mol/l buffer fosfat pH 7,5 sebanyak 25 ml.
4. Ulangi sentrifus dan pencucian pada poin c, sebanyak 3x
5. Inaktivasi dalam waterbath 80^o C selama 1 jam.
6. Dilakukan uji sterilitas dengan diambil satu ose dan ditanam dalam media padat TYC, inkubasi 37^oC selama 48 jam dalam anaerobik jar.
7. Hasil whole cell Antigen disimpan dalam lemari es, 4^oC sampai digunakan untuk disuntikkan ke hewan coba (Estoepang estie, 1994).

d. Pembuatan antigen whole cell dari *S. mutans* sampel penderita untuk uji serologi

1. Pengambilan koloni *S. mutans* dari kultur kuman hasil isolasi sampel, ditanam dalam media Todd Hewitt Broth 50 ml, inkubasi dalam anaerobik jar, 37°C selama 18 jam.
2. Sentrifus 15000 x g, pada 4°C, 10 menit. Buang supernatannya dan tambahkan PZ 10 ml, ulangi sentrifuse lalu buang supernatannya.
3. Pada endapan kuman ditambahkan 0,5 ml NaCl 0,15 mol/l tambahkan indikator 0,05% Phenolred alkohol, kemudian dinetralsir dengan NaOH (1 mol/l) hingga terlihat warna merah muda.
4. Selanjutnya di autoklav 20 menit, 120°C setelah itu ulangi sentrifuse 15.000 x g, pada 4°C, 10 menit. Supernatan diambil sebagai ekstrak antigen.

e. Pembuatan antigen sel membran dari *S. mutans* serotipe c dan d untuk produksi antiserum serta dari *S. mutans* sampel penderita untuk uji serologi

1. Pengambilan koloni dari stok *S. mutans* serotipe c dan d lalu ditanam dalam media BHIB 25 ml.
2. Sentrifus 12.000 x g, pada 4°C selama 5 menit. Buang supernatannya, endapan dicuci dengan PBS, 1M, pH 7,4.
3. Ulangi poin b, sentrifuse dan pencucian sebanyak 3 kali

4. Sonikasi selama 30 detik sebanyak 3 kali.
5. Sentrifus 12.000 x g, 10 menit pada 4^o C, supernatan dibuang dan endapan dicuci dengan PBS, 1M, pH 7,4.
6. Ulangi pencucian dan sentrifus sebanyak 3 kali.
7. Endapan ditambahkan tosil phenyl chloro keton (TPCK) 1% dalam salin sebanyak 20 ul, phenyl methyl sulfonyl fluoride (PSMF) 1% dalam Dymethyl Formamid sebanyak 100 ul, Napthol-40 (NP-40) 5% sebanyak 10 ul dan ditambah normal salin 870 ul sehingga jumlah volume adalah 1000 ul.
8. Ulangi sonikasi selama 30 detik sebanyak 3 kali.
9. Sentrifus kembali pada 12000 x g selama 10 menit, supernatan diambil sebagai ekstrak antigen untuk disuntikkan ke hewan coba (Artama, 1999).

Cara pembuatan antigen sel membran dari *S. mutans* sampel penderita untuk uji serologi sama dengan cara tersebut diatas ; *S. mutans*-nya dari sampel penderita.

4.7.2. Tahap Penelitian

Pada tahap penelitian ini meliputi :

a. Imunisasi hewan coba dari antigen whole cell *S. mutans* serotipe c dan d

1. Hewan coba kelinci New Zealand sebanyak 4 ekor, masing-masing dengan umur 4 bulan, berat kurang lebih 4 kg. Sebelum dilakukan imunisasi diambil darahnya sebanyak 5 cc untuk memperoleh serum pra-kekebalan sebagai uji kendali.
2. Untuk imunisasi pertama disuntikkan 0,5 ml antigen whole cell dari *S. mutans* serotipe c atau d pada masing-masing kelinci secara intraneva (2 ekor kelinci untuk serotipe c dan 2 ekor kelinci untuk serotipe d).
3. Imunisasi kedua, sampai ke-empat diberikan dosis 1 ml dengan interval 1 minggu.
4. Setiap 7 hari, sebelum dilakukan imunisasi berikutnya ; diambil darahnya sebanyak 5 ml, untuk melihat tinggi rendah titer antibodinya (tabel 5.2).
5. 7 hari setelah imunisasi yang terakhir, darah diambil sebanyak 15 cc, biarkan selama 2 jam pada temperatur kamar, setelah terbentuk *blood clot*, simpan dalam almari es selama 24 jam. Kemudian disentrifus 3000 x g selama 10 menit, ambil serumnya.

