

Daya Antibakteri Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) terhadap Bakteri *Enterococcus Faecalis* sebagai Bahan Medikamen Saluran Akar dengan Metode Dilusi

*Anti-Bacterial Power of Red Batel Leaves (*Piper Crocatum*) to *Enterococcus Faecalis* Bacteria as Medikamen Material for Canal Root by Dilution Method*

Yusrini Pasril¹, Aditya Yuliasanti²

¹ Dosen Bagian Konservasi Gigi Program Studi Pendidikan Dokter Gigi FKIK UMY

² Mahasiswa Program Studi Pendidikan Dokter Gigi FKIK UMY
Korespondensi: yusrinipasil@yahoo.com

Abstrak

Perawatan saluran akar adalah perawatan yang dilakukan dengan mengangkat jaringan pulpa yang telah terinfeksi dari kamar pulpa dan saluran akar. Salah satu tahap yang penting yaitu sterilisasi dimana dibutuhkan bahan medikamen yang paling efektif dan biokompatibel. Daun sirih merah (*Pipper crocatum*) diyakini mempunyai banyak kandungan antibakteri seperti alkaloid, flavonoid, saponin dan tannin. *Enterococcus faecalis* adalah salah satu bakteri yang memiliki resistensi serta paling sering ditemukan pada infeksi saluran akar. Kemampuan dari bakteri ini dapat mengadakan kolonisasi yang baik dan dapat bertahan dalam saluran akar. Tujuan penelitian untuk mengetahui daya antibakteri ekstrak daun sirih merah (*Pipper crocatum*) terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*. Desain penelitian ini dilakukan secara eksperimental laboratorium in vitro. Metode yang digunakan yaitu dilusi tabung untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM). Konsentrasi ekstrak yang digunakan yaitu 10%, 15%, 20%, 25% dan 30%. Hasil penelitian diperoleh KHM sebesar 20% dan KBM 25%. Kesimpulan penelitian ini ekstrak daun sirih merah mempunyai daya antibakteri dengan nilai KHM 20% dan KBM 25%. Ekstrak etanol daun sirih merah (*Pipper crocatum*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada konsentrasi 20% dan dapat membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* pada konsentrasi 25%.

Kata kunci : Perawatan saluran akar, Sirih merah, *Enterococcus faecalis*, metode dilusi

Abstract

The root canal treatment is the treatment that provided by remove infected pulp tissue from the pulp and the root canal . One of the important stages is sterilization which its medicaments material need to be the most effective and biocompatible .The red betel leaf (Pipper crocatum) is believed that content any antibacterial agent such as alkaloids, flavonoid, saponin and tannin. Enterococcus faecalis is one of the bacteria that has resistance and found almost in the root canal infection. This bacteria have a good ability to colonized and can hold up in root canal. The study design was experimental laboratory study in vitro to determine the antibacterial activity of the extract of red betel leaves (Pipper crocatum) against Enterococcus faecalis. The tube dilution was the method that used to determine the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC). The concentration of the extract were 10%, 15%, 20%, 25% and 30%. The experiment result showed that MIC was 20% and MBC was showed at 25%.

Keywords: root canal treatment, red betel, *Enterococcus faecalis*, tube dilution method

Pendahuluan

Perawatan saluran akar adalah perawatan yang dilakukan dengan mengangakat jaringan pulpa yang telah terinfeksi dari kamar pulpa dan saluran akar, kemudian diisi oleh bahan pengisi saluran akar agar tidak terjadi infeksi ulang. Perawatan saluran akar terdiri dari tiga tahapan yaitu preparasi biomekanis saluran akar atau pembersihan dan pembentukan (*cleaning and shaping*), sterilisasi, dan pengisian saluran akar¹.

Beberapa faktor seperti kompleksitas saluran akar, invasi mikroorganisme ke dalam tubulus dan pembentukan *smear layer* yang melindungi bakteri mengakibatkan bakteri masih dapat dijumpai di dalam tubulus dentin walaupun sudah dilakukan pembersihan melalui preparasi biomekanis dan irigasi². Bahan medikamen saluran akar digunakan untuk mensterilisasi mikroorganisme patogen dalam saluran akar. Bahan medikamen saluran akar berfungsi mengeliminasi bakteri yang tidak dapat dihancurkan dengan proses *chemomechanical* seperti instrumentasi dan irigasi.

