

KARAKTERISASI ADESIN *FIMBRIAE STREPTOCOCCUS MUTANS LOKAL* YANG BERPERAN DALAM PATOGENESIS PENYAKIT KARIES GIGI

Indah Listiana Kriswandidi*), Sumarno**), I.G.A. Wahyu Ardani*)

ABSTRACT

FIMBRIAL ADHESIN CHARACTERIZATION OF *LOCAL STREPTOCOCCUS MUTANS* PLAYING A ROLE THE PATHOGENESIS OF DENTAL CARIES

The purpose of this study was to characterize adhesin molecular weight of *S. mutans* fimbriae with the specific receptor molecular weight of dental pellicle glycoprotein that play a role in the pathogenesis of dental caries. The stages of this study were, first, performing fimbrial isolation, followed with dental pellicle isolation, inducing polyclonal antibodies from fimbrial isolates and from dental pellicle isolates. These materials were used in western blotting test. Protein band appeared from the results of blotting test was matched with broad marker protein from Sigma used during electrophoresis, thereby, the molecular weight could be estimated. Results obtained from this study was that the estimated molecular weight of fimbrial AM playing a role in the pathogenesis of dental caries was 204,4 kDa, while the estimated molecular weight of the receptor molecular of pellicle glycoprotein was 118 kDa. The estimated molecular weights of adhesin and its specific receptor from the early process of dental caries can be applied for producing preventive materials of dental caries.

Keywords: *Fimbrial, adhesin, the pathogenesis, dental caries*

PENDAHULUAN

Penyakit karies gigi merupakan penyakit yang merusak jaringan keras gigi yang banyak menyerang hampir seluruh lapisan masyarakat. Di berbagai negara baik pada negara maju maupun negara berkembang penyakit ini tetap mempunyai prevalensi yang cukup tinggi. Faktor yang

*) Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga

**) Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya

kompleks antara konsumsi makanan yang mengandung gula-gula, kesadaran tentang kebersihan gigi dan mulut yang kurang serta aplikasi program fluoridasi yang kurang memadai memperparah kejadian penyakit ini (Dragheim *et al.*, 2000).

Faktor-faktor utama yang berperan dalam menyebabkan terjadinya karies gigi ini adalah faktor host, faktor substrat, faktor waktu dan faktor mikroorganisma. Faktor terakhir ini adalah faktor yang memegang peran penting dalam patogenesis karies gigi. Pada penelitian terdahulu telah dibuktikan oleh Clarke dalam penelitiannya yang menggunakan binatang coba hamster. Dari penelitian ini akhirnya dapat dipostulatkan bahwa bakteri *S.mutans* merupakan mikroorganisma penyebab terjadinya karies gigi. Adapun pernyataan dari postulat Koch dituliskan sebagai berikut: *pertama*, dapat diisolasi dari plak penderita karies gigi; *kedua*, isolat ini dapat ditumbuhkan pada perbenihan sebagai biakan murni; *ketiga*, isolat ini dapat diinfeksi pada tikus atau hamster dan dapat menyebabkan terjadinya karies gigi; dan yang keempat, plak yang berasal dari lesi binatang coba tersebut dapat diisolasi ulang serta dapat ditumbuhkan lagi pada perbenihan sebagai biakan murni (Lehner, 1992).

Dengan diakunya *S.mutans* sebagai penyebab utama karies gigi, maka peneliti semakin banyak mempelajari tentang keberadaan bakteri ini dan mempelajari patogenesis karies gigi yang disebabkan oleh bakteri ini. Finally dan Caparon (2000) menyebutkan bahwa bakteri *S.mutans* ini biasanya mempunyai adesi yang berupa protein yang terletak diujung pili atau fimbriae atau adesi ini terdapat pada membran bakteri (permukaan dinding sel) yang biasa disebut dengan *afimbriae protein*. Salyes dan Whitt (2002) menyatakan bahwa pili atau *fimbriae* ini memperantarai perlekatan bakteri pada molekul permukaan sel *host*. sel *host* yang berfungsi sebagai reseptor dari pili ini biasanya merupakan residu dari glikoprotein atau glikolipid.

