



**DAYA ANTIBAKTERI EKSTRAK MINYAK ATSIRI  
RIMPANG TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza*  
Roxb.) TERHADAP PERTUMBUHAN  
*Enterococcus faecalis* DAN  
*Fusobacterium nucleatum***

**SKRIPSI**

Oleh

**Nakhita Lintang Syafira**

**NIM 141610101085**

**BAGIAN MIKROBIOLOGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**



**DAYA ANTIBAKTERI EKSTRAK MINYAK ATSIRI  
RIMPANG TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza*  
Roxb.) TERHADAP PERTUMBUHAN  
*Enterococcus faecalis* DAN  
*Fusobacterium nucleatum***

**SKRIPSI**

diajukan guna melengkapi tugas akhir dan memenuhi salah satu syarat  
untuk menyelesaikan Program Studi Kedokteran Gigi (S1)  
dan mencapai gelar Sarjana Kedokteran Gigi

oleh

**Nakhita Lintang Syafira**

**NIM 141610101085**

**BAGIAN MIKROBIOLOGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER  
2018**

## PERSEMBAHAN

Skripsi ini saya persembahkan untuk:

1. Ayahanda Nur Rohim dan Ibunda Tutik Nurnaningsih yang selalu mengalunkan doa tanpa lelah, mengalirkan dukungan tanpa henti, dan memberikan saran-saran yang solutif sehingga saya bisa menyelesaikan skripsi ini;
2. Kakaku Desvin Maulana Amri yang dengan sabar mendampingi dalam setiap suka maupun duka;
3. Guru-guruku sejak taman kanak-kanak sampai dengan perguruan tinggi;
4. Almamater Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

**MOTO**

Sesungguhnya bersama kesulitan ada kemudahan.  
Maka apabila engkau telah selesai (dari sesuatu urusan), tetaplah bekerja keras  
(untuk urusan yang lain), dan hanya kepada Tuhanmulah engkau berharap.  
(Q.S. Al Insyirah : 6-8)<sup>\*)</sup>



---

<sup>\*)</sup> Departemen Agama Republik Indonesia. 2013. *Al-Qur'an dan Terjemahannya*. Solo: PT Tiga Serangkai Pustaka Mandiri .

**PERNYATAAN**

Saya yang bertanda tangan di bawah ini:

nama : Nakhita Lintang Syafira

NIM : 141610101085

menyatakan dengan sesungguhnya bahwa karya ilmiah yang berjudul "Daya Antibakteri Ekstrak Minyak Atsiri Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis* dan *Fusobacterium nucleatum*" adalah benar-benar hasil karya sendiri, kecuali kutipan yang sudah saya sebutkan sumbernya, belum pernah diajukan pada institusi mana pun, dan bukan karya jiplakan. Saya bertanggung jawab atas keabsahan dan kebenaran isinya sesuai dengan sikap ilmiah yang harus dijunjung tinggi.

Demikian pernyataan ini saya buat dengan sebenarnya, tanpa ada tekanan dan paksaan dari pihak manapun serta bersedia mendapat sanksi akademik jika ternyata di kemudian hari pernyataan ini tidak benar.

Jember, 14 Maret 2018

Yang menyatakan,

Nakhita Lintang Syafira

NIM 141610101085

**SKRIPSI**

**DAYA ANTIBAKTERI EKSTRAK MINYAK ATSIRI  
RIMPANG TEMULAWAK (*Curcuma xanthorrhiza*  
Roxb.) TERHADAP PERTUMBUHAN  
*Enterococcus faecalis* DAN  
*Fusobacterium nucleatum***

Oleh

Nakhita Lintang Syafira

NIM 141610101085

Pembimbing:

Dosen Pembimbing Utama : drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes

Dosen Pembimbing Pendamping : Prof. drg. Dwi Prijatmoko, Ph.D

**PENGESAHAN**

Skripsi berjudul “Daya Antibakteri Ekstrak Minyak Atsiri Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis* dan *Fusobacterium nucleatum*” telah diuji dan disahkan oleh Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember pada:

hari, tanggal : Rabu, 14 Maret 2018

tempat : Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember

Penguji Ketua,

Penguji Anggota,

drg. Dyah Setyorini, M.Kes  
NIP 196604012000032001

drg. Erawati Wulandari, M.Kes  
NIP 196708191993032001

Pembimbing Utama,

Pembimbing Pendamping.

drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes  
NIP 197608092005012002

Prof. drg. Dwi Prijatmoko, Ph.D  
NIP 195808041983031003

Mengesahkan,  
Dekan Fakultas Kedokteran Gigi  
Universitas Jember,

drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Prof  
NIP 196901121996011001

## RINGKASAN

**Daya Antibakteri Ekstrak Minyak Atsiri Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis* dan *Fusobacterium nucleatum***; Nakhita Lintang Syafira, 141610101085; 2018: 97 halaman; Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Nekrosis pulpa merupakan suatu keadaan kematian pulpa yang dapat terjadi pada sebagian atau seluruh jaringan pulpa. Penyebab utama nekrosis pulpa yaitu adanya invasi mikroorganisme dengan persentase kasus 98,5%, sedangkan 1,5% disebabkan oleh trauma dan iritasi kimiawi. Perawatan saluran akar gigi merupakan salah satu perawatan yang diindikasikan untuk nekrosis pulpa. Suatu perawatan tidak lepas dari kemungkinan adanya suatu kegagalan, termasuk perawatan saluran akar. Persentase kegagalan perawatan saluran akar tergolong tinggi, yaitu 78,8%. Penyebab utama kegagalan perawatan saluran akar gigi adalah adanya resistensi mikroorganisme terhadap obat sterilisasi saluran akar yang digunakan. Mikroorganisme yang paling sering ditemukan pada infeksi saluran akar gigi yaitu *Enterococcus faecalis* dan *Fusobacterium nucleatum*.

Perawatan saluran akar terdiri dari 3 tahap utama, yaitu preparasi, sterilisasi, dan pengisian. Sterilisasi merupakan faktor yang sangat dominan dalam menentukan keberhasilan perawatan saluran akar. Obat sterilisasi saluran akar yang cukup efektif dan biasa digunakan dalam kedokteran gigi adalah *Chlorophenol Kamfer Menthol (ChKM)* dan *Cresophene*. Namun, *ChKM* dan *Cresophene* memiliki efek samping yang perlu dipertimbangkan bagi tubuh, salah satunya karena kedua bahan tersebut dilaporkan mengurangi viabilitas sel fibroblast. Oleh karena itu, perlu adanya suatu *herbal medicine* sebagai alternatif obat sterilisasi saluran akar dengan efek samping minimal, salah satunya yaitu temulawak. Rimpang temulawak dilaporkan mengandung minyak atsiri yang memiliki aktivitas antibakteri dengan merusak porin dan penghambatan pembentukan biofilm bakteri. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui daya



antibakteri ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) terhadap pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum*.

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris dengan rancangan penelitian *the post test only control group design*. Penelitian ini menggunakan metode *disc-diffusion* yang terdiri dari 7 kelompok penelitian (3 kelompok kontrol dan 4 kelompok perlakuan). Kelompok kontrol terdiri dari kontrol positif (*ChKM* dan *Cresophene*) dan kontrol negatif (DMSO 10%+Tween 80 0,5%). Kelompok perlakuan terdiri dari konsentrasi 100%, 75%, 50%, 25%. Setiap kelompok diambil sebanyak 20 µl, lalu diteteskan pada kertas cakram dengan diameter 5 mm. Kertas cakram lalu diletakkan di atas permukaan media MH-A yang telah diinokulasi *E. faecalis* dan *F. nucleatum*. Petridish dimasukkan ke dalam desikator dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah 24 jam, dapat dilakukan pengukuran diameter zona hambat di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong digital.

Data hasil penelitian kemudian dianalisis menggunakan uji statistik non parametrik, *Kruskal-Wallis*. Hasil uji *Kruskal-Wallis* pada kedua bakteri menunjukkan nilai signifikansi 0,000 ( $p < 0,05$ ) yang dapat diartikan bahwa ada perbedaan bermakna pada kelompok penelitian, sehingga dapat dilanjutkan dengan uji lanjutan *Mann-Whitney*. Data hasil penelitian juga dilakukan pengklasifikasian berdasarkan besarnya diameter zona hambatnya. Rata-rata diameter zona hambat kelompok perlakuan yaitu sebesar 8,17-10,75 mm. Hasil penelitian tersebut, berdasarkan klasifikasi Ponce *et al.* (2003), termasuk ke dalam daya antibakteri dengan tingkatan sedang. Kesimpulan pada penelitian ini adalah bahwa ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak memiliki daya antibakteri terhadap pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum* dengan tingkatan sedang.

## PRAKATA

Puji syukur kehadirat Allah SWT. atas segala rahmat dan karunia-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Daya Antibakteri Ekstrak Minyak Atsiri Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis* dan *Fusobacterium nucleatum*". Skripsi ini disusun untuk memenuhi salah satu syarat menyelesaikan pendidikan strata satu (S1) pada Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember.

Penyusunan skripsi ini tidak lepas dari bantuan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Allah SWT. karena berkat kuasa dan kehendaknya penulis diberi kekuatan jasmani dan rohani, kesabaran, ketabahan, kelancaran, dan kemudahan;
2. drg. R. Rahardyan Parnaadji, M.Kes., Sp.Pros, selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember;
3. drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes., selaku Dosen Pembimbing Utama dan Prof. drg. Dwi Prijatmoko, Ph.D., selaku Dosen Pembimbing Pendamping yang telah meluangkan waktu dalam memberikan bimbingan dan motivasi dengan penuh kesabaran sehingga skripsi ini dapat terselesaikan;
4. drg. Dyah Setyorini, M.Kes., selaku Dosen Penguji Ketua dan drg. Erawati Wulandari, M.Kes., selaku Dosen Penguji Anggota yang telah memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini;
5. drg. Amandia Dewi Permana Shita, selaku Dosen Pembimbing Akademik yang telah memberikan bimbingan dan motivasi dalam perjalanan studi selama penulis menjadi mahasiswa;
6. Orang tua tercinta, Ayahanda Nur Rohim dan Ibunda Tutik Nurnaningsih, terima kasih atas cinta yang tak henti mengalir, doa yang terus mengalir, motivasi, dukungan, dan petuah-petuahnya;
7. Kakak tersayang yang sekaligus juga pejuang "Scrispy", Desvin Maulana Amri, yang selalu mendampingi dan memberikan dukungan moril;
8. Staf Laboratorium Botani Fakultas Pertanian Politeknik Negeri Jember, Bapak Ujang, yang telah memberikan waktu dan bantuannya;

9. Staf Laboratorium Alat Mesin Pertanian Politeknik Negeri Jember, Bapak Yasir, yang telah memberikan waktu, bantuan, dan motivasinya;
10. Staf Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Bapak Setyo Pinardi, A.Md., dan Ibu Indria Cahyani, A.Md yang telah meluangkan waktu dan bantuannya sehingga penelitian dapat berjalan lancar dan skripsi ini dapat terselesaikan;
11. Bapak Budi sekeluarga, pemilik ladang temulawak, yang telah menyediakan rimpang temulawak segar untuk kelancaran skripsi ini;
12. Yuniko Dimas Ardi Ansyah, yang telah menemani pahit manisnya dunia perkuliahan dari nol hingga tahap ini. Terima kasih telah menjadi tempat berkeluh kesah ternyaman dan untuk segala dukungan moril;
13. Teman-teman pejuang Skripsweet: Kholisa, Najla Irhamni Phasa, Arofah, Nadiya, Anisa Hakima, Karunia Nur Anisa, Fisca, Firdi. Terima kasih atas kerja sama, motivasi, dan bantuannya;
14. Teman-teman proyekan sebelah: Erfika, Umil, Nanik, Irsa, Lady, Rusella, Yuniko, Wawan, yang selalu memberikan semangat, doa, dan dukungan;
15. Erfika yang selalu memberikan semangat, motivasi, nasehat, dan doa selama perjalanan menyelesaikan skripsi ini;
16. Teman-teman KKN 87: Dian, Iin, Han, Anis, Yayuk, Tanti, Febby, Syarif yang telah memberikan doa dan dukungan dalam mengerjakan skripsi ini;
17. Seluruh teman-teman FKG 2014 LECI, terima kasih atas motivasi, kerja sama, persaudaraan, dan kekompakannya selama ini;
18. Semua pihak yang tidak dapat disebutkan satu per satu.

Penulis juga menerima segala kritik dan saran dari semua pihak demi kesempurnaan skripsi ini. Akhirnya penulis berharap, semoga skripsi ini dapat bermanfaat.

Jember, 14 Maret 2018

Penulis

**DAFTAR ISI**

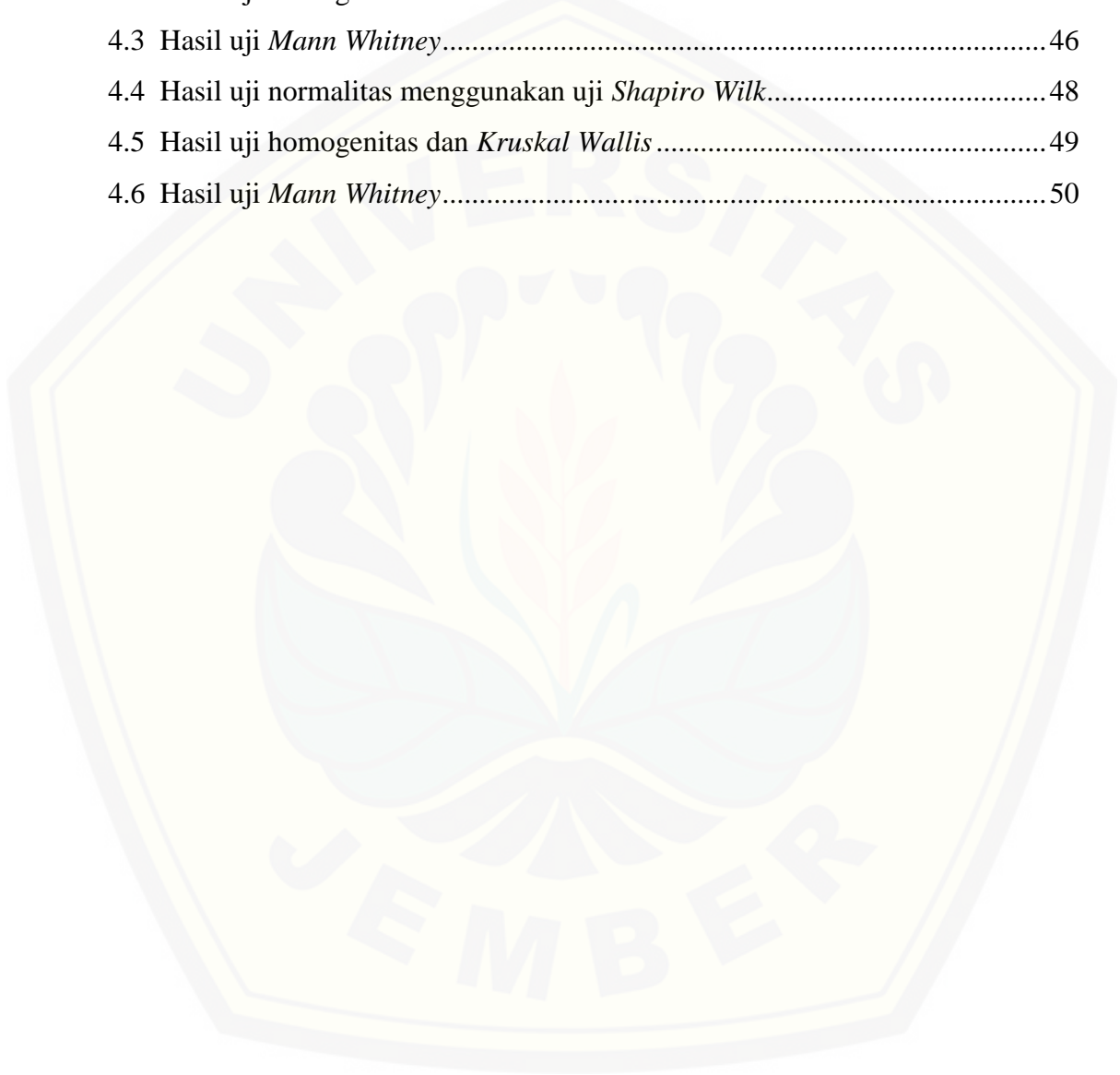
	Halaman
<b>HALAMAN JUDUL</b> .....	i
<b>HALAMAN PERSEMBAHAN</b> .....	ii
<b>HALAMAN MOTO</b> .....	iii
<b>HALAMAN PERNYATAAN</b> .....	iv
<b>HALAMAN PEMBIMBINGAN</b> .....	v
<b>HALAMAN PENGESAHAN</b> .....	vi
<b>RINGKASAN</b> .....	vii
<b>PRAKATA</b> .....	ix
<b>DAFTAR ISI</b> .....	xi
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	xiv
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	xv
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	xvi
<b>BAB 1. PENDAHULUAN</b> .....	1
<b>1.1 Latar Belakang</b> .....	1
<b>1.2 Rumusan Masalah</b> .....	3
<b>1.3 Tujuan Penelitian</b> .....	4
<b>1.4 Manfaat Penelitian</b> .....	4
<b>BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	5
<b>2.1 <i>Enterococcus faecalis</i></b> .....	5
2.1.1 Morfologi dan Klasifikasi .....	5
2.1.2 Virulensi.....	6
2.1.3 Pertumbuhan dan Metabolisme .....	8
<b>2.2 <i>Fusobacterium nucleatum</i></b> .....	10
2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi .....	10
2.2.2 Virulensi.....	11
2.2.3 Pertumbuhan dan Metabolisme .....	13
<b>2.3 Mekanisme Antibakteri</b> .....	14
<b>2.4 Obat Sterilisasi Saluran Akar</b> .....	15
2.4.1 Syarat Obat Sterilisasi Saluran Akar .....	15
<b>2.5 <i>Chlorophenol Kamfer Menthol (ChKM)</i></b> .....	16