Spesies *Enterococcus faecalis* adalah spesies yang resisten serta paling sering ditemukan pada infeksi saluran akar³. Keberadaan bakteri *Enterococcus faecalis* mampu mengadakan kolonisasi atau perlekatan yang baik terhadap permukaan protein serta membentuk biofilm pada dinding-dinding dentin. Bakteri *Enterococcus faecalis* memiliki peran 80-90 % terhadap infeksi saluran akar. *Gelatinase* dan *Hyaluronidase* yang juga merupakan enzim pada bakteri *Enterococcus faecalis* menjadi penyebab kerusakan jaringan serta mampu mengadakan degradasi matriks organik dentin⁴.

Kalsium hidroksida ($Ca(OH)_2$) merupakan bahan medikamen saluran akar yang paling sering digunakan, serta terbukti sebagai bahan biokompatibel. Apabila $Ca(OH)_2$ tidak dapat mempertahankan pHnya yang tinggi maka akan kurang efektif dalam membunuh *Enterococcus faecalis*.

Salah satu tanaman yang berpotensi sebagai alternative bahan medikamen saluran akar adalah family *Piperaceae* yaitu daun sirih merah (*Piper crocatum*). Sirih merah bersifat antiseptik seperti sirih hijau, misalnya dapat digunakan untuk obat kumur, pembersih kewanitaan, obat untuk radang mata. Khasiat sirih merah itu berasal dari sejumlah senyawa aktif yang dikandungnya, antara lain alkaloid, flavonoid, polevenolad, tanin, dan minyak atsiri. Alkaloid bersifat detoksifikasi yang dapat menetralkan racun. Flavonoid dan polevenolad bersifat antioksidan, antidiabetik, antikanker, antiseptik, dan antiinflamasi. Tanin memiliki kemampuan dalam mengikat dan mengendapkan protein serta sebagai antibakteri⁵.

Berdasarkan hal tersebut di atas, peneliti ingin menguji *daya antibakteri ekstrak etanol* daun sirih merah (*Piper crocatum*) terhadap *Enterococcus faecalis* sebagai bahan medikamen pada perawatan saluran akar.

Bahan dan Metode

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental laboratoris terhadap biakan bakteri *Enterococcus faecalis* yang diberi perlakuan dengan berbagai konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*).

Sampel penelitian ini adalah ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*)

dengan berbagai konsentrasi (10%, 15%, 20%, 25%, 30%) hasil dari pembuatan ekstrak di Lembaga Penelitian dan Pengujian Terpadu Laboratorium Farmasi dan Farmakologi Klinik Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta. Penelitian uji antibakteri dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Waktu penelitian pada bulan November 2014-Januari 2015.

Berdasarkan perhitungan rumus Federer, maka jumlah sampel yang diperlukan ditambah drop out 10% adalah 5 sampel pengulangan untuk tiap-tiap kelompok perlakuan dengan rincian sebagai berikut :

- a. Lima sampel untuk kelompok perlakuan *calcium hydroxide* ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) 10% sebagai kontrol positif.
- b. Lima sampel menggunakan aquades steril untuk kelompok perlakuan kontrol negatif.
- c. Lima sampel untuk masing-masing konsentrasi ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) 10%, 15%, 20%, 25% dan 30%.