Molekul adesi atau disebut juga sebagai adesi ini merupakan suatu molekul yang terdapat pada permukaan sel bakteri yang berfungsi untuk melekatkan diri pada permukaan sel *host*. Pada sel prokaryota atau eukaryota adesi ini biasanya berupa *polysaccharide-binding lectins*. Adesi ini biasanya terdapat sebagai *fimbriae*, *fuzzy* atau fibril. Pada *Streptococci* umumnya adesi ini bisa berupa asam terkoat yang terdapat pada permukaan sel dan fibril yang dapat mengikat semua sel eukaryota dan semua permukaan glikoprotein (firbronectin) yang terdapat pada plasma, pelikel dan aglutinin saliva (Rosen and Elvin-Lewis, 1991).

Email gigi normal selalou diselimuti oleh suatu lapisan yang disebut dengan pelikel. Lapisan ini terbentuk dari adsorpsi selektif komponen-komponen partikel saliva yang mengandung zat glikoprotein. Glikoprotein inilah yang akan mengikat molekul adesi dari *S.treptococcus S.mutans*

sehingga kuman ini dapat melakukan berkembang biakan dan menghasilkan asam (Smith, 1992).

Vacca Smith and Bowen (2000) juga menyebutkan bahwa pelikel ini dibentuk oleh adsorpsi selektif dari saliva dan *bacterial-derived molecules* yang terdapat pada gigi dan permukaan apatit. Pelikel saliva ini membantu beberapa fungsi sebagai pelumas, mencegah perkembangan kristal dan modulasi mikrobial flora pada permukaan gigi. Terbentuknya komposisi dan aktivitas pelikel berkisar sekitar 2 jam atau lebih.

Berdasar latar belakang di atas dibuat suatu penelitian untuk melakukan karakterisasi berat molekul fimbriae *S.mutans* yang berfungsi untuk melekatkan diri pada reseptor spesifiknya yang berupa glikoprotein pelikel gigi. Adapun tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui karakterisasi berat molekul fimbriae *S.mutans* pada penderita karies gigi yang mempunyai reseptor spesifik pada pelikel gigi. Dengan berhasilnya dilakukan karakter berat molekul fimbriae *S.mutans* dengan karakter berat molekul reseptor spesifiknya maka, dapat digunakan sebagai dasar pencegahan karies gigi, yaitu dengan membuat anti MA atau anti MR yang dimasukkan dalam pasta gigi atau sebagai bahan vaksin karies gigi.

METODE PENELITIAN

Subyek penelitian adalah penderita karies gigi dengan obyek yang akan dilakukan penelitian berupa: (1) Isolasi pelikel gigi yang diambil dari lapisan permukaan gigi penderita karies setelah puasa 2 jam di klinik FKG-Unair dengan *flow saliva rate* yang telah dikendalikan; (2) Protein fimbriae yang dipotong dari isolat *S.mutans* lokal dengan menggunakan *shearing technique* serta protein dinding sel dari isolat *S.mutans* lokal, bakteri *S.mutans* ini diperoleh dengan melakukan isolat dari plak penderita karies yang diambil di klinik FKG-Unair.

Cara pengambilan isolat pelikel: Pasien pada pagi hari diminta menggosok gigi hingga bersih, bila perlu dicek dengan *disclosing solution*, untuk melihat kebersihan giginya. Kemudian pasien diminta puasa selama 2 jam, diharapkan pasien tidak terlalu banyak bicara dan menelan. Setelah 2 jam pelikel yang terdapat pada seluruh permukaan gigi diambil dengan ekskavator yang telah disetirilkan dan dimasukkan pada *microtube ependorff* untuk masing-masing pasien.

Pengambilan sampel ini dilakukan selama 7 hari berturut-turut dengan 7 kali pengambilan pada masing-masing pasien, kemudian sampel juga disimpan dalam freezer -40°C pada setiap kali pengambilan dan dicairkan dahulu bila akan ditambahkan sampel baru (Modifikasi Vacca Smith and Bowen, 2000).

