



**UJI EFEKTIVITAS ANTIBAKTERI MINYAK ATSIRI  
RIMPANG KENCUR (*Kaempferia galanga L*) SEBAGAI  
BAHAN MEDIKAMEN SALURAN AKAR TERHADAP  
*Enterococcus faecalis***

**SKRIPSI  
UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN  
MEMPEROLEH GELAR SARJANA**

Oleh:

**NINDYA TAMAYA  
155070401111050**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN GIGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG**

**2019**

DAFTAR ISI

Hal.

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI ..... i

HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI ..... ii

ABSTRAK ..... iii

ABSTRACT ..... iv

KATA PENGANTAR ..... iv

DAFTAR TABEL ..... vii

DAFTAR GAMBAR ..... viii

DAFTAR SINGKATAN ..... lix

DAFTAR LAMPIRAN ..... x

**BAB I ..... 1**

**PENDAHULUAN ..... 1**

    1.1 Latar Belakang ..... 1

    1.2 Rumusan Masalah ..... 4

    1.3 Tujuan ..... 4

        1.3.1 Tujuan Umum ..... 4

        1.3.2 Tujuan Khusus ..... 4

    1.4 Manfaat Penelitian ..... 4

        1.4.1 Manfaat Akademisi ..... 4

**BAB II ..... 6**

**TINJAUAN PUSTAKA ..... 6**

    2.1 Medikamentosa Saluran Akar ..... 6

        2.1.1 Cresotin ..... 9

    2.2 Mikroba Saluran Akar ..... 10

    2.3 Bakteri *Enterococcus faecalis* ..... 13

        2.3.1 Tes Identifikasi Bakteri ..... 19

            2.3.1.1 Metode Konvensional ..... 19

            1. Tes Pewarnaan Gram ..... 19

            2. Tes Katalase ..... 20

            3. Tes Toleransi Garam (*Salt Tolerance Test*) ..... 21

            4. Tes Biokimia ..... 21

            5. Tes Hemolisis ..... 21

            2.3.1.2 Metode Otomatis ..... 22

        2.3.2 Uji Kepekaan Bakteri terhadap Antimikroba ..... 23

            2.3.2.1 Metode Dilusi ..... 24

            2.3.2.2 Metode Difusi Cakram ..... 24



2.3.2.3	Metode Difusi Sumuran.....	25
2.3.2.4	Metode Difusi Silinder.....	25
2.4	Kencur ( <i>Kaempferia galanga L.</i> ).....	26
2.4.1	Sejarah.....	26
2.4.2	Sinonim dan nama daerah kencur.....	26
2.4.3	Taksonomi.....	26
2.4.4	Karakteristik tanaman kencur.....	27
2.4.5	Kandungan kimia kencur.....	28
2.5	Minyak Atsiri.....	31
2.5.1	Kandungan Minyak Atsiri.....	32
2.6	Destilasi Uap.....	32
<b>BAB III</b>	.....	<b>34</b>
<b>KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN</b>	.....	<b>34</b>
3.1	Kerangka Konsep.....	34
3.2	Hipotesis Penelitian.....	36
<b>BAB IV</b>	.....	<b>37</b>
<b>METODOLOGI PENELITIAN</b>	.....	<b>37</b>
4.1	Rancangan Penelitian.....	37
4.2	Sampel Penelitian.....	37
4.3	Variabel Penelitian.....	37
4.3.1	Variabel Bebas.....	37
4.3.2	Variabel Terikat.....	38
4.4	Lokasi dan Waktu Penelitian.....	38
4.4.1	Tempat Penelitian.....	38
4.4.2	Waktu Penelitian.....	38
4.5	Definisi Operasional.....	38
4.6	Bahan dan Alat Penelitian.....	39
4.6.1	Bahan dan Alat Tes Dilusi Tabung.....	39
4.7	Prosedur Penelitian.....	40
4.7.1	Minyak Atsiri Rimpang Kencur.....	40
4.7.2	Pembuatan Kontrol Negatif.....	40
4.7.3	Pengenceran Minyak Atsiri Rimpang Kencur.....	41
4.7.4	Identifikasi Bakteri <i>Enterococcus faecalis</i> .....	42
4.7.3.1	Pembiakan Bakteri.....	43
4.7.3.2	Prosedur Uji Antibakteri Metode Dilusi Tabung.....	44
4.8	Estimasi Jumlah Pengulangan.....	46
4.9	Analisis Data.....	47
<b>BAB V</b>	.....	<b>49</b>





<b>HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>49</b>
5.1 Hasil.....	49
5.1.1 Minyak Atsiri Rimpang Kencur.....	49
5.1.2 Hasil Identifikasi Enterococcus faecalis.....	49
5.1.3 Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung.....	51
5.1.4 Hasil Dilusi Tabung dan Uji Pengulangan.....	52
5.2 Analisis Data.....	54
5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Uji Homogenitas.....	55
5.2.2 Analisis Hasil Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri.....	55
5.2.3 Hasil Uji Korelasi Pearson.....	57
5.2.4 Hasil Uji Regresi Linear.....	58
5.3 Pembahasan.....	59
<b>BAB VI.....</b>	<b>67</b>
<b>PENUTUP.....</b>	<b>67</b>
6.1 Kesimpulan.....	67
6.1.1 Kesimpulan Umum.....	67
6.1.2 Kesimpulan Khusus.....	67
6.2 Saran.....	67
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>69</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>74</b>



## ABSTRAK

Nindya Tamaya, 155070401111050, Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Brawijaya, Malang, 20 Januari 2019, "Uji Efektivitas Antibakteri Minyak Atsiri Rimpang Kencur (*Kaempferia Galanga L*) Sebagai Bahan Medikamen Saluran Akar Terhadap *Enterococcus Faecalis*", Pembimbing: drg. Yuliana Ratna Kumala, Sp.KG.

Perawatan saluran akar merupakan salah satu jenis perawatan yang bertujuan untuk mempertahankan gigi agar tetap dapat berfungsi. Disinfeksi saluran akar sangat penting dalam perawatan saluran akar yang dapat dilakukan dengan memberikan bahan medikamen saluran akar. Bakteri merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi keberhasilan perawatan saluran akar. Salah satu bakteri yang menyebabkan kegagalan perawatan saluran akar ialah bakteri *Enterococcus faecalis*. Minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) memiliki kandungan kimia antara lain, *sineol* (8,76%), *borneol* (2,87%), dan *camphere* (2,47%) yang mampu menghambat dan membunuh bakteri *Enterococcus faecalis*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibakteri minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) sebagai bahan medikamen saluran akar terhadap *Enterococcus faecalis*. Penelitian ini adalah *true experimental* dengan pendekatan *post test only control group*. Sampel dibagi menjadi 2 kelompok kontrol dan 6 kelompok perlakuan (8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%). Kadar Hambat Minimum (KHM) pada konsentrasi 6% dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) pada konsentrasi 8%. Hasil uji statistika menunjukkan terdapat perbedaan bermakna pada setiap konsentrasi minyak atsiri (*One Way ANOVA*,  $p=0,000$ ) dan terdapat hubungan bermakna antara konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur yang diberikan terhadap rerata jumlah koloni bakteri yang tumbuh (Pearson, *Correlation coefficient* = -0,922). Kesimpulan penelitian ini adalah minyak atsiri rimpang kencur memiliki efek antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis*.

**Kata Kunci:** Kadar Hambat Minimum, kadar bunuh minimum, minyak atsiri rimpang kencur, perawatan saluran akar, *Enterococcus faecalis*.

## ABSTRACT

Nindyta Tamaya, 155070401111050, Bachelor of Dentistry, Faculty of Dentistry, Brawijaya University, Malang, January 20<sup>th</sup>, 2019, "Antibacterial Effectiveness Test of Kencur (*Kaempferia galanga L*) Rhizome Essential Oil as a Medicinal Material for Root Canal Against *Enterococcus faecalis*", Supervisor: drg. Yuliana Ratna Kumala, Sp.KG.

Root canal treatment is one type of treatment that aims to keep the teeth functioning. Root canal disinfection is very important in root canal treatment which can be done by providing root canal medicinal material. Bacteria are one of the factors that influence the success of root canal treatment. One of the bacteria that causes failure of root canal treatment is *Enterococcus faecalis*. The kencur (*Kaempferia galanga L.*) rhizome essential oil has chemical contents, among others, cineol (8.76%), borneol (2.87%), and camphere (2.47%) which can inhibit and kill *Enterococcus faecalis* bacteria. The purpose of this study was to determine the antibacterial activity of kencur (*Kaempferia galanga L*) rhizome essential oil as a root canal medicinal material against *Enterococcus faecalis*. This study is true experimental with a post test only control group approach. The sample was divided into 2 control groups and 6 treatment groups (8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%). Minimum Inhibitory Concentration (MIC) at a concentration of 6% and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) at a concentration of 8%. The results of statistical tests showed significant differences in each concentration of essential oils (*One Way ANOVA*,  $p = 0,000$ ) and there was a significant correlation between the concentrations of essential oils of kencur (*Kaempferia galanga L.*) rhizomes given to the average number of bacterial colonies that grew (Pearson, *Correlation coefficient* = -0,922). The conclusion of this research is that the essential oil of the kencur rhizome has an antibacterial effect on *Enterococcus faecalis*.

Keywords: Minimum Inhibition Concentration, minimum bactericidal concentration, kencur rhizome essential oil, root canal treatment, *Enterococcus faecalis*.





## BAB I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Perawatan saluran akar merupakan perawatan yang dilakukan untuk mempertahankan gigi agar tetap berfungsi. Perawatan saluran akar terdiri dari tiga tahapan utama antara lain: preparasi biomekanis saluran akar yang terdiri dari pembersihan dan pembentukan saluran akar, disinfeksi, dan obturasi saluran akar. Keberhasilan perawatan saluran akar dipengaruhi oleh banyak faktor, salah satunya adalah bakteri. Adanya bakteri baik yang tertinggal setelah preparasi saluran akar ataupun yang tumbuh setelah pengisian saluran akar merupakan penyebab utama dari kegagalan perawatan saluran akar. Tujuan disinfeksi saluran akar pada perawatan endodontik adalah untuk membunuh bakteri pada saluran akar, mengurangi rasa sakit, mengeliminasi eksudat apikal, dan membantu proses penyembuhan. Pemberian bahan medikamentosa dapat digunakan untuk mendisinfeksi saluran akar sehingga saluran akar tetap dalam keadaan steril dari bakteri (Walton & Torabinejad, 2008).

Penyakit pada pulpa biasanya diawali oleh invasi bakteri karies seperti *S. mutans* dan *Lactobacillus spp.* yang akan mengakibatkan enamel atau sementum yang melindungi dentin dan pulpa yang ada dibawahnya rusak sehingga mengakibatkan infeksi pada pulpa (Richard *et al.*, 2014). Karies yang tidak dirawat akan mencapai pulpa dan mengakibatkan pulpa terinflamasi yang bila dibiarkan akan menyebabkan pulpa nekrosis. Hal ini disebabkan oleh adanya penetrasi toksin bakteri ke pulpa dan saluran akar melalui



tubuli dentin atau atap pulpa yang terbuka kemudian mengakibatkan perubahan sirkulasi darah di dalam pulpa sehingga menyebabkan nekrosis. Selain itu, nekrosis pulpa juga dapat disebabkan oleh hal terkait perlukaan jaringan pulpa seperti trauma atau kimiawi (Delgado *et al.*, 2010).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh E. Ercan dan M. Dalli (2006) mikroba yang terdapat pada infeksi saluran akar menunjukkan adanya 68,0% bakteri Gram positif, 27,9% bakteri Gram negatif, 52,8% bakteri fakultatif, dan *strict anaerob* sebesar 43,1%. *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri Gram positif yang memiliki peran sebesar 80-90% infeksi saluran akar oleh *Enterococci* dan satu-satunya bakteri yang dapat bertahan dalam saluran akar tanpa dukungan dari bakteri lain (Fisher, 2009). *Enterococcus faecalis* bertanggung jawab sebesar 40% terhadap infeksi primer pada saluran akar tetapi paling sering terlibat pada infeksi persisten asimtomatik. Bakteri ini predominan terlibat dalam kegagalan saluran akar dan infeksi persisten yang ditemukan pasca perawatan periodontitis apikal sebesar 24% sampai 77% (Hedge, 2009).

Pemberian bahan medikamen saluran akar sangat membantu untuk mengeliminasi bakteri yang masih tertinggal di dalam saluran akar atau menghambat terjadinya infeksi berulang pada saluran akar (Rosa, 2002). Banyak bahan medikamen saluran akar yang sering digunakan antara lain golongan fenol, yang meliputi formokresol, camphorated paracholoro-phenol, eugenol, metakresilasetat, dan halida (iodin-potassium iodida). Tetapi, bahan medikamen tersebut bersifat antigenik dan sitotoksik yang hanya efektif dalam waktu





singkat. Saat ini bahan medikamentosa yang paling sering digunakan ialah kalsium hidroksida ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) (Walton and Torabinejad, 2008). Kalsium hidroksida sering digunakan karena memiliki kelebihan yaitu, efek antibakteri spektrum luas, antiinflamasi, biokompatibel dengan jaringan, dan bersifat basa (Richard J, 2014). Namun, pada penelitian yang dilakukan oleh Delgado et al. (2010), ditemukan bahwa *Enterococcus faecalis* resisten terhadap kalsium hidroksida. Klorheksidin 2% yang juga dikenal sebagai medikamentosa spektrum luas lebih efektif menghambat *Enterococcus faecalis* dibandingkan dengan kalsium hidroksida (Delgado, et al., 2010).

Penelitian tentang bahan alami sebagai obat-obatan sedang banyak dilakukan. Hal ini dikarenakan bahan alami mempunyai toksisitas yang lebih rendah sehingga lebih aman digunakan. Bahan alami tersebut dapat diperoleh dari tumbuh-tumbuhan. Salah satunya adalah rimpang kencur. Rimpang kencur merupakan tanaman herbal yang dikenal luas oleh masyarakat sebagai pengobatan, diantaranya adalah bronchitis, asma, malaria, penyakit kulit, dan gangguan limpa. Rimpang kencur mengandung saponin, flavonoid, polifenol dan minyak atsiri (Winarto, 2007). Kandungan minyak atsiri dari rimpang kencur diantaranya terdiri atas etil p-metoksisinamat yang telah terbukti memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Mycobacterium tuberculosis* dan *Candida albicans* (Dash, 2014).

Minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) belum pernah diuji sebagai antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis* yang menyebabkan kegagalan pada perawatan saluran akar, sehingga



peneliti perlu membuktikan efek antimikroba minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) terhadap *Enterococcus faecalis*.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka disusunlah rumusan masalah penelitian sebagai berikut:

Apakah minyak atsiri Rimpang Kencur memiliki efek antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis* secara *in vitro*?

## 1.3 Tujuan

### 1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui bahwa minyak atsiri rimpang kencur memiliki efek antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis* secara *in vitro*.

### 1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui hubungan antara konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur terhadap pertumbuhan *Enterococcus faecalis* secara *in vitro*.

2. Mengetahui besarnya Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM) dari minyak atsiri Rimpang Kencur terhadap jumlah koloni *Enterococcus faecalis*.

3. Mengetahui perbedaan rata – rata dari setiap konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur terhadap *Enterococcus faecalis* yang tumbuh.

## 1.4 Manfaat Penelitian

### 1.4.1 Manfaat Akademisi

Menambah ilmu pengetahuan dan memberikan informasi sebagai dasar ilmiah untuk pengembangan lebih lanjut mengenai



manfaat rimpang kencur sebagai antimikroba terhadap *Enterococcus faecalis* khususnya dibidang kesehatan gigi dan mulut.