Penelitian dimulai dari pemilihan daun sirih merah (*Piper crocatum*) yang muda dan segar dipetik lalu dicuci bersih. Daun dikeringkan dalam almari pengering dengan suhu 45°C selama 3 hari. Setelah itu daun ditimbang untuk mengetahui berat keseluruhan daun kering yaitu 800 gram. Pembuatan ekstrak daun sirih merah yang telah kering ini menggunakan cara maserasi, yaitu dengan merendam daun sirih merah ke dalam bejana maserasi secara terpisah kemudian diberi larutan etanol 70% sampai daun terendam sempurna. Hasil yang diperoleh disaring dan diulang sebanyak tiga

kali kemudian ditampung di dalam botol untuk selanjutnya dipekatkan dengan menggunakan alat *rotator evaporator* pada suhu 70°C pada tekanan 1 ATM. Proses ini menyebabkan etanol menguap sehingga diperoleh ekstrak yang kental dari daun sirih merah. Dari proses tersebut didapatkan 100 ml ekstrak sirih merah kental.

Biakan bakteri *Enterococcus faecalis* diinkubasi dalam suasana aerob pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian sebanyak 1-2 ose dari biakan murni bakteri uji tersebut disuspensikan dalam larutan NaCl 0,9% pada tabung reaksi steril, diinkubasi selama 2-4 jam pada suhu 37°C . Larutan tersebut kemudian diencerkan dengan cara dimasukkan ke dalam *Brain Heart Infussion* (BHI) hingga diperoleh jumlah kuman yang sesuai dengan jumlah larutan Standar Brown III dengan konsentrasi kuman 10^8 CFU/ml. Larutan diencerkan lagi hingga mencapai konsentrasi 10^6 CFU/ml.

Uji daya antibakteri ekstrak daun sirih merah (*Piper crocatum*) dilakukan dengan metode pengenceran tabung (*tube dilution method*). Pertama disediakan tabung reaksi steril yang masing-masing diberi label 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sebagai kontrol negatif (-), aquades steril sebagai kontrol negatif (-) serta tabung berisi BHI sebagai control bahan sekaligus control positif (+). Masing masing konsentrasi dilakukan sebanyak 4 kali pengulangan.

Tabung konsentrasi 10% diisi 0,10 ml ekstrak dan 0,90 ml aquades. Tabung konsentrasi 15% diisi 0,15 ml ekstrak dan 0,85 ml aquades. Tabung konsentrasi 20% diisi 0,2 ml ekstrak dan 0,80 ml aquades. Tabung konsentrasi 25% diisi 0,25 ml ekstrak dan 0,75 ml aquades. Tabung konsentrasi 30% diisi 0,30 ml ekstrak dan

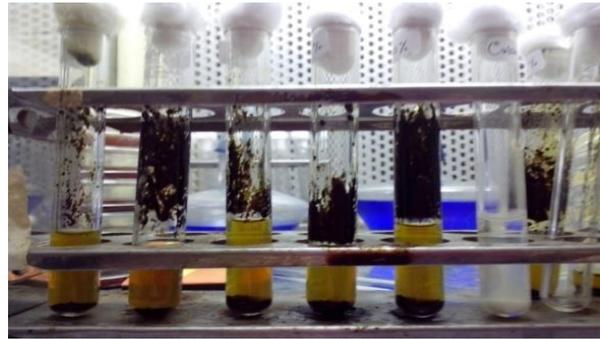
0,70 ml aquades. Tabung berlabel $\text{Ca}(\text{OH})_2$ diisi oleh pasta *calcium hydroxide* berkonsentrasi 10%. Terlebih dahulu pasta seberat 1 gram diencerkan dengan 1ml aquades, kemudian diambil sebanyak 0,10 ml ditambah aquades sebanyak 0,90 ml sehingga mencapai konsentrasi 10% larutan. Tabung ini dijadikan sebagai control negatif. Tabung terakhir yaitu berlabel (-) berisi aquades steril.

Tahap selanjutnya ditambahkan suspensi bakteri sebanyak 1 ml dengan mikropipet pada tabung 1 sampai 5. Tabung 6 berisi $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 10% dan 1 ml bakteri. Tabung 7 berisi aquades steril. Tabung terakhir berisi media BHI sebagai kontrol bahan. Semua tabung diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37-37,5°C. Hari ke-2 semua tabung dikeluarkan dari *incubator* kemudian dilakukan pemeriksaan ada tidaknya pertumbuhan bakteri yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan dalam tabung. KHM ditentukan dengan memperhatikan tabung dengan konsentrasi yang pertama terlihat jernih. Tabung yang terlihat keruh menunjukkan masih adanya pertumbuhan bakteri. Tabung yang pertama kali terlihat jernih merupakan konsentrasi daun sirih yang akan digunakan pada pengujian terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.