Pemotongan fimbriae: kultur bakteri *S.mutans* dari Todd Hewitt 250 ml ditambah 10 ml TCA 3% dan didiamkan selama 30-60 menit, kemudian

disentrifugasi dengan kecepatan 6000 rpm (pada suhu 4^o C) selama 15 menit (sentrifus dari Sigma 3 K18).

Supernatan dibuang dan endapan disuspensikan dengan PBS pH = 7,4 sebanyak 50 ml dan dilakukan pemotongan fimbriae dengan alat Ominimixer 3 kali. Saat melakukan pemotongan fimbriae tempat suspensi bakteri harus dimasukkan dalam bak berisi bongkahan es. Pemotongan (pemutaran) dilakukan selama 1 menit dan istirahat 30 detik (untuk pendinginan), kemudian dipotong lagi, istirahat lagi dan seterusnya sampai 3 kali pemotongan. Masing-masing potongan disentrifus dengan kecepatan 12.000 rpm selama 15 menit dan supernatan (potongan fimbriae) disimpan. (Sumarno, 2000).

Pembuatan Poliklonal Antibodi: Antigen diinjeksikan pada binatang coba kelinci (*Oryctolagus coniculus*), dengan aturan sebagai berikut: dibuat suspensi antigen dalam amulsi CFA (*Complete Freund's Adjuvant*) (Difco) dengan perbandingan 1:1 (volume total 200 µl) yang disuntikkan pada daerah sub hutan kelinci, 2 hari sebelum disuntik dengan suspensi pelikel tersebut daerah kelinci 1,5 cc dari cuping telinga untuk dilihat titer sebelum dilakukan injeksi. Setelah dilakukan vaksinasi dengan suspensi antigen tersebut 2 minggu kemudian dilanjutkan dengan booster 1 dengan campuran suspensi antigen dan *incomplete Freund's adjuvant* (IFA) dengan perbandingan 1:1 (volume 300 µl). Seminggu kemudian dilakukan *bleeding* dan selang setiap minggunya dilakukan *bleeding* hingga 3 kali. Selang 2 hari kemudian dilakukan Booster II demikian seterusnya hingga hari ke-35 dari vaksinasi dilakukan pemanenan antibodi poliklonal (Levesque, *et al.*, 2001).

Bahan *pellicle* yang terdapat dalam bentuk suspensi pelikel digunakan sebagai bahan antigen untuk penyuntikan pada binatang coba kelinci, dengan persiapan sebagai berikut: *pellicle* dalam bentuk suspensi dilakukan elektroforesis, kemudian pita-pita yang terbentuk pada gel elektroforesis dipotong dan dilakukan purifikasi dengan dianalisa dan elektroelusi. Eluat yang telah ditambah dengan adjuvant digunakan sebagai bahan vaksin pada kelinci. Serum hasil penyuntikan pada kelinci ini sebagai anti pelikel.

Pembuatan anti *fimbriae* diperoleh dari hasil gel elektroforesis dari *fimbriae S.mutans* yang telah dipotong dan dilakukan dialis dan elektroelusi. Eluat ini digunakan sebagai bahan protein yang dicampur dengan bahan *adjuvant* yang disuntikkan pada binatang coba kelinci (*Oryctolagus coniculus*). Hasil pemanenan serum (anti *fimbriae*) dilakukan pada hari ke-35 setelah vaksinasi. Serum anti *fimbriae* ini dilakukan purifikasi dan disimpan untuk digunakan perlakuan selanjutnya. Cara vaksinasi binatang coba kelinci sama seperti di atas (Levesque, 2001).