#### 1.4.2 Manfaat Praktis

Sebagai masukan kepada para klinisi untuk menggunakan minyak atsiri rimpang kencur sebagai alternatif bahan medikamentosa saluran akar.





## BAB II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Medikamentosa Saluran Akar

Perawatan saluran akar bertujuan untuk mempertahankan gigi agar tetap bertahan di dalam rongga mulut walaupun jaringan pulpanya telah mengalami infeksi atau nonvital. Perawatan ini meliputi pengeluaran seluruh jaringan pulpa gigi pada ruang pulpa dan saluran akar yang rusak dan diikuti dengan pembersihan, perbaikan bentuk, dan pengisian saluran akar sehingga gigi dapat menjadi unit fungsional dalam lengkung rahang (Stock *et al.*, 2004).

Perawatan saluran akar bertujuan untuk membersihkan ruang pulpa yang terinfeksi serta untuk membentuk saluran akar agar dapat menerima bahan pengisi yang akan menutup seluruh sistem saluran akar. Tujuan lainnya adalah untuk membersihkan dan mendisinfeksi sistem saluran akar sehingga menghilangkan bakteri serta jaringan nekrotik, dan membantu proses penyembuhan periapikal (Rhodes, 2006).

Dalam tahapannya, perawatan saluran akar memiliki tiga prinsip penting. Prinsip ini disebut *triad endodontic* yang meliputi: preparasi biomekanis saluran akar yang terdiri dari pembersihan dan pembentukan saluran akar, disinfeksi, dan obturasi saluran akar. Pemberian bahan medikamentosa dapat digunakan untuk mendisinfeksi saluran akar sehingga saluran akar tetap dalam keadaan steril dari bakteri (Walton *and* Torabinejad, 2008).

Bahan medikamen saluran akar adalah bahan yang digunakan untuk meminimalkan atau menghilangkan mikroorganismenya pada



saluran akar saat prosedur disinfeksi sebelum obturasi (Mulyati, 2011). Bahan medikamen digunakan untuk membantu meningkatkan keberhasilan perawatan endodontik dengan cara berpenetrasi ke dalam tubulus dentin dan membunuh bakteri (Ercan *et al.*, 2006). Dengan demikian, suatu bahan medikamen saluran akar harus memiliki aktivitas antibakteri, menetralkan sisa-sisa debris di dalam saluran akar, mengontrol nyeri pascarawat, mampu mencegah reinfeksi, dan juga bersifat biokompatibel (Sedgley *et al.*, 2005). Pemberian bahan medikamen saluran akar ini dilakukan dengan kapan atau *paper point* ke dalam saluran akar, sehingga efek antimikrobanya terjadi melalui penguapan dari bahan medikamen tersebut (Ercan *et al.*, 2006).

Saat ini bahan medikamen yang digunakan dalam perawatan endodontik terdiri atas beberapa kelompok besar yaitu golongan fenol, aldehyd / formaldehida, halida / halogen, steroid, kalsium hidroksida, antibiotik dan kombinasi. Golongan fenol meliputi eugenol, *camphorated monoparachlorophenol* (CMCP), *parachlorofenol* (PCP), *camphorated parachlorofenol* (CPC), *metacresyl acetate* (kresatin), kresol, kreosote (beechwood), dan timol. Aldehyd / formaldehida meliputi formokresol dan glutaraldehyd. Sementara halida / halogen meliputi natrium hipoklorit (NaOCl) dan iodinkalium-iodida (Sedgley, 2005)

Golongan fenol dan aldehyd merupakan pembunuh sel yang poten, tetapi memiliki efek samping pada penggunaannya yaitu alergenitas sehingga dapat membahayakan jaringan pulpa dan periapiks. Selain itu golongan fenol juga memiliki bau yang menyengat, rasa yang tidak enak, dan memiliki daya aktif dalam



waktu 24 jam. Disisi lain, penggunaan golongan aldehyd pada jaringan yang nekrotik akan membuat jaringan itu lebih toksik. Golongan fenol dan formokresol menunjukkan bahwa medikamen ini tidak berpengaruh pada pencegahan nyeri, sedangkan golongan steroid dapat menurunkan nyeri pasca rawat, tetapi tidak akan menurunkan insiden *flare-up* (nyeri parah) (Sedgley, 2005).

Bahan medikamen yang paling umum digunakan saat ini ialah kalsium hidroksida ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ). Bahan ini masih menjadi “*gold standard*” yang sering digunakan sebagai medikamen selama kunjungan terapi endodontik (Athanasiadis B, 2007).  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  memiliki kelarutan yang rendah dalam air, tidak larut dalam alkohol, memiliki pH tinggi (berkisar 12,5 - 12,8).  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  memiliki kemampuan untuk mengurangi inflamasi periapeks, merangsang penyembuhan periapikal, dan sebagai antibakteri yang baik. Efek antibakteri  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  terjadi melalui pelepasan dan difusi dari ion hidroksil (OH) dengan menciptakan lingkungan yang bersifat *alkaline* yang tidak kondusif bagi kelangsungan mikroorganisme (Ercan, *et al.*, 2006).

Efek antibakteri kalsium hidroksida berkaitan dengan beberapa mekanisme, yaitu secara mekanis dan fisik. Aksi mekanis terjadi dengan cara merusak membran sitoplasma mikroba dengan aksi langsung ion hidroksil, menekan aktivitas enzim dan mengganggu metabolisme seluler, dan menghambat replikasi DNA dengan memisahkan DNA. Sedangkan secara fisik, kalsium hidroksida bertindak sebagai *barrier* yang mengisi rongga dalam kanal dan mencegah masuknya bakteri ke dalam sistem saluran akar serta





membunuh mikroorganisme yang tersisa dengan menahan substrat untuk pertumbuhan dan membatasi tempat untuk multiplikasi (Ercan *et al.*, 2006). Kalsium hidroksida juga memiliki kelemahan yaitu memiliki efek merusak jaringan periodontal ketika digunakan sebagai medikamen intrakanal, dengan mempengaruhi proses penyembuhan jaringan lunak marginal dan menghambat perlekatan sel fibroblas gingiva. Menurut penelitian yang dilakukan Sharma S, *dkk.* (2008), kalsium hidroksida mengakibatkan nekrosis pada jaringan apabila masuk ke pembuluh darah dan menyebabkan toksisitas jaringan secara langsung. Selain itu, kalsium hidroksida telah dilaporkan tidak sama efektifnya untuk semua bakteri. Kalsium hidroksida telah resisten terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* dan *Candida albicans* (Ercan *et al.*, 2006).

Menurut penelitian Peters *et al.*, (2002) menyatakan bakteri dalam saluran setelah perawatan saluran akar dengan kalsium hidroksida meningkat menjadi 0,93%, dan kalsium hidroksida tidak benar-benar mencegah pertumbuhan bakteri endodontik (Peters *et al.*, 2002). Dengan demikian, walaupun kalsium hidroksida direkomendasikan sebagai bahan medikamen intrakanal pada perawatan periodontitis apikalis, bukan berarti dapat digunakan secara universal karena tidak menunjukkan kemampuan yang sama terhadap seluruh bakteri (Gomez *et al.*, 2002).

### 2.1.1 Cresotin

CRESOTIN merupakan salah satu medikamentosa saluran akar yang digunakan saat ini. CRESOTIN mencakup 2 cairan (*liquid* nomor 1 dan 2) dan bentuk pasta (Tehnodent, 2016).

*Liquid* No. 1 CRESOTIN mengandung klorofenol, eugenol, *m-cresol* yang merupakan antiseptik spektrum luas, dan *lidocaine hydrochloride* sebagai anestesi. *Liquid* No1 CRESOTIN biasanya digunakan untuk anestesi pada pulpitis traumatik dan akut sebelum memasukkan pasta devitalisasi, dan periodontitis. Cairan ini dapat digunakan sebagai obat perawatan jangka panjang pada pulpitis (Tehnodent, 2016).

Pasta CRESOTIN digunakan sebagai bahan pengisi pada saluran akar yang terinfeksi setelah preparasi dan sterilisasi karena mengandung *zinc oxide* dan *zinc sulphate*, dan dexamethasone untuk mengurangi nyeri setelah dilakukan preparasi saluran akar (Tehnodent, 2016).

*Liquid* No. 2 CRESOTIN digunakan sebagai medikamentosa pada saluran akar untuk sterilisasi setelah dilakukan preparasi saluran akar. Bahan ini mengandung 3 komposisi utama yaitu fenol, eugenol, dan formaldehida yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein dari bakteri karena memiliki sifat antiseptik dan mensterilisasi saluran akar (Tehnodent, 2016). Bahan ini diaplikasikan dengan menggunakan kapas kecil yang telah diberikan *liquid* no2 cresotin lalu ditutup dengan tumpatan sementara selama 2 – 3 hari kemudian saluran akar diisi dengan menggunakan pasta cresotin (Tehnodent, 2016).

## 2.2. Mikroba Saluran Akar

Bakteri rongga mulut dapat masuk ke dalam pulpa gigi melalui beberapa macam cara seperti karies, atrisi, abrasi, dan erosi yang menyebabkan terbukanya tubuli dentin. Selain itu, bakteri juga



dapat masuk ke dalam saluran akar ketika dilakukan preparasi saluran akar serta masuk melalui poket periodontal secara langsung maupun tidak langsung melalui foramen apikal (Halkai *et al.*, 2014).

Infeksi saluran akar dimulai melalui invasi mikroorganisme, kolonisasi, pembelahan (multiplikasi) dan adanya aktivitas patogen. Kolonisasi terjadi bila tersedia kondisi fisik dan biokimia yang cocok bagi pertumbuhan bakteri serta faktor - faktor penghambat yang dapat menghancurkan mikroorganisme tidak cukup tersedia. Adanya cairan jaringan dan disintegrasi sel dari jaringan nekrotik yang membentuk *substrat nutrient* (polipeptida, asam amino) merupakan faktor penting dalam pertumbuhan mikroorganisme yang membuat saluran akar menjadi tempat yang ideal bagi perkembangbiakan bakteri dan reservoir bakteri (Walton *and* Torabinejad, 2008).

Kesalahan prosedur pada saat perawatan saluran akar, seperti instrument yang patah, perforasi, *overfilling*, *underfilling*, *ledge*, dan sebagainya merupakan penyebab langsung kegagalan endodontik. Namun, umumnya tidak membahayakan hasil perawatan endodontik kecuali terdapat infeksi yang bersamaan (Murad, 2008). Adanya kesalahan pada saat prosedur perawatan saluran akar ini akan mengganggu dan mempersulit prosedur yang dibutuhkan untuk mencapai kontrol yang adekuat dari infeksi saluran akar karena dapat menyebabkan mikroorganisme pada area tersebut bertahan dan memicu terjadinya infeksi pasca perawatan dan berlanjut ke kegagalan perawatan saluran akar (Chugal, 2001). Banyak kasus kegagalan perawatan saluran akar disebabkan oleh hasil perawatan yang kurang mampu memenuhi standar kontrol dan eliminasi infeksi bakteri.





Bakteri dapat masuk ke saluran akar apabila teknik aseptis tidak baik pada saat perawatan saluran akar (Mattigatti *et al.*, 2012).

Menurut penelitian yang dilakukan oleh E. Ercan dan M. Dalli (2006) mikroba yang terdapat pada infeksi saluran akar menunjukkan adanya 68,0% bakteri Gram positif, 27,9% bakteri Gram negatif, 52,8% bakteri fakultatif, dan *strict* anaerob sebesar 43,1%.

**Tabel 1. Bakteri pada saluran akar gigi nekrosis**

Obligat anaerob	Fakultatif Anaerob
<b>Gram positif bentuk bulat</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Peptostreptococcus</i></li> </ul>	<b>Gram positif bentuk bulat</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Streptococcus</i></li> <li>• <i>Enterococcus</i></li> </ul>
<b>Gram positif bentuk batang</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Lactobacillus</i></li> <li>• <i>Bifidobacterium</i></li> <li>• <i>Eubacterium</i></li> <li>• <i>Propionibacterium</i></li> </ul>	<b>Gram positif bentuk batang</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Actinomyces</i></li> </ul>
<b>Gram negatif bentuk bulat</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Veillonella</i></li> </ul>	<b>Gram negatif bentuk bulat</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Neisseria</i></li> </ul>
<b>Gram negatif bentuk batang</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Porphyromonas</i></li> <li>• <i>Prevotella</i></li> <li>• <i>Fusobacterium</i></li> <li>• <i>Selenomonas</i></li> <li>• <i>Campylobacter</i></li> </ul>	<b>Gram negatif bentuk batang</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Capnocytophaga</i></li> <li>• <i>Eikenella</i></li> </ul>

Persentase bakteri *Enterococcus faecalis* pada infeksi saluran akar berulang yang diteliti dengan berbagai metode pada berbagai



penelitian mencapai 43,3% (Pinheiro *et al.*, 2015). Hal ini menunjukkan bahwa bakteri *Enterococcus faecalis* merupakan mikroba dominan pada infeksi saluran akar berulang.

### 2.3 Bakteri *Enterococcus faecalis*

Penyebab utama infeksi pasca perawatan adalah mikroorganisme yang persisten pada apikal saluran akar gigi yang telah dirawat. Beberapa mikroorganisme yang ditemukan pada infeksi pasca perawatan mampu bertahan pada lingkungan yang tidak mendukung dan keterbatasan nutrisi. Penelitian menunjukkan bahwa mikroflora dengan prevalensi tinggi pada infeksi persisten adalah *Enterococci* dan *Streptococci*, kemudian *Lactobacilli*, *Actinomyces sp.*, *Peptostreptococci*, dan *Candida* (Luis *et al.*, 2004).

Berdasarkan taksonominya, klasifikasi bakteri *Enterococcus faecalis* adalah sebagai berikut:

Kingdom : *Bacteria*  
Filum : *Firmicutes*  
Famili : *Enterococcaceae*  
Kelas : *Bacili*  
Ordo : *Lactobacillales*  
Genus : *Enterococcus*  
Spesies : *Enterococcus faecalis* (Veterinary Bacteriology, 2015)



Gambar 1. Pewarnaan Gram *Enterococcus faecalis*



Sumber: Delisle and Tomalty, 2002

*Enterococcus faecalis* adalah bakteri fakultatif anaerob, kokus Gram positif dan tidak membentuk spora. Bakteri ini berbentuk ovoid dengan diameter 0,5 – 1  $\mu\text{m}$  dan terdiri dari rantai pendek, berpasangan atau bahkan tunggal (Hedge, 2009). Pada *blood agar*, permukaan koloni berbentuk sirkular, halus, dan menyeluruh (Vos *et al.*, 2011).

*Enterococcus faecalis* merupakan flora normal komensal yang habitatnya pada gastrointestinal dan rongga mulut (Kundabala *et al.*, 2002). Namun, dapat menjadi mikroorganisme patogen penyebab infeksi pada luka, bakteremia, endokarditis, dan meningitis. Sedangkan pada rongga mulut, *Enterococcus faecalis* merupakan salah satu jenis bakteri yang sering ditemukan pada saluran akar. Mikroorganisme ini dapat diisolasi dari berbagai infeksi rongga mulut serta berhubungan erat respon inflamasi periradikular (Delisle *and* Tomalty, 2002).



