

Perbandingan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Rasamala (*Altingia excelsa noronha*) dan Bahan Pengisi 3 Mix terhadap *Enterococcus faecalis*

Risyandi Anwar, Suaeni Kurnia Wirda, Etny Dyah Harniati

Faculty of Dentistry, Universitas Muhammadiyah Semarang, Indonesia

Abstract: **Introduction :** Lesion Sterilization and Tissue Repair (LSTR-3MIX) are new paradigm in caries care with or without involving pulp and periapical by using combination of three antibiotics. Bacteria that cause endodontic or root canal infection are dominated by *Enterococcus faecalis*, which is facultative anaerobic gram-positive bacteria and the bacteria are resistant against antimicrobial substance and often found in failed endodontic treatment. LSTR method is an effort that disinfects pulp lesions by killing the bacteria through using three antibiotics, which are metronidazole, ciprofloxacin, and minocycline. The use of several kinds of antibiotics can trigger the resistance of bacteria. However, it is needed an alternative of new antibiotic finding by using natural antibacterial herbal medicine as filler substance for endodontic that has antibacterial ability as balanced as 3MIX antibiotic pasta. **Purpose :** This research aimed at knowing the difference of antibacterial effect between rasamala leaf extract against *E. faecalis* bacteria that was compared with 3MIX antibiotic pasta. **Method :** The method used in this research was laboratory experiment by utilizing post test only control group design. This research was consisted of 6 treatment groups of rasamala leaf extract with concentration of 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, and 1 control group of 3MIX antibiotic pasta. **Result :** 3MIX antibiotic was more effective in inhibiting the growth of bacteria rather than rasamala leaf extract in inhibiting the growth of *Enterococcus faecalis*. **Conclusion :** ethyl acetate from rasamala leaf extract was not more effective than 3MIX antibiotic in inhibiting the growth of *Enterococcus faecalis*.

Keywords: Rasamala leaf extract, LSTR, *Enterococcus faecalis*, 3 MIX

PENDAHULUAN

Karies gigi masih menjadi masalah utama kesehatan pada anak-anak dan orang dewasa di Indonesia. Prevalensi karies gigi di Indonesia menunjukkan angka yang tinggi. Survei Kesehatan Rumah Tangga (SKRT) tahun 2009, 73% penduduk Indonesia mengalami karies gigi.¹ Karies gigi adalah kerusakan pada jaringan keras gigi (enamel dan dentin) disebabkan oleh demineralisasi asam yang dihasilkan oleh bakteri.² Kerusakan jaringan keras gigi akibat karies apabila dibiarkan terlalu lama akan mengakibatkan kerusakan pada jaringan pulpa dan menyebabkan kematian pulpa (nekrosis), selain itu penyebaran infeksi dapat berlanjut ke jaringan periapikal yang berakibat timbulnya abses periapikal. Infeksi utama penyebab penyakit pulpa dan periapikal adalah kombinasi bakteri aerob dan anaerob. Spesies bakteri yang paling sering di jumpai pada saluran akar adalah *Peptostreptococcus* diikuti oleh *Streptococcus*, *Porphyromonas*, dan *Enterococcus faecalis*.³ Bakteri utama pada infeksi saluran akar di dominasi oleh *Enterococcus faecalis* yang merupakan bakteri gram positif fakultatif anaerob yang resisten terhadap bahan antimikrobal dan sering ditemukan pada perawatan saluran akar yang gagal.⁴

Saat ini telah terjadi perubahan paradigma tidak hanya pada perawatan saluran akar tapi juga pada praktek di kedokteran gigi seperti karies, pulpitis tanpa membuang dentin yang terinfeksi termasuk jaringan dentin yang lunak, jaringan pulpa dan instrumensasi pada saluran akar serta obturasi pada saluran akar dan menunjukkan hasil klinis yang memuaskan. Metode tersebut adalah pengisian saluran akar dengan menggunakan campuran 3 antibiotik minosiklin, ciproflosasin dan metronidazol atau yang biasa di sebut 3 MIX LSTR (*Lesion Sterilization and Tissue Repair*). *Lesion Sterilization and Tissue Repair* (LSTR) merupakan upaya mendesinfeksi lesi-lesi pulpa dengan cara membunuh bakteri menggunakan tiga macam antibiotik yaitu minosiklin, ciprofloxacin dan metronidazole. Konsep ini dikembangkan oleh Unit Penelitian kariologi di Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Nigata pada tahun 1988. Penelusuran litelatur telah menunjukkan bahwa pasta antibiotik 3MIX efektif dalam mendesinfeksi saluran akar dan penyembuhan lesi pada jaringan periradikuler.⁵ Penggunaan antibiotik sintetis dalam jangka waktu yang lama dapat memicu resistensi bakteri, superinfeksi, mutasi, dan transfer genetik, sehingga penelitian dan pencarian bahan antibiotik baru dari bahan alam terus dilakukan.