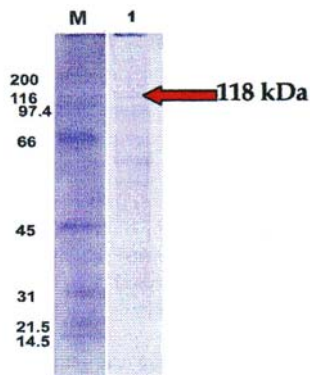
Karakterisasi molekul adesi (MA) *fimbriae S.mutans* dan molekul reseptor (MR) polikel gigi. (1) Karakterisasi molekul fimbriae *S.mutans* untuk pelikel. Isolat fimbriae dilakukan running elektroforesis, kemudian protein yang ada pada gel ditransfer ke membran nitroseforesis, kemudian

diinkubasi dengan suspensi pelikel 1 jam, kemudian dicuci dengan PBS 3 X 15 menit dan dilanjutkan dengan inkubasi anti pelikel selama 1 jam dan dicuci lagi dengan PBS seperti cara diatas. Setelah dilakukan pencucian diinkubasi dengan antibodi sekunder (Ig G *anti rabbit*) kemudian dilakukan deteksi protein dengan *western blue*. (2) Karakterisasi MR pelikel gigi untuk *fimbriae S.mutans*. Antigen yang dilakukan *running* elektroforesis adalah kebalikan dari prediksi molekul adesi, yaitu *crude pellicle* gigi. Protein yang terjaring pada gel ditransfer pada membran nitroselulose, kemudian diinkubasi dengan isolat *fimbriae S.mutans* 1 selama 1 jam. Setelah diinkubasi dicuci dengan larutan PBS 3 X 15 menit, kemudian diinkubasi lagi dengan anti *fimbriae* dan dilakukan pencucian lagi. Terakhir diinkubasi dengan antibodi sekunder (Ig G *anti rabbit*) dan dicuci lagi dengan PBS baru kemudian dilakukan deteksi antigen dengan menggunakan *western blue*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini adalah penelitian observasional eksploratif untuk menentukan dan melakukan karakterisasi dari molekul adesi (adesin) yang terdapat pada *fimbriae S.mutans* yang berperan dalam perjalanan (patogenesis) karies gigi. Sampel bakteri diperoleh dengan melakukan kultur dan isolasi bakteri *S.mutans* sebagai penyebab karies gigi yang diambil dari plak gigi penderita. Sampel pelikel sebagai reseptor bakteri, diambil dengan mengumpulkan lapisan pelikel gigi yang tumbuh dari penderita karies gigi setelah penderita diminta untuk puasa 2 jam setelah gosok gigi.

Suspensi pelikel (dengan PBS) dilakukan *running* elektroforesis dengan gambaran pita protein seperti yang tercantum pada Gambar 1.



Gambar 1.

Hasil elektroforesis pellicle (glikoprotein pelikel gigi)

Keterangan:

M = Broad Marker Protein dari Sigma

Lajur 1 = Hasil elektroforesis glikoprotein pelikel gigi penderita karies gigi.

Sampel yang berupa isolasi bakteri *S.mutans*, dikulturkan dalam medium *Todd Hewitt* untuk ditumbuhkan *fimbriae*-nya, kemudian dilakukan pemotongan *fimbriae* secara kimia dan fisik dengan alat omnimix. Eluat

fimbriae dilakukan running elektroforesis dengan hasil seperti Gambar 2 di bawah ini. Untuk pembandingan juga dilakukan *running* elektroforesis *whole cell* bakteri *S.mutans* dan bakteri *S.mutans* yang telah dilakukan penggudulan *fimbriae*-nya.

Gambar 2.

Hasil elektroforesis dari *whole cell S.mutans*, dinding sel *S.mutans* dan *fimbriae S.mutans*.

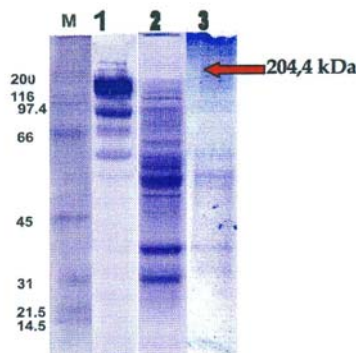
Keterangan:

M = Broad Marker Protein dari Sigma

Lajur 1 = hasil elektroforesis protein *whole cell S.mutans*.