6. Dititrasi dengan penipisan seri, untuk mengetahui titernya dan simpan dalam aliquot pada -20°C , sebagai anti serum whole cell (Estoepangestie, 1994)

b. Imunisasi hewan coba dari antigen membran sel *S.mutans* serotipe c dan d

1. Hewan coba kelinci New Zealand sebanyak 4 ekor dengan umur 4 bulan, berat masing-masing kurang lebih 4 kg. Sebelum diimunisasi diambil darahnya 5 cc untuk memperoleh serum pra-kekebalan sebagai uji kendali.
2. Imunisasi untuk 2 ekor serotipe c dan 2 ekor serotipe d, secara sub cutan, dengan interval 14 hari sekali.
3. Perhitungan dosis antigen berdasarkan kosentrasi protein dari hasil spektrofotometer, (serotipe c = 26,19, d = 37,58), adalah sebagai berikut :
c : 3,8 ul antigen + 496,2 ul PBS + 500 ul adjuvan
d : 2,6 ul antigen + 497,4 ul PBS + 500 ul adjuvan
4. Penyuntikan pertama digunakan complete Freund adjuvan, sedangkan untuk penyuntikan selanjutnya (booster) digunakan incomplete Freund adjuvan.

5. Setiap 14 hari sekali, sebelum dilakukan imunisasi berikutnya, diambil darahnya sebanyak 5 ml untuk melihat tinggi rendah titer antibodinya (tabel 5.3).
6. 14 hari setelah penyuntikan yang terakhir (ke empat) diambil darahnya dari cuping telinga kelinci sebanyak 15 cc menggunakan alat suntik ukuran 5 cc.
7. Diamkan pada temperatur kamar selama 2 jam, agar darah membeku dan keluar serumnya, simpan dalam almari es selama 24 jam.
8. Sentrifus dengan kecepatan 3000 x g, 10 menit, ambil serum yang jernih kemudian dititrasi dengan penipisan seri untuk mengetahui titer antibodinya.
9. Simpan dalam tabung aliquot pada -20°C sebagai antiserum sel membran (Artama 1996).

Tabel 4.1. Imunisasi pada hewan coba kelinci New Zealand

Jumlah Kelinci	Antigen	Cara Imunisasi	Dosis ul	Freund Ajuvan
2 ekor	Whole cell serotipe c	iv	500 – 1000	-
2 ekor	Whole cell serotipe d	iv	500 – 1000	-
2 ekor	Membran cell serotipe c	Sc	1000	+
2 ekor	Membran cell serotipe d	Sc	1000	+

Keterangan : - = tidak memakai Freund adjuvan
 + = memakai Freund adjuvan

c. Titrasi antibodi poliklonal dari antiserum kelinci

1. Darah kelinci yang dipanen, didiamkan dalam temperatur kamar selama 2 jam, agar darah membeku dan keluar serumnya, simpan dalam almari es selama 24 jam.
2. Sentrifus darah dengan kecepatan 3000 x g, 10 menit, ambil serum yang jernih.
3. Cuci eritrosit domba dalam PBS, sentrifus 3000 x g, ulangi 3 kali.
4. Buat suspensi eritrosit 2% dalam PBS (IM,pH7,4). Ambil sebagian suspensi kemudian jadikan suspensi 1% dengan PBS (kontrol sel tidak disensitisasi). Sisa sebagian lagi dicampur antiserum kelinci dalam volume yang sama, inkubasikan selama 1 jam dalam 37°C (sel eritrosit yang disensitisasi).
5. Sumuran mikroplate nomer 1 diisi 175 ml PBS dan 25ml sel eritrosit yang disensitisasi.
6. Sumuran nomer 2 sampai ke 11 diisi PBS 100 ul.
7. Ambil 100 ul dari sumur nomer 1 (campuran sel eritrosit yang disensitisasi dengan PBS), lalu pindahkan kesumuran nomer 2 dan begitu seterusnya sampai sumuran nomer 11; sehingga didapatkan penipisan seri antiserum dari 1/8 sampai 1/8192.
8. Sumuran nomer 1 sampai nomer 12 di-isi dengan 12 ul ekstrak antigen whole cell atau membran cell dari *S.mutans serotipe c atau d*.

9. Sumuran nomer 12 digunakan sebagai kontrol negatif, berisi 100 ul sel eritrosit yang tidak disensitisasi dan ekstrak antigen 12 ul.
10. Inkubasikan dalam 37°C, selama 2 jam dan dipindahkan dalam almari es selama 24 jam.
11. Pembacaan titer dilakukan setelah dibiarkan 1-2 jam diluar almari es. Alat baca menggunakan kaca pembesar dan senter.
12. Dari tiap penipisan dalam sumuran dapat dilihat adanya gumpalan atau kekeruhan (Kresno,1984).

d. Pembuatan media untuk imunodifusi

1. Timbang $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ = 1,186 gr dan dilarutkan dalam 100 cc aquadest.
2. Timbang KH_2PO_4 sebanyak 0,907 gram dan dilarutkan dalam 100 cc aquadest.
3. Campurkan larutan $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 60 cc dengan larutan KH_2PO_4 sebanyak 40 cc.
4. Tambahkan aquadest pada campuran larutan tersebut sebanyak 500 cc.
5. Sebelum digunakan, larutan bufer Sorensen ini harus diencerkan 10 kali.
6. Cawan petri dicuci, steril dengan autoklav.