Bakteri ini memiliki dinding sel yang terdiri dari 40% peptidoglikan, sisanya merupakan *teichoic acid* dan polisakarida (Kundabala *et al.*, 2002). Peptidoglikan pada *Enterococcus faecalis* berfungsi untuk menahan pecahnya sel yang disebabkan oleh tekanan osmotik sitoplasmik yang tinggi (Arif, 2006). *Enterococcus faecalis* dapat bertahan pada pH 4 – 11 dan pada suhu 5 – 50 °C. Hal ini diperkirakan mendapat pengaruh dari impermeabilitas membran terhadap asam dan alkali (Walton *and* Torabinejad, 2008).

*Enterococcus faecalis* sering ditemukan pada saluran akar yang telah dilakukan pengisian saluran akar dengan gejala periodontitis apikal kronis (Hedge, 2009; Halkai *et al.*, 2014). *Enterococcus faecalis* menunjukkan banyak ditemukan pada infeksi persisten pada kasus kegagalan perawatan saluran akar daripada infeksi saluran akar primer (Halkai *et al.*, 2014).

Bakteri ini dapat tumbuh dengan atau tanpa oksigen dan bertahan pada lingkungan dengan pH alkalin yang ekstrim. Sebanyak 4% – 40% *E. faecalis* ditemukan pada infeksi endodontik primer dan bertambah banyak pada lesi periradikular persisten dengan prevalensi 24% - 77%. Faktor - faktor yang menyebabkan *E. faecalis* dapat bertahan di dalam saluran akar, antara lain: bertahan terhadap ketidaktersediaan nutrisi, berikatan dengan dentin, menginvasi tubulus dentin, mengubah respon host, menekan kerja limfosit, bersaing dengan bakteri lain, membentuk biofilm, dan resisten terhadap pemberian kalsium hidroksida. (Stuart *et al.*, 2006).

Menurut Javidi *et al.* (2011) kalsium hidroksida tidak mampu mengeliminasi seluruh bakteri *E. faecalis* dari saluran akar, baik



setelah satu hari maupun tujuh hari pemberian kalsium hidroksida.

Beberapa faktor virulensi *E. faecalis* yang berperan pada infeksi saluran akar, yaitu *aggregation substance (AS)*, *surface adhesions*, *sex pheromones*, *lipoteichoic acid (LTA)*, *extracellular superoxide*, *gelatinase*, *hyaluronidase*, *cytolysin AS-48*.

**Tabel 2 Faktor virulensi *Enterococcus faecalis* dan fungsinya**

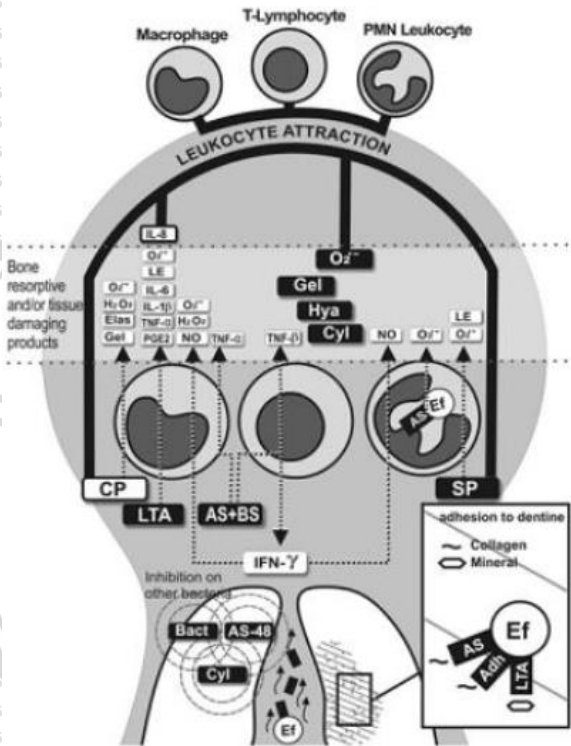
FUNGSI	FAKTOR VIRULENSI
Adhesi dan kolonisasi	<i>Aggregation Substance (AS)</i> <i>Lipoteichoic Acid (LTA)</i> <i>Surface adhesions</i> lainnya
Resistensi terhadap pertahanan <i>host</i>	<i>Aggregation Substance (AS)</i>
Menghambat bakteri lain	<i>Cytolysin AS-48</i> <i>Bacteriocins</i> lain
Kerusakkan jaringan	<i>Lipoteichoic Acid (LTA)</i> <i>Extracellular superoxide anion</i> <i>Gelatinase</i> <i>Hyaluronidase</i> <i>cytolysin</i>
Induksi inflamasi	<i>Sex pheromones</i> <i>Lipoteichoic Acid (LTA)</i>

Faktor-faktor virulensi bakteri dalam tubulus dentin dan saluran akar yang dilepas menuju daerah periradikular sehingga merangsang leukosit untuk menghasilkan mediator inflamasi atau enzim litik. Bakteri *Enterococcus faecalis* secara tidak langsung dapat menghasilkan perubahan patogen melalui proses inflamasi. Proses inflamasi lokal ini terjadi dengan cara menstimulasi leukosit untuk



melepas beberapa mediator yang ikut berperan dalam kerusakan periodikular yang dimodulasi oleh *sex pheromones*, LTA, dan *peptide corresponding inhibitor* (Nurdin dan Satari, 2013).

Gambar 2. Faktor virulensi *Enterococcus faecalis*



Sumber: Nurdin & Satari, 2011

*Sex pheromones* merupakan plasmid yang bersifat kemotaktik terhadap neutrofil manusia serta menginduksi produksi *superoxide* dan sekresi *lysosomal enzymes*. Resistensi antibiotik dan sifat – sifat virulensi lainnya, seperti produksi *cytolysin* dapat disebarluaskan di antara *strain Enterococcus faecalis* melalui system *sex pheromones*.



Enzim ini mengaktifasi system komplemen, yang memperbesar resorpsi tulang pada jaringan periapikal baik berupa kerusakan tulang maupun dengan menghambat pembentukan tulang baru (Mathew *and* Boophaty, 2011).

*Lipoteichoic acid (LTA)* melepas mediator inflamasi berupa TNF- $\alpha$ , interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8), prostaglandin (PGE2), *lysosomal enzymes*, dan *superoxide anion*. Mediator – mediator tersebut berperan dalam kerusakan jaringan (Nurdin & Satari, 2011).

*Superoxide anion* yang terdapat pada *extracellular superoxide* merupakan radikal oksigen yang sangat reaktif terlibat dalam kerusakan sel dan jaringan pada proses inflamasi. *Superoxide anion* juga dihasilkan oleh osteoklas dan berperan dalam resorpsi tulang. *Gelatinase* berkontribusi terhadap resorpsi tulang dan degradasi dentin matriks organik. Hal ini berperan penting terhadap timbulnya inflamasi periapikal (Nurdin & Satari, 2011).

*Hyaluronidase* membantu degradasi *hyaluronan* pada dentin dan dihubungkan dengan kerusakan jaringan. Peranan *hyaluronidase* ialah menyuplai nutrisi untuk bakteri, karena produk degradasi dari substrat target merupakan disakarida yang diangkut dan metabolisme pada intraseluler bakteri (Halkai, 2014).

*Enterococcus faecalis* mempunyai kemampuan untuk masuk fase *Viable But Non Culturable (VBNC)* yang merupakan fase dimana bakteri tersebut dapat bertahan hidup namun tidak dapat berkembang biak pada medium kultur. Kemampuan inilah yang membantu bakteri ini mampu bertahan pada lingkungan yang sulit seperti saluran akar.



Bakteri ini juga mampu bertahan dalam lingkungan yang ekstrim dengan cara mempertahankan homeostasis melalui pH internal yang menjaga agar enzim dan protein tetap berjalan normal. Ada dua macam cara homeostasis yaitu pasif dan aktif. Mekanisme aktif terjadi dengan cara mengontrol transport kation (kalium, natrium, dan proton) melalui membran sel. Mekanisme pasif terdiri dari permeabilitas membran yang rendah dan kemampuan buffer sitoplasma. Kedua mekanisme ini memungkinkan bakteri untuk menurunkan pH ketika suasana basa, dan menaikannya ketika suasana asam sehingga homeostasis dapat berlangsung. Dengan demikian, *Enterococcus faecalis* resisten dengan antimikroba kalsium hidroksida yang bekerja dengan memanfaatkan pH (Pinheiro *et al.*, 2015).

### 2.3.1 Tes Identifikasi Bakteri

Terdapat dua teknik identifikasi yang populer yaitu secara konvensional (Biokimiawi) dan dengan AIS (*Automatic Identification System*) salah satunya yaitu menggunakan *Vitek 2 compact* (Puspa, 2016).

#### 2.3.1.1 Metode Konvensional

##### 1. Tes Pewarnaan Gram

Tes pewarnaan Gram dilakukan untuk membedakan dua kelompok bakteri, yaitu Gram positif dan Gram negatif. Bahan yang digunakan dalam tes ini adalah kristal violet, lugo, alkohol, dan safranin (Tortora, 2010).

Bakteri yang telah difiksasi dengan panas akan membentuk noda pada kaca objek diwarnai dengan warna basa yaitu kristal violet.

Pewarna ini disebut pewarna primer karena warna ungu akan



mewarnai seluruh sel. Selanjutnya, noda dicuci dan pada noda spesimen ditetesi dengan alkohol yang merupakan *decorolozing agent* (senyawa peluntur warna) yang pada spesies bakteri tertentu dapat menghilangkan warna ungu dari sel. Setelah alkohol dicuci, noda spesimen diwarnai kembali dengan safaranin sebagai pewarna basa merah. Bakteri yang tetap berwarna ungu digolongkan sebagai bakteri Gram positif, sedangkan bakteri berwarna merah digolongkan sebagai bakteri Gram negatif. *Enterococcus faecalis* akan menghasilkan warna ungu karena merupakan bakteri Gram positif (Tortora, 2010).

Perbedaan warna ini disebabkan karena adanya perbedaan struktur pada dinding selnya. Pada bakteri Gram positif terdapat banyak peptidoglikan, sedangkan dinding bakteri Gram negatif banyak lipopolisakarida (Tortora, 2010).

## 2. Tes Katalase

Beberapa bakteri menghasilkan enzim katalase untuk memfasilitasi detoksifikasi seluler. Katalase menetralkan efek bakterisida hidrogen peroksida dan konsentrasi dalam bakteri telah berkorelasi dengan patogenisitas. Katalase berfungsi untuk menetralkan efek bakterisida hidrogen peroksida. Selain itu, enzim ini juga mempercepat pemecahan hidrogen peroksida menjadi air dan oksigen (Reiner, 2010).

Pada tes ini digunakan  $H_2O_2$  3%. Jika pada tes ini terlihat adanya gelembung udara maka hasilnya positif, namun bila tidak ada terlihat gelembung udara maka hasilnya adalah negatif. Hasil tes katalase *Enterococcus faecalis* adalah negatif (Reiner, 2010).





### 3. Tes Toleransi Garam (*Salt Tolerance Test*)

Kegunaan dari tes ini adalah untuk mengetahui kemampuan suatu mikroorganisme untuk tumbuh dalam konsentrasi garam yang tinggi.

Hal ini digunakan untuk membedakan *enterococci* dari *non-enterococci*. *Broth Heart Infusion Broth* (BHIB) yang mengandung 6,5% NaCl digunakan sebagai media uji. Selain itu juga terdapat sedikit glukosa dan bromkresol ungu sebagai indikator untuk produksi asam. Pengamatan pada tes ini dilakukan maksimal 48 jam (Forbes, 2007).

Jika BHIB terlihat keruh dengan atau tanpa perubahan warna dari ungu menjadi kuning maka hasilnya adalah positif (*enterococci*) dan jika tidak terlihat keruh dan tidak ada perubahan warna maka hasilnya ada negatif (*non-enterococci*) (Forbes, 2007).

### 4. Tes Biokimia

Tes biokimia dilakukan untuk mengidentifikasi bakteri *Enterococcus sp.* Bahan kimia yang digunakan untuk mengidentifikasi bakteri *Enterococcus faecalis* adalah L-arabinose, arginin dihidrolase, dan manitol. Pengamatan dilakukan pada sumur uji biokimia. Bakteri *Enterococcus faecalis* akan menunjukkan hasil positif terhadap arginin dihidrolase dan mannitol, serta hasil tes negatif terhadap L-arabinose (Manero, 1999).

### 5. Tes Hemolisis

Untuk mengetahui enzim hidrolitik yang dimiliki bakteri dapat menggunakan tes hemolisis. Bakteri memiliki enzim hemolisis yang dapat mengubah warna agar darah yang jelas disekitar koloni. Hemolisis alfa akan terbentuk zona hambatan di sekeliling koloni



berwarna kehijauan sampai kecokelatan. Diskolorasi ini terjadi karena adanya destruksi eritrosit parsial. Sedangkan hemolisis beta akan terbentuk zona hambatan yang jelas tidak berwarna (transparan) di sekitar koloni karena adanya destruksi eritrosit secara sempurna.

Diskolorasi pada media agar darah tidak terjadi pada hemolisis gamma atau non-hemolitik. (Buxton, 2013).

Hasil untuk *Enterococcus faecalis* adalah hemolisis positif muncul sebagai adanya zona kehijauan (hemolisis alfa) hingga hampir transparan (hemolisis beta) (Triyana, 2013).

### 2.3.1.2 Metode Automatis

Teknik identifikasi bakteri berkembang dengan menggunakan identifikasi secara otomatis. Menurut Thomas *et al.* (2001), identifikasi bakteri secara otomatis dan uji kerentanan telah dikembangkan dan dikomersialkan dalam dua dekade. Identifikasi bakteri secara otomatis biasanya menggunakan alat yaitu Vitek 2 *system*. Menurut Wallet *et al.* (2005), vitek 2 *system* merupakan alat identifikasi yang menggunakan *card identification*. Misalnya GP (Gram Positive) *card* dan GN (Gram Negative) *card*. Pada alat ini terdapat *database* yang dipergunakan untuk identifikasi bakteri secara otomatis. Hasil dari identifikasi menggunakan vitek ini berupa presentase kebenaran dari pengujian yang telah dicocokkan pada *database* (Wallet *et al.*, 2005).

Prosedur identifikasi dilakukan dengan membuat suspense menggunakan 0,45% sodium klorida dan kekeruhan disesuaikan dengan standar McFarland menggunakan *densycheck system*



(*bioMerieux*), lalu dipergunakan *card identification* untuk identifikasi bakteri secara otomatis (Wallet *et al.*, 2005).

### 2.3.2 Uji Kepekaan Bakteri terhadap Antimikroba

Antimikroba adalah obat pembasmi mikroba, terutama mikroba yang merugikan manusia. Obat antimikroba harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin untuk mikroba, tetapi relative tidak toksisk untuk hospes (Setiabudy, 2011). Senyawa antimikroba mempunyai dua macam efek terhadap pertumbuhan mikroba, yaitu bakteristatik dan bakterisidal. Bakterisidal memberikan efek dengan cara membunuh sel namun tidak terjadi lisis sel atau pecah sel. Sedangkan bakteristatik memberikan efek dengan cara menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh bakteri (Madigan *et al.*, 2012).

Daya antimikroba diukur secara *in vitro* untuk menentukan beberapa hal yaitu potensi zat antimikroba, konsentrasi dalam cairan tubuh dan jaringan, dan kepekaan mikroorganisme terhadap obat pada konsentrasi tertentu (Brooks *et al.*, 1996). Uji aktivitas antimikroba dapat dilakukan dengan dua metode. Metode yang pertama adalah metode dilusi atau metode pengenceran. Metode ini menggunakan tabung reaksi atau *microdilution plate* dan suspense bakteri yang diujikan memiliki konsentrasi  $10^6$  CFU/ml. Metode yang kedua adalah metode difusi. Syarat jumlah bakteri untuk uji kepekaan / sensitivitas dengan metode difusi yaitu  $10^5$  -  $10^8$  CFU/ml. Metode difusi ini dapat dilakukan melalui tiga metode berbeda, yaitu metode silinder, lubang/sumuran, dan cakram kertas (Nurhanafi *dkk.*, 2012).