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki keanekaragaman hayati yang luar biasa, tercatat tidak kurang dari 30.000 jenis tanaman obat yang tumbuh di Indonesia. Beberapa jenis tanaman obat mengandung sejumlah besar senyawa antibakteri, seperti flavonoid dan tanin. Penelitian terhadap tumbuhan dari famili *Hamamelidaceae* telah banyak dilakukan seperti efektifitas antibakteri dan antiinflamasi dari minyak atsiri. Ekstrak daun *L. Styraciflua* yang merupakan famili dari *Hamamelidaceae* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhimurium*, *Bacillus subtilis* dan *Enterococcus faecalis*, sedangkan kandungan minyak atsirinya dapat membunuh bakteri *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, dan *Staphylococcus aureus*.²¹ Salah satu tumbuhan

dari famili *Hamamelidaceae* yang hidup dan tumbuh banyak di Indonesia adalah rasamala (*Altingia excelsa* Noronha).

Daun rasamala diduga memiliki aktivitas antibakteri karena minyak atsiri dari daun tersebut mengandung senyawa monoterpen. Daun rasamala mengandung komponen utama α -pinen (19.80%), β -pinen (16.00%), α -felandren (15.90%), limonen (10.90%) dan β - felandren (8.10%) . Kandungan senyawa utama daun rasamala tersebut tergolong senyawa monoterpen yang diduga menyebabkan daun rasamala memiliki aktivitas antibakteri.⁷ Berdasarkan uraian diatas penulis ingin mengetahui efek antibakteri ekstrak etil asetat daun rasamala terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.

METODE

Jenis penelitian ini merupakan eksperimental laboratorik (*true experimental*) dengan *post test only control group design*.²² Penelitian ini telah memenuhi uji kelayakan penelitian (*ethical clearance*) dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan, Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Semarang (UNIMUS) dengan No. 040/EC/FK/2018.

Alat

Alat-alat gelas laboratorium, satu set alat meserasi, satu set alat KCV, blender, chamber, pipa kapiler, botol-botol vial, neraca analitik, pinset, lampu *Ultraviolet* merk *Vilber Lourmat VL-8.LC*, *rotary evaporator* (*Heidolph Laborota 4000*), satu set alat kromatografi cair vakum, spektrofotometer Ultraviolet *Hewlett Packard 8453*, Spektrofotometer Inframerah merk *Shimadzu Tipe Prestige-21*, Spektrometer NMR ¹H merk JEOL Tipe JNM-ECA 500 MHz,

Bahan

Daun rasamala, akuades, aseton (CH_3COCH_3) redest, etil asetat ($\text{CH}_3\text{COOC}_2\text{H}_5$) redest, diklorometana (CH_2Cl_2) redest, metanol (CH_3OH) redest, *n*-heksana (C_6H_{14}) redest, kloroform (CHCl_3) p.a.

Ekstraksi

Daun segar rasamala sebanyak 20 kg dikeringkan ke udian dibuat simplisia yang kemudian diekstraksi menggunakan pelarut *n*-heksana selama 24 jam. Lakukan pengulangan proses maserasi hingga filtrat tidak berwarna dengan pembuktian kontrol KLT. Kemudian lakukan penyaringan, ekstraksi kembali residu hasil penyaringan dengan cara maserasi menggunakan metilen klorida selama 24 jam. Saring kembali, lakukan pengulangan proses maserasi hingga filtrat tidak berwarna dengan pembuktian kontrol KLT. Lakukan penyaringan, tampung filtrat dan pekatkan menggunakan *rotary evaporator* untuk menghasilkan ekstrak metilen klorida yang berwarna hijau tua pekat (35 g). Penelitian ini dilakukan di laboratorium kimia Universitas Jenderal Ahmad Yani Bandung (UNJANI)

Pengujian Aktivitas Antibakteri

Populasi *Enterococcus faecalis* diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Sampel dalam penelitian ini adalah bakteri yang telah disetarakan dengan metode McFarlan 0,5 dengan kepekatan $1 \times 10^8 \text{CFU/ml}$. Ekstrak yang digunakan yaitu ekstrak etil asetat daun rasamala dengan konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, 20%, kontrol positif antibiotik minosiklin, ciprofloxacin dan metronidazole (3MIX) dan pelarut dimetil sulfoksida (DMSO) tanpa tambahan ekstrak etil asetat daun rasamala sebagai kontrol negative.