<b>2.6</b>	<b><i>Cresophene</i></b> .....	16
<b>2.7</b>	<b>Temulawak</b> .....	17
	2.7.1 Morfologi dan Klasifikasi .....	17
	2.7.2 Lingkungan Tumbuh.....	18
	2.7.3 Manfaat .....	19
<b>2.8</b>	<b>Ekstraksi Minyak Atsiri</b> .....	19
<b>2.9</b>	<b>Kandungan Minyak Atsiri Temulawak</b> .....	20
<b>2.10</b>	<b>Hipotesis</b> .....	23
<b>2.11</b>	<b>Kerangka Konseptual</b> .....	24
<b>BAB 3.</b>	<b>METODOLOGI PENELITIAN</b> .....	25
<b>3.1</b>	<b>Jenis Penelitian</b> .....	25
<b>3.2</b>	<b>Waktu dan Tempat Penelitian</b> .....	25
	3.2.1 Waktu Penelitian .....	25
	3.2.2 Tempat Penelitian .....	25
<b>3.3</b>	<b>Variabel Penelitian</b> .....	25
	3.3.1 Variabel Bebas .....	25
	3.3.2 Variabel Terikat .....	25
	3.3.3 Variabel Terkendali .....	26
<b>3.4</b>	<b>Definisi Operasional</b> .....	26
	3.4.1 Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100% .....	26
	3.4.2 Hambatan pertumbuhan <i>E. faecalis</i> dan <i>F. nucleatum</i> .....	26
	3.4.3 Media biakan bakteri .....	26
	3.4.4 Suspensi <i>E. faecalis</i> dan <i>F. nucleatum</i> .....	27
	3.4.5 Suhu dan durasi inkubasi .....	27
	3.4.6 Alat ukur .....	27
<b>3.5</b>	<b>Sampel Penelitian</b> .....	27
	3.5.1 Pengelompokan Sampel.....	27
	3.5.2 Jumlah Sampel.....	28
	3.5.3 Kriteria Sampel .....	28
<b>3.6</b>	<b>Alat dan Bahan Penelitian</b> .....	28
	3.6.1 Alat Penelitian.....	28
	3.6.2 Bahan Penelitian .....	29
<b>3.7</b>	<b>Prosedur Penelitian</b> .....	30

3.7.1 Tahap Persiapan .....	30
3.7.2 Tahap Perlakuan .....	37
3.7.3 Tahap Pengukuran .....	39
<b>3.8 Analisis Data.....</b>	<b>41</b>
<b>3.9 Alur Penelitian .....</b>	<b>42</b>
<b>BAB 4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>43</b>
<b>4.1 Hasil Penelitian.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2 Pembahasan.....</b>	<b>50</b>
<b>BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>54</b>
<b>5.1 Kesimpulan.....</b>	<b>54</b>
<b>5.2 Saran .....</b>	<b>54</b>
<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>55</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>63</b>

**DAFTAR TABEL**

	Halaman
4.1 Hasil uji normalitas menggunakan uji <i>Shapiro Wilk</i> .....	45
4.2 Hasil uji homogenitas dan <i>Kruskal Wallis</i> .....	45
4.3 Hasil uji <i>Mann Whitney</i> .....	46
4.4 Hasil uji normalitas menggunakan uji <i>Shapiro Wilk</i> .....	48
4.5 Hasil uji homogenitas dan <i>Kruskal Wallis</i> .....	49
4.6 Hasil uji <i>Mann Whitney</i> .....	50



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
2.1 Morfologi <i>E. faecalis</i> .....	6
2.2 Fase pertumbuhan <i>E. faecalis</i> selama 4 hari dengan suhu 37°C .....	9
2.3 Morfologi <i>F. nucleatum</i> .....	11
2.4 Fase pertumbuhan <i>F. nucleatum</i> dengan suhu 37°C .....	13
2.5 Temulawak .....	18
2.6 Rantai kimia terpena .....	21
2.7 Kerangka konseptual penelitian .....	24
3.1 Rimpang temulawak yang telah dipotong dengan ketebalan 1-2 mm .....	31
3.2 Alat destilasi uap air .....	32
3.3 Corong pemisah minyak atsiri dan air .....	33
3.4 Ilustrasi pengenceran minyak atsiri rimpang temulawak .....	34
3.5 Perbandingan suspensi dengan standar McFarland 0,5 dan suspensi asli dari bakteri .....	35
3.6 Skema pembagian daerah pada <i>petridish</i> .....	37
3.3 Ilustrasi gerakan <i>streaking</i> .....	38
3.4 Ilustrasi pengukuran diameter zona hambat .....	40
3.5 Alur penelitian daya antibakteri ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak terhadap pertumbuhan <i>E. faecalis</i> dan <i>F. nucleatum</i> .....	42
4.1 Zona hambat minyak atsiri rimpang temulawak terhadap <i>E. faecalis</i> .....	43
4.2 Histogram nilai rata-rata diameter zona hambat pada bakteri <i>E. faecalis</i> .....	44
4.3 Zona hambat minyak atsiri rimpang temulawak terhadap <i>F. nucleatum</i> .....	47
4.4 Histogram nilai rata-rata diameter zona hambat pada bakteri <i>F. nucleatum</i> .....	48



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
A. Pembuatan Kontrol Negatif.....	63
B. Pembuatan Perlakuan Minyak Atsiri.....	63
C. Data Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat .....	63
C.1 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	63
C.2 <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	64
D. Analisis Data .....	64
D.1 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	64
D.1.1 Hasil Uji Normalitas dengan Uji <i>Shapiro Wilk</i> .....	64
D.1.2 Hasil Uji Homogenitas dengan <i>Levene Test</i> .....	64
D.1.3 Hasil Uji Non Parametrik dengan Uji <i>Kruskal Wallis</i> .....	65
D.1.4 Hasil Uji Beda Antar Kelompok Perlakuan dengan Uji <i>Mann</i> <i>Whitney</i> .....	65
D.2 <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	75
D.2.1 Hasil Uji Normalitas dengan Uji <i>Shapiro Wilk</i> .....	75
D.2.2 Hasil Uji Homogenitas dengan <i>Levene Test</i> .....	75
D.2.3 Hasil Uji Non Parametrik dengan Uji <i>Kruskal Wallis</i> .....	75
D.2.4 Hasil Uji Beda Antar Kelompok Perlakuan dengan Uji <i>Mann</i> <i>Whitney</i> .....	76
E. Foto Hasil Penelitian .....	86
E.1 <i>Enterococcus faecalis</i> .....	86
E.2 <i>Fusobacterium nucleatum</i> .....	86
F. Foto Alat dan Bahan Penelitian.....	87
F.1 Alat Penelitian .....	87
F.2 Bahan Penelitian.....	89
G. Surat Keterangan .....	91
G.1 Identifikasi Tanaman Temulawak .....	91
G.2 Identifikasi Bakteri <i>E. faecalis</i> dengan Pewarnaan Gram .....	92
G.3 Identifikasi Bakteri <i>F. nucleatum</i> dengan Pewarnaan Gram .....	94

G.4 Pembuatan Ekstrak Minyak Atsiri Rimpang Temulawak ..... 96



## BAB 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Nekrosis pulpa merupakan suatu keadaan kematian pulpa sebagai akibat inflamasi pada pulpa yang tidak dirawat. Nekrosis pulpa dapat terjadi pada sebagian maupun seluruh jaringan pulpa. Nekrosis pulpa dapat disebabkan oleh mikroorganisme, trauma, maupun iritasi kimiawi (Garg dan Garg, 2013). Mikroorganisme merupakan penyebab terbesar nekrosis pulpa dengan persentase kasus 98,5%, sedangkan sisanya disebabkan oleh trauma dan iritasi kimiawi dengan persentase 1,5% (Larasati *et al.*, 2014).

Salah satu perawatan yang diindikasikan untuk nekrosis pulpa ialah perawatan saluran akar gigi (Garg dan Garg, 2013). Suatu perawatan tidak lepas dari kemungkinan adanya suatu kegagalan, termasuk perawatan saluran akar gigi. Menurut Zehnder (2006) bahwa penyebab utama kegagalan perawatan saluran akar gigi adalah adanya persistensi dan kolonisasi kembali mikroorganisme. Mikroorganisme yang paling sering ditemukan pada infeksi saluran akar gigi antara lain bakteri Gram positif anaerob kokus, yaitu *Enterococcus faecalis*, dan Gram negatif anaerob batang, yaitu *Fusobacterium nucleatum* (Guimarães *et al.*, 2012; Shan *et al.*, 2014).

*E. faecalis* dan *F. nucleatum* telah banyak dilaporkan bertanggung jawab pada infeksi saluran akar. Hal ini diperkuat pada penelitian yang telah dilakukan oleh Topcuoglu *et al.* (2013) dilaporkan bahwa dari 30 sampel gigi dengan infeksi awal saluran akar, 29 gigi (96,7%) diketahui terinfeksi *F. nucleatum*. Penelitian lain yang dilakukan oleh Guimarães *et al.* (2012) dilaporkan bahwa pada 6 gigi yang telah dilakukan perawatan saluran akar, 4 gigi (66,6%) mengalami infeksi ulang oleh *F. nucleatum* sedangkan 5 dari 6 gigi (83,3%) juga diketahui terinfeksi bakteri Gram positif kokus.

Sterilisasi saluran akar merupakan faktor yang sangat dominan dalam menentukan keberhasilan perawatan saluran akar (Mulyawati, 2011). Sterilisasi saluran akar dilakukan melalui irigasi dan pemberian medikamen saluran akar. Penggunaan obat sterilisasi saluran akar ini bertujuan untuk mengeliminasi bakteri

yang tidak dapat dihancurkan dengan proses instrumentasi khemomekanikal (Torabinejad dan Walton, 2009).

Obat sterilisasi saluran akar yang cukup efektif dan biasa digunakan dokter gigi adalah *Chlorophenol Kamfer Menthol (ChKM)* dan *Cresophene*. *ChKM* dan *Cresophene* digunakan secara bergantian selama perawatan dimaksudkan untuk tindakan *rotation of medication*. Tindakan *rotation of medication* bertujuan untuk menanggulangi resistensi bakteri terhadap obat saluran akar yang dipakai sebelumnya (Mardewi, 2003).

*ChKM* merupakan antiseptik yang aktif dan baik untuk saluran akar. *ChKM* mampu berdifusi dengan cepat ke dalam tubuli dentinalis dan merusak ikatan protein dan lipid pada membran sel bakteri (Dammaschke *et al.*, 2013). *Cresophene* juga diketahui sangat efektif dalam disinfeksi saluran akar. Aktivitas antibakteri *Cresophene* mirip dengan *ChKM* karena keduanya sama-sama dari golongan fenol, yaitu berinteraksi dengan protein dan membran sel bakteri (Al-Shahwany, 2014).

*ChKM* dan *Cresophene* juga memiliki efek samping yang perlu dipertimbang bagi tubuh. Biokompatibilitas *ChKM* masih menjadi kontroversi karena bersifat toksik. *ChKM* dilaporkan dapat mengurangi viabilitas sel fibroblast gingiva dan menginduksi destruksi DNA *double-strand* pada sel host (Dammaschke *et al.*, 2013). *Cresophene* tidak direkomendasikan pada penggunaan jangka panjang karena bersifat sitotoksik dan berpotensi menjadi karsinogenik (Madarati *et al.*, 2017). Hasil penelitian menunjukkan *cresophene* memiliki efek toksik yang relatif tinggi pada fibroblast (Gheorghiu *et al.*, 2014). Oleh karena itu, perlu adanya suatu *herbal medicine* sebagai alternatif obat sterilisasi saluran akar yang memiliki efek samping minimal.

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan tanaman yang berasal dari kawasan Indo-Malaysia. Temulawak telah banyak dimanfaatkan sebagai jamu dan obat tradisional (biofarmaka). Menurut Kementerian Pertanian (2015), temulawak menempati posisi enam teratas komoditi tanaman biofarmaka pada tahun 2014, setelah jahe, kunyit, kapulaga, lengkuas, dan kencur. Meskipun

demikian, rimpang temulawak dilaporkan mengandung minyak atsiri paling banyak, yaitu sekitar 4-6% (Setyawan, 2003).

Senyawa aktif terbesar yang menyusun minyak atsiri rimpang temulawak yaitu xanthorrhizol. Xanthorrhizol merupakan senyawa aktif yang khas ditemukan hanya pada temulawak dan kunyit. Namun, pada kunyit jumlahnya sedikit. Xanthorrhizol memiliki keunggulan dapat tetap bekerja efektif sebagai agen antibakteri pada suhu tinggi (121°C, 15 menit) dan pH asam maupun basa. Xanthorrhizol dilaporkan memiliki daya antibakteri dan antibiofilm yang baik untuk bakteri patogen rongga mulut (Lee *et al.*, 2008).

Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak telah dilaporkan memiliki daya antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen. Hal ini dibuktikan pada penelitian yang dilakukan oleh Jeeva *et al.* (2012) dilaporkan bahwa minyak atsiri dari rimpang temulawak kering berbentuk serbuk dengan metode *hydro-distillation* memiliki daya antibakteri terhadap pertumbuhan *Escherichia coli*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Shigella sonnei*, *Enterobacter aerogens*, *Streptococcus thermophilus*, *Salmonella typhi*, dan *Staphylococcus aureus*.

Berdasarkan uraian mengenai potensi ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak di atas, peneliti tertarik untuk melakukan penelitian lebih lanjut mengenai daya antibakteri ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak terhadap pertumbuhan bakteri rongga mulut lain yaitu *E. faecalis* dan *F. nucleatum* sebagai alternatif obat sterilisasi saluran akar.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan masalah yang didapat dari uraian mengenai potensi ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak di atas, yaitu:

- a. Apakah ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak (*C. xanthorrhiza* Roxb.) memiliki daya antibakteri terhadap pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum*?

- b. Jika memiliki daya antibakteri, seberapa besar tingkat daya antibakteri ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak (*C. xanthorrhiza* Roxb.) terhadap pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum*?

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini, yaitu:

- a. Mengetahui daya antibakteri ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak (*C. xanthorrhiza* Roxb.) terhadap pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum*.
- b. Mengetahui besar tingkat daya antibakteri ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak (*C. xanthorrhiza* Roxb.) terhadap pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum*.

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat yang dapat diambil dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

- a. Dapat memberikan dan melengkapi informasi mengenai pemanfaatan ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak (*C. xanthorrhiza* Roxb.) dalam bidang kedokteran gigi, khususnya sebagai pengembangan obat sterilisasi saluran akar dengan efek samping minimal.
- b. Dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak terhadap mikroflora rongga mulut.