### 2.3.2.1 Metode Dilusi

Metode dilusi digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari bahan antimikroba. Adapun prinsip metode dilusi yaitu dengan menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Lalu masing-masing tabung diisi dengan bahan yang telah diencerkan secara serial. Kemudian seri tabung diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 – 24 jam dan diamati kekeruan pada tabung. KHM dari bahan uji dilihat melalui konsentrasi terendah bahan pada tabung yang menunjukkan adanya hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba). Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar padat, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni mikroba yang tumbuh. KBM dari bahan uji ditentukan dari konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba (Dzen, *et al.*, 2003).

### 2.3.2.2 Metode Difusi Cakram

Metode difusi cakram sering disebut juga sebagai uji *Kirby-Bauer*. Metode ini menyediakan ukuran kualitatif dari kemampuan sebuah antimikroba untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Metode ini merupakan metode uji kepekaan pertama yang distandardisasikan dan merupakan metode yang sangat berguna meskipun ada pergeseran di laboratoris menggunakan mikro dilusi KHM atau prosedur *semi automatic* (Hermawan *dkk.*, 1994).

Pada metode ini obat dijenuhkan ke dalam cakram yang terbuat dari kertas kemudian ditanam dengan media perbenihan agar



padat yang telah dicampur dengan mikroba uji, lalu diinkubasikan 37°C selama 18-24 jam (Dzen *dkk.*, 2003). Setelah diinkubasikan, zona hambatan diukur tergantung pada konsentrasi cakram antimikroba dan karakteristik difusi obat yang melewati agar (McClatchey, 1994). Zona hambatan ditunjukkan dengan ciri area jernih disekitar cakram kertas yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba (Brooks *et al.*, 1996).

### 2.3.2.3 Metode Difusi Sumuran

Metode ini digunakan untuk menguji beberapa bahan antimikroba. Metode ini dilakukan dengan cara membuat lubang atau sumuran pada agar padat yang telah diinokulasikan dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, lalu lubang diisi dengan ekstrak yang akan diuji. Kemudian dilakukan inkubasi selama 18-24 jam. Potensi antimikroba diamati dengan pengukuran zona hambatan di sekeliling lubang dengan menggunakan jangka sorong (Kusmayati, 2007).

### 2.3.2.4 Metode Difusi Silinder

Metode ini dilakukan dengan menggunakan medium MHA (*Mueller-Hinton Agar*), atau bisa juga dengan GNA (*Glucose Nutrient Agar*) yang dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibuat menjadi dua lapis dengan ketebalan  $\pm 0,5$  cm. lapisan pertama dibuat pada temperatur kamar selama  $\pm 20$  menit hingga mengeras. Kemudian lapisan kedua dibuat yang sebelumnya telah dicampur dengan biakan bakteri uji sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam cawan petri. Sebelum mengeras, lapisan kedua ditempatkan pada silinder *stainless steel* dengan diameter luar 8 mm dan diameter dalam 6 mm



pada cawan petri dengan konsentrasi yang berbeda sesuai dengan sampel dan kontrol yang digunakan.

Selanjutnya cawan petri dimasukkan ke dalam incubator selama 24 jam pada temperatur 37°C. Efek antimikroba diketahui dengan cara mengukur diameter dari setiap zona inhibisi pertumbuhan bakteri yang terjadi disekitar silinder menggunakan jangka sorong setelah 24 jam masa inkubasi (Sabir, 2013).

## 2.4 Kencur (*Kaempferia galanga* L.)

### 2.4.1 Sejarah

Kencur (*Kaempferia galanga* L.) merupakan tanaman tropis yang banyak tumbuh pada berbagai daerah di Indonesia sebagai tanaman yang dipelihara. Tanaman ini sering digunakan sebagai ramuan obat tradisional dan sebagai bumbu dalam masakan sehingga para petani banyak membudidayakan tanaman ini. Bagian dari tanaman kencur yang diperdagangkan adalah buah akar yang tinggal di dalam tanah yang dikenal dengan rimpang kencur (Barus, 2009).

### 2.4.2 Sinonim dan nama daerah kencur

Kencur (*Kaempferia galanga* L.) memiliki nama yang berbeda – beda di beberapa wilayah di Indonesia, antara lain ceuko (Aceh), kencur (Jawa), cekuh (Bali), sukung (Minahasa), cakuru (Makasar), onegai (Buru), bataka (Ternate-tidore), cikur (Sunda), kencor (Madura), cekor (Kangean), soku (Bima), humapoto (Gorontalo), ukap (Irian) (Regianto, 2009).

### 2.4.3 Taksonomi

Klasifikasi *Kaempferia galanga* L. di dalam dunia botani adalah sebagai berikut:





Kerajaan : *Plantae*  
 Divisi : *Spermatophyta*  
 Sub Divisi : *Angiospermae*  
 Kelas : *Monocotyledoneae*  
 Ordo : *Zingiberales*  
 Famili : *Zingiberaceae*  
 Subfamili : *Zingiberoideae*  
 Genus : *Kaempferia*  
 Spesies : *Kaempferia galanga L. (Barus, 2009)*

**Gambar 3. Rimpang Kencur**



Sumber: Misbahatori, 2013.

#### 2.4.4 Karakteristik tanaman kencur

Kencur memiliki bentuk batang semu yang pendek. Daun kencur berbentuk bulat lebar, tumbuh mendatar di atas permukaan tanah dengan jumlah 3 sampai 4 helai. Permukaan daun bagian atas berwarna hijau sedangkan bagian atas berwarna hijau pucat. Panjang daun berkisar 10 – 12 cm dengan lebar 8 – 10 cm dan memiliki sirip



daun tipis dari pangkan daun tanpa tulang – tulang induk daun yang nyata (Robijanto, 2011).

Rimpang kencur ada di dalam tanah bergerombol dan bercabang dengan induk rimpang di tengah. Kulit ari berwarna cokelat dan bagian dalam putih berair dengan aroma yang tajam. Rimpang yang masih muda berwarna putih kekuningan dengan kandungan air yang lebih banyak, sedangkan rimpang yang lebih tua ditumbuhi akar pada ruas – ruas rimpang berwarna putih kekuningan (Barus, 2009).

Bunga kencur memiliki warna putih dan berbau harum serta terdiri dari 4 helai daun mahkota. Panjang sekitar 4 cm dan terdapat 4 sampai 12 bunga. Tangkai bunga berdaun kecil sepanjang 2 – 3 cm, tidak bercabang, dapat tumbuh lebih dari satu tangkai, panjang tangkai 5 – 7 cm berbentuk bulat dan beruas. Putik bunga menonjol keatas berukuran 1 – 1,5 cm, tangkai sari berbentuk corong pendek (Regianto, 2009).

#### 2.4.5 Kandungan kimia kencur

Rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) mengandung saponin, flavonoida, alkaloid, polifenol, dan minyak atsiri (Depkes, 2001). Minyak atisiri rimpang kencur merupakan senyawa yang mudah menguap dan terdiri atas borneol, sineol, methyl - p, cumaric acid, cinamicacid ethil ester, pentadecane, cinamic aldehide, kaemferin dan sineol, p-metoksi sinamat dan golongan flavonoid (Utami, 2013).



Tabel 3. Komponen Kimia Minyak Atsiri Rimpang Kencur

Komponen	Jumlah (%)
$\alpha$ -pinene	1,28
Camphere	2,47
Carvone	11,13
Benzene	1,33
Eucalyptol	9,59
Borneol	2,87
Sineol	8,76
Metil sinamat	23,23
Pentadekana	6,41
Etil p-metoksinamat	31,77

Berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilakukan oleh Nadia (2015), minyak atsiri rimpang kencur juga mengandung beberapa senyawa kimia yang dapat berfungsi sebagai antibakteri yaitu alkaloid, terpenoid, fenol, dan flavonoid. Uji fitokimia adalah suatu metode uji yang dilakukan untuk mengetahui kandungan golongan metabolit sekunder pada tumbuhan. Hasil uji fitokimia lain yang telah dilakukan oleh Hasanah (2011) juga menyatakan bahwa minyak atsiri rimpang kencur mengandung senyawa kimia seperti flavonoid, alkaloid, tannin, dan terpenoid (Aliya Nur Hasanah, 2011).

Alkaloid sebagai antibakteri mampu menghambat sintesis dinding sel bakteri, jika dinding sel bakteri tidak terbentuk dengan sempurna maka sel bakteri akan lisis dan hancur (Primawati *dkk.*, 2012). Terpenoid bekerja sebagai antibakteri melalui reaksi dengan





protein yang ada pada luar membran dinding sel bakteri sehingga terbentuk ikatan polimer yang dapat merusak protein sehingga mengakibatkan permeabilitas dinding sel bakteri terganggu dan pertumbuhan bakteri terhambat atau mati karena sel bakteri kekurangan nutrisi (Rachmawati, 2012).

Tanin merupakan senyawa antibakteri yang bersifat bakteristatik atau bakterisidal terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Akiyama *dkk.*, 2001). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah dengan cara menghambat protein yang ditunjukkan melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim serta inaktivasi fungsi materi genetik. Enzim *reverse transcriptase* dan DNA *topoisomerase* dihambat sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Nuria, 2009).

Senyawa fenol bekerja sebagai antibakteri dengan mendenaturasi protein sel bakteri melalui ikatan dengan protein. Ikatan tersebut akan mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma bakteri yang tersusun atas protein sehingga terjadi ketidakseimbangan makromolekul dan ion di dalam sel, sehingga sel menjadi lisis (Rijayanti, 2014).

Flavonoid adalah salah satu senyawa polifenol yang memiliki berbagai efek antara lain antioksidan, anti tumor, anti radang, antibakteri, dan anti virus. Senyawa ini bekerja sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi (Madijah, 2014).



Berdasarkan hasil uji fitokimia yang dilakukan oleh Nadia (2015), minyak atsiri rimpang kencur tidak mengandung saponin dan steroid. Saponin sebagai antibakteri dengan cara mengganggu ketegangan permukaan dinding sel bakteri sehingga meningkatkan kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler keluar dan mengikat sitoplasma sehingga sitoplasma keluar dari sel dan terjadi kematian sel (Ngajowa, 2013). Steroid sebagai antibakteri akan berikatan dengan membran lipid dan sensitivitas bakteri terhadap komponen steroid yang dapat mengakibatkan kebocoran liposom bakteri. Adanya interaksi tersebut menyebabkan menurunnya integritas dan perubahan morfologi dari membran sel bakteri (Rijayanti, 2014).

## 2.5 Minyak Atsiri

Minyak atsiri merupakan minyak yang mudah menguap pada temperatur kamar tanpa mengalami dekomposisi, tetapi dapat rusak karena penyimpanan jika dibiarkan lama. Minyak atsiri akan mengabsorpsi oksigen dari udara sehingga akan berubah warna, aroma, dan kekentalan sehingga sifat kimia juga akan berubah. Selain itu, minyak atsiri juga mempunyai rasa getir (*pungent taste*), tidak larut air, larut dalam pelarut organik, dan berbau harum sesuai dengan tanaman penghasilnya (Kadarohman, 2009)

Selain rimpang kencur, beberapa spesies lain yang dikenal mengandung minyak atsiri (*essential oil*) sebagai antimikroba antara lain, *allicin* dalam bawang putih, *cinnamic aldehyde* dalam kayu manis, *allyl isothiocyanate* dalam biji mostar, *thymol* dalam oregano.



Bahan – bahan tersebut dapat menstabilkan beberapa makanan yang diserang oleh mikroba (Nani, 2009).

### 2.5.1 Kandungan Minyak Atsiri

Pada umumnya minyak atsiri terdiri dari berbagai campuran persenyawaan kimia yang terbentuk dari unsur karbon (C), hidrogen (H) dan oksigen (O) serta beberapa senyawa kimia yang mengandung unsur nitrogen (N) dan belerang (S). Minyak atsiri dibagi dua berdasarkan komposisi kimia dan unsurnya, yaitu: hidrokarbon dan *oxygenated hydrocarbon*. Jenis hidrokarbon pada minyak atsiri sebagian besar terdiri atas: monoterpen (2 unit isoprene), sesquiterpene (3 unit isoprene), diterpen (4 unit isoprene), politerpen, paraffin, olefin dan hidrokarbon aromatik. Umumnya komponen kimia dalam minyak atsiri terdiri dari campuran hidrogen dan turunannya yang mengandung oksigen yang disebut dengan terpenoid (Parhan, 2008).

Dari segi kimia fisik, minyak atsiri hanya mengandung dua golongan senyawa yaitu oleoptena dan stearoptena. Oleoptena merupakan bagian hidrokarbon pada minyak atsiri dan berwujud cairan. Umumnya golongan oleoptena ini terdiri atas senyawa monoterpena, sedangkan stereoptena adalah senyawa hidrokarbon teroksidasi yang berwujud padat (Agusta, 2000).

### 2.6 Destilasi Uap

Destilasi uap ekstraksi dari senyawa yang kandungannya menguap seperti minyak atsiri yang berasal dari bahan segar atau simplisia dengan uap air melalui peristiwa tekanan parsial sehingga senyawa kandungan menguap dalam fase uap air dalam ketel secara





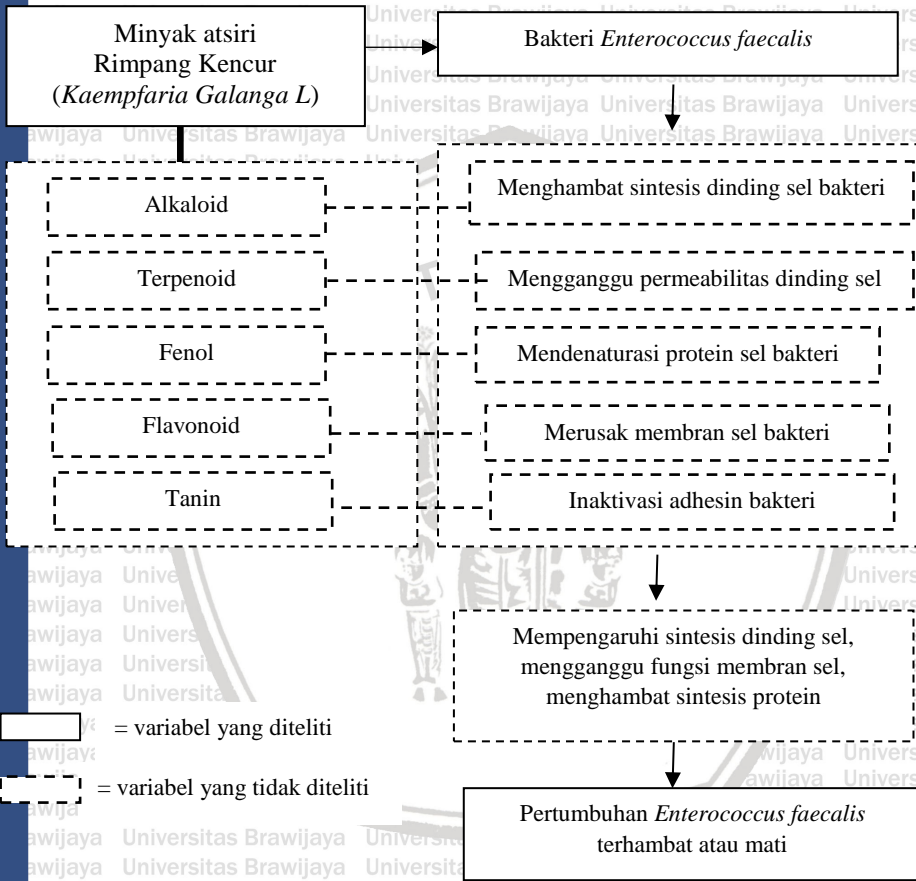
kontinu sampai sempurna, diakhiri dengan kondensasi fase uap campuran menjadi destilat air bersama senyawa yang terpisah sempurna atau sebagian (Depkes RI, 2000).