Lajur 2 = hasil elektroforesis protein dinding sel *S.mutans* yang telah dilakukan penggudulan *fimbriae*.

Lajur 3 = hasil elektroforesis potongan *fimbriae S.mutans*.

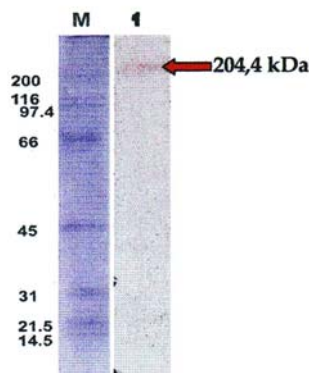


Untuk menentukan adesin dari *fimbriae S.mutans* yang berfungsi sebagai alat perlekatan bakteri ini pada reseptor spesifiknya yaitu pelikel gigi, maka dilakukan adalah uji blotting dari pita-pita protein hasil *running* baik dari pelikel maupun dan isolat *fimbriae S.mutans*.

1. Hasil blotting MA *fimbriae S.mutans*.

Adesin *fimbriae S.mutans* ditentukan dengan melakukan running protein dari isolat *fimbriae* yang kemudian hasilnya ditransfer pada membran nitroselulose dan dilakukan *blocking* dengan isolat pelikel, anti pelikel dan sekunder Ig G *anti rabbit*.

Hasil *blotting* yang didapat merupakan molekul adesi dari *fimbriae S.mutans* yang berfungsi sebagai alat pelekatan pada reseptor spesifik pelikel gigi yang tercantum pada Gambar 3.



Gambar 3.

Hasil blotting potongan *fimbriae S.mutans* dengan aluat pelikel dan anti pelikel serta sekunder Ig G *anti rabbit*.

Keterangan:

M = Broad Marker Protein dari Sigma

Lajur 1 = Hasil *blotting* dari protein *fimbriae* dengan eluat pelikel

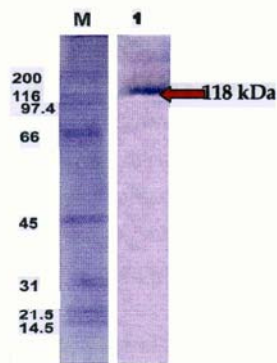
Hasil blotting dari isolat fimbriae yang diperoleh dikonversikan dengan Broad Marker Protein dari sigma dan diperoleh hasil yang serta dengan berat molekul 204,4 kDa.

2. Hasil blotting MR glikoprotein pelikel gigi

Untuk menentukan molekul reseptor (MR) dari glikoprotein pelikel terhadap adesin *fimbriae* tersebut diatas juga dilakukan *blotting* dengan cara yang hampir sama bila menentukan molekul adesin.

Isolat suspensi pelikel gigi yang telah terkumpul dilakukan *running* elektroforesis, kemudian proteinnya dipindahkan ke membran nitroselulose dan dilakukan *blotting* dengan eluat *fimbriae*, anti *fimbriae* dan sekunder Ig G anti rabbit.

Hasil yang diperoleh adalah karakterisasi berat molekul reseptor pelikel untuk *fimbriae S.mutans*. Hasil ini dikonversikan dengan *Broad Marker Protein* dari Sigma dan didapat berat molekul yang setara dengan 118 kDa.



Gambar 4.

Hasil blotting suspensi pelikel gigi dengan isolat potongan *fimbriae S.mutans* dan anti *fimbriae* dan sekunder Ig G anti rabbit.

Keterangan:

M = Broad Marker Protein dari Sigma

Lajur 1 = Hasil *blotting* dari suspensi pelikel gigi dengan eluat *fimbriae S.mutan*.

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan bahwa bakteri *S.mutans* mempunyai adesin yang terdapat pada *fimbriae* serta mempunyai reseptor yang spesifik pula. Adesin dan reseptor spesifik ini sangat penting dalam perjalanan patogenesis penyakit, demikian juga dengan ikatan adesin *S.mutans* dan reseptor pelikel yang spesifik.