7. Cawan petri kemudian dilapisi dengan lapisan agar dan bufer Sorensen yang telah dipanaskan sampai mendidih serta terlihat bening. Untuk membuat lapisan agar yang tipis maka campurkan PZ. Agar dan bufer Sorensen tersebut harus diencerkan sebanyak 1 : 5 dalam aquadest.
8. Tuangi dengan campuran PZ, agar dan bufer Sorensen sehingga ketebalan 25 mm. Biarkan mengeras.
9. Setelah mengeras, dibuat lubang dengan menggunakan gel punch, diameter 3 mm (1 lubang ditengah dan 6 lubang ditepi) dengan jarak 4mm (Ernawati dkk,1998).

e. Uji serologi metode imunodifusi ganda

1. Masukkan antiserum pada lubang ditengah, kemudian masukkan antigen pada 6 lubang ditepi, yang sebelumnya telah dilakukan penipisan 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32 dan 1/64 masing-masing sebanyak 15 ul.
2. Inkubasikan preparat tersebut pada suhu kamar dan jaga kelembabannya agar tidak mudah kering.
3. Hasil dapat dibaca setelah 1-2 hari inkubasi berupa garis presipitasi.
4. Adanya garis presipitasi menunjukkan adanya kecocokan antara antigen dan antibodi yang diperiksa.
5. Titer antigen adalah pengenceran tertinggi yang masih membentuk garis presipitasi.

6. Apabila antigen yang diperiksa mengandung antigen terhadap 2 jenis antiserum yang tidak identik akan terbentuk garis presipitasi yang menyilang.
7. Apabila 2 jenis antigen yang diperiksa mempunyai kesamaan parsial, maka garis presipitasi akan membentuk taji pada titik pertemuan. Pada poin f dan g disebut sebagai reaksi silang.
8. Apabila diantara antigen dan antiserum yang diperiksa terbentuk beberapa garis presipitasi, menunjukkan bahwa antiserum tersebut adalah poliklonal.
9. Apabila pada pertemuan kedua jenis antigen yang diperiksa tidak membentuk taji atau saling menyilang, berarti antara kedua jenis antigen tersebut identik (Sofro 1994).

f. Uji serologi metode Reserve passif hemagglutination

1. Cuci eritrosit domba dalam PBS, sentrifus 1000 x g ulangi 3 kali
2. Buat suspensi eritrosit 2% dalam PBS.
3. Ambil sebagian suspensi kemudian jadikan suspensi 1% dengan PBS (kontrol sel tidak disensitisasi). Sisa sebagian lagi masukkan antiserum kelinci dalam volume yang sama, campur dan inkubasikan selama 1 jam dalam 37 °C (sel eritrosit yang disensitisasi).

4. Masukkan kedalam 2 sumur mikrotitrasi plate dengan dasar berbentuk U, masing-masing 25 ul sampel yang diencerkan dahulu 1 : 20 dengan PBS.
5. Masukkan kedalam sumur yang satu eritrosit yang disensitisasi, kedalam sumur yang lain eritrosit yang tidak disensitisasi, sebanyak 75ul.
6. Goyang dan inkubasikan selama 4 jam dalam suhu kamar (15 - 25 °C) dan perhatikan adanya aglutinasi (Kresno, 1984).

Uji serologi dengan metode imunodifusi ganda (IMG) poin 4, dan reserve passif hemagglutination (RPHA) poin 5, masing-masing dilakukan dengan mereaksikan antigen whole cell dan membran cell dari sampel dengan antibodi serum kelinci whole cell dan membran cell *S.mutans* serotipe c atau d.

Tabel 4.2. Pembacaan hasil RPHA (Kresno, 1984)

Derajat Hemaglutinasi	Pembacaan	Penafsiran
a. Aglutinasi membentuk endapan sel yang menutupi seluruh dasar sumur, dengan endapan kadang-kadang berlipat.	4+	Reaktif
b. Aglutinasi membentuk endapan yang menutupi sebagian dasar sumur (lebih kecil dari a).	3+	Reaktif
c. Endapan pada dasar sumur dikelilingi cincin merah.	2+	Reaktif
d. Seperti c, dengan cincin merah lebih kecil.	1+	Reaktif
e. Tidak ada aglutinasi.	-	Non Reaktif

4.8. Analisis data

Setelah data terkumpulkan dilakukan pengolahan data, untuk pembuktian hipotesa dan karena distribusinya tidak normal, maka digunakan uji *Spearman correlation coefficients*.