Bahan simplisia ini berasal dari tanaman obat yang merupakan bahan baku dalam pembuatan ekstrak baik sebagai produk maupun bahan obat (Depkes RI, 2000). Bahan simplisia dalam proses destilasi uap tidak tercelup ke dalam air secara keseluruhan, tetapi dilewati uap air sehingga senyawa kandungan yang menguap ikut terdestilasi. Sedangkan bahan simplisia dalam proses destilasi uap dan air, tercelup ke dalam air secara keseluruhan tetapi senyawa kandungan yang menguap tetap kontinu untuk ikut terdestilasi (Depkes RI, 2000).

Destilasi uap dilakukan untuk mengisolasi minyak atsiri dari tanaman. Bahan tanaman atau simplisia diletakkan dalam alembik sehingga uap air keluar dari tanaman dari bagian atas alembik kemudian dikondensasikan dan dikumpulkan di dalam tabung (Y. Li *et al.*, 2014).

### BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESA PENELITIAN

#### 3.1 Kerangka Konsep



Gambar 1. Skema Kerangka Konsep

Rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.) mengandung saponin, flavonoida, alkaloid, polifenol, dan minyak atsiri (Depkes, 2001). Minyak atsiri rimpang kencur merupakan senyawa yang mudah menguap dan terdiri atas borneol, sineol, methyl - p, cumaric acid, cinamic acid ethil ester, pentadecane, cinamic aldehyde, kaemferin dan sineol, p-metoksi sinamat dan golongan flavonoid (Utami, 2013).

Berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilakukan oleh Nadia (2015), minyak atsiri rimpang kencur mengandung beberapa senyawa kimia yang dapat berfungsi sebagai antibakteri yaitu alkaloid, terpenoid, fenol, tannin, dan flavonoid. Alkaloid sebagai antibakteri mampu menghambat sintesis dinding sel bakteri, jika dinding sel bakteri tidak terbentuk dengan sempurna maka sel bakteri akan lisis dan hancur (Primawati *dkk.*, 2012). Terpenoid bekerja sebagai antibakteri melalui reaksi dengan protein yang ada pada luar membran dinding sel bakteri sehingga terbentuk ikatan polimer yang dapat merusak protein sehingga mengakibatkan permeabilitas dinding sel bakteri terganggu dan pertumbuhan bakteri terhambat atau mati karena sel bakteri kekurangan nutrisi (Rachmawati, 2012).

Tanin merupakan senyawa antibakteri yang bersifat bakteristatik atau bakterisidal terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Akiyama *dkk.*, 2001). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah dengan cara menghambat protein yang ditunjukkan melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim serta inaktivasi fungsi materi genetik. Enzim *reverse transcriptase* dan





DNA *topoisomerase* dihambat sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Nuria, 2009).

Senyawa fenol bekerja sebagai antibakteri dengan mendenaturasi protein sel bakteri melalui ikatan dengan protein. Ikatan tersebut akan mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma bakteri yang tersusun atas protein sehingga terjadi ketidakseimbangan makromolekul dan ion di dalam sel, sehingga sel menjadi lisis (Rijayanti, 2014).

Flavonoid adalah salah satu senyawa polifenol yang memiliki berbagai efek antara lain antioksidan, anti tumor, anti radang, antibakteri, dan anti virus. Senyawa ini bekerja sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi (Madajah, 2014).

Berdasarkan sifat senyawa antibakteri yang dimiliki oleh minyak atsiri rimpang kencur tersebut, maka dapat menghambat pertumbuhan bahkan sampai dengan kematian sel bakteri *Enterococcus faecalis*.

### 3.2 Hipotesis Penelitian

Minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) memiliki efek antibakteri terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.



## BAB IV METODOLOGI PENELITIAN

### 4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini menggunakan desain penelitian eksperimental laboratoris dengan rancangan *true experimental posttest only control group design*, dengan fokus penelitian pada keadaan bakteri *Enterococcus faecalis* setelah perlakuan berupa pemberian minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) secara *in vitro*. Tujuan penelitian ini adalah membuktikan bahwa minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L.*) memiliki efek antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis* sebagai bahan medikamentosa saluran akar dengan menggunakan metode dilusi tabung untuk mengetahui Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

### 4.2 Sampel Penelitian

Sampel penelitian adalah *Enterococcus faecalis*, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

### 4.3 Variabel Penelitian

#### 4.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah minyak atsiri rimpang kencur dengan konsentrasi 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%.



### 4.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis*.

### 4.4 Lokasi dan Waktu Penelitian

#### 4.4.1 Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

#### 4.4.2 Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Desember 2018 – Januari 2019.

### 4.5 Definisi Operasional

1) Minyak atsiri rimpang kencur adalah minyak murni yang berasal dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) yang diperoleh dari CV. ETERIS NUSANTARA Jogjakarta yang telah disertai *Certificate of Analysis*.

2) *Enterococcus faecalis* merupakan bakteri kokus gram positif yang bersifat fakultatif anaerob dan dapat berkoloni secara rantai, soliter, ataupun berpasangan. *Enterococcus faecalis* yang digunakan adalah *Enterococcus faecalis* yang dimiliki oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

3) Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi terendah bahan coba yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri setelah diinkubasi 24 jam dan tidak tumbuh koloni bakteri pada media perbenihan. KHM diperoleh dengan tingkat kekeruhan minyak atsiri rimpang kencur yang telah diberi bakteri uji dalam media *Brain Heart*





*Infusion Broth* (BHIB). Kekeruhan dapat diamati dengan bantuan kertas bergaris – garis hitam yang diletakkan di belakang tabung – tabung uji. KHM ditandai oleh tabung dengan larutan yang mulai tampak jernih atau tabung dengan garis hitam yang paling terlihat jelas.

4) Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah konsentrasi terendah dari minyak atsiri rimpang kencur yang mampu membunuh *Enterococcus faecalis*. Jumlah koloni pada setiap konsentrasi dihitung secara kuantitatif menggunakan *colony counter*. KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri (Dzen, et al., 2003).

5) *Original Inoculum* (OI) adalah inokulasi bakteri dengan konsentrasi  $10^6$  CFU/ml yang diinokulasikan pada media BHIA/agar padat.

## 4.6 Bahan dan Alat Penelitian

### 4.6.1 Bahan dan Alat Tes Dilusi Tabung

- a. Minyak atsiri rimpang kencur
- b. isolat bakteri *Enterococcus faecalis*
- c. *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB)
- d. *Brain Heart Infusion Agar* (BHIA)
- e. Akuades
- f. Tabung reaksi
- g. Rak tabung reaksi
- h. Pipet
- i. *Ose*
- j. Inkubator
- k. *bunsen brander*



l. spidol

m. kertas label

n. *vortex*

#### 4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari prosedur identifikasi bakteri

*Enterococcus faecalis* (identifikasi otomatis dengan vitek 2 system), pembiakan sampel bakteri *Enterococcus faecalis*, dan uji aktivitas antimikroba terhadap *Enterococcus faecalis* dengan metode dilusi tabung, serta dilakukan pengamatan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM).

##### 4.7.1 Minyak Atsiri Rimpang Kencur

Pengambilan minyak atsiri rimpang kencur dengan cara destilasi uap air yang dilakukan oleh produsen ETERIS NUSANTARA Yogyakarta yang telah disertai *Certificate of Analysis*. Minyak atsiri rimpang kencur yang dihasilkan memiliki kemurnian 100% sehingga perlu dilakukan pengenceran pada tahap selanjutnya.

##### 4.7.2 Pembuatan Kontrol Negatif

Kontrol negatif yang digunakan pada penelitian ini adalah larutan Dimetil Sulfoksida DMSO 10% + Tween 80 0,5%. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan sebelumnya, larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5% tidak mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis* yang ditandai dengan tidak adanya zona hambat di sekeliling lubang sumuran. (Prabuseenivasan *et al.*, 2006).



Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5% dibuat berdasarkan perhitungan sebagai berikut (misal dibutuhkan 5000  $\mu\text{L}$  larutan kontrol negatif):

$$\begin{aligned}\text{Volume DMSO 10\%} &= 10/100 \times 5000 \mu\text{L} \\ &= 500 \mu\text{L}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Volume Tween 80 0,5\%} &= 0,5/100 \times 5000 \mu\text{L} \\ &= 25 \mu\text{L}\end{aligned}$$

Volume akuades steril yang dibutuhkan

$$\begin{aligned}&= 5000 \mu\text{L} - (\text{volume DMSO 10\%} + \text{volume Tween 80 0,5\%}) \\ &= 5000 \mu\text{L} - (5000 \mu\text{L} + 25 \mu\text{L}) \\ &= 5000 \mu\text{L} - 525 \mu\text{L} \\ &= 4475 \mu\text{L}\end{aligned}$$

#### 4.7.3 Pengenceran Minyak Atsiri Rimpang Kencur

Proses pengenceran minyak atsiri rimpang kencur dilakukan dengan metode *serial dilution* menggunakan pelarut DMSO 10% + Tween 80 0,5%. *Serial Dilution* adalah metode pengenceran yang dilakukan secara bertahap pada zat tertentu dalam suatu larutan. Konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur yang digunakan dalam penelitian ini adalah untuk uji pendahuluan yaitu 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%. Setelah itu dilakukan perapatan konsentrasi dengan konsentrasi 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%.

Pengenceran minyak atsiri rimpang kencur dilanjutkan dengan menggunakan metode *serial dilution* sebagai berikut:

1. Konsentrasi 8% = 0,8 ml minyak atsiri rimpang kencur

konsentrasi 100% + 0,2 ml DMSO 10% + Tween 80 0,5%



2. Konsentrasi 7% = 0,7 ml minyak atsiri rimpang kencur  
konsentrasi 100% + 0,3 ml DMSO 10% + Tween 80 0,5%
3. Konsentrasi 6% = 0,6 ml minyak atsiri rimpang kencur  
konsentrasi 100% + 0,4 ml DMSO 10% + Tween 80 0,5%
4. Konsentrasi 5% = 0,5 ml minyak atsiri rimpang kencur  
konsentrasi 100% + 0,5 ml DMSO 10% + Tween 80 0,5%
5. Konsentrasi 4% = 0,4 ml minyak atsiri rimpang kencur  
konsentrasi 100% + 0,6 ml DMSO 10% + Tween 80 0,5%
6. Konsentrasi 3% = 0,3 ml minyak atsiri rimpang kencur  
konsentrasi 100% + 0,7 ml DMSO 10% + Tween 80 0,5%

#### 4.7.4 Identifikasi Bakteri *Enterococcus faecalis*.

Bakteri *Enterococcus faecalis* diambil dari Rumah Sakit Saiful Anwar lalu dilakukan identifikasi bakteri dengan menggunakan alat identifikasi VITEK 2 *system* oleh Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Saiful Anwar.

Hasil yang diperoleh dalam identifikasi dengan VITEK 2 dinyatakan dalam presentase untuk kebenaran organisme yang berhasil diidentifikasi, yaitu jika nilai presentase *probability* >85% maka hasil tersebut masih dapat diterima, namun jika <85% maka bakteri yang teridentifikasi masih meragukan dan harus diulang kembali dalam pemurnian.



Tabel 1. Keterangan Hasil Identifikasi dengan VITEK 2

<i>Confidence level</i>	<i>Choice</i>	<i>% Probability</i>
<i>Excellent</i>	1	96 to 99
<i>Very Good</i>	1	93 to 95
<i>Good</i>	1	89 to 92
<i>Acceptable</i>	1	85 to 88
<i>Low discrimination</i>	2 to 3	
<i>Inconclusive</i>	>3	n/a
<i>Unidentified Organism</i>	0	n/a

#### 4.7.3.1 Pemiakan Bakteri

1. Strain bakteri *Enterococcus faecalis* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi *Brain Heart Infusion Broth (BHIB)*.
2. *Enterococcus faecalis* yang telah teridentifikasi, dibiakkan pada medium cair dengan menggunakan *BHIB* dan disimpan dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
3. Lalu BHI-B yang berisi bakteri dimasukkan ke dalam alat spektrofotometer kemudian diukur *Optical Density (OD)* atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada  $\lambda = 625 \text{ nm}$ . Dari hasil yang diperoleh ( $OD = 0,1$ ) sebanding dengan  $1 \times 10^8 \text{ CFU/ml}$  kemudian dilakukan pengenceran hingga  $1 \times 10^6 \text{ CFU/ml}$  dengan menggunakan rumus  $N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$  (Murray *et al.*, 1999)



4. Untuk mendapatkan suspensi bakteri yang mengandung  $1 \times 10^6$  CFU/ml dilakukan pengenceran dengan cara mengambil 1 ml dari tabung yang mengandung  $1 \times 10^8$  CFU/ml lalu dicampur dengan 9 ml NaCl 0,9% steril, sehingga didapatkan suspensi  $1 \times 10^7$  CFU/ml. kemudian dilanjutkan sekali lagi hingga mencapai konsentrasi suspensi bakteri yang digunakan untuk tes, yaitu  $1 \times 10^6$  CFU/ml.

5. Kemudian dari hasil pengenceran tersebut, bakteri diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 1 cc lalu ditetaskan ke cawan petri berisi media agar dan diratakan dengan ose.

#### 4.7.3.2 Prosedur Uji Antibakteri Metode Dilusi Tabung

Rangkaian uji aktivitas antibakteri minyak atsiri rimpang kencur adalah sebagai berikut:

1. Disediakan 8 tabung steril untuk koloni bakteri *Enterococcus faecalis* yang telah dibiakkan dalam BHI dan telah distarakan kekeruhannya dengan spektrofotometer. Serta sediakan 8 plate steril, 6 plate untuk perlakuan tersebut, 1 plate sebagai kontrol negatif (K-) dan 1 plate sebagai kontrol positif (K+).
2. Dilakukan penelitian pendahuluan untuk pencarian konsentrasi pengulangan.
3. Menyiapkan minyak atsiri rimpang kencur dengan konsentrasi minyak atsiri 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%. Setelah itu dilakukan perapatan konsentrasi berdasarkan hasil dari penelitian pendahuluan.





4. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan konsentrasi  $1 \times 10^6$  CFU/ml

5. Suspensi bakteri *Enterococcus faecalis* dimasukkan pada semua tabung, masing – masing sebanyak 1 ml ditambah dengan konsentrasi minyak atsiri, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$ .

6. Pada uji pendahuluan, didapatkan konsentrasi 12,5% tidak terdapat pertumbuhan bakteri dan pada konsentrasi 6,25% masih terdapat pertumbuhan bakteri. Maka untuk mencari konsentrasi yang merupakan KHM dan KBM, penelitian dilanjutkan dengan merapatkan konsentrasi yang dimulai dari konsentrasi 8% hingga 3% karena diperkirakan bakteri sudah mulai tidak tumbuh sebelum konsentrasi 12,5%. Sehingga konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur yang digunakan adalah:

Tabung 1: 0% (Kontrol negatif)

Tabung 2: 3%

Tabung 3: 4%

Tabung 4: 5%

Tabung 5: 6%

Tabung 6: 7%

Tabung 7: 8%

Tabung 8: Cresotin (kontrol positif)

7. Setelah 24 jam kemudian, nilai KHM didapatkan dengan melihat kekeruhan tabung. Tingkat kekeruhan tabung diamati



secara visual dengan dibantu oleh kertas bergaris – garis hitam yang diletakkan dibelakang tabung.