Seluruh alat yang digunakandicucibersih, kemudiandisterilisasi di dalam *autoclave* selama 15 menit pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm. Pembuatan ekstrak etil asetat daun rasamala (*Altingia excelsa* Noronha) dilakukan dengan metode maserasi, kemudian maserat dipekatkan dengan menggunakan rotari evaporator (untuk menguapkan pelarut sehingga ekstrak adalah benar benar merupakan metabolit sekunder tanpa pelarut) dan *water bath* sehingga diperoleh ekstrak daun rasamala yang kental dan padat. Proses pengenceran ekstrak daun rasamala kedalam konsentrasi 1,25%, 2,5%, 5%, 10%, 20% dengan menggunakan pelarut DMSO.

Pengujian daya hambat dilakukan secara *in vitro*. Pengumpulan data dilakukan dengan pengamatan dan mengukur lebar zona bening di sekitar sumuran dengan jangka sorong pada masing-masing variasi konsentrasi ekstrak etil asetat daun rasamala dan kontrol positif antibiotik 3 MIX.

Penelitian ini dilakukan dilaboratorium mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Semarang (UNIMUS) pada bulan Juli – Agustus 2018.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini memiliki tujuan untuk mengetahui aktifitas antibakteri antara ekstrak etil asetat daun rasamala dengan antibiotik 3 MIX terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. Data dianalisis dengan uji normalitas menggunakan *Shapiro-wilk* dengan selang kepercayaan 5% dan uji homogenitas *Levene-Test* dengan selang kepercayaan 5%.

Tabel 1. Hasil pengukuran zona hambat.

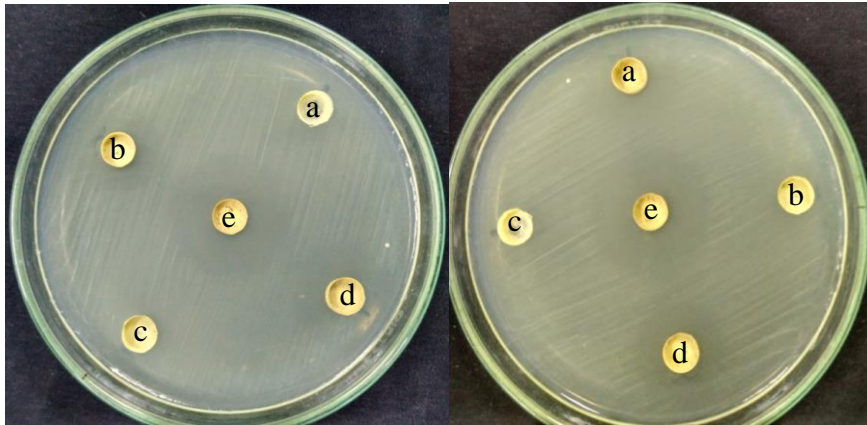
Kelompok	N	Daya Hambat			
		Mean	Std.Deviasi	Minimum	Maximum
Konsentrasi 1.25%	4	2.59	0.24	2.33	2.93
Konsentrasi 2.5%	4	4.90	0.33	4.41	5.10
Konsentrasi 5%	4	9.82	0.92	8.66	10.76
Konsentrasi 10%	4	13.91	0.52	13.47	14.54
Konsentrasi 20%	4	18.20	0.45	17.60	18.60
Kontrol +	4	23.03	0.40	22.43	23.32

Hasil uji normalitas menunjukkan bahwa distribusi data pada kelompok konsentrasi 1.25%, 5%, 10%, 20% dan kontrol positif adalah normal ($p > 0.05$), adapun pada kelompok konsentrasi 2.5% menunjukkan distribusi data yang tidak normal karena memiliki 2 nilai yang sama pada pengulangan ke-2 dan ke-4 ($p < 0.05$), selanjutnya dilakukan uji homogenitas *Levene-Test* dengan nilai homogenitas sebesar 0,043 yang artinya ada data tidak homogen ($p < 0.05$). Dengan demikian syarat uji *Oneway Anova* tidak terpenuhi dikarenakan salah satu kelompok data memiliki distribusi data yang tidak normal dan hasil uji homogenitas menunjukkan hasil yang tidak homogen, sehingga peneliti menggunakan Uji *Kruskal-Wallis*.

