

Efektivitas antibakteri ekstrak alga merah (*Eucheuma spinosum*) untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Porphyromonas gingivalis* (*Antibacterial Effectivity of red algae extract (Eucheuma spinosum) to inhibit the growth of bacteri Porphyromonas gingivalis*)

¹Indrya Kirana Mattulada, ¹Aries Chandra Trilaksana, ²Dhiyaan Annisah Abduh M.N.

¹Departemen Konservasi Gigi

²Mahasiswa tahap akademik

Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin, Makassar

E-mail: dhiyaan18@gmail.com

ABSTRACT

Endodontic infection is an inflammation caused by the development of microorganisms in the root canals that are affected by decreasing of host defense and so potentially pulp necrosis. Based on the evaluation of root canal infections, the number of *P. gingivalis* was the third (12.2%). The content of red algae (*E. spinosum*) flavonoid compounds is able to denature the bacterial protein of *P. gingivalis* so that bacteria are not growing back. The purpose of this research is to determine the effect of red algae extract toward *P. gingivalis*. This study was performed by making red algae extract then continued with determination of minimum inhibitory concentration (MIC). The MIC tested for inhibition by viewing the size of the inhibit zone formed. Based on testing on BHIB and MHA medium showed that red algae extract has antibacterial effect toward *P. gingivalis* bacteria because it formed inhibition zone at the concentration of 3.5% red algae on *P. gingivalis* culture medium. The conclusion is a 3.5% red algae extract is able to inhibit the growth of *P. gingivalis*.

Keywords: *Porphyromonas gingivalis*, red algae extract (*Eucheuma spinosum*), antibacterial

ABSTRAK

Infeksi endodontik merupakan peradangan karena perkembangan organisme mikro pada saluran akar yang dipengaruhi penurunan pertahanan host sehingga berpotensi terjadi nekrosis pulpa. Berdasarkan hasil evaluasi infeksi saluran akar, jumlah *Porphyromonas gingivalis* menduduki peringkat ketiga (12.2%). Kandungan senyawa flavonoid alga merah (*Eucheuma spinosum*) mampu mendenaturasi protein sel bakteri *P. gingivalis* sehingga bakteri tidak bertumbuh kembali. Tujuan penelitian untuk mengetahui efek ekstrak alga merah terhadap bakteri *P. gingivalis*. Penelitian diawali dengan pembuatan ekstrak alga merah kemudian dilanjutkan penentuan konsentrasi hambat minimal (KHM) ekstrak. KHM kemudian diuji daya hambatnya dengan melihat besar zona hambat yang terbentuk. Berdasarkan hasil pengujian pada media BHIB dan MHA diperoleh ekstrak alga merah memiliki efek antibakteri terhadap *P. gingivalis* karena terbentuk zona inhibisi pada konsentrasi 3,5% di media biakan *P. gingivalis*. Disimpulkan ekstrak alga merah 3,5% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. gingivalis*.

Kata kunci: *Porphyromonas gingivalis*, ekstrak alga merah (*Eucheuma spinosum*), antibakteri

PENDAHULUAN

Karies adalah penyebab paling utama penyakit pulpa dan periapikal. Ketika karies telah melibatkan jaringan pulpa lalu pulpa mengalami nekrosis, satu-satunya pilihan perawatan yang dapat dilakukan yaitu perawatan saluran akar, karena infeksi pulpa yang nekrosis dari sistem saluran akar tidak dapat disembuhkan hanya melalui mekanisme pertahanan imun dan pemberian antimikroba, sehingga jaringan pulpa yang nekrotik harus dibuang dari saluran akar untuk mencegah infeksi yang berkelanjutan menjadi periodontitis apikal.¹

Infeksi endodontik yang melibatkan isolasi polimikroba yang didominasi oleh bakteri obligat anaerob dan fakultatif anaerob serta lebih dari 150

spesies bakteri yang ditemukan, sedangkan di dalam saluran akar terdapat 3 sampai 6 spesies.² Dari hasil pengamatan, salah satu bakteri yang terdapat di dalam saluran akar yaitu *Porphyromonas gingivalis*. Bakteri ini menduduki urutan ketiga (12,2%) setelah *Streptococcus spp* (14,2%), dan *Peptostreptococcus spp* (16%).³