8. Selanjutnya dari masing – masing tabung dilusi diambil satu ose untuk diinokulasikan pada media BHIA. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

9. Kontrol negatif digoreskan pada BHIA sebagai *original inoculum* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

10. Pada hari ketiga, nilai KBM dilihat dari jumlah koloni yang terbentuk dengan menggunakan *colony counter*. KBM ditentukan dengan tidak adanya jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media BHI-A

#### 4.8 Estimasi Jumlah Pengulangan

Dalam penelitian ini banyaknya pengulangan ditentukan berdasarkan perhitungan rumus Frederer (1995):

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

Keterangan :

t : jumlah perlakuan dalam penelitian

r : jumlah perlakuan ulang (sampel)

Dalam penelitian ini digunakan, yaitu minyak atsiri dengan konsentrasi 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, satu kontrol negatif, dan satu tabung sebagai kontrol positif, maka:

$$(t - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$(8 - 1) (r - 1) \geq 15$$

$$7r - 7 \geq 15$$

$$7r \geq 23$$



$$r \geq 3,3$$

Jadi, jumlah pengulangan pada penelitian adalah 3 kali

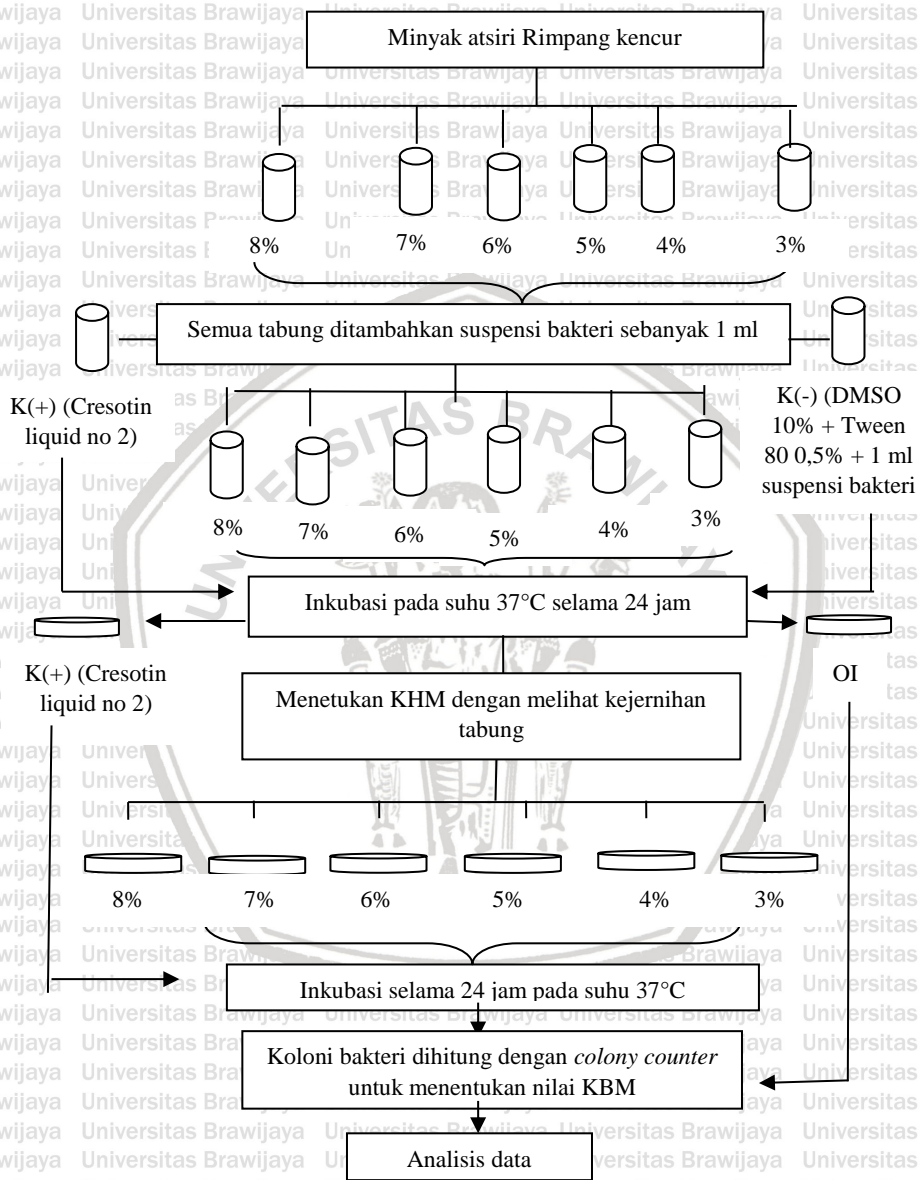
#### 4.9 Analisis Data

Dilakukan tiga kali pengulangan percobaan, kemudian hasil data yang diperoleh dianalisis menggunakan uji statistik *one way ANOVA* dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur terhadap jumlah koloni *Enterococcus faecalis*. Uji korelasi untuk menunjukkan apakah ada hubungan antara konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur dengan jumlah pertumbuhan koloni *Enterococcus faecalis*, yaitu untuk mengetahui arah hubungan tersebut, apakah dengan peningkatan konsentrasi akan terjadi penurunan jumlah koloni dan sebaliknya, atau tidak berhubungan. Sedangkan uji regresi digunakan untuk mengetahui seberapa besar hubungan tersebut.





### 4.10 Alur Penelitian



**Gambar 1. Alur Penelitian.**



## BAB V HASIL DAN PEMBAHASAN

### 5.1 Hasil

#### 5.1.1 Minyak atsiri Rimpang Kencur

Minyak atsiri yang digunakan adalah minyak murni yang berasal dari rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) yang diperoleh dari CV. ETERIS NUSANTARA Jogjakarta yang telah disertai *Certificate of Analysis*. Minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) berbentuk cair dan berwarna kuning.

**Gambar 1. Minyak atsiri Rimpang Kencur**



#### 5.1.2 Hasil Identifikasi *Enterococcus faecalis*

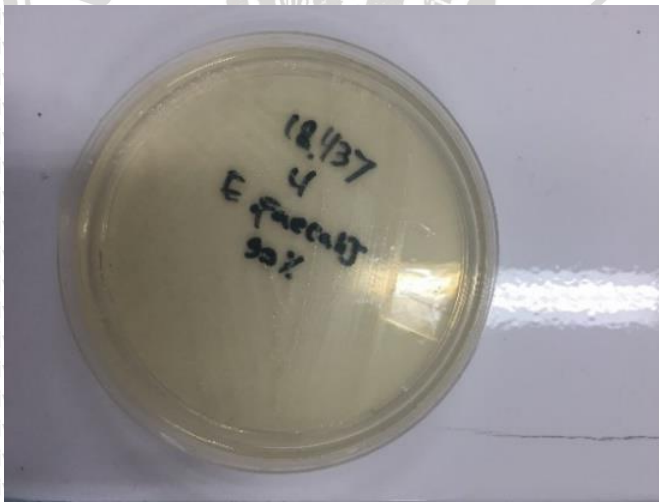
Isolat bakteri *Enterococcus faecalis* yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum bakteri digunakan untuk penelitian, telah dilakukan uji identifikasi bakteri terlebih dahulu untuk memastikan bakteri tersebut adalah *Enterococcus faecalis*. Isolat



bakteri diidentifikasi secara otomatis dengan menggunakan VITEK 2 oleh Laboratorium Mikrobiologi Rumah Sakit Saiful Anwar. Hasil yang diperoleh dalam identifikasi dengan VITEK 2 dinyatakan dalam presentase untuk kebenaran organisme yang berhasil diidentifikasi.

Untuk klasifikasi presentase dalam hasil analisis dengan VITEK 2 dapat dilihat pada Tabel 4, jika nilai presentase *probability* >85% maka hasil tersebut masih dapat diterima, namun jika <85% maka bakteri yang teridentifikasi masih meragukan dan harus diulang kembali dalam pemurnian. Hasil identifikasi menunjukkan presentase *probability* 99% (gambar terlampir), maka dapat disimpulkan bahwa bakteri yang diidentifikasi adalah bakteri *Enterococcus faecalis*.

**Gambar 2. Isolat bakteri *Enterococcus faecalis***

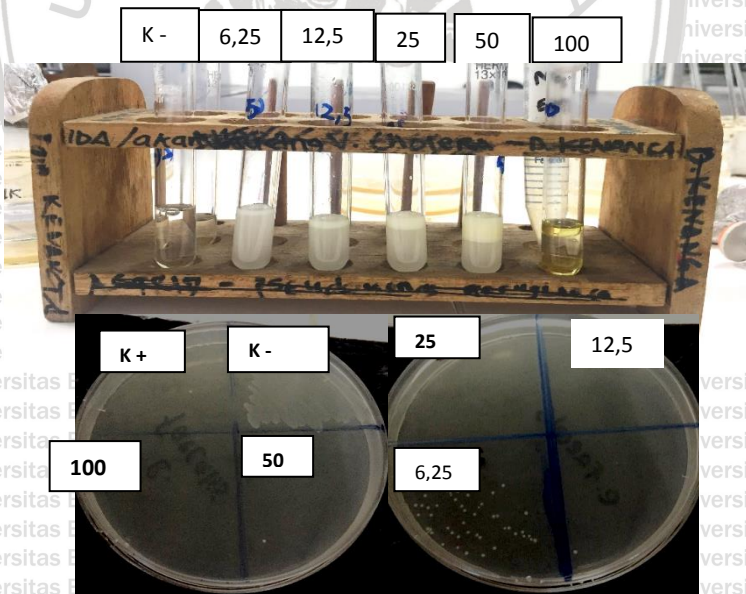




### 5.1.3 Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk memperoleh konsentrasi seminimal mungkin agar diperoleh hasil yang lebih teliti. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian pendahuluan adalah 100%; 50%; 25%; 12,5%; dan 6,25%. Hasil uji pendahuluan didapatkan konsentrasi 12,5% tidak terdapat pertumbuhan bakteri dan pada konsentrasi 6,25% masih terdapat pertumbuhan bakteri. Maka untuk mencari konsentrasi yang merupakan KHM dan KBM, dilanjutkan dengan merapatkan konsentrasi menggunakan konsentrasi 8%; 7%; 6%; 5%; 4%; dan 3% karena diperkirakan bakteri sudah mulai tidak tumbuh sebelum konsentrasi 12,5%.

**Gambar 3. Hasil Uji Pendahuluan**



#### 5.1.4 Hasil Dilusi Tabung dan Uji Pengulangan

Penelitian dilakukan dengan menggunakan metode dilusi tabung dengan konsentrasi 8%; 7%; 6%; 5%; 4%; dan 3%; *Cresotin liquid no. 2* sebagai kontrol positif dan 0% sebagai kontrol negatif.

Setelah seluruh tabung diinkubasi selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C kemudian dilihat hasil KHM.

KHM (Kadar Hambat Minimum) adalah kadar terendah dari antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Untuk mengetahui KHM, dapat diamati dengan melihat perbedaan tingkat kekeruhan pada setiap tabung yang dibantu dengan kertas bergaris – garis hitam yang diletakkan dibelakang tabung. Hasil penentuan KHM dengan metode dilusi tabung menggunakan konsentrasi 8%; 7%; 6%; 5%; 4%; dan 3%; *Cresotin liquid no. 2* sebagai kontrol positif dan 0% sebagai kontrol negatif diperoleh tampak perbedaan kekeruhan antar konsentrasi. Pada konsentrasi 6% tabung terlihat mulai tampak jernih.

Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa konsentrasi 6% sebagai nilai KHM.

Setelah dilakukan penentuan KHM, dilakukan penentuan KBM (Kadar Bunuh Minimum) yaitu kadar terendah dari antibakteri yang dapat membunuh bakteri. KBM ditandai dengan tidak ada pertumbuhan koloni bakteri pada media BHI-A. Untuk mengetahui konsentrasi yang merupakan KBM, hasil dilusi tabung digoreskan pada *plate* berisi media BHI-A, kemudian setiap *plate* diinkubasi selama 18 – 24 jam pada suhu 37°C. Berdasarkan gambar 10, dapat diperoleh bahwa minyak atsiri rimpang kencur, pada konsentrasi 8%



ditetapkan sebagai nilai KBM karena tidak ada pertumbuhan bakteri pada konsentrasi tersebut.

Setelah itu masing – masing perlakuan dilakukan penggoresan ulang pada media BHI-A sebanyak tiga kali.

Berdasarkan gambar 10, terlihat bahwa koloni bakteri pada kontrol negatif dan konsentrasi 3% rapat dan banyak sehingga diperlukan pengenceran untuk memudahkan perhitungan koloni bakteri. Pada perlakuan kontrol negatif dilakukan pengenceran sebanyak seribu kali, dan pada konsentrasi 3% dilakukan pengenceran sebanyak sepuluh kali. Setelah itu, koloni bakteri pada setiap *plate* dihitung dengan menggunakan *colony counter*.

**Gambar 4. Hasil Penentuan KHM dengan Dilusi Tabung**

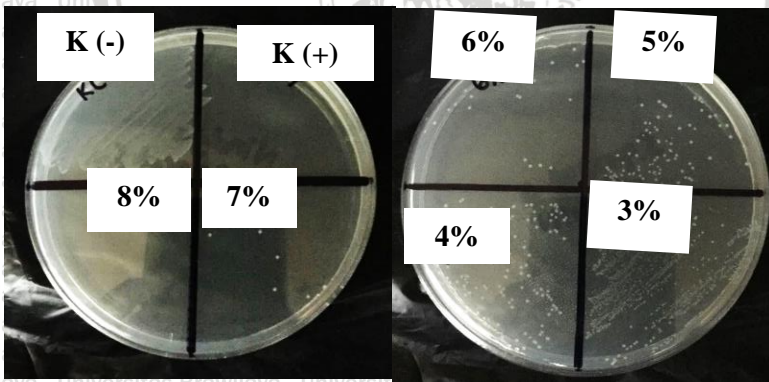




**Tabel 1. Hasil Perhitungan Menggunakan Colony Counter**

Konsentrasi	Jumlah Koloni			Total	Total x Pengenceran	Rerata
	I	II	III			
K (-)	934	945	1047	2926	2926000	975333,3
3%	869	849	927	2645	26450	8816,6
4%	764	709	801	2274	2274	758
5%	558	571	783	1912	1912	637,3
6%	473	481	354	1308	1308	436
7%	130	111	245	486	486	162
8%	0	0	0	0	0	0
K(+)	0	0	0	0	0	0

**Gambar 5. Hasil Streaking Media BHI-A.**



## 5.2 Analisis Data

Analisis data dilakukan berdasarkan jumlah koloni bakteri yang tumbuh pada media BHI-A. Data yang didapat terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas varian data. Uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas



menggunakan uji *Levene*. Setelah diketahui bahwa uji normalitas dan homogenitas didapatkan hasil data terdistribusi normal dan homogen ( $p>0,05$ ), maka dilanjutkan dengan uji parametrik *One way ANOVA*, uji Korelasi *Pearson* dan uji Regresi Linear.