Untuk mengetahui KBM dilakukan penggoresan kedelapan tabung hasil inkubasi hari ke-2 pada 4 medium TSA yang kemudian diinkubasi selama 18-24 jam dengan suhu 37-37,5°C sebanyak satu ose. KBM ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri pada medium TSA pada konsentrasi terendah. Pembacaan KHM ditentukan dengan melihat kekeruhan pada cairan di dalam tabung reaksi.

Hasil dan Pembahasan

Hasil pengujian Kadar Hambat Minimal (KHM) ekstrak etanol daun sirih merah terhadap bakteri *Enterococcus faecalis* dapat dilihat pada gambar berikut :



Gambar 1. Perubahan kekeruhan pada uji dilusi ekstrak etanol daun sirih merah

Tabel 1. Tingkat kekeruhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media BHI

Tabung ke-	Bahan Uji	Cakram ke			
		1	2	3	4
1	Ekstrak 10%	+	+	+	+
2	Ekstrak 15%	+	+	+	+
3	Ekstrak 20%	+	+	+	+
4	Ekstrak 25%	-	-	-	-
5	Ekstrak 30%	-	-	-	-
6	$\text{Ca}(\text{OH})_2$ 10%	-	-	-	-
7	Aquades steril	-	-	-	-
8	Kontrol bahan	+	+	+	+

Keterangan Tabel :

- Tanda negatif (-) menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dilihat berdasarkan warna larutan mulai tampak jernih.
- Tanda positif (+) menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dilihat berdasarkan warna larutan yang tampak keruh.

Tabel tersebut menunjukkan konsentrasi yang mengalami kekeruhan yaitu pada konsentrasi 10% dan 15%. Sedangkan yang tidak mengalami kekeruhan yaitu pada konsentrasi 20%, 25%, 30%. Berdasarkan pengujian tersebut dapat dikatakan bahwa Konsentrasi Hambat Minimum Ekstrak daun sirih merah adalah konsentrasi 20%.



Gambar 2. Pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media Trypticase Soy Agar (TSA).

Tabel 2. Hasil pengujian dilusi padat ekstrak etanol daun sirih merah terhadap bakteri bakteri *Enterococcus faecalis*

Tabung ke-	Bahan Uji	Cakram ke -			
		1	2	3	4
1	Ekstrak 10%	+	+	+	+
2	Ekstrak 15%	+	+	+	+
3	Ekstrak 20%	+	+	+	+
4	Ekstrak 25%	-	-	-	-
5	Ekstrak 30%	-	-	-	-
6	(Ca(OH) ₂) 10%	-	-	-	-
7	Aquades steril	-	-	-	-
8	Kontrol bahan	+	+	+	+

Keterangan Tabel :

a. Tanda negatif (-) menunjukkan tidak adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media Trypticase Soy Agar (TSA)

b. Tanda positif (+) menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media Trypticase Soy Agar (TSA).

Tabel 2 menunjukkan Kadar Bunuh Minimal (KBM) yaitu pada konsentrasi ekstrak etanol daun sirih merah 25%, yang dilihat dari tidak adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA) pada konsentrasi terendah.

Uji aktivitas antibakteri pada dasarnya dapat dilakukan dalam dua cara, yaitu metode difusi cakram dan dilusi. Pada metode difusi cakram, penilaian aktivitas antibakteri dilihat dari pengukuran zona inhibisi yang dipengaruhi kelarutan dan difusi bahan yang diuji sehingga kurang efektif dalam menginhibisi mikroorganisme. Sedangkan metode dilusi dilakukan untuk mengamati aktivitas antibakteri dan dinyatakan lebih efektif karena bahan coba langsung berkontak dengan mikroorganisme⁶. Nilai KHM diperoleh dengan mengamati perubahan kekeruhan suspensi bakteri yang telah diinkubasi 37°C selama 24 jam dan nilai KBM diperoleh dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA) sehingga hasil penelitian akan lebih representative⁷.