P. gingivalis merupakan bakteri gram negatif anaerob yang ciri khas berpigmen hitam yang banyak ditemukan di plak gigi dan menyebabkan perubahan patologik pada jaringan periodontal.⁴ Bakteri ini merupakan salah satu spesies yang sering ditemukan pada infeksi primer saluran akar, abses periodontal, dan periodontitis apikalis, bahkan setelah perawatan saluran akar bakteri ini masih dapat ditemukan.⁵

Pembuangan organisme mikro dari saluran akar dapat dilakukan dengan cara preparasi kemomekanik menggunakan instrumen tertentu dan bahan irigasi serta medikamen untuk intrakanal. Namun, sterilisasi ruang pulpa tidak selalu memuaskan karena mungkin masih ada infeksi persistensi dari bakteri yang masih terdapat dalam tubulus dentinalis atau anatomi akar gigi yang rumit. Kegagalan perawatan endodontik bahkan dapat terjadi pasca preparasi kemomekanik bakteri tetap dapat ditemukan di saluran akar.⁶

Perawatan saluran akar terbagi menjadi tiga tahap utama, yaitu preparasi biomekanik saluran akar (pembersihan dan pembentukan saluran akar), disinfeksi dan obturasi saluran akar. Menurut Ford, irigasi dengan larutan yang tepat dapat memengaruhi tingkat kebersihan saluran akar karena bahan irigasi berfungsi sebagai pelarut debris, pelubrikasi sistem kanal sehingga pergerakan instrumen saat preparasi saluran akar lebih mudah, melarutkan sisa jaringan organik dan sebagai larutan disinfektan. Suatu irigan yang ideal sebaiknya tidak bersifat toksik, tidak mahal dan mudah penggunaannya.⁷

Larutan irigasi yang umum digunakan yakni larutan *sodium hypochlorite* (NaOCl), *chlorhexidine* (CHX), dan larutan *ethylene diaminetetraacetic acid* (EDTA).^{8,9} Diantara larutan tersebut, larutan *sodium hypochlorite* digunakan karena dapat membuang jaringan nekrotik dan komponen debris. Hal tersebut dibuktikan dengan sifatnya dapat menghancurkan plak pada jaringan endodontik melalui studi *in vitro* oleh Clegg et al. Larutan NaOCl efektif sebagai antibakteri tetapi dapat menyebabkan toksik jika mengenai jaringan periapikal.⁹ Oleh sebab itu, dibutuhkan larutan irigasi dengan bahan baru yang aman dan memiliki efek antibakteri dan anti-inflamasi pada perawatan endodontik yang aman.

Mengingat tingginya keanekaragaman rumput laut di perairan Indonesia, maka potensi rumput laut khusus dalam bidang kesehatan seperti antioksidan dan antibakteri yang telah banyak budidayakan. Salah satu jenis rumput laut adalah alga merah jenis *Eucheuma spinosum* yang banyak ditemukan di Pantai Desa Punaga Takalar Sulawesi Selatan. Alga jenis ini banyak digunakan sebagai penghasil agar-agar, bahan baku industri farmasi, kosmetik, dan makanan. Namun, *Eucheuma spinosum* masih kurang dieksplorasi untuk diuji antibakterinya.¹⁰ Berdasarkan hasil beberapa penelitian, alga merah mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, dan triterpenoid yang diduga menjadi antioksidan alami dan antibakteri.¹¹

Berdasarkan asumsi tersebut, perlu dilakukan sebuah penelitian yang ditujukan untuk menguji efek antibakteri ekstrak alga merah (*Eucheuma spinosum*) terhadap bakteri *P. gingivalis*.

BAHAN DAN METODE

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen laboratorium, menggunakan rancangan eksperimen dengan rancangan penelitian *post test only control group design*. Sampel diperoleh dari daerah budi daya rumput laut Desa Punaga Kabupaten Takalar lalu dilakukan uji determinasi di Laboratorium Ilmu Lingkungan dan Kelautan Biologi Fakultas MIPA Unhas, yang menunjukkan bahwa tanaman yang digunakan adalah *E.denticulatum* atau *E.spinsum*. Ekstrak rumput laut (*E. spinosum*) diperoleh dengan cara ekstraksi dengan metode maserasi. Ekstrak alga merah dibuat di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi. Subjek dalam penelitian ini adalah koloni bakteri *P. gingivalis* yang diperoleh dari sedimen Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Hasanuddin.