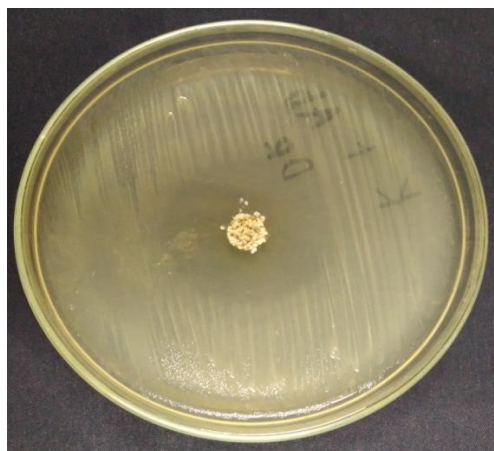
Hasil uji *Kruskal-Wallis* memperoleh nilai p sebesar 0,000 ($p < 0,05$), Hal ini menunjukkan hipotesis diterima, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun rasamala (*Altingia excelsa* Noronha) dapat menghambat bakteri *Enterococcus faecalis*. Uji selanjutnya untuk mengetahui secara lebih rinci mengenai perbedaan zona hambat antar kelompok maka dengan uji *Mann Whitney*. Hasil uji *Mann Whitney* untuk melihat besarnya perbedaan dari berbagai konsentrasi ekstrak daun rasamala dan kontrol positif. Uji *Mann Whitney* menunjukkan perbedaan setiap kelompok perlakuan signifikan dalam menghambat bakteri *Enterococcus faecalis* ($\text{sig} < 0.05$) artinya pada masing-masing kelompok perlakuan (perbedaan konsentrasi) menghasilkan pengaruh yang berbeda dalam menghambat bakteri *Enterococcus faecalis* dan berdasarkan uji tersebut kontrol positif terbukti paling efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*.

Tabel 2. Tabel uji Mann-Whitney

	Konsentrasi ekstrak etil asetat daun rasamala (<i>Altingia excelsa</i> Nornha)				
	1,25%	2,5%	5%	10%	20%
Kontrol (+)	0,021	0,021	0,014	0,014	0,014
1,25%	.000	.000	.000	.000	.000
2,5%	1,000	.000	.000	.000	.000
5%	1,000	1,000	.000	.000	.000
10%	0,014	0,014	0,014	000	.000
20%	0,014	0,014	0,014	0,021	.000



Gambar 1. Zona hambat ekstrak daun rasamala terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* a. Konsentrasi 1,25%, b. Konsentrasi 2,5%, c. Konsentrasi 5%, d. Konsentrasi 10% dan e. Konsentrasi 20%



Gambar 2. Kontrol (+) pasta antibiotik 3 MIX

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etil asetat daun rasamala (*Altingia excelsa* Noronha) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. Hal ini dimungkinkan karena ekstrak etil asetat memiliki kandungan senyawa antibakteri berupa tanin, saponin dan flavonoid yang diduga memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. Bakteri ini dikenal sebagai spesies yang paling resisten pada rongga mulut dan paling sering ditemukan pada infeksi endodontik persisten pada gigi yang telah dilakukan perawatan saluran akar.⁸

Ekstrak daun rasamala pada konsentrasi 20% memiliki rata-rata zona bening sebesar 18,20 mm. Zona bening yang dihasilkan oleh ekstrak daun rasamala termasuk dalam kategori sedang (intermediet). Bakteri ini adalah spesies yang dapat beradaptasi pada gigi yang telah dilakukan perawatan saluran akar. preparasi biomekanik dan irigasi saluran akar dengan menggunakan obat-obatan sulit dilakukan untuk menghilangkan bakteri *Enterococcus faecalis*.⁸ Bakteri ini menghasilkan racun *cytolysin* yang dapat menyebabkan hemolisis pada darah.¹⁰