Seperti yang telah kita ketahui bakteri *S.mutans* mempunyai banyak reseptor, antara lain adalah komponen-komponen dari saliva sendiri dan komponen dari bakteri lain (Jenkinson dan Lamnot, 1997). Pelikel merupakan reseptor spesifik dari bakteri *S.mutans* yang berasal dari adsorpsi saliva (Smith, 1992; Nissengard and Newman, 1994). Dengan melekatnya bakteri *S.mutans* pada reseptor spesifik, maka proses karies gigi akan segera berlangsung. Bila *S.mutans* melekat pada reseptor yang tidak spesifik, kolonisasi juga berjalan lambat dan proses karies gigi lebih sulit berlangsung.

Dengan diketemukannya karakter berat molekul reseptor spesifik untuk perlekatan adesi *fimbriae S. mutans*, maka dapat dipergunakan untuk pengembangan molekuler patogenesis karies gigi. Perlekatan pada reseptor spesifik ini yang menjadi terakselerasinya sifat kariogenitas dari bakteri *S. mutans* ini. Lain halnya bila *S. mutans* melekat pada reseptor yang tidak spesifik yang terdapat pada rongga mulut (misal pada komponen saliva), maka *S. mutans* akan terhambat kecepatan berkolonisasinya sehingga produk asam yang dihasilkan juga kurang mencukupi untuk menjadikan penyebab karies gigi.

Hasil dari uji ini adalah adesi (MA) dari *fimbriae S. mutans* yang mempunyai berat molekul 204,4 kDa dapat berkaitan secara spesifik dengan reseptor glikoprotein *crude pellicle* dengan berat molekul 118 kDa. Dapat digambarkan bahwa proses perlekatan bakteri pada reseptor pelikel dimulai dari perlekatan MA (adesi *fimbriae*) dengan BM 204,4 kDa pada MR *crude pellicle* dengan BM 118 kDa. Setelah perlekatan tersebut diperkuat dengan ikatan pada dinding sel pada pelikel. Bila perlekatan ini terjadi pada *S. mutans* yang *afimbriae*, maka proses perlekatan hanya terjadi pada adesi dinding sel dengan protein pelikel gigi saja.

Pada umumnya ikatan antara adesi dan reseptor seperti *key and lock* yang digambarkan dengan reseptor yang menyelimuti adesi, sehingga dibayangkan reseptor mempunyai BM yang lebih besar dari adesi. Penjelasan pada kasus penelitian ini yang mempunyai reseptor untuk *fimbriae* yang mempunyai BM lebih kecil (118 kDa) dari adesi *fimbriae*-nya (204 kDa) adalah sebagai berikut. Reseptor dalam hal ini pelikel gigi terdiri dari polimerisasi glikoprotein yang digambarkan adesi yang berupa protein *fimbriae S. mutans*. Polimerisasi glikoprotein ini setelah dilakukan elektroforesis, salah satu pita-nya glikoproteinya mempunyai BM 118 kDa. Dari hasil elektroforesis suspensi pelikel tersebut ternyata setelah dilakukan uji *western blott* dengan isolasi *fimbriae* pita tersebut (118 kDa) adalah sebagai reseptornya. Jadi glikoprotein dengan BM 118 kDa ini sudah merupakan monomer dari glikoprotein. Dengan demikian bisa dimengerti bila reseptor tidak selalu mempunyai BM yang lebih tinggi dibanding dengan adesinya.

Komponen fraksi protein *fimbriae* yang mempunyai berat molekul tinggi tersebut dapat digunakan sebagai bahan vaksin karena mempunyai berat molekul yang cukup tinggi dan memenuhi syarat dalam pembuatan vaksin sebagai bahan yang potensial untuk bahan vaksin. Dua kriteria pokok untuk syarat sebagai bahan vaksin yaitu keamanan dan potensial. Syarat BM tinggi dalam pembuatan vaksin dianggap memenuhi syarat sebagai bahan yang potensial, karena dapat menginduksi antibodi dari bahan tersebut. Sedangkan sifat aman dipresentasikan dengan tidak menimbulkan efek samping. Akan tetapi persyaratan ini menurut penulis kurang lengkap sebagai persyaratan bahan vaksin. Sifat perlekatan dari

bahan yang diunggulkan sebagai bahan vaksin (*fimbriae S.mutans*) untuk reseptor spesifik juga merupakan fungsi yang perlu ditambahkan dalam persyaratan tersebut. Dengan demikian bila perlekatan tersebut dapat dicegah maka akan memutuskan rantai patogenesis dari karies gigi.