Sampel alga merah segar dicuci dengan air jernih yang mengalir untuk membersihkan pasir, sisa lumpur dan kotoran lainnya yang masih melekat, lalu diangin-anginkan selama sekitar 3 hari dan tidak boleh terkena sinar matahari langsung. Sampel alga merah yang kering kemudian dipotong-potong dan ditimbang sebanyak 200 g dan dimasukkan ke dalam toples yang ditambahkan dengan larutan etanol 96% sebanyak 1000 mL. Lalu dimaserasi selama 24 jam pada suhu kamar 37°C. Setelah 24 jam, larutan dipisahkan atau difiltrasi dengan menggunakan penyaringan. Residu penyaringan diangin-anginkan dan dimaserasi ulang hingga 3 kali, kemudian saringan 1-3 dicampur dan dipisahkan dengan *rotary vacuum evaporator*.¹²

Setelah diperoleh hasil ekstrak alga merah yang sudah pekat lalu diencerkan dengan pemanfaatan ekstrak alga merah pekat dari konsentrasi 100% yang lalu diencerkan menjadi konsentrasi 12,5%, 11%, 9,5%, 8%, 6,5%, 5% dan 3,5%. Untuk penentuan kadar hambat minimal, disiapkan 7 tabung reaksi berisi BHIB 5 mL lalu tambahkan ekstrak alga merah masing-masing konsentrasi 12,5%, 11%, 9,5%, 8%, 6,5%, 5%, dan 3,5% dengan volume 2 mL. Bakteri *P. gingivalis* dimasukkan pada ekstrak alga merah sebanyak 1 mL. Tabung ke-8 dan 9 masing-masing berisi 2 mL NaOCl 2,5% dan larutan klorheksidin sebagai pembanding, diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam. Larutan pada tabung reaksi dengan kadar terkecil yang tetap jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri *P. gingivalis* ditetapkan sebagai kadar hambat minimal (KHM).¹³

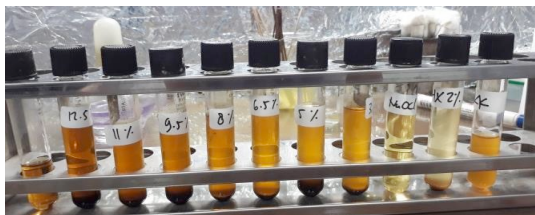
Selanjutnya dilakukan pengujian zona inhibisi alga merah 3,5% terhadap bakteri *P. gingivalis* dengan menyiapkan 3 cawan petri yang masing-masing telah dibagi menjadi tiga gradient dan diberi label, lalu dilanjutkan dengan pembuatan media biak agar dengan pemberian 38 g MHA dilarutkan dengan 1

L akuades menggunakan tabung erlenmeyer lalu dihomogenkan dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Selanjutnya, biakan bakteri *P. gingivalis* pada suspensi diambil sebanyak 10 µL dan dituang ke dalam cawan petri steril lalu dihomogenkan dan ditunggu sampai media agar memadat. Ekstrak alga merah 3,5%, NaOCl 2,5% dan CHX 2% masing-masing 10 µL diteteskan pada *paper disc* steril dan dibiarkan beberapa saat. *Paper disc* yang sudah kering diletakkan secara teratur di atas medium agar yang mengandung bakteri uji. Cawan petri yang berisi bakteri uji dan ekstrak senyawa antibakteri tersebut diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.^{14,15}

Daya hambat diketahui berdasarkan pengukuran diameter zona inhibisi, yaitu zona bening atau daerah jernih tanpa organisme mikro, yang terbentuk di sekitar *paper disc*. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan jangka sorong (mm).¹⁴

HASIL

Dari hasil penentuan KHM dengan mengamati media BHIB yang telah diberikan ekstrak kulit alga merah terhadap bakteri *P. gingivalis* setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam, hasil tersebut ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1 Medium BHIB yang diberikan ekstrak alga merah terhadap *P. gingivalis* setelah diinkubasi