Dalam hal ini, senyawa aktif daun sirih merah yang berkhasiat sebagai antibakteri adalah fenol, flavonoid, alkaloid, saponin dan tannin. Fenol dan deviratnya mempunyai daya antibakteri dengan cara menurunkan tegangan permukaan sel dan denaturasi protein. Adanya fenol yang merupakan senyawa toksik mengakibatkan struktur tiga dimensi protein terganggu dan terbuka menjadi struktur acak tanpa adanya

kerusakan pada struktur kerangka kovalen. Hal ini mengakibatkan protein berubah sifat namun deretan asam amino protein tersebut masih tetap. Selanjutnya aktivitas biologisnya menjadi rusak sehingga protein tidak dapat melakukan fungsinya. Dengan terdenaturasinya protein sel maka semua aktivitas metabolisme sel dikatalis oleh enzim sehingga bakteri tidak dapat melakukan fungsinya⁸.

Flavonoid berfungsi sebagai bakterostatik dengan cara merusak membran sel bakteri karena sifatnya yang lipofilik selain itu juga berfungsi sebagai antiinflamasi. Alkaloid berperan sebagai antimikroba karena sifatnya yang dapat berikatan dengan DNA. Adanya zat yang berada diantara DNA akan menghambat replikasi DNA itu sendiri, akibatnya terjadi gangguan replikasi DNA yang akhirnya akan menyebabkan kematian sel. Selain itu alkaloid juga bersifat detoksifikan yang dapat menetralkan racun. Saponin sebagai deterjen yang memiliki molekul amfipatik (mengandung bagian hidrofilik dan hidrofobik) yang dapat melarutkan protein membrane. Ujung hidrofobik saponin berikatan dengan region hidrofobik protein membrane sel dengan menggeser sebagian besar unsure lipid yang terikat. Akibatnya, sel bakteri menjadi lisis. Tannin merupakan polifenol yang larut dalam air, mekanisme antibakterinya yaitu dengan cara menghambat enzim ekstra seluler mikroba, mengambil alih substrat yang dibutuhkan pada pertumbuhan mikroba, atau bekerja langsung pada metabolisme dengan cara menghambat fosforilasi oksidasi⁹.

Daya antibakteri juga ditunjukkan oleh larutan *calcium hydroxide* ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) 10% yang pada penelitian ini berperan sebagai

sebagai kontrol negatif. Pada konsentrasi ini, tidak ditemui adanya pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada media agar padat. Hal ini terjadi kemungkinan karena kemampuan kalsium hidroksida dalam mengkondisikan suasana dan pH lingkungannya oleh karena keberadaan ion kalsium (Ca^{2+}) dan ion hidroksil (OH^-). Ion kalsium (Ca^{2+}) dapat berikatan dengan karbon dioksida menjadi kalsium bikarbonat sehingga bakteri kekurangan supply CO_2 . Ion hidroksil (OH^-) akan mengganggu permeabilitas membrane sel, menaikkan pH lingkungan sehingga menghambat aktivitas enzim bakteri untuk oksidasi enzim lain dan protein sel, juga mengganggu DNA bakteri dan menghambat replikasi DNA. Sediaan kalsium hidroksida yang berbentuk pasta dilarutkan menjadi konsentrasi 10% dengan aquades steril. Pada tahap ini, kehadiran aquades semakin mensinergiskan aktivitas disosiasi menjadi ion kalsium (Ca^{2+}) dan ion hidroksil (OH^-) sehingga dalam konsentrasi 10% kalsium hidroksida sudah mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis*^{10,11}.