Ekstrak daun rasamala dibuat dengan menggunakan pelarut etil asetat dengan metode maserasi. Etil asetat adalah pelarut semi polar yang volatil (mudah menguap), tidak beracun, dan tidak higroskopis. Pelarut ini dapat digunakan untuk memperoleh senyawa metabolit sekunder bersifat semi polar seperti saponin, flavonoid, dan tanin. Struktur dasar dari senyawa flavonoid adalah *2-phenyl-benzo [a] pyrane* atau *flavane nucleus*, yang terdiri dari dua cincin benzen (A dan B) dihubungkan melalui cincin heterosiklik *pyrane* (C).¹¹ Mekanisme antibakteri flavonoid menghambat sintesis asam nukleat adalah cincin A dan B yang memegang peran penting dalam proses interkalisasi atau ikatan hidrogen dengan menumpuk basa asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA. Letak gugus hidroksil di posisi 2',4' atau 2',6' dihidroksilasi pada cincin B dan 5,7 dihidroksilasi pada cincin A berperan penting terhadap aktivitas antibakteri flavonoid. Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan

permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri. Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membran sel adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut, sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Penelitian lain menyatakan mekanisme flavonoid menghambat fungsi membran sel dengan cara mengganggu permeabilitas membran sel dan menghambat ikatan enzim seperti ATPase dan fosfolipase.

Tanin terbagi dalam dua kelompok, tanin terhidrolisa dan tanin yang tidak terhidrolisa (pekat). Tanin terhidrolisa tersusun oleh asam galat dibentuk oleh D-glukosa dan sejumlah variabel molekul asam fenol, sementara tanin yang tidak terhidrolisa (*proanthocyanidins*) berasal dari monomer flavonoid.¹² Tanin mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri menyebabkan fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein dari sel bakteri menjadi terganggu hal tersebut sama dengan mekanisme saponin.¹³

Penelitian yang telah dilakukan dengan mengisolasi dan mengidentifikasi struktur flavonoid sehingga di dapatkan senyawa bioaktif golongan flavonoid dalam ekstrak daun rasamala yaitu *apigenin*, *quercetin*, *kaemferol* dan *3,4 dihidroksi benzoate*.¹⁶ Kemampuan antibakteri dari kaemferol telah banyak dipublikasikan, kaemferol dan atau tanpa glikosida dapat menghambat pertumbuhan beberapa spesies bakteri. Kaemferol terbukti dapat membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* dan dapat bekerja secara sinergis dengan antibiotik seperti rimpafisin, vankomisin, eritromisin dan klindamisin untuk mengurangi resiko terjadinya resistensi.^{14, 15}

Apigenin merupakan derivat dari flavonoid yang memiliki potensi kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Senyawa kimia apigenin diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif sama baiknya dengan gram negatif. Efek antibakteri dari apigenin yang dikombinasikan dengan ampicilin atau gentamisin menunjukkan efek bakterisidal yang kuat terhadap bakteri patogen dalam rongga mulut.^{17,18}

Quercetin adalah senyawa kimia yang paling banyak dipelajari, *quercetin* dengan konsentrasi 500µg/ml dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *A. parasiticus*, *A. flavus*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. subtilis*, dan *M. Luteus*. Mekanisme quercetin dalam menghambat pertumbuhan bakteri, dengan penghambatan DNA *gyrase*.^{19,20} Senyawa-senyawa ini merupakan inovasi terbaru yang nantinya akan dikembangkan secara masal agar dapat diterima sebagai bahan antibakteri.

Diameter zona hambat kelompok kontrol positif antibiotik 3MIX sebagai pembanding memiliki rata-rata yang lebih tinggi yaitu 23,03 mm dibandingkan zona hambat yang dihasilkan oleh kelompok ekstrak daun rasamala terhadap pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*. Hal ini disebabkan karena 3MIX merupakan gabungan 3 antibiotik yaitu minosiklin, ciprofloxacin dan metronidazole. Metronidazole dan minosiklin merupakan antibiotik dari golongan tetrasiklin yang bersifat bakteristatik yang dapat membunuh bakteri golongan gram positif dan negatif menghambat sintesis protein mikroorganisme dengan mempengaruhi subunit ribosom 30S dan 50S. Antibiotik ini menyebabkan terjadinya hambatan dalam sintesis protein secara reversibel yang dapat memicu kematian pada sel bakteri. ciprofloxacin antibiotik dari golongan fluorokuinolon yang berfungsi mempercepat efek bakterisidal dengan merusak enzim DNA pada bakteri.^{23,24}

SIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etil asetat daun rasamala (*Altingia excelsa* Noronha) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*, tetapi daya hambat ekstrak etil asetat daun rasamala tidak lebih efektif dibandingkan dengan pasta antibiotik 3MIX.