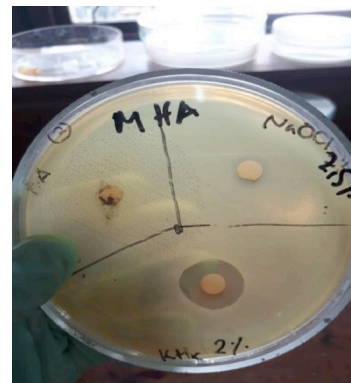
Dari Gambar 1 terlihat bahwa terdapat tabung yang keruh dan jernih. Tabung yang keruh merupakan tabung yang masih terdapat pertumbuhan bakteri, sedangkan tabung yang jernih ialah tabung yang sudah tidak ada lagi pertumbuhan bakterinya. Dari konsentrasi yang telah diuji mulai dari 12,5%, 11%, 9,5%, 8%, 6,5%, 5%, dan 3,5% yang membandingkan kejernihan larutan NaOCl 2,5% serta klorheksidin 2% menunjukkan bahwa semua tabung tampak jernih, tabung yang terlihat keruh berada pada tabung yang berisi BHIB dengan pemberian suspensi bakteri tanpa diberikan perlakuan (K-). Dari gambar di atas, hasil uji KHM dapat dilihat pada tabel 1.

Berdasarkan pengujian pada media BHIB dalam penentuan uji KHM, dikatakan bahwa ekstrak alga merah telah menghambat dengan konsentrasi 3,5% pada bakteri *P. gingivalis* kemudian tahap selanjutnya dilakukan pengujian daya hambat antibakteri ekstrak

alga terhadap bakteri *P. gingivalis*. Hasil pengukuran rata-rata zona inhibisi pada penelitian tampak pada tabel 1.

Tabel 1 Hasil uji KHM ekstrak alga merah terhadap bakteri *P. gingivalis*

Konsentrasi ekstrak alga merah (<i>E. spinosum</i>)	Hasil inkubasi 1 x 24 jam
12,5%	-
11%	-
9,5%	-
8%	-
6,5%	-
5%	-
3,5%	-
NaOCl 2,5%	-
CHX 2%	-
K(-)	+



Gambar 2 Pembentukan zona inhibisi pada MHA yang telah diinkubasi selama 24 jam

Tabel 2 Hasil pengukuran nilai rata-rata zona inhibisi

Konsentrasi	N	Mean ± SD
Ekstrak alga merah 3,5%	6	6,4812 ± 0,1135
NaOCl 2,5%	6	8,3623 ± 1,4313
CHX 2%	6	17,5822 ± 1,47298

Dari Tabel 2 terlihat bahwa ekstrak alga merah memiliki zona inhibisi yang kecil daripada larutan NaOCl 2,5% dan klorheksidin 2%. Berdasarkan uji Shapiro-Wilk untuk mengetahui nilai normalitas diperoleh nilai $p = 0,688$ untuk ekstrak alga merah 3,5%, $p = 0,803$ untuk NaOCl 2,5% dan $p = 0,357$ untuk CHX 2% yang menunjukkan data terdistribusi normal ($p > 0,05$) sehingga uji dilanjutkan dengan uji oneway Anova.

Dari Tabel 3 hasil uji oneway Anova diperoleh nilai yang signifikan ($p = 0,000 < 0,05$). Hal ini berarti ada perbedaan zona inhibisi efektivitas antara ekstrak alga merah 3,5% dengan larutan NaOCl 2,5% maupun klorheksidin 2% terhadap pertumbuhan bakteri *P.*

gingivalis. Oleh karena hasilnya signifikan, maka dilanjutkan dengan uji analisis *post hoc LSD* untuk mengetahui besarnya perbedaan signifikan secara statistik.

Tabel 3 Hasil uji oneway Anova

	Sum of square	Df	Mean square	F	Sig.
Between groups	423,553	2	211,776	150,150	0,00
Within groups	21,157	15	1,410		
Total	444,709	17			

Hasil uji *post hoc* nilai rata-rata zona inhibisi antar kelompok perlakuan terhadap bakteri *P. gingivalis*. Pada konsentrasi ekstrak alga merah 3,5% apabila dibandingkan dengan NaOCl 2,5% menghasilkan nilai $p=0,015<0,05$ yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan. Selanjutnya pada ekstrak alga merah 3,5% apabila dibandingkan dengan larutan CHX 2% menghasilkan nilai $p=0,000<0,05$ yang juga berarti terdapat perbedaan signifikan. Perbedaan signifikan tampak juga terlihat pada larutan NaOCl 2,5% jika dibandingkan dengan larutan CHX 2% dengan nilai $p=0,000<0,05$.