## BAB 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 *Enterococcus faecalis*

#### 2.1.1 Morfologi dan Klasifikasi

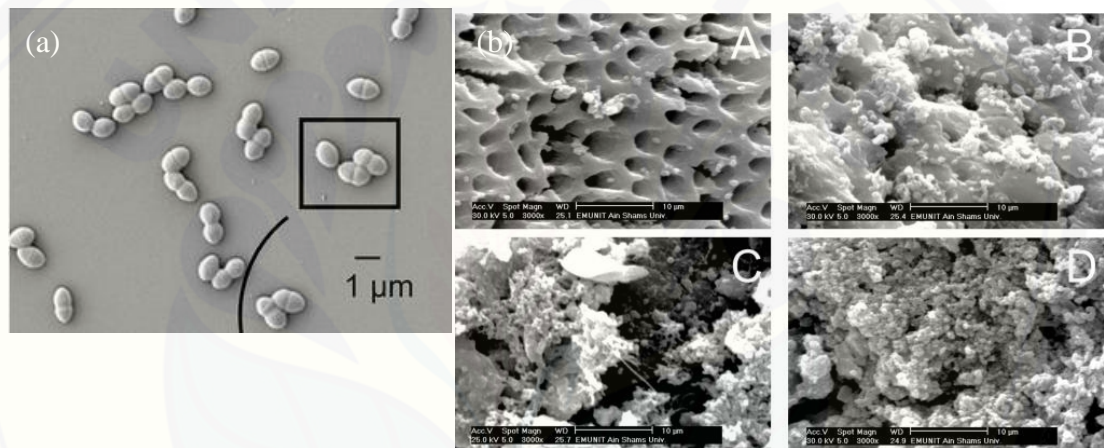
*E. faecalis* adalah bakteri fakultatif anaerob gram positif yang berbentuk kokus, dapat tumbuh dengan ada atau tidaknya oksigen dan merupakan flora normal pada manusia yang biasanya terdapat pada rongga mulut, saluran gastrointestinal dan saluran vagina. Bakteri ini dapat menginfeksi saluran urinaria, pembuluh darah, endokardium, lambung, saluran empedu, luka bakar, dan lain-lain. Bakteri ini tidak membentuk spora, berbentuk ovoid dengan diameter 0,5-1 µm, tampak sebagai kokus tunggal, berpasangan atau berbentuk rantai pendek (lihat Gambar 2.1(a)) dan permukaan koloni pada agar darah berbentuk bulat dan halus (Mulyawati, 2011).

*E. faecalis* merupakan bakteri yang paling resisten yang dapat dideteksi pada infeksi saluran akar. Pada gigi dengan periodontitis apikalis, *E. faecalis* ditemukan pada 71% kasus. Bakteri ini bertanggung jawab pada 80-90% infeksi saluran akar yang biasanya merupakan satu-satunya spesies *Enterococcus* yang diisolasi dari saluran akar pasca perawatan. *E. faecalis* menginvasi tubuli dentinalis lebih cepat daripada bakteri patogen endodontik lainnya dan dapat bertahan hidup di dalam tubuli dentinalis cukup lama (lihat Gambar 2.1(b)). *E. faecalis* mampu bertahan hidup dalam kondisi lingkungan yang ekstrim maupun kondisi dengan suplai nutrisi yang sangat sedikit (Dammaschke *et al*, 2013; Nurdin dan Satari, 2011).

Dinding sel bakteri *E. faecalis* terdiri dari peptidoglikan, polimer anion (*teichoic acid*), dan protein. Peptidoglikan dan polimer anion menyusun hampir 90% dari berat dinding sel, sedangkan sisanya disusun oleh protein (Hancock *et al.*, 2014). Peptidoglikan merupakan makromolekul utama yang terlibat dalam penentuan bentuk sel dan pemeliharaannya. Zat ini juga berguna sebagai lapisan pelindung dari kerusakan oleh tekanan osmotik sitoplasma yang tinggi (Nurdin dan Satari, 2011).

Klasifikasi bakteri *E. faecalis* adalah sebagai berikut (Lebreton *et al.*, 2014) :

Domain	: <i>Bacteria</i>
Kingdom	: <i>Eubacteria</i>
Filum	: <i>Firmicutees</i>
Klas	: <i>Bacilli</i>
Ordo	: <i>Lactobacillales</i>
Famili	: <i>Enterococcaceae</i>
Genus	: <i>Enterococcus</i>
Spesies	: <i>Enterococcus faecalis</i>



(a) Koloni *E. faecalis* dengan *scanning electron microscope (SEM)*; (b) Koloni *E. faecalis* dengan *scanning electron microscope* membentuk biofilm pada dentin saluran akar

Gambar 2.1 Morfologi *E. faecalis* (Sumber: Biaggini *et al.*, 2017; Saber dan El-Hady, 2012)

### 2.1.2 Virulensi

*Enterococcus faecalis* memiliki sejumlah faktor virulensi yang membuatnya sangat invasif. Faktor-faktor virulensi yang dimiliki *E. faecalis* antara lain *haemolysin*, *gelatinase*, *surface adhesins [Enterococcal Surface Protein (ESP)]*, *extracellular superoxide*, *aggregation substance (AS)*, *sex pheromones*, *lipoteichoic acid (LTA)*, *hyaluronidase*, *bacteriosin* dan *cytolysin*



*toxin* (Upadhyaya *et al.*, 2009; Nurdin dan Satari, 2011). Faktor–faktor virulensi tersebut menyebabkan bakteri ini memiliki kemampuan untuk melekat dan berkolonisasi pada host, dapat bersaing dengan bakteri lain, resisten terhadap mekanisme pertahanan host, resisten terhadap antimikroba, menghasilkan perubahan patogen baik secara langsung melalui produksi toksin atau secara tidak langsung melalui rangsangan terhadap mediator inflamasi (Stuart *et al.*, 2006; Nurdin dan Satari, 2011).

*Aggregation substance* merupakan suatu protein pada permukaan bakteri yang berfungsi untuk beragregasi dengan sel-sel host. AS berikatan dengan LTA dilaporkan dapat meningkatkan kemampuan perlekatan bakteri dengan makrofag dan bertahan dari sel *polymorphonuclear* (PMN). AS juga dapat melakukan perlekatan dengan matriks ekstraseluler, sedangkan LTA dapat menstimulasi pelepasan mediator inflamasi berupa TNF-, interleukin 1 beta (IL-1 $\beta$ ), interleukin 6 (IL-6), interleukin 8 (IL-8) dan *superoxide anion* (Nurdin dan Satari, 2011; Sava *et al.*, 2010).

*E. faecalis* dapat berkolonisasi dalam saluran akar dan bertahan tanpa bantuan dari bakteri lain. Bakteri ini mengkontaminasi saluran akar dan membentuk koloni di permukaan dentin dengan bantuan LTA, sedangkan AS dan *surface adhesin* lainnya berperan pada perlekatan di kolagen. *Cytolysin*, AS-48 dan *bacteriosin* menghambat pertumbuhan bakteri lain. Hal ini menjelaskan rendahnya jumlah bakteri lain pada infeksi saluran akar yang persisten sehingga *E. faecalis* menjadi mikroorganisme dominan pada saluran akar (Kayaoglu dan Ørstavik, 2004).

*Sex pheromones*, LTA dan *peptide corresponding inhibitor* berperan secara tidak langsung dengan menstimulasi respon imun host. Faktor virulensi tersebut awalnya berada dalam tubuli dentinalis dan saluran akar, kemudian dilepas menuju daerah periradikular. Faktor virulensi tersebut merangsang leukosit untuk menghasilkan mediator inflamasi atau enzim litik. Hal ini menyebabkan apoptosis pada sel-sel (osteoblas, osteoklas, jaringan ikat ligamen periodontal, makrofag dan neutrofil) sehingga berakibat terjadinya lesi periradikular (Kayaoglu dan Ørstavik, 2004).

Faktor virulensi yang menyebabkan perubahan patogen secara langsung adalah *gelatinase*, *hyaluronidase*, *cytolysin* dan *extracellular superoxide anion*. *Gelatinase* adalah enzim protease yang mampu menghidrolisis gelatin, kolagen, dan kasein, sehingga menyebabkan resorpsi tulang dan degradasi dentin matrik organik. *Hyaluronidase* membantu degradasi *hyaluronan* yang terdapat pada dentin untuk menghasikan energi organisme, sedangkan *extracellular superoxide* dan *cytolysin* berperan aktif terhadap kerusakan jaringan (Kayaoglu dan Ørstavik, 2004; Upadhyaya *et al.*, 2009).

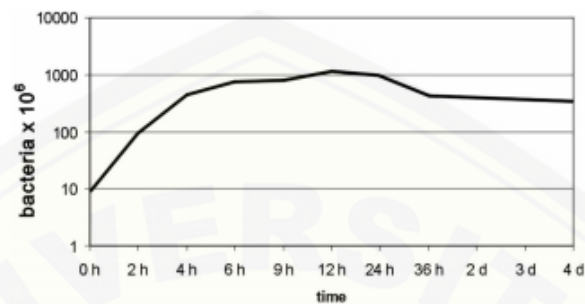
*E. faecalis* resisten terhadap banyak antibiotik spektrum luas. Resistensi dari *E. faecalis* terhadap antimikroba diperoleh secara intrinsik maupun *acquired* (didapat) melalui transfer gen. Resistensi *acquired* diperoleh dari mutasi DNA atau dapat juga dari gen yang baru melalui transfer plasmid dan transposons. Selain itu, adanya mekanisme yang mempertahankan level pH di dalam sitoplasma tetap optimal menyebabkan bakteri tersebut juga resisten terhadap antimikroba kalsium hidroksida. *E. faecalis* akan menjaga homeostasis melalui pH internal yang berfungsi untuk menjaga agar enzim dan protein berfungsi normal (Nurdin dan Satari, 2011).

Prinsip homeostasis terdiri dari dua komponen, yaitu fungsi pasif dan aktif. Fungsi pasif terdiri dari permeabilitas membran yang rendah dan kemampuan buffer sitoplasma. Sedangkan mekanisme aktif melalui kontrol transport kation (kalium, natrium dan proton) melalui membran sel. Pada lingkungan asam, sistem antiport kation akan meningkatkan pH internal dengan keluarnya proton melalui membran sel. Pada keadaan basa kation/proton akan dipompa ke dalam sel agar pH internal lebih rendah. Fungsi pompa proton intraseluler merupakan faktor utama dari resistensi *E. faecalis* terhadap pH (Nurdin dan Satari, 2011).

### 2.1.3 Pertumbuhan dan Metabolisme

Pertumbuhan bakteri dalam media kultur secara umum dapat dimodelkan dengan empat fase yang berbeda: fase lag, fase logaritmik (eksponensial), fase stasioner, dan fase kematian. Pertumbuhan bakteri *E. faecalis* langsung masuk ke dalam fase logaritmik, dimana jumlah sel hidup bakteri mengalami peningkatan

secara eksponensial selama 6 jam pertama inkubasi. Jumlah sel hidup bakteri kemudian tetap stabil pada 6 sampai 24 jam inkubasi (fase stasioner). Jumlah sel hidup bakteri mengalami penurunan yang stabil setelah 24 jam inkubasi (fase kematian) (lihat Gambar 2.2) (Portenier *et al.*, 2005).



Gambar 2.2 Fase pertumbuhan *E. faecalis* selama 4 hari dengan suhu 37°C (Sumber: Portenier *et al.*, 2005)

Komponen kunci metabolisme dari sebagian besar *Eubacteri* yaitu metabolisme karbohidrat heksosa dan pentosa. Fermentasi karbohidrat oleh *enterococci* memungkinkan genus ini berkembang di lingkungan yang beragam. Ada sedikitnya 13 gula dimetabolisme oleh semua spesies *Enterococcus*. Sumber karbohidrat tidak hanya terdiri dari beragam monomer, tapi juga banyak polimer karbohidrat alami. Metabolisme dari beragam karbohidrat membuat *Enterococci* memiliki keunggulan kuat dalam menguasai lingkungan yang kompetitif (Ramsey *et al.*, 2014).

Metabolisme gliserol juga sangat penting sebagai jalur untuk sintesis lipid dan (lipo)teichoic acid pada banyak bakteri Gram positif, termasuk *E. faecalis*. Gliserol juga bisa menjadi sumber karbon atau energi untuk beberapa bakteri patogen, seperti *Listeria monocytogenes*. *L. monocytogenes* menggunakan enzim *gliserol-catabolizing* untuk pertumbuhan intraselular. Studi tentang *Mycoplasma sp.*, bakteri yang disesuaikan dengan kehidupan di dalam host eukariotik masih mengandalkan beberapa sumber karbon, termasuk gliserol (Ramsey *et al.*, 2014).

*E. faecalis* memiliki metabolisme gliserol paling beragam. Bakteri ini dapat memfermentasi gliserol dalam kondisi aerobik maupun anaerobik. *E. faecalis* melalui dua jalur untuk katabolisme gliserol. Jalur pertama dimulai dengan fosforilasi gliserol *ATP-dependent* oleh gliserol kinase (GlpK/EF1929)

untuk menghasilkan *Gliserol-3-fosfat* (gliserol-3-P). Gliserol-3-P yang terbentuk kemudian dioksidasi menjadi *dihydroxyacetone phosphate* (DHAP) (Ramsey *et al.*, 2014).

Jalur kedua melibatkan oksidasi gliserol menjadi *dihydroxyacetone* oleh gliserol dehidrogenase  $\text{NAD}^+$  yang dapat larut (GldA1/EF1358). *Dihydroxyacetone* kemudian terfosforilasi ke DHAP oleh *dihydroxyacetone kinase* (DhaK/EF1360). Pertumbuhan anaerobik *E. faecalis* pada gliserol bergantung pada fumarat sebagai akseptor elektron untuk memungkinkan reoksidasi NADH. Dalam reaksi ini, fumarat dikurangi menjadi suksinat oleh reduktase fumarat terkait membran. Gen untuk aktivitas ini dikodekan dalam struktur operon (EF1358 sampai EF1361) yang mencakup GldA1, protein hipotetis kecil, dan dua subunit untuk DhaK (DhaK dan DhaL) (Ramsey *et al.*, 2014).

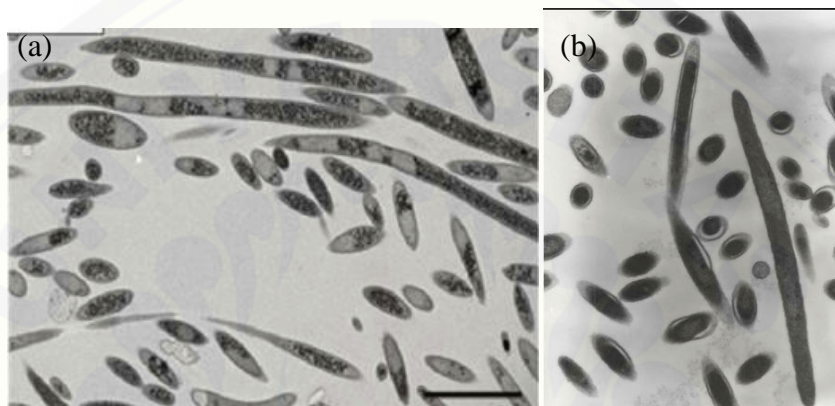
## 2.2 *Fusobacterium nucleatum*

### 2.2.1 Morfologi dan Klasifikasi

*F. nucleatum* merupakan spesies dari genus *Fusobacterium*, yang termasuk famili *Bacteroidaceae*. Nama *Fusobacterium* memiliki arti *fus*, suatu gelondong; dan *bacterion*, suatu batang kecil. Istilah *nucleatum* berasal dari tampilan nucleus yang sering terlihat berupa granul-granul intraseluler pada preparat mikroskop cahaya maupun elektron. *F. nucleatum* adalah bakteri gram negatif yang tidak membentuk spora dan non motil. Bakteri ini bersifat anaerobik, tetapi masih dapat tumbuh dengan oksigen hingga 6% (Avila-Campos dan Nakano, 2006).

*F. nucleatum* rata-rata memiliki panjang sekitar 5-10  $\mu\text{m}$  dengan ujung-ujung sel yang runcing (lihat Gambar 2.3). *F. nucleatum* dibagi menjadi empat subspecies yang berbeda: *nucleatum*, *polymorphum*, *fusiforme* dan *animalis*. Asam butirat merupakan produk utama fermentasi glukosa dan pepton, yang dapat membedakan spesies *Fusobacterium* dengan bakteri anaerob Gram negatif lainnya (Musrati *et al.*, 2016).

*F. nucleatum* juga dilaporkan berperan dalam terjadinya infeksi saluran akar. Pada penelitian yang telah dilakukan, dari 30 sampel gigi dengan infeksi awal saluran akar, 29 gigi (96,7%) diketahui terinfeksi *F. nucleatum* (Topcuoglu *et al.*, 2013). Pada 6 gigi yang telah dilakukan perawatan saluran akar, 4 gigi (66,6%) mengalami infeksi ulang oleh *F. nucleatum* sedangkan 5 dari 6 gigi (83,3%) diketahui terinfeksi bakteri kokus Gram positif. *F. nucleatum* diduga menjadi penyebab *flare-up* pasca perawatan saluran akar (Guimarães *et al.*, 2012).



(a) Koloni *E. faecalis* dengan *scanning electron microscope* (SEM); (b) Koloni *E. faecalis* dengan *transmission electron microscope* (TEM)

Gambar 2.3 Morfologi *F. nucleatum* (Sumber: Musrati *et al.*, 2016; Okamoto *et al.*, 2002)

### 2.2.2 Virulensi

Mekanisme virulensi dari *F. nucleatum* secara umum diklasifikasi menjadi dua kelompok, yaitu (1) kemampuannya dalam melakukan kolonisasi, dan (2) menginduksi respon host (Han, 2015).