SIMPULAN DAN SARAN

Dari hasil penelitian yang diperoleh, maka dapat ditarik suatu kesimpulan sebagai berikut: (1) *Fimbriae S.mutans* berfungsi sebagai sarana perlekatan pada reseptor spesifik pelikel gigi yang dapat membantu proses patogenesis karies gigi, (2) *Fimbriae S.mutans* ini mempunyai karater berat molekul adesin 204,4 kDa. Sedangkan reseptor spesifik dari adesin *fimbriae* ini yang berupa glikoprotein pelikel mempunyai karakter berat molekul 118 kDa.

Dengan berhasilnya dilakukan karakterisasi adesin *fimbriae S.mutans* dan reseptor spesifiknya, maka dapat digunakan sebagai: (1) Dasar molekuler untuk mempelajari patogenesis karies gigi, (2) Dasar pengembangan pencegahan karies gigi, (3) Dasar pemblokiran perlekatan bakteri *S.mutans* pada reseptornya untuk memutuskan rantai patogenesis karies gigi.

DAFTAR PUSTAKA

- Dragheim, E., Petersen, PE., Kalon I and Saag M., 2000. Dental Caries. In: Schoolchildren of an Estonian and a Danish Municipality. Int Journal of Pediatric Denstistry 10: 271-277.
- Finlay, BB., and Camparon M., 2000. Bacterial Adherence to Cell Surfaces and Extracellular Matrix. In Cellular Microbiology: ASM Press, pp 67-80.
- Jenkinson, HF., and Lamnot, RI., 1997. Streptococcal Adhesion and Colonization. Crit Rev Oral Biol Med 8: 175-200.
- Lehner T, 1992 Immunology of Oral Diseases. 3rd ed. London: Blackwell Scientific Publication, pp 70-71.
- Levesque, C., Vadeboncoeur, C., Chandad, F., and Frenette, M., 2001. Streptococcus salivarius *Fimbriae* are Composed of A Glucoprotein Containing A Repeated Motif Assembled into A Filamentous Non dissociable structure. Journal of Bact, May, pp 2724-2732.
- Nisengard, RJ., and Newman, MC., 1994. Oral Microbiology and Immunology. 2nd ed. United States of America: WB Saunders Co, pp 145-146.
- Rosen S and Elvin-Lewis, M., 1991. Oral Microflora. In (willet NP, White RR and Rosen S) Essential Dental Microbiology. New Jersey: Prentice Hall, Englewood Cliffs, Printed in The Republic of Singapore, pp 319 - 340.
- Salyers, AA., and Whitt, DD., 2002. Bacterial Strategis for Evading or Surviving the Deference Systems of the Human Body. In: Bacterial Patogenesis, A Molecular Approach. 2nd ed. Washington DC 20036-2904, USA: ASM Press, pp 115-130.

- Smith, DJ., 1992 Ontogeny of Immune Mechanisma In The Oral Cavity. In (Slots J and Taubman MA) Contemporary Oral Microbiology and Microbiology. St Louis, Missouri: Mosby Year Book, pp 513-523.
- Sumarno, 2000. Karakterisasi Molekuler Protein Adesi *Vibrio cholerae* 01 M094V dan Protein Reseptornya pada sel Epitel Usus Halus Tikus Putih (Wistar). Disertasi, Universitas Airlangga, Surabaya.
- Vacca Smith, AM., and Bowen, WH., 2000. In situ Studies of Pellicle Formation on Hydroxyapatite Disc. Arch. Oral Biol 45 (4): 277-291.