Berdasarkan data tersebut terlihat bahwa ekstrak alga 3,5% dan NaOCl 2,5% memiliki nilai p yang lebih besar bila dibandingkan dengan ekstrak alga 3,5% dan CHX 2%, yang berarti ekstrak alga 3,5% tidak lebih efektif dari NaOCl 2,5% maupun CHX 2%.

PEMBAHASAN

Hasil uji KHM yang dilakukan memperlihatkan bahwa ekstrak alga merah pada konsentrasi terkecil, yaitu 3,5% menunjukkan hasil dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. gingivalis* setelah diinkubasi selama 24 jam karena tampak lebih jernih dibanding tabung yang berisi BHIB tanpa diberi perlakuan. Hasil ini menunjukkan bahwa pada konsentrasi 3,5% telah terjadi penghambatan pertumbuhan *P. gingivalis*.

Hasil dari pengujian ini juga menunjuk adanya zona hambat yang terbentuk pada ekstrak alga merah pada konsentrasi 3,5%. Data menunjukkan bahwa setelah 24 jam masa inkubasi, konsentrasi ekstrak alga merah 3,5% mampu menghambat pertumbuhan

bakteri *P. gingivalis*. Zona hambat juga akan semakin meningkat sejalan peningkatan konsentrasinya. Hal ini sesuai dengan pendapat Pelzcer and Chan bahwa semakin tinggi konsentrasi suatu bahan antibakteri maka aktivitas antibakterinya akan semakin kuat.¹⁶

Data penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi 3,5% telah menghambat bakteri *P. gingivalis* dengan nilai rata-rata diameter zona hambat sebesar 6,48 mm. Berdasarkan hasil suatu penelitian, konsentrasi 5% ekstrak alga merah menghambat bakteri *E. coli* dan konsentrasi 4% alga merah menghambat bakteri *S. aureus* masing-masing sebesar 7,00 mm.¹⁴ Hal ini membuktikan bahwa konsentrasi 3,5% masih dapat memberikan efek antibakteri khususnya terhadap bakteri *P. gingivalis*. Pada pengujian efektivitas larutan NaOCl 2,5% diameter zona hambat yang terbentuk lebih besar dari zona hambat konsentrasi ekstrak alga merah 3,5%. Penelitian Jerin Jose menunjukkan data larutan NaOCl 2,5% dapat menghambat bakteri *E. faecalis* dengan rata-rata nilai diameter zona hambat sebesar 10,3 mm.¹⁷ Berdasarkan data Sharma, NaOCl 2,5% mampu menghambat *Pseudomonas aeruginosa* sebesar 9,0 mm dan *E. coli* sebesar 6,0 mm,¹⁸ serta penelitian oleh Tatiana bahwa larutan NaOCl 2,5% hanya dapat membentuk zona bening pada 5,4 mm pada medium agar bakteri *E. faecalis* dan 8,8 mm pada bakteri *S. aureus*.¹⁹ Hal ini sejalan dengan hasil data yang diperoleh, larutan NaOCl 2,5% memiliki nilai rata-rata diameter zona hambat yang tidak jauh berbeda yakni sebesar 7,378 mm.

Klorheksidin 2%, juga terbentuk zona hambat namun dengan ukuran yang lebih besar dibanding zona hambat yang terbentuk pada ekstrak alga merah maupun larutan NaOCl 2,5% yaitu sebesar 17,58 mm. Hal ini hampir sama dengan hasil penelitian oleh Gulha dalam menghambat bakteri *P. gingivalis*; nilai rata-rata diameter yang terbentuk sebesar 21,2 mm.²⁰ Pembentukan diameter dari zona inhibisi dapat dipengaruhi oleh toksisitas bahan uji, kemampuan difusi bahan uji pada media, interaksi antar komponen yang terdapat pada media, dan kondisi lingkungan mikro *in vitro*.²¹

Dari hasil penelitian diketahui bahwa konsentrasi hambat minimal 3,5% telah menghambat bakteri *P.*

Tabel 4 Hasil uji post hoc LSD

(I)kelompok	(J) Kelompok	Mean difference (I-J)	Std Error	Sig
Ekstrak alga 3,5%	NaOCl 2,5%	-1,8817*	0,68567	0,015
	CHX 2%	-11,10100*	0,68567	0,000
NaOCl 2,5%	Ekstrak alga 3,5%	1,8817*	0,68567	0,015
	CHX 2%	-9,21983*	0,68567	0,000
CHX 2%	Ekstrak alga 3,5%	11,10100*	0,68567	0,000
	NaOCl 2,5%	9,21983*	0,68567	0,000