#### 1. Kolonisasi

*F. nucleatum* merupakan bakteri adhesif yang dapat melakukan perlekatan dengan berbagai macam spesies bakteri lainnya. *F. nucleatum* menghasilkan beberapa adhesin seperti Fap2, RadD, dan aid1. Selain berikatan dengan spesies bakteri lainnya, *F. nucleatum* juga berikatan dengan sel-sel host seperti sel monosit, eritrosit, fibroblas, *Natural Killer cell*, dan PMN (Han, 2015).

Membran protein terluar dari *F. nucleatum*, Fap2 dan RadD, berperan dalam kematian sel host. Fap2 dan RadD merupakan protein autotransporter yang

diduga memicu kematian dengan melakukan kontak dengan sel. Mekanisme ini berbeda dengan mekanisme protein autotransporter pada umumnya yang memicu kematian sel dengan cara disekresikan ke dalam sel atau berfungsi sebagai protease. *F. nucleatum* menggunakan kedua adhesin ini untuk menekan sistem imun dan berkontribusi dalam menyebabkan penyakit. Namun, mekanisme Fap2 dan RadD dalam memicu kematian sel secara pasti masih dalam penelitian lebih lanjut (Kaplan *et al.*, 2010).

Sebuah adhesin baru pada *F. nucleatum* yaitu FadA, juga terlibat dalam perlekatan dan invasi ke sel host. FadA memiliki dua bentuk. Jenis pertama adalah pre-FadA non-sekresi yang mengandung 129 asam amino dan terhubung dengan membran bagian dalam. Kedua adalah mFadA yang mengandung 111 asam amino dan dapat dengan mudah dipisahkan dari bakteri dengan pencucian. Pre-FadA dan mFadA bergabung dan membentuk agregat dengan berat molekul tinggi, yang diperlukan dalam perlekatan dan invasi ke sel host (Han, 2015).

## 2. Induksi Respon Host

Selain penetrasi bakteri ke dalam jaringan, karakteristik lain yang penting dalam infeksi periodontal yaitu inflamasi, suatu keadaan dimana terjadi infiltrasi neutrofil ke jaringan yang terinfeksi. Produksi yang terus-menerus dari sitokin proinflamasi, seperti IL-8, berperan dalam perkembangan infeksi dan kerusakan jaringan. Pada penelitian yang telah dilakukan, diketahui bahwa *F. nucleatum* merupakan stimulator terkuat dalam produksi IL-8 (Han *et al.*, 2000).

Pada keadaan normal, faktor proinflamasi dan anti-inflamasi bekerja dalam kondisi yang seimbang. *F. nucleatum* dapat berikatan dengan NK cell untuk memicu respon inflamasi, sehingga keberadaan bakteri ini dapat memperparah proses inflamasi. Produksi sitokin proinflamasi yang terus-menerus berperan dalam perkembangan infeksi sehingga keadaan berubah menjadi patogen (Han, 2015).

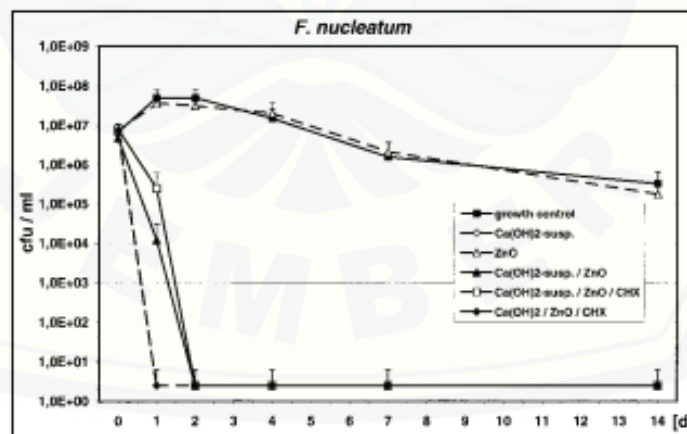
*F. nucleatum* juga dapat menginduksi TNF- $\alpha$ . *Tumor Necrosis Factor Alpha* (TNF- $\alpha$ ) adalah sitokin yang berperan penting pada proses inflamasi, diferensiasi sel, proliferasi, apoptosis, dan metabolisme jaringan adiposa. Makrofag merupakan sel yang paling banyak memproduksi TNF- $\alpha$ . TNF $\alpha$

menginduksi pelepasan mediator inflamasi lainnya seperti prostaglandin dan *platelet activating factor*. TNF-  $\alpha$  menjadi pengatur utama pada aktivasi sel-sel inflamasi dan berperan dalam perkembangan banyak penyakit inflamasi kronis (Parameswaran dan Patial, 2010).

*F. nucleatum* memiliki lipopolisakarida (LPS) yang berperan sebagai endotoksin. LPS merupakan bagian yang terintegrasi dengan dinding sel bakteri Gram negatif. LPS memiliki dampak biologis pada host seperti memicu respon imun di dalam pulpa. Endotoksin ini turut serta menyebabkan rasa sakit pada pulpa, menginduksi inflamasi periapikal, dan mengaktifkan kerusakan tulang periapikal (Narayanan dan Vaishnavi, 2010).

### 2.2.3 Pertumbuhan dan Metabolisme

Pertumbuhan bakteri *F. nucleatum* langsung memasuki fase logaritmik pada hari ke-0 atau sejak dimulainya inkubasi hingga hari ke-1 atau 24 jam. Jumlah sel hidup bakteri kemudian tetap stabil dari hari ke-1 hingga hari ke-2 atau dari 24 jam hingga 48 jam inkubasi (fase stasioner). Jumlah sel hidup bakteri mengalami penurunan yang stabil setelah 48 jam inkubasi (fase kematian) (lihat Gambar 2.4) (Podbielski *et al.*, 2003).



Gambar 2.4 Fase pertumbuhan *F. nucleatum* dengan suhu 37°C (Sumber: Podbielski *et al.*, 2003)

*F. nucleatum* merupakan salah satu spesies bakteri nonspora yang memanfaatkan katabolisme asam amino untuk menghasilkan energi dan beberapa

strain *F. nucleatum* memerlukan peptida untuk proses pertumbuhannya. Energi yang diperlukan berasal dari fermentasi anaerob glutamin, lisin, dan histidin. Senyawa ini harus menyediakan energi untuk akumulasi glukosa dan galaktosa melalui proses yang melibatkan translokasi membran, fosforilasi intraselular, dan sintesis polimer (Avila-Campos dan Nakano, 2006).

*F. nucleatum* berperan dalam desulfurasi sistein dan methionin sehingga menghasilkan ammonia, *hydrogen sulfida*, asam butirat dan *methyl mercapthan*. Kemampuan patogenesis *F. nucleatum* tidak hanya sebagai bakteri tunggal namun dapat dikaitkan dengan keberadaan bakteri lain. Adanya interaksi *F. nucleatum* dengan jenis bakteri lain berhubungan dengan beberapa hal, diantaranya adalah kemampuan mengumpulkan glukosa dalam bentuk *glukan* intraseluler yang dapat digunakan sebagai sumber energi. Apabila jumlah glukosa berkurang, maka glukosa yang ada dapat dieksresikan dari sel bakteri. Hal ini memungkinkan bakteri lain mendekati permukaan *F. nucleatum* dan selanjutnya berikatan dengan dinding selnya (Avila-Campos dan Nakano, 2006).

### 2.3 Mekanisme Antibakteri

Mekanisme antibakteri secara umum dapat dikelompokkan menjadi lima, yaitu penghambatan sintesis dinding sel, penghambatan sintesis protein, penghambatan sintesis asam nukleat, perubahan fungsi membran sel, dan perubahan metabolisme sel (Simon, 2012).

Penghambatan sintesis dinding sel bakteri dapat melalui beberapa aksi, antara lain: menghambat *cross-linking* peptidoglikan dengan menonaktifkan *transpeptidase* (PBPs), agen antibakteri mengikatkan diri ke terminal *D-ala-D-ala* dan mencegah penggabungan ke peptidoglikan yang sedang terbentuk, menghambat terjadinya *transglycosylation*, menghambat defosforilasi fosfolipid *carrier* dalam struktur peptidoglikan, mencegah penggabungan *D-alanin* menjadi peptidoglikan (Anderson *et al.*, 2012; Kohanski *et al.*, 2010).

Penghambatan sintesis protein melalui pengikatan pada subunit-subunit ribosom. Subunit yang sering menjadi sasaran dari agen antibakteri yaitu 30S dan 50S. Penghambatan sintesis protein pada ribosom ini juga sejalan dengan



penghambatan sintesis asam nukleat pada inti sel. Penghambatan sintesis asam nukleat dapat melalui beberapa aksi, yaitu menghentikan proses replikasi, menghambat sintesis mRNA, dan menghambat DNA gyrase & topoisomerase (Kohanski *et al.*, 2010).

Perubahan fungsi membran sel secara garis besar melalui pengrusakan *selective permeability* sehingga sel bakteri tidak dapat mengendalikan apa yang masuk dan keluar dari sel. Sel bakteri menjadi sensitif terhadap tekanan osmotik karena kehilangan integritasnya. Perubahan metabolisme sel melalui beberapa aksi, yaitu pengikatan pada enzim di dalam sel bakteri untuk mengganggu fungsi normalnya, gangguan biosintesis *ubiquinon*, asam tetrahidrofolik, dan respirasi sel (Kohanski *et al.*, 2010).

## 2.4 Obat Sterilisasi Saluran Akar

Mikroorganisme merupakan etiologi utama pada penyakit pulpa dan periradikular. Tujuan utama dari perawatan endodontik adalah untuk menghilangkan dan membunuh seluruh mikroorganisme di dalam saluran akar. Prosedur perawatan endodontik dapat dibagi ke dalam tiga tahap, yaitu preparasi biomekanik, disinfeksi, dan obturasi. Disinfeksi merupakan tahap yang penting setelah maupun selama pembersihan saluran akar. Obat sterilisasi saluran akar ini digunakan untuk disinfeksi saluran akar (Ambikathanaya, 2014).

Obat sterilisasi saluran akar terdiri dari beberapa kelompok sesuai penyusunnya. Klasifikasi obat sterilisasi saluran akar menurut Grossman terdiri dari golongan *essential oil* seperti eugenol; golongan fenol seperti fenol, paraklorofenol, *ChKM*, cresol, creosot, cresatin, cresanol; golongan N<sub>2</sub>; golongan logam berat seperti metaphen, merthiolate, mercurophen; golongan halogen seperti sodium hypochlorite, iodides, chlorhexidine; golongan *Quaternary ammonium compounds*; golongan asam lemak seperti asam propionat; dan golongan sulfonamid (Ambikathanaya, 2014).

### 2.4.1 Syarat Obat Sterilisasi Saluran Akar

Syarat-syarat ideal dari suatu obat sterilisasi saluran akar adalah harus efektif membasmi kuman dan jamur, tidak mengiritasi jaringan, stabil dalam

larutan, memiliki daya antibakteri yang cukup lama, tetap aktif meskipun terdapat darah dan serum, tidak terganggu dengan perbaikan jaringan periapikal, dan tidak merubah warna gigi (Ambikathanaya, 2014).

### **2.5 Chlorophenol Kamfer Menthol (ChKM)**

Salah satu medikamen saluran akar yang cukup efektif dan biasa digunakan dokter gigi dan mahasiswa profesi kedokteran gigi adalah *ChKM*. *ChKM* merupakan campuran dari 27% 4-chlorophenole, 71% kamfer resemik, dan 1,6% *levementhol*. *ChKM* merupakan antiseptik dan disinfektan yang baik untuk saluran akar. *ChKM* memiliki daya antibakteri yang lebih besar dibandingkan dengan disinfektan lainnya (Dammaschke *et al.*, 2013).

*ChKM* memiliki daya antibakteri berspektrum luas dan efektif terhadap jamur. Bahan utamanya, 4-chlorophenole mampu memusnahkan berbagai mikroorganisme di dalam saluran akar. Kamfer sebagai sarana pengencer dapat memperpanjang efek antimikroba serta mengurangi efek iritasi dari chlorophenole murni. Menthol dapat mengurangi sifat iritasi chlorophenol dan mengurangi rasa sakit (Surya, 2014).

Selain kelebihan yang dimilikinya, *ChKM* juga memiliki banyak kekurangan. Biokompatibilitas *ChKM* masih menjadi kontroversi karena bersifat toksik. *ChKM* mengurangi viabilitas sel fibroblas gingiva dan menginduksi destruksi DNA *double-strand* pada sel (Dammaschke *et al.*, 2013). *ChKM* mudah menguap sehingga dapat memicu rasa sakit pada pemakaian yang berlebihan. *ChKM* memiliki aroma dan rasa yang kurang menyenangkan sehingga pada beberapa pasien dapat merangsang muntah (Kharismayanti, 2015).

### **2.6 Cresophene**

*Cresophene* adalah salah satu bahan kedokteran gigi yang sering digunakan sebagai obat sterilisasi saluran akar. *Cresophene* mengandung *parachlorophenol* 30%, *dexamethasone* 1%, *thymol* 5%, dan *camphor* 64%. *Parachlorophenol* memiliki sifat bakterisid yang kuat; *dexamethasone* sebagai anti-inflamasi, sedangkan *thymol* dan *camphor* berfungsi sebagai antiseptik.

*Cresophene* juga sering digunakan sebagai sterilisasi pada kavitas yang dalam dan periodontitis apikalis (Anggono dan Kuswandari, 2017).

Meskipun *cresophene* diketahui efektif, tetap harus berhati-hati dalam penggunaannya. *Cresophene* tidak direkomendasikan pada penggunaan jangka panjang karena sitotoksitasnya, berpotensi sebagai teratogenik dan mutagenik, serta menginduksi respon imun berlebihan (Madarati *et al.*, 2017). Hasil penelitian terkini menunjukkan *cresophene* memiliki efek toksik yang relatif tinggi pada fibroblast. Kandungan dalam *cresophene* yang membawa sifat toksik ini diketahui dari *parachlorophenol* dan *thymol* (Gheorghiu *et al.*, 2014).

## 2.7 Temulawak

### 2.7.1 Morfologi dan Klasifikasi

Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) merupakan tanaman obat berupa tumbuhan rumpun berbatang semu. Di daerah Jawa Barat temulawak disebut sebagai koneng gede sedangkan di Madura disebut sebagai temu lobak. Kawasan Indo-Malaysia merupakan tempat dari mana temulawak ini menyebar ke seluruh dunia. Saat ini tanaman ini selain di Asia Tenggara dapat ditemui pula di Cina, India, Jepang, Korea, Amerika Serikat dan beberapa negara Eropa (Rukmana, 2006).

Temulawak merupakan tanaman berbatang semu dengan tinggi hingga lebih dari 100 cm tetapi kurang dari 200 cm. Tiap batang mempunyai daun 2-9 helai dengan bentuk bundar memanjang, warna daun hijau atau coklat keunguan terang sampai gelap (lihat Gambar 2.5). Panjang daun 31-84 cm dan lebar 10-18 cm. Tanaman ini juga memiliki tangkai dengan panjang 9-23 cm dan lebar 4-6 cm. Mahkota bunga berbentuk tabung dengan panjang keseluruhan 4.5 cm dan berkelompok 3-4 buah. Kelopak bunga berwarna putih berbulu dengan ujung yang berwarna merah atau merah, berbentuk bundar memanjang, panjang 8-13 mm (Rukmana, 2006; Hayani 2006).

Klasifikasi tanaman temulawak adalah sebagai berikut (Rukmana, 2006) :

Kingdom	: <i>Plantae</i>
Divisi	: <i>Spermatophyta</i>

Sub-divisi	: <i>Magnoliophyta</i>
Kelas	: <i>Monocotyledoneae</i>
Ordo	: <i>Zingiberales</i>
Famili	: <i>Zingiberaceae</i>
Genus	: <i>Curcuma</i>
Spesies	: <i>Curcuma xanthorriza</i> , Roxb



(a) Daun; (b) Tangkai; (c) Bunga; (d) Rimpang utama; (e) Anak Rimpang

Gambar 2.5 Temulawak (Sumber: [www.bibitbunga.com](http://www.bibitbunga.com) dan [www.tanobat.com](http://www.tanobat.com))

### 2.7.2 Lingkungan Tumbuh

Secara alami temulawak tumbuh dengan baik di lahan-lahan yang teduh dan terlindung dari teriknya sinar matahari. Tanaman ini tumbuh subur di bawah naungan pohon bambu atau jati. Namun demikian temulawak juga dapat dengan mudah ditemukan di tempat yang terik seperti tanah tegalan. Secara umum, tanaman ini memiliki daya adaptasi yang tinggi terhadap berbagai cuaca di daerah beriklim tropis. Suhu udara yang baik untuk budidaya tanaman ini antara 19-30°C. Tanaman ini memerlukan curah hujan tahunan antara 1.000-4.000 mm/tahun (Rukmana, 2006).