### 5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Uji Homogenitas

Pada tabel 6 dapat diketahui bahwa hasil uji normalitas didapatkan nilai signifikansi jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* adalah 0,360 ( $p>0,05$ ) sehingga dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi normal. Setelah dilakukan uji normalitas, maka dilanjutkan dengan uji homogenitas menggunakan uji *Levene* untuk mengetahui apakah data homogen atau tidak. Pada tabel 6, hasil uji *Levene* didapatkan signifikansi data sebesar 0,382 ( $p>0,05$ ) sehingga dapat disimpulkan bahwa data homogen.

**Tabel 2. Hasil Normalitas, Homogenitas, dan One Way ANOVA**

Kelompok	Rerata Jumlah Koloni Bakteri	Uji <i>Shapiro – Wlik</i>	Uji <i>Levene</i>	Uji <i>One Way ANOVA</i>
		Angka signifikansi	Angka signifikansi	Angka signifikansi
K -	975333,3			
3%	8816,6			
4%	758			
5%	637,3			
6%	436	0,360	0,382	0,000
7%	162			
8%	0			
K +	0			

### 5.2.2 Analisis Hasil Perhitungan Jumlah Koloni Bakteri

Data yang telah diuji normalitas dan homogenitas selanjutnya dilakukan uji *One Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan



rata – rata dari setiap konsentrasi minyak atsiri yang digunakan terhadap rata – rata jumlah koloni bakteri yang tumbuh.

Berdasarkan tabel 6, hasil uji *One Way ANOVA* didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ( $p < 0,05$ ). Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang signifikan pada pemberian berbagai tingkatan konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur terhadap jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis*. Selanjutnya dilakukan uji *Post-Hoc* untuk membandingkan pada setiap dua kelompok konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur terhadap jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* sehingga dapat diketahui kelompok mana yang memiliki perbedaan rata – rata jumlah koloni yang bermakna.

Uji *Post-Hoc* Tukey merupakan uji pembandingan berganda (*Multiple Comparison Test*) bertujuan untuk menunjukkan pasangan kelompok konsentrasi yang memberikan perbedaan signifikan dan yang tidak memberikan perbedaan signifikan. Hasil uji *Post-Hoc* Tukey pada Tabel 7, diketahui jika nilai signifikansi kurang dari 0,05 ( $p < 0,05$ ) maka antar konsentrasi memiliki perbedaan yang bermakna pada jumlah koloni yang tumbuh, sedangkan jika nilai signifikansi lebih dari 0,05 ( $p > 0,05$ ) maka antar rerata konsentrasi tidak memiliki perbedaan yang bermakna pada jumlah koloni yang tumbuh. Pada konsentrasi 4%, 5%, 6%, 7% dan 8% menunjukkan perbedaan yang signifikan jika dibandingkan dengan konsentrasi 0%.





**Tabel 3. Hasil Uji *Post – Hoc* Tukey**

	K-	3%	4%	5%	6%	7%	8%	K+
K-		0,652	0,015*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
3%	0,652		0,338	0,006*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
4%	0,015*	0,338		0,365	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
5%	0,000*	0,006*	0,365		0,027*	0,000*	0,000*	0,000*
6%	0,000*	0,000*	0,000*	0,027*		0,002*	0,000*	0,000*
7%	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,002*		0,107	0,107
8%	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,107		1,000
K+	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,107	1,000	

Keterangan:

\* : perbedaan yang signifikan (Batas perbedaan adalah 5% atau 0,05).

### 5.2.3 Hasil Uji Korelasi Pearson

Uji Korelasi *Pearson* digunakan untuk mengetahui ada tidaknya hubungan yang bermakna antar konsentrasi yang diberikan terhadap rerata jumlah koloni yang tumbuh. Hasil uji korelasi *Pearson* didapatkan bahwa terdapat korelasi atau hubungan yang bermakna antara konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur yang diberikan terhadap rerata jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* yang tumbuh dengan nilai signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ). Pada tabel 8, kekuatan korelasi sebesar -0,922 yang menunjukkan kekuatan



korelasinya termasuk dalam kategori korelasi sangat kuat dengan arah korelasi negatif (berlawanan arah). Dengan demikian, dapat disimpulkan bahwa semakin besar konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur yang diberikan, maka rerata jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* yang tumbuh akan menurun (Dahlan, 2014).

#### 5.2.4 Hasil Uji Regresi Linear

Setelah dilakukan uji korelasi *Pearson*, maka dapat dilanjutkan dengan uji regresi linear untuk mengetahui bentuk hubungan antara konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur dan jumlah koloni bakteri serta besarnya pengaruh peningkatan konsentrasi minyak atsiri kemangi terhadap jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Pada tabel 8, didapatkan koefisien determinasi *R square* sebesar 0,850 yang menunjukkan bahwa pengaruh pemberian minyak atsiri rimpang kencur terhadap penurunan rerata jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* yang tumbuh sebesar 85%. Hubungan antara pemberian minyak atsiri rimpang kencur dengan jumlah koloni bakteri yang tumbuh diperoleh dengan rumus berikut:

$$Y = a + bX$$

$$Y = 1151,202 + (-127,518X)$$

Nilai Y adalah jumlah koloni bakteri yang tumbuh dan nilai X adalah besarnya konsentrasi. Hasil dari perhitungan Y lalu dibandingkan dengan *range* pada tabel *One Way ANOVA* pada kolom 95% *Confidence Interval For Mean*, jika lebih rendah dari *Lower Bound* pada kontrol negatif (0%) maka minyak atsiri rimpang kencur memiliki perbedaan cukup efektif pada setiap pemberian konsentrasinya terhadap pertumbuhan koloni bakteri.



Tabel 4. Hasil Uji Kolerasi Pearson dan Regresi Linear

Kelompok	Rerata Jumlah Koloni Bakteri	Uji Korelasi Pearson		Uji Regresi Linear
		Angka signifikansi	Hubungan Korelasi	Nilai R Square
K(-)	975333,3			
3%	8816,6			
4%	758			
5%	637,3			
6%	436	0,000	-0.922	0,850
7%	162			
8%	0			
K(+)	0			

### 5.3 Pembahasan

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris secara *in vitro* untuk mengetahui apakah minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galangal L*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*. Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode dilusi tabung. Metode ini dilakukan karena minyak atsiri rimpang kencur tidak pekat dan tidak berwarna keruh, sehingga dapat diamati dengan baik melalui metode dilusi tabung. Metode ini dapat memberikan kemungkinan untuk memperkirakan nilai Konsentrasi Hambar Minimum (KHM) melalui media *broth* dalam tabung, dan juga nilai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) melalui media agar (Balouiri *et al.*, 2016). Penelitian ini menggunakan *Brain Heart Infusion Broth* (BHI-B) untuk menentukan KHM dan media *Brain Heart Infusion Agar* (BHI-A) untuk menentukan nilai KBM.





Isolat bakteri *Enterococcus faecalis* yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Sebelum digunakan untuk penelitian, bakteri *Enterococcus faecalis* telah diidentifikasi menggunakan alat identifikasi VITEK 2. VITEK 2 adalah sebuah sistem untuk identifikasi bakteri yang secara otomatis melakukan semua langkah yang diperlukan untuk identifikasi dan uji resistensi bakteri (Ligozzi, *et al.*, 2002). Sampel yang akan dimasukkan kedalam alat VITEK 2 harus berbentuk suspensi bakteri yang dibuat dengan cara mengambil beberapa koloni kedalam tabung polistiren kemudian disuspensikan kedalam cairan steril saline 0,45% lalu di cek dengan menggunakan *DensiCheck* yang menggunakan prinsip turbidimetri setara dengan pengenceran 0,5 McFarland (Atef dan Rania, 2014). Reagen dimasukkan kedalam alat VITEK 2 kemudian diinkubasi selama 24 jam kemudian hasilnya dapat diinterpretasikan secara otomatis pada komputer. VITEK 2 dilengkapi dengan seperangkat alat komputer dan reagen uji yang berbentuk kaset atau kartu reagen. Kartu reagen memiliki 64 lubang atau sumuran yang berisi substrat uji yang memiliki aktivitas metabolik. Kartu reagen memiliki 3 jenis yaitu GN (Gram negatif) yang digunakan untuk mengidentifikasi secara langsung bakteri Gram negatif, GP (Gram positif) yang digunakan untuk mengidentifikasikan bakteri Gram positif, dan YST (Yeast) digunakan untuk mengidentifikasi jenis yeast, tergantung dari jenis bakteri atau jamur yang akan diidentifikasi. Selain itu, VITEK 2 juga dapat digunakan untuk uji resistensi bakteri terhadap antibiotik.



Kebenaran organisme yang berhasil diidentifikasi dengan menggunakan VITEK 2 dinyatakan dalam presentase *probability*, yaitu jika nilai presentase *probability* >85% maka hasil tersebut masih dapat diterima, namun jika <85% maka bakteri yang teridentifikasi masih meragukan dan harus diulang kembali dalam pemurnian. Berdasarkan hasil identifikasi VITEK 2 tersebut, dapat dibuktikan bahwa bakteri yang digunakan adalah benar *Enterococcus faecalis* karena memiliki nilai presentase *probability* sebesar 99%.

Minyak atsiri rimpang kencur yang digunakan untuk penelitian ini didapatkan dari CV. ETERIS NUSANTARA Jogjakarta yang telah disertai *Certificate of Analysis*. Minyak atsiri rimpang kencur yang dihasilkan memiliki kemurnian 100% sehingga perlu dilakukan pengenceran pada tahap selanjutnya. Metode pembuatan minyak menggunakan metode destilasi uap dari rimpang kencur jenis *Kaempferia galangal L.* Minyak atsiri rimpang kencur berbentuk cairan dan berwarna kuning bening. Minyak ini dapat larut dalam turunan alkohol tetapi tidak larut dalam air. Maka dari itu penelitian ini menggunakan DMSO 10% + Tween 80 0,5% sebagai pelarut untuk pengenceran minyak atsiri kemangi dalam berbagai konsentrasi. Hal ini dikarenakan DMSO 10% + Tween 80 0,5% tidak memiliki aktivitas antibakteri sehingga dapat digunakan sebagai bahan kontrol negatif (Rattanachaikumsopon and Phumkhachorn, 2010).

Konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur yang digunakan pada penelitian pendahuluan adalah 100%, 50%, 25%, 12,5%, dan 6,25%. Setelah diinkubasi selama 24 jam, bakteri sama sekali tidak tumbuh pada perlakuan konsentrasi 12,5%. Berdasarkan hasil uji



pendahuluan tersebut, dilakukan perapatan konsentrasi dengan konsentrasi 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, dan 3%. Rentang konsentrasi yang digunakan sebesar 1%. Pemilihan rentang konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini dikarenakan terlihat beda yang jelas dari jumlah koloni yang tumbuh pada setiap kenaikan konsentrasi. Pada konsentrasi 100% hingga 12,5% tidak terlihat adanya pertumbuhan bakteri pada media BHI-A, namun terlihat bakteri mulai tumbuh pada konsentrasi 6,25%.

Penentuan nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan menggunakan metode dilusi tabung. Hasil uji dilusi tabung menunjukkan bahwa tabung mulai tampak jernih pada konsentrasi 6% yang menandakan kadar hambat minimum (KHM) minyak atsiri rimpang kencur terhadap *Enterococcus faecalis* adalah 6%. Penentuan nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM) dilakukan dengan mengambil 1 ose pada tiap tabung, kemudian di *streaking* pada media BHI-A, dan di inkubasi selama 18-24 jam suhu 37°C. Setelah itu dihitung jumlah koloni pada setiap *plate* menggunakan *colony counter* (Balouiri *et al.*, 2016). Hasilnya didapatkan nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM) minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galangal L*) terhadap *Enterococcus faecalis* pada konsentrasi 8%.

Kemampuan minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galangal L*) dalam menghambat dan membunuh *Enterococcus faecalis* diperkirakan oleh karena zat-zat aktif yang terkandung didalamnya yang bekerja sebagai antibakteri, yaitu alkaloid, terpenoid, fenol, dan flavonoid (Nadia, 2015).





Alkaloid sebagai antibakteri mampu menghambat sintesis dinding sel bakteri, jika dinding sel bakteri tidak terbentuk dengan sempurna maka sel bakteri akan lisis dan hancur (Primawati *dkk.*, 2012). Terpenoid bekerja sebagai antibakteri melalui reaksi dengan protein yang ada pada luar membran dinding sel bakteri sehingga terbentuk ikatan polimer yang dapat merusak protein sehingga mengakibatkan permeabilitas dinding sel bakteri terganggu dan pertumbuhan bakteri terhambat atau mati karena sel bakteri kekurangan nutrisi (Rachmawati, 2012).

Tanin merupakan senyawa antibakteri yang bersifat bakteriostatik atau bakterisidal terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* (Akiyama *dkk.*, 2001). Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah dengan cara menghambat protein yang ditunjukkan melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim serta inaktivasi fungsi materi genetik. Enzim *reverse transcriptase* dan DNA *topoisomerase* dihambat sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Nuria, 2009).

Senyawa fenol bekerja sebagai antibakteri dengan mendenaturasi protein sel bakteri melalui ikatan dengan protein. Ikatan tersebut akan mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma bakteri yang tersusun atas protein sehingga terjadi ketidakseimbangan makromolekul dan ion di dalam sel, sehingga sel menjadi lisis (Rijayanti, 2014).

Flavonoid adalah salah satu senyawa polifenol yang memiliki berbagai efek, antara lain antioksidan, anti tumor, anti radang, antibakteri, dan anti virus. Senyawa ini bekerja sebagai antibakteri



dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi (Madijah, 2014).

Data yang diperoleh dari hasil penelitian kemudian dianalisis menggunakan uji statistic dengan berbagai uji. Data diuji normalitas dan homogenitas terlebih dahulu dan didapatkan nilai signifikansi dari jumlah koloni *Enterococcus faecalis* sebesar 0,360 ( $p>0,05$ ) dan 0,382 ( $p>0,05$ ) sehingga dapat disimpulkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen. Data yang telah terbukti normal dan homogen dapat dilanjutkan uji *One Way* ANOVA untuk mengetahui adanya pengaruh antara pemberian minyak atsiri terhadap rata – rata jumlah koloni yang tumbuh dan mengetahui perbedaan rata – rata dari setiap konsentrasi minyak atsiri yang digunakan terhadap rata – rata jumlah koloni yang tumbuh. Hasil uji *One Way* ANOVA didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ( $p<0,05$ ). Hal tersebut menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pada pemberian minyak atsiri terhadap rata – rata jumlah koloni yang tumbuh dan setidaknya terdapat dua kelompok dari delapan perlakuan yang mempunyai perbedaan rata – rata jumlah koloni yang bermakna. Setelah itu dilanjutkan uji *Post-Hoc* Tukey untuk mengetahui kelompok mana yang memiliki perbedaan rata – rata jumlah koloni yang bermakna (Dahlan, 2014). Menurut hasil *Post-Hoc* Tukey, diketahui bahwa antara kontrol negatif dengan konsentrasi 4%, 5%, 6%, 7%, dan 8% memiliki nilai signifikansi kurang dari 0,05. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian setiap pasangan konsentrasi minyak atsiri memberikan perbedaan efek yang bermakna terhadap pembentukan koloni *Enterococcus faecalis*. Hasil



uji *Post-Hoc* Tukey konsentrasi 8% dengan kontrol positif didapatkan nilai signifikansi sebesar 1,000. Hasil ini menunjukkan bahwa pemberian minyak atsiri dengan konsentrasi 8% sudah memiliki aktivitas antibakteri setara dengan kontrol positif. Hasil uji *Post-Hoc* Tukey terhadap kontrol negatif dengan konsentrasi 3% didapatkan nilai signifikansi 0,652; konsentrasi 3% dengan 4% didapatkan nilai signifikansi 0,338; konsentrasi 4% dengan 5% didapatkan nilai signifikansi 0,652. Hasil menunjukkan bahwa pemberian kedua konsentrasi minyak atsiri tidak memberikan perbedaan efek yang bermakna terhadap pembentukan koloni *Enterococcus faecalis*. Adanya perbedaan yang tidak signifikan antar konsentrasi coba dikarenakan rentang perbedaan konsentrasi yang sedikit dan terbentuk jumlah koloni yang tidak berbeda signifikan (Gaio *et al.*, 2015).