DAFTAR PUSTAKA

1. Trihono. Riset Kesehatan Dasar; RISKESDAS. Jakarta: Balitbang Kemenkes RI; 2013. p.110-118.
2. Odzemir. D. Dental Caries and Preventive Strategies. Journal of Educational and Instructional studies in the world. 2014;4(4): 20-24.
3. Ezrafil. B.G., Aghazadeh. M., Abaashov. R., Salem. A. M., and Mosavi. Z. Microbial Flora of Root Canals of Pulpally-infected Teeth: *Enterococcus faecalis* a Prevalent Species. Journal of Dental Research. Dental Clinics, Dental Prospects. 2009;.3(1): 24-27.
4. Torabinejad, M. Root Canal Irrigants and Disinfectants. AAE (American Association of Endodontics). Chicago ; 2011.p. 1-6.

5. Hoshino. LSTR 3Mix-MP method – better and efficient clinical procedures of lesion sterilization and tissue repair (LSTR) therapy. *Dental Rev.* 2004; 6 (4): 16-25.
6. Anila, B., Murali. H., Cheranjeevi. J., and Kapil. R.S. Lesion Sterilization and Tissue Repair (LSTR) : A Review. *Journal of Scientific Dentistry.* 2014; 4 (2): 49-55.
7. Kanjalil. P.B., Kotoky. R., and Singh. R.S. Chemical composition of the leaf oil of *Altingia excelsa* Noronha. *Flav Frag J.* 2003; 18 (5): 449-450.
8. Suchitra. U. & Kundabala. M. *Enterococcus faecalis*: An Endodontic Pathogen. *Endodontology.* 2006; 18(2):11-13.
9. Varalakshmi. R.P., and Banker. S.M. 3Mix- MP in Endodontics – An overview. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (JDMS).* 2012; 3(1): 36-45.
10. Van. D. T., Melissa J. M., and Michael S. G.. Structure, Function, and Biology of the *Enterococcus faecalis* Cytolysin. *Toxins.* 2013; 5:895-911.
11. Cushnie. T. P. T., and Lamb. A. J. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 2005; 26:343-356.
12. Hugo. F. A. F., and Salgado. H. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. *Critical Reviews in Analytical Chemistry.* 2016; 46 (3): 257–265.
13. Eka. J., dan Yunita. A.S. A. Aktivitas Antibakteri dan Antioksidan Asam Galat dari Kulit Buah Lokal yang Diproduksi dengan Tanase. *ALCHEMY Jurnal Penelitian Kimia.* 2018; 14(1):131-142.
14. Cowan. M.M. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews.* 1999; 12: 564 – 582.
15. Akiyama. H., Fujii K., Yamasaki O., Oono T., and Iwatsuki. K. Antibacterial Action of Several Tannin against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2001; 48: 487 – 491.
16. Anwar, Risyandi. Metabolit Sekunder dari Daun Rasamala (*Altingia excelsa* noronha) Sebagai Penghambat Siklus Sel dan Induksi Apoptosis Sel Kanker Lidah Manusia In Vitro. Bandung, Universitas Padjajaran. Disertasi; 2015.p. 87.
17. Habbu. P.V., Mahadevan. K.M., Shastry. R.A., Manjunatha. H. Antimicrobial activity of flavanoid sulphates and other fractions of *Argyrea speciosa* (Burm.f) Boj. *Indian J. Exp. Biol.* 2009; 47: 121-8.
18. Cha. S.M., Kim. G.U., and Cha J.D. Synergistic Antimicrobial Activity of Apigenin Against Oral Pathogens. *International Journal of Engineering and Science (IJOER).* 2016; 2(1): 27-37.
19. Jose. M.C.M., Concepcion. P.G., Burgos. E.M., and Miguel, L.L. A Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2011;11:298-344.
20. Rauha. J.P., et al. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *International Journal of Food Microbiology.* 2000; 56: 3–12.
21. Grazielle. F. F. M., Carolina. A. P.L., Brandaise. M. B., Assis F., and Nakashima. T. Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Leaves, Bark and Stems of *Liquidambar styraciflua* L. (*Altingiaceae*). *Int.J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2016;5(1): 306-317.
22. Notoatmodjo, S. *Metodologi Penelitian Kesehatan* 5ed. Rineka Cipta. Jakarta; 2010. p.141-168.
23. Varalakshmi. R.P., and Banker. S.M. 3Mix- MP in Endodontics – An overview. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences (JDMS).* 2012;3(1):36-45.
24. Mohammadi. Z., Abbot. P.V. On Local Applications Of Antibiotics And Antibiotics-Based Agents In Endodontic And Dental Traumatology. *Int. Endod J.* 2009; 42(7):555-67.