Temulawak dapat beradaptasi dengan baik pada berbagai jenis tanah baik tanah berkapur, berpasir, agak berpasir maupun tanah-tanah berat yang berliat. Namun demikian untuk memproduksi rimpang yang optimal diperlukan tanah yang subur, gembur dan berdrainase baik dengan demikian pemupukan anorganik dan organik diperlukan untuk memberi unsur hara yang cukup dan menjaga

struktur tanah agar tetap gembur. Tanah yang mengandung bahan organik diperlukan untuk menjaga agar tanah tidak mudah tergenang air (Rukmana, 2006).

Temulawak dapat tumbuh pada ketinggian tempat 5-1.000 m/dpl dengan ketinggian tempat optimum adalah 750 m/dpl. Kandungan pati tertinggi di dalam rimpang diperoleh pada tanaman yang ditanam pada ketinggian 240 m/dpl. Temulawak yang ditanam di dataran tinggi menghasilkan rimpang yang hanya mengandung sedikit minyak atsiri. Tanaman ini lebih cocok dikembangkan di dataran sedang (Rukmana, 2006).

### 2.7.3 Manfaat

Temulawak secara historis mempunyai kegunaan tradisional dan sosial cukup luas dikalangan masyarakat Indonesia. Di Indonesia, satu-satunya bagian yang dimanfaatkan dari temulawak adalah rimpangnya. Banyak kalangan yang mempromosikan temulawak sebagai tanaman obat khas Indonesia, yang sangat efektif untuk mengatasi gangguan liver, rematik, menghilangkan rasa sakit, antibakteri, antijamur, antidiabetik, antioksidan, anti-inflamasi, antikolesterol, antitumor, diuretic, depresi, dan meningkatkan nafsu makan (Rukmana, 2006; Hayani, 2006).

Rimpang temulawak juga sering digunakan dalam pengobatan tradisional di antaranya mengobati keputihan, obat jerawat, gatal-gatal, kejang-kejang, ambeien, dan diare (Sudarsono, 2004; Dermawaty, 2015). Rimpang temulawak juga diketahui bermanfaat untuk organ dalam manusia seperti empedu, hati dan pankreas (Dermawaty, 2015).

## 2.8 Ekstraksi Minyak Atsiri

Penyulingan (destilasi) merupakan metode ekstraksi minyak atsiri yang paling lazim dilakukan. Penyulingan adalah proses pemisahan komponen cairan atau padatan dari berbagai macam campuran berdasarkan titik uap atau perbedaan kecepatan menguap bahan. Metode penyulingan menggunakan alat berupa ketel suling. Ketel yang digunakan biasanya terbuat dari bahan kaca tahan panas atau

*stainless steel*. Metode yang paling umum digunakan yaitu penyulingan cara dikukus (*Water and Steam distillation*) (Rusli, 2011).

Bagian utama dari alat penyuling cara dikukus yaitu tungku api, ketel penyuling, kondensor (pendingin) dan penampung/pemisah minyak. Pada cara ini bahan diletakkan di atas rak-rak atau saringan berlobang. Bahan yang akan disuling berada pada jarak tertentu di atas permukaan air. Ketel suling diisi air sampai permukaan air berada tidak jauh dari saringan. Ciri khas metode ini adalah uap selalu dalam keadaan basah, jenuh dan tidak terlalu panas, dan bahan yang disuling hanya berhubungan dengan uap dan tidak dengan air panas (Sahwalita dan Herdiana, 2015).

Metode penyulingan ini cocok untuk bahan-bahan berupa rumput, biji, dan daun-daunan. Metode ini lebih unggul bila dibandingkan dengan cara direbus karena proses dekomposisi minyak (hidrolisa ester, polimerisasi, dan resinifikasi) lebih kecil. Selain itu, lebih efisien karena jumlah bahan bakar lebih sedikit, waktu penyulingan lebih singkat, dan rendemen minyak atsiri yang dihasilkan lebih tinggi (Kharismayanti, 2015).

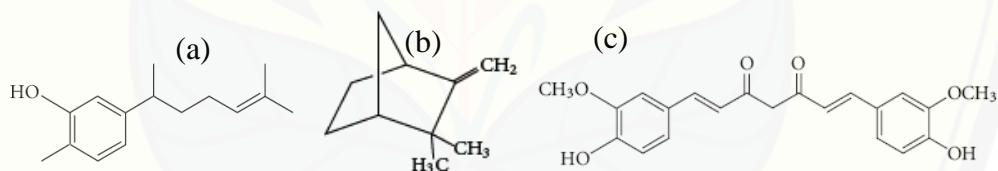
## **2.9 Kandungan Minyak Atsiri Temulawak**

Minyak atsiri adalah zat berbau yang terkandung dalam tanaman. Minyak ini disebut juga minyak menguap, minyak eteris, atau minyak esensial. Peranan paling utama dari minyak atsiri terhadap tumbuhan itu sendiri adalah sebagai pengusir serangga dan hewan pemakan daun lainnya sehingga bunga dan daun tidak rusak. Namun, sebaliknya minyak atsiri juga berfungsi sebagai penarik serangga guna membantu penyerbukan (Gunawan dan Mulyani, 2010).

Minyak atsiri dalam keadaan segar dan murni umumnya tidak berwarna, namun pada penyimpanan yang lama minyak atsiri dapat teroksidasi dan membentuk resin serta warnanya berubah menjadi lebih gelap. Minyak atsiri harus terlindungi dari pengaruh cahaya dengan menyimpannya dalam botol kaca berwarna gelap. Botol tersebut diisi sepenuh mungkin sehingga tidak memungkinkan berhubungan langsung dengan udara, ditutup rapat, serta disimpan di tempat yang dingin dan sejuk (Gunawan dan Mulyani, 2010).

Minyak atsiri terbagi ke dalam 3 kelompok besar sesuai susunan kimianya, yaitu terpena, terpenoid, dan fenilpropana. Terpena merupakan rantai hidrokarbon yang terbentuk dari kombinasi beberapa unit isopren ( $C_5H_8$ ). Terpena yang paling umum ditemukan yaitu monoterpen ( $C_{10}H_{16}$ ) dan sesquiterpen ( $C_{15}H_{24}$ ). Rantai yang lebih panjang jarang ditemukan, seperti diterpen ( $C_{20}H_{32}$ ) dan triterpen ( $C_{30}H_{40}$ ). Terpenoid merupakan terpena yang telah tersubstitusi molekul oksigen atau terpena yang telah kehilangan gugus metil. Fenilpropana merupakan senyawa yang mengandung suatu gugus fenol aromatik dengan 6 karbon dan suatu rantai propana dengan 3 karbon. (Nazzaro *et al.*, 2013)

Kadar minyak atsiri rimpang temulawak adalah sekitar 4-6% (Setyawan, 2003). Analisis dengan *Gas Chromatography-Mass Spectroscopy* (GCMS), ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak mengandung senyawa xanthorrhizol (64,38%), camphene (8,27%), curcumin (5,85%) (lihat Gambar 2.6),  $\alpha$ -Pinene (1,93%),  $\alpha$ -Thujenen (0,16%),  $\beta$ -Pinene (0,14%), myrcene (0,37%), linalool (0,27%) dan zingiberene (0,10%). Terpena merupakan kelompok terbanyak yang ditemukan dalam minyak atsiri rimpang temulawak (Jeeva *et al.*, 2012).



(a) Xanthorrhizol; (b) Camphene; (c) Curcumin

Gambar 2.6 Rantai kimia terpena (Sumber: Jantan *et al.*, 2012; Quintans-Junior *et al.*, 2012)

Secara umum, aktivitas kerja minyak atsiri dalam menghambat atau membunuh bakteri yaitu dengan cara mempengaruhi membran sel dan sitoplasma. Ketidakmampuan bakteri melepas minyak atsiri dari permukaan terluar sel mengakibatkan kerusakan struktur bakteri. Kerusakan ini akan meningkatkan permeabilitas sel dan tekanan turgor. Peningkatan permeabilitas sel dan tekanan intraseluler memicu kerusakan sitoplasma dan lisisnya sel bakteri (Nazzaro *et al.*, 2013).

Xanthorrhizol merupakan senyawa aktif terbesar penyusun minyak atsiri rimpang temulawak (Jeeva *et al.*, 2012). Xanthorrhizol hanya dapat ditemukan pada temulawak dan kunyit. Namun, pada kunyit jumlahnya sedikit. Xanthorrhizol memiliki keunggulan dapat tetap bekerja stabil sebagai agen antibakteri pada suhu tinggi dan pH asam maupun basa. Xanthorrhizol bekerja dengan mengganggu pembentukan biofilm dari bakteri-bakteri rongga mulut (Lee *et al.*, 2008). Rukayadi dan Hwang (2006) melaporkan bahwa xanthorrhizol memiliki daya antibakteri yang kuat pada bakteri *Streptococcus mutans*.

Terpena lain seperti camphene, juga merupakan kelompok terbanyak yang ditemukan dalam minyak atsiri rimpang temulawak (Jeeva *et al.*, 2012). Aktivitas antibakteri terpena diduga melibatkan pemecahan membran sel bakteri oleh komponen-komponen lipofilik. Senyawa terpena bekerja dengan merusak porin (protein transmembran) pada bakteri sehingga pertumbuhan bakteri terhambat atau mati (Kharismayanti, 2015).

Curcumin (*diferuloylmethane*) merupakan senyawa polifenol yang memberikan warna kuning pada spesies *Curcuma*. Curcumin diketahui memiliki daya antibakteri, antijamur, antidiabetik, antitumor, anti-inflamasi, dan antioksidan. Curcumin sebagai antibakteri dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif dan Gram negatif. Aktivitas antibakteri curcumin diduga melibatkan kerusakan pada dinding dan membran sel sehingga memicu lisisnya sel bakteri. Curcumin juga diduga mengganggu pembentukan protein sehingga menghambat proliferasi sel bakteri (Teow *et al.*, 2016).

Terpena, curcumin, maupun senyawa aktif lainnya bekerja secara sinergis untuk menghasilkan daya antibakteri yang baik. Terpena dilaporkan kurang efektif apabila bekerja hanya sebagai senyawa tunggal. Oleh karena itu, keberadaan senyawa aktif lainnya dapat mempengaruhi daya antibakteri dari minyak atsiri (Nazzaro *et al.*, 2013). Hal ini yang mungkin menjadi alasan mengapa, pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Prabuseenivasan *et al.* (2006) dan Jantan *et al.* (2012), semakin besar konsentrasi minyak atsiri yang digunakan, semakin besar daya antibakterinya terhadap pertumbuhan bakteri patogen.



Beberapa penelitian terdahulu telah dilakukan untuk mengetahui aktivitas antibakteri rimpang temulawak. Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak menunjukkan aktivitas antibakteri terhadap beberapa bakteri patogen pada manusia antara lain *Escherichia coli* dan *Bacillus amyloliquefaciens* dengan zona hambat 14 mm, *Klebsiella pneumoniae* (12 mm), *Shigella sonnei* (11 mm), *Enterobacter aerogens* (10 mm), *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhi*, dan *Xanthomonas campestris* masing-masing 9 mm, *Staphylococcus aureus* (8 mm), *Bacillus megaterium* (7 mm) (Jeeva *et al.*, 2012).

Daya antibakteri minyak atsiri rimpang temulawak dapat diklasifikasikan berdasarkan diameter zona hambatnya. Klasifikasi tingkat daya antibakteri oleh Ponce *et al.* (2003) membagi daya antibakteri menjadi 4 tingkatan, yaitu lemah (< 8 mm), sedang (8-14 mm), kuat (15-19 mm), dan sangat kuat (> 20 mm). Berdasarkan klasifikasi oleh Ponce *et al.* (2003), hasil penelitian yang telah dilakukan oleh Jeeva *et al.* (2012) bahwa ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak memiliki daya antibakteri dengan tingkatan sedang pada sebagian besar bakteri yang diteliti.

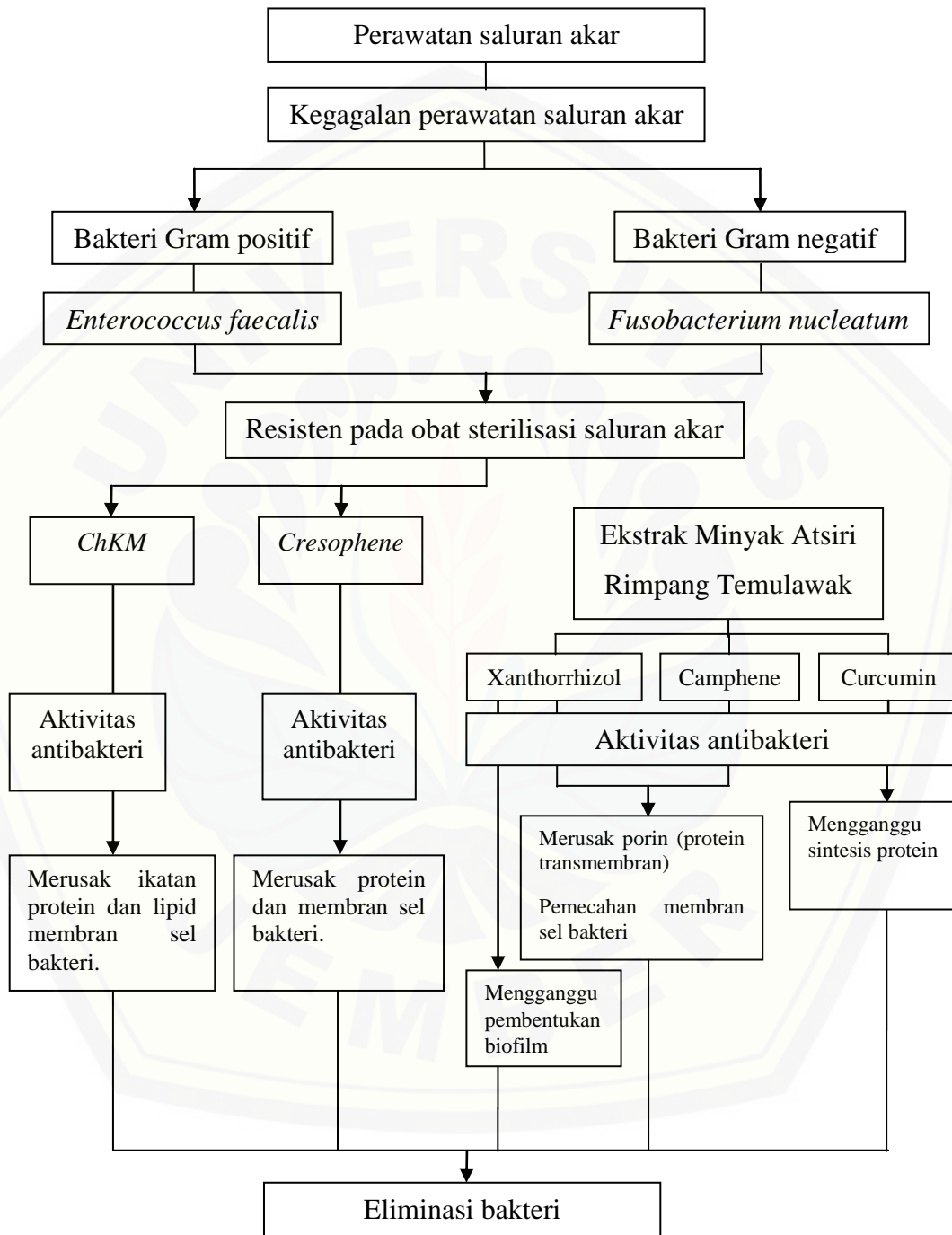
## 2.10 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini, yaitu:

- a. Jika ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak (*C. xanthorrhiza* Roxb.) dalam penelitian ini mengandung xanthorrhizol, camphene, dan curcumin, maka ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak memiliki daya antibakteri terhadap pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum*.
- b. Jika kandungan ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak (*C. xanthorrhiza* Roxb.) serupa dengan kandungan ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak pada penelitian sebelumnya, maka tingkat daya antibakterinya terhadap pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum* tergolong sedang.

## 2.11 Kerangka Konseptual

Kerangka konseptual penelitian ini dapat dilihat dalam Gambar 2.7 berikut:



Gambar 2.7 Kerangka konseptual penelitian

## BAB 3. METODOLOGI PENELITIAN

### 3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini adalah eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan ialah *the post test only control group design*, yaitu pengujian dilakukan setelah perlakuan (Notoatmodjo, 2010).

### 3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

#### 3.2.1 Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Oktober-Desember 2017.

#### 3.2.2 Tempat Penelitian

- a. Pengambilan minyak atsiri rimpang temulawak dengan cara destilasi uap air dilakukan di Laboratorium Mesin dan Alat Pertanian, Politeknik Negeri Jember.
- b. Penelitian daya antibakteri minyak atsiri rimpang temulawak terhadap *E. faecalis* dan *F. nucleatum* dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.