Berdasarkan pembahasan diatas menunjukkan bahwa mekanisme dari *fenol*, *flavonoid*, *alkaloid*, *saponin* dan *tannin* yang terdapat dalam ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) memiliki peran sebagai daya antibakteri terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*. Mekanisme kerja zat aktif tersebut dengan menghambat sintesis dinding sel, menghambat fungsi membrane sel dan menghambat sintesis protein. Daya antibakteri ini ditunjukkan dengan hasil penelitian yang membuktikan bahwa ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) mempunyai kadar hambat minimal (KHM) yaitu 20% dan kadar bunuh minimal (KBM)

yaitu 25% terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.

Pemakaian ekstrak etanol daun sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai bahan *dressing* masih perlu dipertimbangkan karena sifat biokompabilitas dan biodegradasinya sangat baik karena merupakan produk alami. Konsentrasi KHM dan KBM yang besar disebabkan penelitian dilakukan secara *in vitro* harus membunuh bakteri 99,9% -100% dan aplikasinya menggunakan bahan pelarut. Oleh karena itu penelitian ini perlu dilanjutkan dengan penelitian *in vivo* untuk menentukan berapa nilai KHM dan KBM daun sirih merah yang aman jika dipakai sebagai bahan *dressing* saluran akar.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun sirih

merah (*Pipper crocatum*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* pada konsentrasi 20% dan dapat membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* pada konsentrasi 25%.

Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang penggunaan kontrol negatif selain *calcium hydroxid* (Ca(OH)₂) 10%.
2. Perlu adanya penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan ekstrak daun sirih merah (*Pipper crocatum*) sebagai bahan medikamen saluran akar dengan bentuk sediaan lain menyesuaikan bahan yang sudah ada di pasaran dan aman untuk jaringan gigi dan mulut.

DAFTAR PUSTAKA

1. Grossman, I.L., Oliet S, Del Rio CE. *Ilmu Endodontik dalam praktek*. 11nd ed. R.Abiyono Trans. Jakarta: EGC. Hlm. 248–250, 1995
2. H Stephen . *A New solution (MTAD) to remove the smear layer and Disinfect root canals*. *Contemporary Endodontics*: pp. 28-31, 2005
3. Ingle II, Backland LK. *Endodontics*. 5th ed. Chapter 3 : *Microbiology of endododontics and asepsis in endodontic practice*. Baumgartner JC,
4. Bakland LK, Sugita EI. London: BC Decker Inc. Hamilton. Pp. 63-79, 2002
5. Beatrice L. *Daya Antibakteri Ekstrak Buah Mahkota Dewa terhadap Enterococcus faecalis sebagai Bahan Medikamen Saluran Akar secara In-vitro*. Skripsi. Medan: USU, 2010.
6. Ferreira CM, Rosa OPS, Torres SA, Ferreira FBA, Bernardinelli N. 2002. Activity of endodontic antibacterial agents against selected anaerobic bacteria. *Braz Dent J.*, 13(2): 118-22.65.
7. Saraswati, R.S. *Daya Antibakteri Infusa Daun Sirih Merah (Piper crocatum) terhadap Bakteri Enterococcus faecalis*. Skripsi Strata 1. Surabaya: Fakultas

-
- Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, 2011.
8. Nurrokhman. 2006. Efek air rebusan daun sirih pada peningkatan kepekaan *Staphylococcus aureus* terhadap ampisilin in vitro. *Jurnal Kedokteran Yarsi*, 14(1): 024-028.
 9. Dhita, T.A.H. *Efektivitas Anti Bakteri Ekstrak Daun Sirih (Piper Betle Linn) Terhadap bakteri Enterococcus faecalis (PENELITIAN IN VITRO)*. Skripsi Strata 1. Makassar: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin Makassar, 2013.
 10. Chew H, Khoo A.T.R, Jennifer. 2003. Ph changes in root dentin after intracanal placement of improved calcium hydroxide containing gutta-percha points. *J Endodon*, 2003, (29): 4-8.
 11. Banurea, F.E. *Efek Antibakteri Kitosan Blankas (Lymulus polyphemus) Bermolekul Tinggi Terhadap Fusobacterium nucleatum (Penelitian in vitro)*. Skripsi Strata 1. Universitas Sumatera Utara, 2008.