*The mean difference is significant at the 0,05 level

gingivalis kemudian didapat hasil pengukuran zona hambat bahwa ekstrak alga merah dengan konsentrasi 3,5% dapat membentuk zona bening 6,41 mm dan semakin meningkat sejalan dengan peningkatan konsentrasinya. Hal ini sesuai dengan pendapat Bell bahwa suatu bahan dikatakan atau sama dengan 6 mm. Hasil penelitian yang dilakukan menunjukkan bahwa berdasarkan zona hambatnya, ekstrak alga merah memiliki aktivitas antibakteri karena diameter hambatan yang terbentuk lebih dari 6 mm.²²

Ekstrak alga merah mengandung suatu senyawa yang memiliki sifat antibakteri sebagaimana yang terbukti pada penelitian ini. Kandungan senyawa kimia seperti triterpenoid, alkaloid, flavonoid, dan asam askorbat yang terkandung dalam ekstrak alga merah khususnya kadar flavonoid yang lebih banyak membuat ekstrak ini memiliki potensi antibakteri yang lebih besar sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P.gingivalis*.¹¹ Flavonoid yang merupakan golongan terbesar dari senyawa polifenol dapat bekerja sebagai antioksidan dan antibakteri. Fenol merupakan suatu alkohol yang bersifat asam sehingga disebut juga asam karbolat yang memiliki kemampuan untuk mendenaturasikan protein dan merusak membran sel. Kondisi asam oleh adanya

fenol dapat mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Mekanisme kerja senyawa flavonoid diduga dengan mendenaturasi protein sel bakteri dan karena bersifat lipofilik sehingga dapat merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi.^{22,23}

Senyawa flavonoid memiliki kemampuan untuk membentuk kompleks dengan protein sel bakteri melalui ikatan hidrogen. Struktur dinding sel dan membran sitoplasma dari bakteri yang mengandung protein menjadi tidak stabil karena struktur protein dari sel bakteri menjadi rusak karena adanya ikatan hidrogen dengan flavonoid, sehingga protein sel bakteri menjadi kehilangan aktivitas biologinya. Akibatnya, fungsi permeabilitas dari sel bakteri terganggu dan sel bakteri akan mengalami lisis yang berakibat pada kematian sel bakteri.²³

Berdasarkan dari hasil penelitian, disimpulkan bahwa ekstrak alga merah atau *E. spinosum* 3,5% mampu menghambat bakteri *P.gingivalis*. Meskipun demikian, larutan NaOCl 2,5% dan klorheksidin 2% terbukti memiliki tingkat efektivitas yang lebih baik. Penelitian perlu dilanjutkan dengan konsentrasi alga merah yang lebih tinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. gingivalis* sebagai bahan irigasi saluran akar dalam bidang kedokteran gigi.

DAFTAR PUSTAKA

1. Saoud TMA, Ricucci D, Lin LM, Gaengler P. Regeneration and repair in endodontics—a special issue of the regenerative endodontics-a new era in clinical endodontics. *Dent J* 2016; 4(3):1-15.
2. Mattigatti S, Jain D, Ratnakar P, Moturi S, Varma S, Rairam S. Antimicrobial effect of conventional root canal medicaments vs propolis against enterococcus faecalis, staphylococcus aureus and candida albicans. *J Contem Dent Prac* 2012;13(3):305-9.
3. Gajan EB, Aghazadeh M, Abashov R, Milani AS, Moosavi Z. Microbial flora of root canal of pulpally infected teeth: enterococcus faecalis a prevalent species. *J Dent Res Dent Clin Den Prospect* 2009; 3(1): 24-7.
4. Kusumawardani B, Pujiastuti P, Sari DS. Uji biokimiawi sistem API 20 A mendeteksi *Porphyromonas gingivalis* isolat klinik dari plak subgingiva pasien periodontitis kronis. *Jurnal PDGI* 2010; 59(3): 110-4.
5. Chong BS. Harty's Endodontics in clinical practice. 6th Ed. London: Churchill Livingstone Elsevier; 2010. p. 11-4, 232-3.
6. Gopalakrishnan S, Rajesh S, Jotish R. A comparative evaluation of antimicrobial efficacy of cinnamon and garlic as endodontic irrigants against enterococcus faecalis - An in vitro study. *J Endo* 2014; 26(1): 149-57.
7. Nisaa U, Darjono A. Analisis minyak atsiri serai (*cymbopogon citratus*) sebagai alternatif bahan irigasi saluran akar gigi dengan menghambat pertumbuhan enterococcus faecalis. *Jurnal Kedokteran Gigi Unsila* 2011; 1-10.
8. Paudel KR, Jaiswal A, Parajuli U, Bajracharya M. Different pharmacological solutions in intracanal irrigation. *Nepal Med Coll J* 2011; 13(2): 111-4.
9. Palazzi F, Morra M, Mohammadi Z, Grandini S, Giardino L. Comparison of the surface tension of 5.25% sodium hypochlorite solution with three new sodium hypochlorite-based endodontic irrigants. *Int Endo J* 2011; 1-7.
10. Farnani YH, Cokrowati N, Farida N. Pengaruh kedalaman tanam terhadap pertumbuhan *Eucheuma spinosum* pada budidaya dengan metode rawai. *Jurnal Kelautan* 2013; 6(1): 75-86.
11. Sari BL, Susanti N, Sutanto. Skrining fitokimia dan aktivitas antioksidan fraksi etanol alga merah *Eucheuma spinosum*. *Pharmacy Sci Res J* 2015; 2(1): 59-66.