### 3.3 Variabel Penelitian

#### 3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dari penelitian ini adalah ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%.

#### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dari penelitian ini adalah hambatan pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum*.

### 3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah media biakan bakteri, suspensi *E. faecalis* dan *F. nucleatum*, suhu dan durasi inkubasi, alat ukur (jangka sorong digital).

## 3.4 Definisi Operasional

### 3.4.1 Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%

Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak merupakan minyak atsiri yang diperoleh dari proses destilasi dengan cara dikukus (*Water and Steam distillation*) dari rimpang temulawak yang konsentrasi 100% kemudian diencerkan untuk mendapatkan konsentrasi 25%, 50% dan 75%.

### 3.4.2 Hambatan pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum*

Hambatan pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum* adalah gangguan pertumbuhan bakteri pada media kultur agar yang dapat diukur melalui diameter zona hambat. Diameter zona hambat diukur dari tepi (*break point*) ke tepi (*break point*) zona hambat yang berseberangan melewati pusat kertas cakram. Jika terlihat adanya diameter zona hambat yang tidak umum, seperti zona hambat ganda, maka yang dilakukan pengukuran adalah zona yang lebih dalam yang terlihat lebih jernih. Jika tidak terdapat zona hambat di sekitar kertas cakram, maka nilai diameter zona hambat dikatakan 0,00 mm (Hudzicki, 2009).

### 3.4.3 Media biakan bakteri

Media biakan bakteri adalah media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri. Media biakan yang digunakan dalam penelitian ini adalah dalam bentuk padat yaitu *Mueller-Hinton Agar* dengan ketebalan media yaitu 4 mm.

#### 3.4.4 Suspensi *E. faecalis* dan *F. nucleatum*

Suspensi *E. faecalis* dan *F. nucleatum* merupakan sediaan cair yang mengandung bakteri *E. faecalis* dan *F. nucleatum* yang disesuaikan dengan standar McFarland 0,5.

#### 3.4.5 Suhu dan durasi inkubasi

Suhu dan durasi inkubasi ialah temperatur dan lamanya waktu yang digunakan dalam memelihara kultur bakteri untuk memantau pertumbuhan bakteri yaitu 37°C selama 24 jam.

#### 3.4.6 Alat ukur

Alat ukur merupakan alat yang digunakan untuk menentukan besaran obyek pengukuran. Alat ukur yang digunakan yaitu jangka sorong digital dengan ketelitian 0,01 mm.

### 3.5 Sampel Penelitian

#### 3.5.1 Pengelompokan Sampel

Sampel yang digunakan akan dibagi menjadi 7 kelompok, yaitu:

- a. Kelompok K(-) : kontrol negatif (Larutan Dimetil Sulfoksida (DMSO) 10% + Tween 80 0,5%)
- b. Kelompok K(+) : kontrol positif (*Chlorophenol Kamfer Menthol* (*ChKM*))
- c. Kelompok K(++) : kontrol positif (*Chresophene*)
- d. Kelompok RT25 : minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 25%
- e. Kelompok RT50 : minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 50%
- f. Kelompok RT75 : minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 75%
- g. Kelompok RT100 : minyak atsiri rimpang temulawak konsentrasi 100%

### 3.5.2 Jumlah Sampel

Jumlah sampel yang digunakan pada penelitian dihitung menggunakan rumus penghitungan jumlah sampel sebagai berikut (Federer dalam Kharismayanti, 2015):

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

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

$$(7 - 1) (n - 1) \geq 15$$

$$6 (n - 1) \geq 15$$

$$(n - 1) \geq \frac{15}{6}$$

$$(n - 1) \geq 2,5$$

$$n \geq 3,5$$

Keterangan :

t : jumlah perlakuan

n : jumlah sampel

Berdasarkan hasil penghitungan menggunakan rumus di atas, jumlah sampel (pengulangan) minimal yang dapat digunakan yaitu 3,5. Pada penelitian ini, peneliti menggunakan 4 sampel (pengulangan) untuk setiap kelompok. Kelompok yang digunakan adalah sebanyak 7 kelompok.

### 3.5.3 Kriteria Sampel

Sampel rimpang temulawak yang digunakan pada penelitian ini adalah keseluruhan bagian rimpang, baik rimpang utama maupun cabang-cabang rimpang. Rimpang temulawak dipanen pada usia sekitar 6-8 bulan dari ladang seorang petani di Desa Tandon Sentul, Kecamatan Lumbang, Kabupaten Probolinggo. Lokasi panen tersebut secara geografis berada pada ketinggian 500-700 m/dpl.

## 3.6 Alat dan Bahan Penelitian

### 3.6.1 Alat Penelitian

Alat yang dipakai pada penelitian ini adalah :

- a. *Petridish* tidak bersekat dengan diameter 150 mm.

- b. Ose
- c. Tabung erlenmeyer
- d. Bunsen
- e. Tabung reaksi
- f. Gelas ukur
- g. Jangka sorong digital
- h. *Thermolyne*
- i. Mikropipet
- j. *Disposable syringe*
- k. Spektrofotometer
- l. Timbangan digital
- m. *Laminar flow*
- n. Inkubator
- o. Kompor
- p. Autoklaf
- q. *Oven*
- r. Desikator
- s. Satu set alat destilasi uap meliputi tabung destilasi, kondensator, dan tabung pendingin balik
- t. Kertas label
- u. Spidol
- v. *Object glass* dan *deck glass*
- w. Mikroskop
- x. Spatula
- y. Pinset steril

### 3.6.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- a. Kultur murni *E. faecalis* dan *F. nucleatum*
- b. Dimetil sulfoksida (DMSO)
- c. Tween 80

- d. *ChKM* (Camphenol, India)
- e. *Cresophene* (Septodont, France)
- f. MH-A (*Mueller-Hinton Agar*)
- g. MH-B (*Mueller-Hinton Broth*)
- h. Akuades steril
- i. Larutan *saline*
- j. Alkohol 70%
- k. Minyak atsiri rimpang temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.)
- l. Kertas cakram (*paper disk*) diameter 5 mm
- m. *Swab* steril
- n. Bahan pewarnaan Gram meliputi *Crystal Violet*, *Iodine*, *Decolorizer Solution*, dan *Safranin*
- o. Kertas penyerap
- p. Minyak imersi
- q. Kapas

### 3.7 Prosedur Penelitian

#### 3.7.1 Tahap Persiapan

##### a. Sterilisasi alat

Semua alat yang terbuat dari kaca, seperti *petridish*, tabung erlenmeyer, tabung reaksi, dan lain-lain disterilkan dengan *oven* pada suhu 160°C selama 60 menit, sedangkan alat yang terbuat dari plastik dicuci bersih dan dikeringkan lalu diulas alkohol 70% (Torabinejad dan Walton, 2009).

##### b. Identifikasi bakteri

Proses identifikasi bakteri dilakukan dengan metode pewarnaan Gram sebagai berikut (G-Biosciences, 2012):

- 1) Ambil satu ose spesimen bakteri, lalu letakkan pada *object glass*.
- 2) Lewatkan di atas api bunsen 10-20 kali. Pastikan *object glass* tidak terlalu panas.
- 3) Tetesi seluruh permukaan spesimen dengan zat warna *Crystal Violet*, tunggu selama 1 menit.



- 4) Bilas *object glass* di bawah air mengalir selama 5 detik.
- 5) Selanjutnya, tetesi spesimen dengan cairan *Iodine* dan ditunggu selama 1 menit.
- 6) Bilas *object glass* di bawah air mengalir lambat selama 5 detik.
- 7) Lalu tetesi *Decolorizer Solution* sampai warna biru-violet tidak lagi terlihat pada spesimen.
- 8) Bilas *object glass* di bawah air mengalir lambat selama 5 detik.
- 9) Terakhir, tetesi spesimen dengan *Safranin* dan ditunggu selama 1 menit.
- 10) Bilas *object glass* di bawah air mengalir lambat selama 5 detik.
- 11) Selipkan kertas penyerap agar sisa air pada *object glass* terbuang.
- 12) *Object glass* yang sudah kering kemudian ditutup dengan *deck glass*, lalu ditetesi minyak imersi untuk dilakukan pengamatan di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Sel bakteri *E. faecalis* secara mikroskopis berbentuk kokus bulat atau ovoid, berwarna keunguan, menunjukkan bakteri tersebut Gram positif. Sel bakteri *F. nucleatum* secara mikroskopis berbentuk batang dengan kedua ujung yang runcing, berwarna merah, menunjukkan bakteri tersebut Gram negatif.

c. Proses destilasi uap air minyak atsiri rimpang temulawak

Proses pengambilan minyak atsiri rimpang temulawak dilakukan dengan metode destilasi uap air sebagai berikut (Sahwalita dan Herdiana, 2015):

- 1) Rimpang temulawak dipotong-potong dengan ketebalan 1-2 mm, ditimbang sebanyak 5 kg (lihat Gambar 3.1).



Gambar 3.1 Rimpang temulawak yang telah dipotong dengan ketebalan 1-2 mm

- 2) Tabung destilasi diisi air sebanyak 6 liter.
- 3) Rimpang temulawak diletakkan di atas saringan berlubang dalam tabung destilasi yang telah berisi air.
- 4) Tabung destilasi ditutup rapat untuk menghindari kebocoran.
- 5) Tabung destilasi dihubungkan dengan kondensor dan tabung pendingin balik. Pendingin balik dialiri air kran secara terus menerus sampai destilasi selesai (lihat Gambar 3.2).



(a) Kondensor; (b) Tabung destilasi; (c) Tabung pendingin

Gambar 3.2 Alat destilasi uap air

- 6) Kompor gas dihubungkan ke tabung destilasi, dihidupkan, lalu diatur besar kecilnya api pemanasan.
- 7) Pemanasan berjalan sekitar 5 jam dengan suhu air  $100^{\circ}\text{C}$ . Pemanasan akan membuat air dan minyak atsiri dalam rimpang temulawak menguap, namun segera mengalami kondensasi di dalam tabung pendingin.
- 8) Selanjutnya, minyak atsiri dan air dipisahkan dengan corong pisah (lihat Gambar 3.3).



Gambar 3.3 Corong pemisah minyak atsiri dan air

- 9) Minyak yang diperoleh ditempatkan dalam botol gelap yang tertutup rapat kemudian disimpan dalam lemari es.

d. Pembuatan kontrol negatif

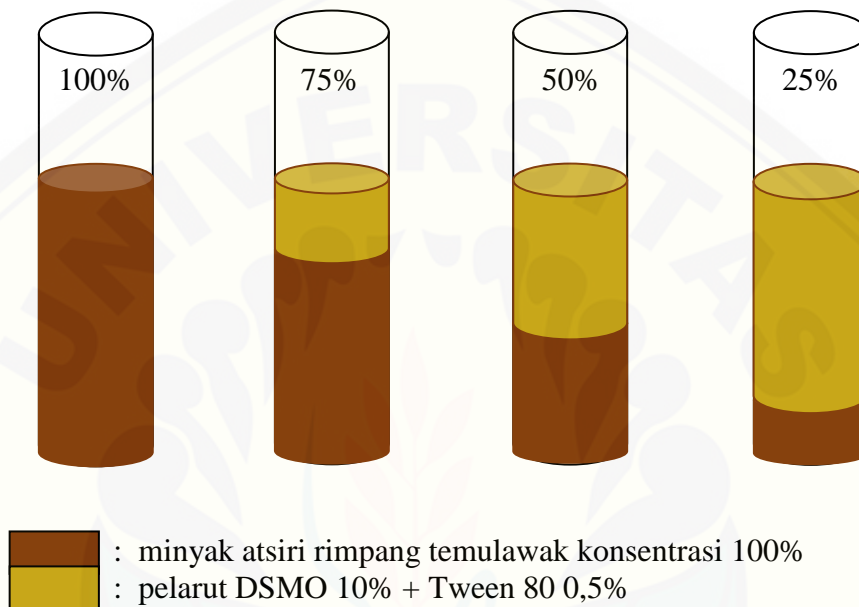
Kontrol negatif yang dipakai pada penelitian adalah larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5% tidak mempunyai aktivitas antibakteri, ditandai dengan tidak ada zona hambat di sekeliling kertas cakram (Prabuseenivasan *et al.*, 2006).

e. Pengenceran minyak atsiri rimpang temulawak

Pengenceran minyak atsiri rimpang temulawak dilakukan dengan larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5% (Prabuseenivasan *et al.*, 2006). Pengenceran dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi yang diinginkan yaitu 25%, 50% dan 75% (lihat Gambar 3.4). Pengenceran minyak atsiri rimpang temulawak dilakukan dengan metode sebagai berikut:

- 1) Ambil minyak atsiri konsentrasi 100% sebanyak 500  $\mu$ l dengan mikropipet, masukkan ke tabung reaksi 1.
- 2) Minyak atsiri konsentrasi 75% dibuat dengan mencampurkan 375  $\mu$ l minyak atsiri konsentrasi 100% dengan 125  $\mu$ l pelarut DMSO 10% + Tween 80 0,5%, lalu masukkan ke tabung reaksi 2.
- 3) Minyak atsiri konsentrasi 50% dibuat dengan mencampurkan 250  $\mu$ l minyak atsiri konsentrasi 100% dengan 250  $\mu$ l pelarut DMSO 10% + Tween 80 0,5%, lalu masukkan ke tabung reaksi 3.

- 4) Minyak atsiri konsentrasi 25% dibuat dengan mencampurkan 125  $\mu$ l minyak atsiri konsentrasi 100% dengan 375  $\mu$ l pelarut DMSO 10% + Tween 80 0,5%, lalu masukkan ke tabung reaksi 4.
- 5) Setiap tabung dikocok dengan menggunakan *thermolyne* agar minyak atsiri dan pengencernya dapat tercampur dengan homogen.



Gambar 3.4 Ilustrasi pengenceran minyak atsiri rimpang temulawak

f. Persiapan media MH-B

MH-B merupakan media penyubur dalam bentuk cair untuk pertumbuhan bakteri yang digunakan dalam pembuatan suspensi. Pembuatan MH-B disesuaikan dengan takaran pabrik pada kemasannya, yaitu sebagai berikut:

- 1) Timbang 2,1 gram bubuk MH-B menggunakan neraca.
- 2) Ukur akuades steril sebanyak 100 ml dengan gelas ukur.
- 3) Masukkan MH-B dan akuades steril kedalam tabung erlenmeyer dan diaduk dengan spatula.
- 4) Panaskan di atas kompor hingga mendidih dan homogen.
- 5) Setelah itu, tutup tabung erlenmeyer dengan kapas dan sterilkan di dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.

g. Pembuatan suspensi *E. faecalis* dan *F. nucleatum*

Pembuatan suspensi sesuai dengan protokol standar dari NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), yaitu sebagai berikut:

- 1) Siapkan 2 buah tabung reaksi.
- 2) Ukur sebanyak 2 ml MH-B, lalu masukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi.
- 3) Ambil 1 ose biakan bakteri, celupkan ke dalam MH-B.
- 4) Masukkan tabung reaksi ke dalam desikator.
- 5) Masukkan desikator ke dalam inkubator, lalu inkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam.
- 6) Kemudian vibrasi menggunakan *thermolyne*.
- 7) Ukur absorbansinya dengan alat spektrofotometer.
- 8) Ambil pelarut *saline* sebanyak 4 ml untuk masing-masing bakteri dengan menggunakan *syringe*, masukkan ke dalam tabung reaksi.
- 9) Ambil suspensi bakteri dengan menggunakan *syringe* 0,3 ml, lalu masukkan beberapa tetes suspensi ke dalam tabung reaksi yang telah terdapat larutan *saline*.
- 10) Sesuaikan kekeruhan suspensinya hingga sesuai standar McFarland 0,5 (lihat Gambar 3.5).



Gambar 3.5 Perbandingan suspensi dengan standar McFarland 0,5 dan suspensi asli dari bakteri

- 11) Apabila suspensi terlalu keruh, tambahkan larutan *saline*, dan apabila suspensi terlalu jernih, tambahkan beberapa tetes suspensi bakteri kembali.