Hasil uji kolerasi *Pearson* didapatkan bahwa terdapat korelasi atau hubungan yang bermakna antara konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur yang diberikan terhadap rerata jumlah koloni bakteri yang tumbuh dengan nilai signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ). Kekuatan korelasi bernilai sebesar -0,922 yang menunjukkan kekuatan korelasinya termasuk dalam kategori sangat kuat karena mendekati -1 dengan arah negatif (berlawanan arah). Hal ini berarti bahwa semakin besar konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur yang diberikan, maka rerata jumlah koloni bakteri *Enterococcus faecalis* yang tumbuh akan menurun (Dahlan, 2014).

Hasil uji regresi linear didapatkan koefisien determinasi R square (R) sebesar 0,850 berarti pengaruh pemberian minyak atsiri rimpang kencur terhadap penurunan rerata jumlah koloni bakteri





*Enterococcus faecalis* sebesar 85%, sedangkan sebesar 15% dapat dipengaruhi hal lain seperti kondisi geografis, lingkungan, waktu panen, irigasi, dan pemupukkan dari tanaman minyak atsiri tersebut yang menyebabkan perbedaan efek yang dihasilkan oleh minyak atsiri tersebut (Abbasy *et al.*, 2015).

Efek antibakteri minyak atsiri rimpang kencur telah didukung oleh beberapa penelitian yang sudah pernah dilakukannya.

Pada penelitian Noor Fajeriwati (2017), disebutkan bahwa minyak atsiri rimpang kencur menunjukkan daya antibakteri yang signifikan terhadap *Escherichia coli* dengan konsentrasi bunuh minimum 10%.

Penelitian terhadap *Enterococcus faecalis* sebelumnya juga menunjukkan pertumbuhan yang terhambat oleh beberapa minyak atsiri. Salah satunya adalah penelitian oleh Mario (2015), menyebutkan bahwa minyak atsiri sereh dapur memiliki efektivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada konsentrasi 25%.

Uraian diatas sesuai dengan hipotesis yang diajukan bahwa minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galangal L*) memiliki daya antibakteri yang dapat menghambat dan membunuh bakteri *Enterococcus faecalis*.



## BAB VI PENUTUP

### 6.1 Kesimpulan

#### 6.1.1 Kesimpulan Umum

Minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) memiliki efek antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis*.

#### 6.1.2 Kesimpulan Khusus

1. Nilai Kadar Hambat Minimum (KHM) minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) terhadap *Enterococcus faecalis* adalah konsentrasi 6%.
2. Nilai Kadar Bunuh Minimum (KBM) minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) terhadap *Enterococcus faecalis* adalah konsentrasi 8%.
3. Adanya perbedaan rata – rata dari setiap konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) terhadap *Enterococcus faecalis* yang tumbuh.
4. Adanya korelasi sangat kuat dengan arah negatif, yaitu semakin besar konsentrasi minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) yang diberikan, maka jumlah koloni *Enterococcus faecalis* yang tumbuh akan menurun.

### 6.2 Saran

Dengan mempertimbangkan adanya keterbatasan pada penelitian ini, maka perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai:

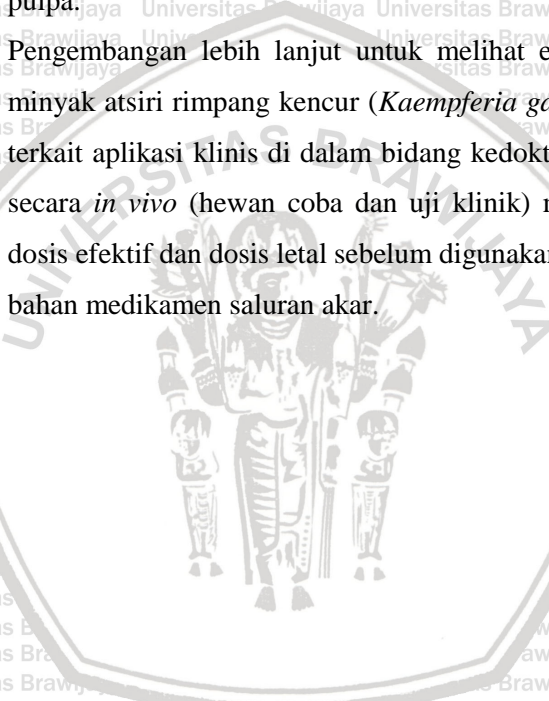
1. Mengidentifikasi senyawa aktif dan mekanisme kerja spesifik yang terkandung dalam minyak atsiri rimpang



kencur (*Kaempferia galanga L*) untuk mengetahui farmakokinetik, farmakodinamik, dan efek toksik sebelum digunakan sebagai bahan pengobatan.

2. Efektifitas minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) sebagai antibakteri terhadap bakteri lain dalam rongga mulut yang juga berperan dalam penyakit pulpa.

3. Pengembangan lebih lanjut untuk melihat efektifitas minyak atsiri rimpang kencur (*Kaempferia galanga L*) terkait aplikasi klinis di dalam bidang kedokteran gigi secara *in vivo* (hewan coba dan uji klinik) mengenai dosis efektif dan dosis letal sebelum digunakan sebagai bahan medikamen saluran akar.





## DAFTAR PUSTAKA

- Agusta, A., 2009. Minyak Atsiri Tumbuhan Tropika Indonesia. Penerbit ITB, pp. 8-29.
- Ajizah, A., 2004. Sensitivitas Salmonella Typhimurium Terhadap Ekstrak Daun Psidium guajava L.. *Jurnal Bioscientie*, 1(1), pp. 31-8.
- Aliya Nur Hasanah, F. N. E. F. d. A. Z., 2011. Analisis Kandungan Minyak Atsiri dan Uji Aktivitas Antiinflamasi Ekstrak Rimpang Kencur (*Kaempferia galanga* L.). *Jurnal Matematika & Sains*, pp. 147-152.
- Arum Darjono, U. N., 2011. Analisis Minyak Atsiri Serai (*Cymbopogon Citratus*) Sebagai Alternatif Bahan Irigasi Saluran Akar Gigi. *Majalah Sultan Agung*, 49(124), pp. 1-10.
- Athanassiadis, B., 2007. The Use of Calcium Hydroxide, Antibiotics, Biocides, as Antimicrobial Medicament in Endodontics. *Australian Dental Journal*, Issue 1, pp. 546-82.
- Barus, R., 2009. *Amidasi Etil P. Metoksisinamat yang Diisolasi dari Kencur (Kaempferia galanga L)*, Sumatera Utara: USU Repository.
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S. & Morse, S. A., 2007. Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology. Dalam: 24 penyunt. USA: s.n.
- Buxton, R., 2013. *Blood Agar Plate and Hemolysis Protocols*. [Online] Available at: <http://microbelibrary.org/component/resource/laboratory-test/2885>
- Carson, C., 2002. Mechanism of Action of Melaleuca alternifolia (Tea Tree) Oil on Staphylococcus aureus Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy. 46(6), pp. 1914-1920.
- Chugal, N., Clive, J. & Spangberg, L., 2001. A prognostic model for assessment of the outcome of endodontic treatment: effect of biologic and diagnostic variables. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, pp. 91: 342-352



- Dash, P. R., Mahmuda, N. & Mohammad Shawkat , A., 2104. In vivo cytotoxic and In vitro antibacterial activity of Kaempferia galanga. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(1), pp. 172-177.
- Delgado, R. et al., 2010. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on Enterococcus faecalis.. *J Endod*, II(36), pp. 1389-1393.
- Delisle, G. & Tomalty , L., 2002. Enterococcus faecalis in a Blood Culture. *American Society for Microbiology*.
- Dzen, S., Roekistiningsih, Sanarto, S. & Winarsih , W., 2003. *Bakteriologi Medik*. 1st penyunt. Malang: Bayumedia Publishing.
- Ercan, E., Dalli, M., Yavuz, I. & Ozekinci, T., 2006. I nvestigation of Microorganisms in Infected Dental Root Canals. *Biotechnol and Biotechnol Eq*, Issue 20, pp. 166-72.
- Fisher, K. & Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of Enterococcus. *Microbiology*, pp. 1749-57.
- Forbes, B., 2007. *Bailey & Scott's: Diagnostic Microbiology*. Ke12 penyunt. St. Louis: C.V. Mosby Company.
- Fouad, A., 2009. *Endodontic Microbiology*. Iowa: Wiley-Blackwell.
- Fré dé ric Wallet, C. L. (2005). Performances of VITEK 2 Colorimetric Cards for Identification of Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, 4402-406.
- Gomes, B., Pinheiro, E. & Gade Neto CR, 2004. Microbiology Examination of Infected Dental Root Canals. *Oral Microbiol Immunol*, 19(2), pp. 71-76.
- Grossman, L. L., Oliet, S. & Del Rio, C. E., 2010. *Ilmu Endodontik dalam Praktek (terj.)*, edisi kesebelas. Jakarta: EGC.
- Halkai, 2014. Evaluation of the presence of Eenterococcus faecalis in root cementum: A confocal laser scanning



- microscope analysis. *J Conserv Dent* 2014, Volume 17, pp. 119-23.
- Hedge, V., 2009. Enterococcus faecalis; clinical significance & treatment. *Endodontology*, 7(1), pp. 48-54.
- Javidi, M., Zarei, M. & Afkhami, F., 2011. Antibacterial Effect of Calcium Hydroxide on Intraluminal and Intratubular Enterococcus Faecalis. *Iranian Endodontic Journal*, 6(3), pp. 103-106.
- Jawetz, Melnick & Adelberg, 2008. *Mikrobiologi Kedokteran*. Jakarta: EGC.
- Kayaoglu G, D. O., 2004. Virulence Factors of Enterococcus faecalis: Relationship to Endodontic Diseases. *Sages Journal*, 15(5), pp. 308-20.
- Kundabala, M. & Suchitra, U., 2002. Enterococcus Faecalis: An Endodontic Pathogen. *J Endodod*, Volume 3, pp. 11-13.
- Kusmiyati, S. A., 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga Porphyridium cruentum. *Biodiversitas*, 8(1), pp.48-53.
- Ling, T. K. W., 2001. Evaluation of VITEK 2 Rapid Identification and Susceptibility Testing System Against Gram - Negative Isolates. *Journal of Microbiology*, pp. 2964 - 2966.
- Madigan, 2003. *Biology of Microorganism, 10th Ed.* New York: Southern Illinois University Carbondale.
- Miranti, L., 2009. Pengaruh Konsentrasi Minyak Atsiri Kencur (*Kaempferia galanga L.*) dengan Basis Salep Larut Air Terhadap Sifat Fisik Salep dan Daya Hambat Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara *In Vitro*., Surakarta: Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah.
- Misbahatori, D., 2013. KENCUR. Obat Penyakit.
- Nurdin, D. & Satari, M., 2011. Peranan *Enterococcus faecalis* terhadap persistensi infeksi saluran akar. [Online].



Nurhanafi, F., Murwani, S. & Winarso, D., 2012. *Perbandingan Potensi Antimikroba Ekstrak n-Heksana Daun Kelor (Moringa oleifera) dengan kulit Biji (Pericarp) Jambu Mete (Anacardium occidentale) terhadap bakteri Pseudomonas aeruginosa secara in vitro*. [Online] Available at: [http://pkh.ub.ac.id/wp-content/uploads/2012/10/0811313011-Faris-Nurhanafi-rev\\_pdf](http://pkh.ub.ac.id/wp-content/uploads/2012/10/0811313011-Faris-Nurhanafi-rev_pdf) [Diakses 24 Desember 2017].

Rattanachaikunsopon, Pongsak., Phumkhachorn, Parichat. 2010. Antimicrobial Activity of Basil (*Ocimum basilicum*) Oil Against *Salmonella Enteritidis* in Vitro and in Food. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 74(6) : 1200-1204.

Regianto, H., 2009. *Minyak Atsiri Rimpang Kencur (Kaempfarai galaga L) Karakterisasi Simplisia, isolasi, Analisis Komponen Minyak Atsiri secara GC-MS*, Sumatera Utara: USU Repository.

Reiner, 2010. Catalase Test Protocol. *ASM Confrence for Undergraduate Educators*.

Rhodes, J. S., 2006. Advanced Endodontics: Clinical Retreatment and Surgery. In: *Advanced Endodontics: Clinical Retreatment and Surgery*. London: Taylor & Francis Group, p. 130.

Robijanto, B., 2011. *Semi Sintesis N, N-Bis(2-Hidroksietil)-3-(4-Metoksifenil) Akrilamida dari Etil P- Metoksisinamat Hasil Isolasi Rimpang Kencur (Kaempferia Galanga, L) Melalui Amidasi Dengan Dietanolamin*, Sumatera Utara: USU Repository.

Rosa, O. P. d. S., Torres, S. A., Ferreira, C. M. & Ferreira, F. B. d. A., 2002. In vitro effect of intracanal medicaments on strict anaerobes by means of the broth dilution method. *Pesqui Odontol Bras*, 16(1), pp. 1-6.

Samaranayake, L., 2006. *Essential Microbiology for Dentistry*. London: Churchill Living Stone.



- Sedgley, L., 2005. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canal ex vivo. *Int Endod J*, pp. 38(10); 735-42.
- Setiani, L., 2010. *Uji Bioaktivitas minyak atsiri Rimpang Temu Putih (Curcuma zedoaria (Bergroscoe)) terhadap Agrobacterium turnefacien A-208*, s.l.: Universitas Udayana.
- Stock, c., Walker, R. & Gulabivala, K., 2004. *Endodontics 3rd Ed.* pp. 1-25, 135.
- Stuart, C., Schwartz, S., Beeson, T. & et al, 2006. Its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *Journal of Endodontics*, pp. 32,93-8.
- Suprava, S. et al., 2014. *Evaluation of yield, quality and antioxidant activity of essential oil of in vitro propagated Kaempferia galanga Linn. Journal of Acute Disease*, pp. 124-130.
- Suryo, J., 2010. *Herbal Penyembuh Gangguan Pernapasan*. Yogyakarta: B First.
- Tehnodent, 2016. *DENTAL KIT CRESOTIN*. [Online] Available at: <http://www.tehnodent.org/en/assets/template/files/EC/instruction%20Cresotin.pdf>
- Tortora, G., Funke BR & Case, C., 2010. *Microbiology an Introduction 10th Ed.* San Fransisco: Pearson Education Inc.
- Tyagi, A. K. & Malik, A., 2010. [Online] Available at: [http://www.biomed\\_central.com/1472-6882/10/65](http://www.biomed_central.com/1472-6882/10/65)
- Walton, R. E. & Torabinejad, M., 2008. *Prinsip dan Praktik Ilmu Endodontik*. Jakarta: EGC.
- Winarto, W., 2007. *Tanaman Obat Indonesia Untuk Pengobatan Herbal*. Jakarta: Karyasari Herba Media.
- Winter, F. S., 2011. Root Canal Irrigants and Disinfectants. *American Association of Endodontics*.