12. Soelama HJJ, Kepel BJ, Siagian KV. Uji minimum inhibitory concentration (mic) ekstrak rumput laut (*eucheuma cottonii*) sebagai antibakteri terhadap streptococcus mutans. *Jurnal e-GiGi* 2015; 3(2): 374-9
13. Alamsjah MA, Nurhayati D, Tjahjaningsih W. Pengaruh ekstrak alga cokelat (*sargassum* sp.) terhadap pertumbuhan bakteri *escherichia coli* secara *in vitro*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan* 2011; 3(1): 79-83.
14. Fattah A, Muslimin L, Omar SA. Efektifitas alga merah *eucheuma spinosum* sebagai anti bakteri patogen pada organisme budidaya pesisir dan manusia: *Prosiding International seminar Veterinary medicine Unair* 2013. ISBN: 978-602-70438-0-0.
15. Hafizah I, Akib NI, Fajrianto M. Uji aktivitas antibakteri ekstrak metanol rumput laut (*eucheuma* sp) pada berbagai tingkat konsentrasi terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kedokteran Haluoleo* 2014; 1(2): 64-70
16. TSS, Lampus BS, Hutagalung BSP. Uji daya hambat ekstrak rumput laut *gracilaria* sp terhadap pertumbuhan bakteri *staphylococcus aureus*. *Jurnal e-GiGi (eG)* 2015; 1(1): 153-9.
17. Sabir A. aktivitas antibakteri flavonoid propolis trigona sp terhadap pertumbuhan bakteri Streptococcus mutans. *Maj Ked Gigi (Dent J)* 2005; 38(3):135-41.
18. Dwyana Z, Johannes E. Uji efektivitas ekstrak kasar alga merah *Eucheuma cottonii* sebagai antibakteri terhadap bakteri patogen. Artikel publikasi MIPA Unhas 2008. 1-7
19. Jose J, Shoba K, Aman S, Tomy N, Sheena, Christie. Comparative evaluation of antimicrobial activity of green tea extract, garlic extract, neem leaf extract and sodium hypochlorite as root canal irrigants against *E. faecalis* and *C. albicans*. *Int J Curr Microbial App* 2015; 4(10): 384-91.
20. Sharma DK, Sachdev V, Sharma N. Evaluation of antimicrobial activity of root canal irrigants. *Indian J Dent Sci* 2012; 4(2): 37-9.
21. Fidalgo PKS, Barcelos B, Portela MB, Soares RMdA, Gleiser R, Filho RCS. Inhibitory activity of root canal irrigants against candida albicans, enterococcus faecalis and staphylococcus aureus. *Braz Oral Res* 2010; 24(4):406-12
22. Solmaz G, Korachi M. Inhibition and disruption properties of chlorhexidine gluconate on single and multispecies oral biofilms. *Jundishapur J Microbiol* 2013;6(1): 61-6
23. Mickel AK, Sharma P, Chogle S. Effectiveness of stannous fluoride and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis*. *J Endo* 2003; 29(4): 259-60