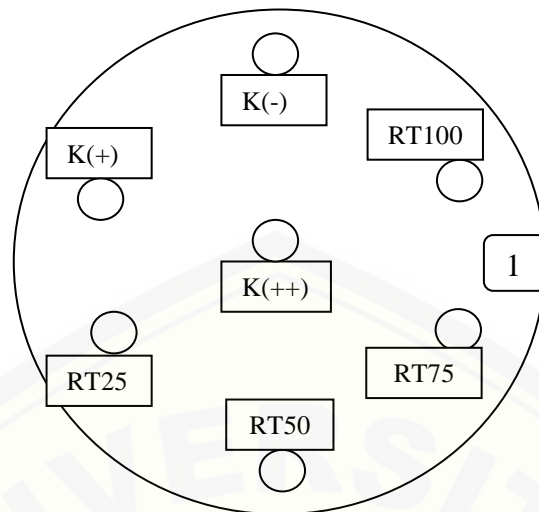
h. Pembuatan media MH-A

Pembuatan MH-A disesuaikan dengan takaran pabrik pada kemasannya, yaitu sebagai berikut:

- 1) Timbang 3,8 gram bubuk MH-A menggunakan neraca.
- 2) Ukur akuades steril sebanyak 100 ml dengan gelas ukur.
- 3) Masukkan MH-A dan akuades steril ke dalam tabung erlenmeyer dan diaduk dengan spatula.
- 4) Panaskan di atas kompor hingga mendidih dan homogen.
- 5) Setelah itu, tutup tabung erlenmeyer dengan kapas dan sterilkan di dalam *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.

i. Pemberian label pada bagian bawah *petridish*

- 1) Siapkan sebanyak 8 buah *petridish* ukuran 15 cm.
- 2) Tempelkan kertas label yang telah diberi nomor 1-8 di tepi *petridish*. Nomor 1-4 merupakan *petridish* untuk media biakan *E. faecalis* dan nomor 5-8 merupakan *petridish* untuk media biakan *F. nucleatum*.
- 3) Buat kertas label untuk setiap kelompok sampel. Label K(-) untuk kontrol negatif larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%, K(+) untuk *ChKM*, K(++) untuk *Cresophene*, RT25 untuk konsentrasi minyak atsiri 25%, RT50 untuk konsentrasi minyak atsiri 50%, RT75 untuk konsentrasi minyak atsiri 75%, RT100 untuk konsentrasi minyak atsiri 100%.
- 4) Tempelkan kertas label tersebut pada tempat yang akan diletakkan kertas cakram yang telah diberi bahan perlakuan sesuai kelompok sampel (lihat Gambar 3.6).



1	: Penomoran <i>petridish</i>
K(-)	: Kertas label untuk larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%
K(+)	: Kertas label untuk <i>ChKM</i>
K(++)	: Kertas label untuk <i>Cresophene</i>
RT25	: Kertas label untuk minyak atsiri rimpang temulawak 25%
RT50	: Kertas label untuk minyak atsiri rimpang temulawak 50%
RT75	: Kertas label untuk minyak atsiri rimpang temulawak 75%
RT100	: Kertas label untuk minyak atsiri rimpang temulawak 100%
○	: Kertas cakram

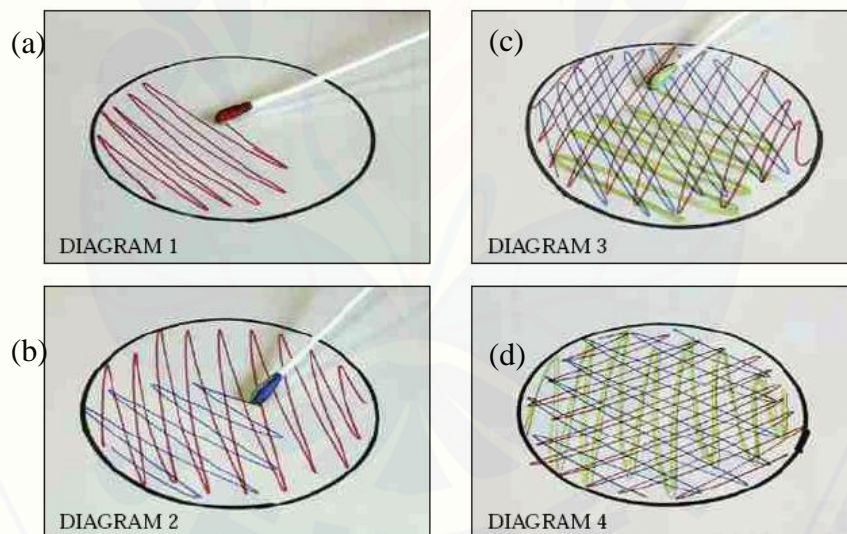
Gambar 3.6 Skema pembagian daerah pada *petridish*

### 3.7.2 Tahap Perlakuan

Tahap perlakuan uji antibakteri dilakukan sesuai protokol standar NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) yang dimodifikasi. Setiap perlakuan ini dilakukan di dalam *laminar flow* untuk mencegah kontaminasi dengan lingkungan luar.

- Media MH-A yang masih hangat pada suhu 45-50°C dituangkan ke dalam setiap *petridish* hingga mencapai ketebalan 4 mm
- Petridish* dibiarkan dalam suhu ruang dengan tutup *petridish* terbuka sedikit, ditunggu sampai memadat dan dingin sekitar 10-30 menit.

- c. Persiapan inokulasi bakteri *E. faecalis* dan *F. nucleatum* pada media agar dengan *swab* steril.
- d. Ambil sebanyak 1 ml suspensi bakteri dengan menggunakan *syringe*.
- e. Teteskan pada *swab* steril perlahan-lahan hingga merata dan tidak ada yang menetes.
- f. Menginokulasikan dengan gerakan *streaking* (lihat Gambar 3.7) pada seluruh permukaan media.
- g. Gerakan *streaking* diulang sebanyak 3 kali dan *petridish* diputar sekitar  $60^\circ$  pada setiap pengulangan.
- h. Ulangi meneteskan suspensi pada *swab* steril hingga tepat 1 ml.
- i. Lalu, tahap terakhir *streaking*, *swab* diusapkan mengililingi tepi media agar.
- j. Tunggu hingga permukaan media kering. Tutup *petridish* dapat dibiarkan terbuka selama 3-5 menit, tapi tidak lebih dari 15 menit.



(a) Gerakan *streaking* pertama (b) Gerakan *streaking* kedua, setelah diputar  $60^\circ$  (c) Gerakan *streaking* ketiga, setelah diputar  $60^\circ$  kedua kalinya (d) gambaran hasil *streaking*

Gambar 3.7 Ilustrasi gerakan *streaking* (Sumber: Sarina dan Knoll, 2002)

- k. Tetesi kertas cakram sebanyak  $20 \mu\text{L}$  ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak dengan konsentrasi 25%, 50%, 75%, dan 100%, kontrol positif *ChKM* dan *Cresophene*, dan kontrol negatif larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5% dengan menggunakan mikropipet.



- l. Letakkan kertas cakram pada permukaan media dengan menggunakan pinset steril.
- m. Kertas cakram harus diletakkan secara merata sehingga tidak lebih dekat dari 24 mm dari pusat cakram ke pusat cakram lainnya.
- n. Kertas cakram yang diperkirakan memberikan zona hambat kecil sebaiknya diletakkan di samping kertas cakram yang memberikan zona hambat lebih besar untuk menghindari zona yang tumpang tindih (*overlapping*).
- o. *Petridish* ditutup, kemudian dimasukkan dengan posisi dibalik ke dalam desikator untuk menciptakan kondisi anaerob.
- p. Masukkan desikator ke dalam inkubator untuk diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.

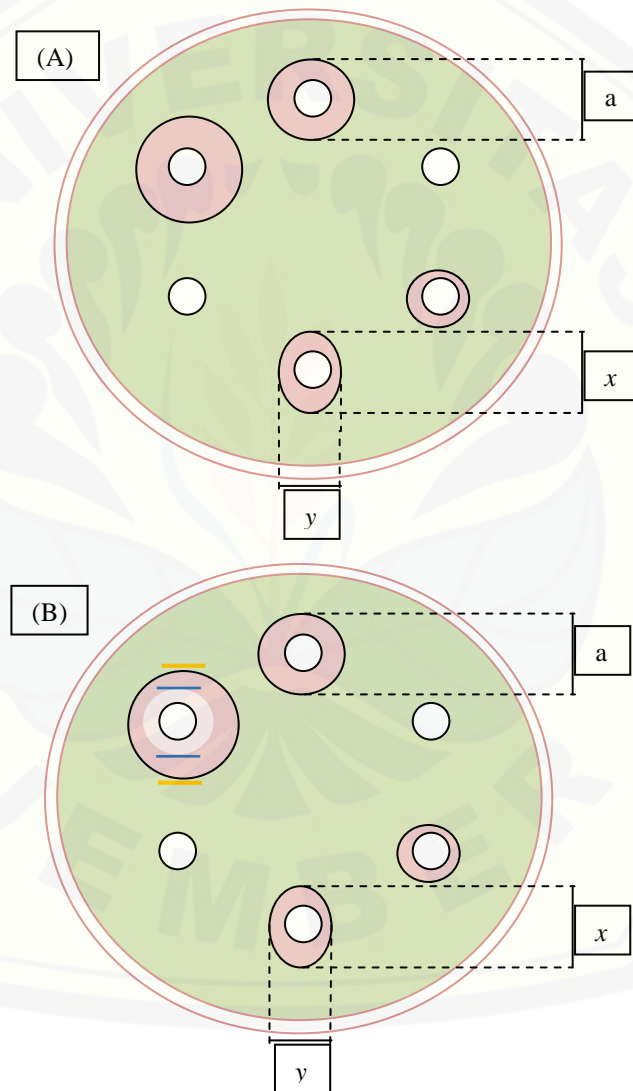
### 3.7.3 Tahap Pengukuran

Pengukuran dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat yaitu daerah jernih di sekitar kertas cakram. Zona hambat yang terbentuk bisa berupa zona hambat tunggal dan zona hambat ganda (*double inhibition zone*). Zona hambat tunggal merupakan zona hambat yang hanya tampak satu daerah jernih di sekitar kertas cakram, sedangkan zona hambat ganda merupakan zona hambat yang tampak memiliki 2 zona jernih yang berbeda, dimana akan terdapat satu zona yang tampak lebih jernih yaitu zona hambat yang berada di sebelah dalam (lihat Gambar 3.8 (b)).

Pengukuran diameter zona hambat dilakukan dengan menggunakan jangka sorong digital dalam satuan milimeter, dari satu sisi ke sisi lainnya yang bersebrangan melewati tepat di pusat kertas cakram (lihat Gambar 3.8 (a)). Pada zona hambat ganda, yang dilakukan pengukuran adalah zona yang terlihat lebih jernih, yaitu zona hambat yang berada di sebelah dalam (lihat Gambar 3.8 (b)). Pengukuran diameter zona hambat yang lebih jernih ini juga dilakukan dengan menggunakan jangka sorong digital, diukur dari satu sisi ke sisi lainnya yang bersebrangan melewati tepat di pusat kertas cakram (NCCLS, 2006).

Zona hambat dapat berbentuk lingkaran atau *elips*. Jika zona hambat berbentuk lingkaran, pengukuran langsung dilakukan dengan mengukur diameter

dari zona hambat. Jika zona hambat berbentuk *elips*, pengukuran dilakukan pada diameter terpanjang (misal  $x$  mm) dan diameter terpendek (misal  $y$  mm), kemudian keduanya dijumlahkan dan dibagi dua. Jadi, diameter zona hambatnya  $= \frac{x+y}{2}$  (Papagianni *et al.*, 2006). Jika tidak terlihat adanya zona hambat, maka diameter zona hambat dikatakan 0 mm (Hudzicki, 2009). Pengukuran dilakukan oleh 3 orang pengamat yang berbeda, yang sebelumnya telah dijelaskan cara pengukurannya, lalu diambil rata-rata (Joshi *et al.*, 2009).



(A) Pengukuran zona hambat tunggal; (B) Pengukuran zona hambat ganda

Pengukuran diameter zona hambat berbentuk lingkaran (a); Pengukuran diameter zona hambat berbentuk *elips* dengan ( $x$ ) diameter terpanjang dan ( $y$ ) diameter terpendek

Gambar 3.8 Ilustrasi pengukuran diameter zona hambat

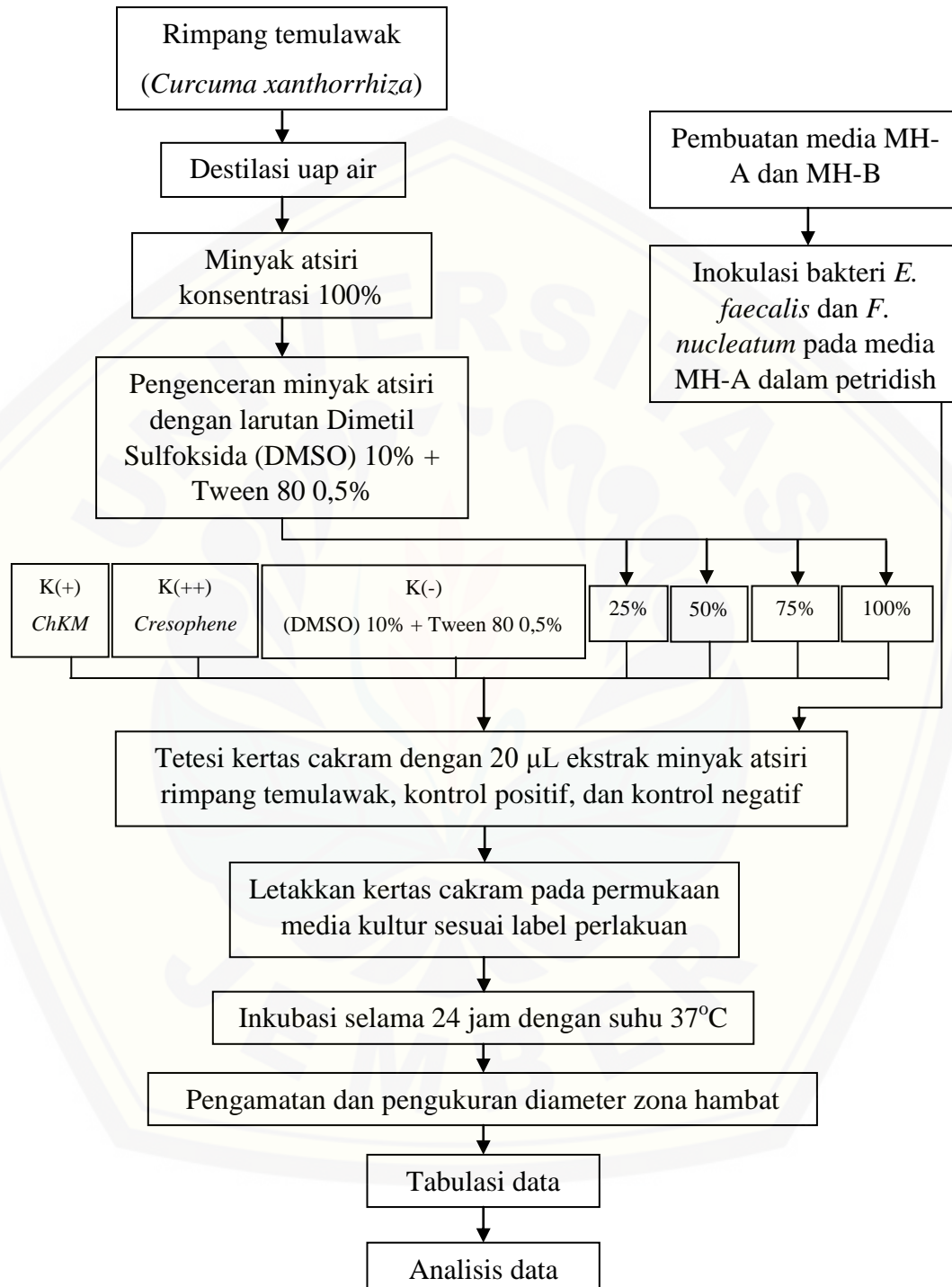
### 3.8 Analisis Data

Data yang terkumpul disusun dalam bentuk tabel, lalu dianalisis menggunakan program *Statistical and Service Solutions* (SPSS). Data hasil penelitian dilakukan uji normalitas dengan uji *Shapiro Wilk* dan uji homogenitas dengan uji *Levene*. Hasil analisis data menunjukkan bahwa data tidak homogen pada kedua bakteri, sehingga analisis data dilanjutkan menggunakan uji statistik non parametrik. *Kruskal Wallis*, kemudian dilanjutkan dengan uji statistik *Mann Whitney*.



### 3.9 Alur Penelitian

Alur penelitian ini dapat dilihat dalam Gambar 3.9 berikut:



Gambar 3.9 Alur penelitian daya antibakteri ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak terhadap pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum*

## BAB 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa:

- a. Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak (*C. xanthorrhiza* Roxb.) memiliki daya antibakteri terhadap pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum*.
- b. Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak (*C. xanthorrhiza* Roxb.) memiliki daya antibakteri dengan tingkatan sedang terhadap pertumbuhan *E. faecalis* dan *F. nucleatum*.

### 5.2 Saran

Saran yang dapat peneliti sampaikan untuk penelitian selanjutnya, antara lain:

- a. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai daya antibakteri minyak atsiri rimpang temulawak menggunakan metode ekstraksi yang berbeda.
- b. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai daya antibakteri minyak atsiri rimpang temulawak dikombinasikan dengan minyak atsiri tanaman herbal lainnya.
- c. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai daya antibakteri senyawa aktif tunggal dari minyak atsiri rimpang temulawak.
- d. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai daya antibakteri minyak atsiri rimpang temulawak terhadap pertumbuhan bakteri patogen lainnya.
- e. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai uji biokompatibilitas minyak atsiri rimpang temulawak terhadap jaringan rongga mulut khususnya jaringan periapikal.

**DAFTAR PUSTAKA**

- Al-Shahwany, A. W. 2014. Alkaloids and Phenolic Compound Activity of *Piper nigrum* against Some Human Pathogenic Bacteria. *Biomedicine and Biotechnology*. 2(1): 20-28.
- Anderson, R. J., P. W. Groundwater, A. Todd, dan A. J. Worsley. 2012. *Introduction to Microorganisms and Antibacterial Chemotherapy*. New York City: John Wiley & Sons, Ltd. p. 3-30.
- Anggono, F. D., dan S. Kuswandari. 2017. Comparison of antibacterial activity inhibitory of black cumin (*Nigella sativa*) oil, Cresophene®, and Calcium Hydroxide. *Padjadjaran Journal of Dentistry*. 29(1):42-47.
- Ambikathanaya UK. 2014. Intracanal Antiseptic Medications; A Review. *Unique Journal of Medical and Dental Sciences*. 02(03): 136-142
- Avila-Campos, M. J., dan V. Nakano. 2006. Pathogenecity of *F.nucleatum*: General Aspects of Its Virulance. *Probiotics and Prebiotics Int J*. 1(2): 105-112.
- Biaggini, K., V. Borrel, S. Szunerits, R. Boukherroub, A. N'Diaye, A. Zébré, M. B. Jusserand, G. Duflos, M. Feuilloley, D. Drider, P. Déchelotte, dan N. Connil. 2017. Substance P enhances lactic acid and tyramine production in *Enterococcus faecalis* V583 and promotes its cytotoxic effect on intestinal Caco-2/TC7 cells. *Gut Pathog*. 9(20): 1-8.
- Borges, A., M. J. Saavedra, dan M. Simões. 2013. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling*. 28(7): 755–767.
- Celikel, N. dan G. Kavas. 2008. Antimicrobial Properties of Some Essential Oils against Some Pathogenic Microorganisms. *Czech J. Food Sci*. 26(3): 174-181.
- Cherfia, R., M. K. Ali, I. Talhi, A. Benaissa, N. K. Chaouche. 2017. Phytochemical analysis, antioxidant and antimicrobial activities of leaves and flower ethyl acetate and n-butanol fractions from Algerian endemic plant *Calycotome spinosa* (L.) Link. *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 9(12): 185-196.
- Dammaschke, T., N. Jung, I. Harks, dan E. Schafer. 2013. The effect of different root canal medicaments on the elimination of *Enterococcus faecalis* ex vivo. *European Journal of Dentistry*. 7(4): 442-448.

- Departemen Kesehatan. 2010. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2009. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. h. 34.
- Departemen Kesehatan. 2011. Profil Kesehatan Indonesia Tahun 2010. Jakarta: Departemen Kesehatan RI. h. 43.
- Dermawaty, D. E. 2015. Potential Extract Curcuma (*Curcuma xanthorrhizal*, Roxb) as Antibacterials. *J Majority*. 4(1): 5-11.
- Ed-Dra, A., F. R. Filai, M. Bou-Idra, B. Zekkori, A. Bouymajane, N. Moukrad, F. Benhallam, dan A. Bentayeb. 2018. Application of *Mentha suaveolens* essential oil as an antimicrobial agent in fresh turkey sausages. *Journal of Applied Biologi & Biotechnology*. 6(1): 7-12.
- Gangoue-Pieboji, J., N. Eze, A. N. Djintchui, B. Ngameni, N. Tsabang, D. E. Pegnyemb, P. Biyiti, P. Ngassam, S. Koulla-Shiro, dan M. Galleni. 2009. The in-vitro antimicrobial activity of some medicinal plants against  $\beta$ -lactam-resistant bacteria. *The Journal of Infection in Developing Countries*. 3(09): 671-680.
- Garg, N dan A. Garg. 2013. *Textbook of Endodontics*. JP Medical Ltd. <https://books.google.com/books?id=996LAGAAQBAJ&pgis=1>. [Diakses pada 10 April 2017]. p. 32-33.
- Gheorghiu, I. M., I. Suci, V. C. Marian, D. Bodnar, M. Chirila, V. Naicu, dan I. M. Stoian. 2014. Biological effects of endodontic medication on human fibroblast cell culture. *Proc. Rom. Acad., Series B*. 16(1): 33-37.
- Guimarães, N. L. S. L., H. M. Otoch, L. C. de Andrade, C. M. Ferreira, M. M. N. P. Rocha, F. A. Gomes. 2012. Microbiological evaluation of infected root canals and their correlation with pain. *RSBO*. 9(1): 31-37.
- Gunawan, D., dan S. Mulyani. 2010. *Ilmu Obat Alam (Farmakognosi) Jilid 1*. Jakarta: Penebar Swadaya.
- G-Biosciences. 2012. *Bacterial Gram Staining*. Cat. #BE-202. USA: A Geno Technology, Inc. p. 6-7.
- Hafidh, R. R., A. S. Abdulamir, L. S. Vern, F. A. Bakar, F. Abas, F. Jahanshiri, dan Z. Sekawi. 2011. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The Open Microbiology Journal*. 5: 96-106.
- Han, Y. W., W. Shi, G. T. J. Huang, S. K. Haake, N. H. Park, H. Kuramitsu, dan R. J. Genco. 2000. Interactions between Periodontal Bacteria and Human

- Oral Epithelial Cells: *Fusobacterium nucleatum* Adheres to and Invades Epithelial Cells. *Infect Immun.* 68(6): 3140-3146.
- Han, Y. W. 2015. *Fusobacterium nucleatum*: a commensal-turned pathogen. *Curr Opin Microbiol.* 0: 141-147.
- Hancock, L. E., B. E. Murray, dan J. Sillanpää. 2014. *Enterococcal Cell Wall Components and Structures*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. p. 1-7.
- Hayani, E. 2006. Analisis Kandungan Kimia Rimpang Temulawak. *Temu Teknis Nasional Tenaga Fungsional Pertanian.* 309-312.
- Hudzicki, J. 2009. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. *American Society for Microbiology.* p. 1-19.
- Jantan, I., F. C. Saputri, M. N. Qaisar, dan F. Buang. 2012. Research Article: Correlation between Chemical Composition of *Curcuma domestica* and *Curcuma xanthorrhiza* and Their Antioxidant Effect on Human Low-Density Lipoprotein Oxidation. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 438356: 1-10.
- Jeeva S., PA, M. Helen, S. Gomathy, S., Jayasree, AM., Nizzy, dan B., Rajagopal. 2012. Phytochemical Characterization and Antimicrobial Activity of *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* S637-S640.
- Joshi, R. K., C. Pande, M. H. K. Mujawar, dan S.D. Kholkute. 2009. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of *Anaphalis nubigena var monocephala*. *Natural Product Communications.* 4: 993-996.
- Kaplan, C. W., X. Ma, A. Paranjpe, A. Jewett, R. Lux, S. K. Haake, dan W. Shi. 2010. *Fusobacterium nucleatum* Outer Membrane Proteins Fap2 and RadD Induce Cell Death in Human Lymphocytes. *Infect Immun.* 78(11): 4773-4778.
- Kayaoglu, G., dan D. Ørstavik. 2004. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: Relationship of endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.* 15(5) : 308-320.
- Kementerian Pertanian. 2015. *Statistik Produksi Hortikultura Tahun 2014*. Direktorat Jenderal Pertanian, Kementerian Pertanian. h. 40-48.
- Kharismayanti, A. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* (Christm. & Panz.) Swingle) terhadap *Porphyromonas Gingivalis* ATCC 33277 secara In Vitro. *Skripsi.* Jember: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember. h. 16-26.



- Kohanski, M., D. J. Dwyer, dan J. J. Collins. 2010. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 8(6): 423-435.
- Larasati, N., Kamizar, dan M. Usman. 2014. Distribusi Penyakit Pulpa berdasarkan Etiologi dan Klasifikasi di RSKGM, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia Tahun 2009-2013. Jakarta: Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. h. 1-16.
- Lebreton, F., R. J. L. Williams, dan M. S. Gilmore. 2014. *Enterococcus Diversity, Origins in Nature, and Gut Colonization*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. p. 1-10.
- Lee, Y. L., J-S. Shim, Y. Rukayadi, dan J-K Hwang. 2008. Research note: Antibacterial Activity of Xanthorrhizol Isolated from *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. against Foodborne Pathogens. *Journal of Food Protection.* 71(9): 1926-1930.
- Lopez-Romero, J. C., H. González-Ríos, A. Borges, dan M. Simões. 2015. Research Article Antibacterial Effects and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* 795435: 1-9.
- Madarati, A. A., M. S. Zafar, AMN Sammani, A. O. Mandorah, dan H. A. Bani-Younes. 2017. Preference and usage of intracanal medications during endodontic treatment. *Saudi Med J.* 38(7): 755-763.
- Mansouri, S., A. Foroumadi, T. Ghaneie, dan A. G. Najjar. 2001. Antibacterial Activity of the Crude Extracts and Fractionated Constituents of *Myrtus communis*. *Pharmaceutical Biology.* 39(5): 399-401.
- Mardewi, S. 2003. Apakah *Rotation of Medication* Masih Diperlukan?. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Indonesia.* ISSN: 0854-364X. 10: 889-895.
- Mulyawati, E. 2011. Peran Bahan Disinfeksi pada Perawatan Saluran Akar. *Maj Ked Gi.* ISSN: 1978-0206. 18(2): 205-209.
- Musrati, A. A., D. Fteita, J. Paranko, E. Kononen, dan U.K. Gursoy. 2016. Morphological and functional adaptations of *Fusobacterium nucleatum* exposed to human neutrophil Peptide-1. *Anaerobe.* 39:31-38.
- Narayanan, L. L., dan C. Vaishnavi. 2010. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent.* 13(4): 233-239.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2006. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard.*

- M2-A9 Volume 6 Number 1. Edisi ke-9. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute. p. 7-12.
- Nazzaro, F., F. Fratianni., L. D. Martino, R. Coppola, dan V. D. Feo. 2013. Review: Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals*. 6: 1451-1474.
- Notoatmodjo, S. 2010. *Metodologi Penelitian Kesehatan*. Jakarta: Rineka Cipta.
- Nurdin, D., dan M. H. Satari. 2011. Peranan *Enterococcus faecalis* terhadap Persistensi Infeksi Saluran Akar. *Prosiding Dies Forum 52 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*. h. 69-76.
- Okamoto, A. C., E. G. Jardim Jr, V. E. Arana-Chavez, dan M. J. Avila-Campos. 2002. Influence of Subinhibitory Concentrations of Antimicrobials on Hydrophobicity, Adherence and Ultra-Structure of *Fusobacterium nucleatum*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 33: 178-184.
- Papagianni, M., N. Avramidis, G. Filioussis, D. Dasiou, dan I. Ambrosiadis. 2006. Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: assessing the factor "indicator microorganism". *Microbial Cell Factories*. 5:30 p. 1-14.
- Parameswaran, N., dan S. Patial. 2010. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Signaling in Macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 20(2): 87-103.
- Podbielski, A., A. Spahr, dan B. Haller. 2003. Additive Antimicrobial Activity of Calcium Hydroxide and Chlorhexidine on Common Endodontic Bacterial Pathogens. *Journal of Endodontics*. 29(5): 340-345.
- Ponce, A. G., R. Fritz, C. del Valle, S. I. Roura. 2003. Antimicrobial activity of essential oils on the native microflora of organic Swiss chard. *Lebensm.-Wiss.u.-Technol*. 36: 679-684.
- Portenier, I., T. Waltimo, D. Ørstavik, dan M. Haapsalo. 2005. The Susceptibility of Starved, Stationary Phase, and Growing Cells of *Enterococcus faecalis* to Endodontic Medicaments. *J. Of Endodontics*. 31(5): 380-386.
- Prabuseenivasan, S., M. Jayakumar, dan S. Ignacimuthu. 2006. Research article: In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complementary and Alternative Medicine*. 6:39 p. 1-8.
- Quintans-Junior, L., JCF. Moreira, MAB. Pasquali, SMS. Rabie, A. S. Pires, R. Schröder, T. K. Rabelo, JPA. Santos, PSS. Lima, SCH. Cavalcanti, AAS. Araújo, JSS. Quintans, dan D. P. Gelain. 2012. Research Article: Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-

- Camphene, p-Cymene, and Geranyl Acetate in Experimental Models. *ISRN Toxicology*. 459530: 1-11.
- Ramsey, M., A. Hartke, dan M. Huycke. 2014. *The Physiology and Metabolism of Enterococci*. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary. p. 1-17.
- Rukayadi, Y. dan J. K. Hwang. 2006. In vitro activity of xanthorrhizol against *Streptococcus mutans* biofilms. *Letters in Applied Microbiology*. 42(4): 400-404.
- Rukmana, R. 2006. *Temulawak: Tanaman Rempah dan Obat*. Yogyakarta: Kanisius.h. 13-19.
- Rusli, M. S. 2011. *Sukses Memproduksi Minyak Atsiri*. Jakarta Selatan: PT AgroMedia Pustaka. h. 56-66.
- Saadoun, I., L. M. A. Challah, F. M. Aldhuhouri, A. A. Hamoudi, dan B. A. Joubori. 2014. Antagonistic Effect of the Exotic Plant "*Prosopis juliflora*" Extract on Different Bacterial Pathogens. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*. 3(7): 865-873.
- Saber, SEDM. dan S. A. El-Hady. 2012. Development of an intracanal mature *Enterococcus faecalis* biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medications; an in vitro study. *Eur J Dent*. 6(1): 43-50.
- Sahwalita, dan N. Herdiana. 2015. *Mengenal Nilam (pogostemon cablin benth.): Tanaman Perdu Penghasil Minyak Atsiri*. Ulu Rawas Musi: Kelompok Citra Lestari Desa Napallicin. h. 46-49.
- Sarina, M. dan B. Knoll. 2002. Comparative Study of an Amies System Incorporating New Easy-Flow Swab Applicators (Copan Diagnostics Inc.), Designed for Improved Sample Release, with a Transport System Utilizing Regular Rayon Swab – STARSWAB II (Starplex Scientific Inc), Using a Direct Swabbing Technique. *ASM General Meeting*. p. 1-3.
- Sava, I. G., E. Heikens, dan J. Huebner. 2010. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect*. 16: 533–540.
- Schinor, E. C., M. J. Salvador, I. Y. Ito, dan D. A. Dias. 2007. Evaluation of The Antimicrobial Activity of Crude Extracts and Isolated Constituents from *Chresta scapigera*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:145-149.
- Setyawan, A. D. 2003. Keanekaragaman Kandungan Minyak Atsiri Rimpang Temu-temuan (Curcuma). *Biofarmasi*. ISSN: 1693-2242. 1(2): 44-49.

- Shan, T., I. Khan., W. Hussain, dan M. A. Manzoor. 2014. Frequency of *Enterococcus faecalis* in Saliva and Root Canals with Treatment Failure. *Pak Armed Forces Med J.* 64(3): 395-398.
- Simon, K. 2012. Penghambatan Sabun Mandi Cair Berbahan Aktif Triclosan terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* di Daerah Babarsari, Sleman, Yogyakarta. *Skripsi.* Yogyakarta: Fakultas Teknologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta. h. 7-9.
- Stuart, C. H., S. A. Schwartz, T. J. Beeson, dan C. B. Owatz. 2006. *Enterococcus faecalis*: Its Role in Root Canal Treatment Failure and Current Concepts in Retreatment. *J Endod.* 32: 93-98.
- Sudarsono. 2004. Kamfora, salah satu komponen minyak atsiri rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) dari Kebun Tanaman Obat PT. Nyonya Meneer, Karangjati. *Majalah Farmasi Indonesia.* 15(4). 194-200.
- Surya, A. A. N. P. 2014. Efektivitas Sterilisasi Saluran Akar Menggunakan Teknik Laser dengan Uji Mikroorganisme dalam Saluran Akar. *Skripsi.* Denpasar: Universitas Mahasaraswati Denpasar. h. 13-14.
- Syafi'i, F. 2015. Optimasi Proses Emulsifikasi dan Mikroenkapsulasi pada Pembuatan Bubuk Oleoresin Lada (*Piper nigrum*). *Tesis.* Bogor: Institut Pertanian Bogor.
- Sylvester, W. S., R. Son, K. F. Lew, dan Y. Rukayadi. 2015. Antibacterial activity of Java turmeric (*Curcuma xanthorrhiza* Roxb.) extract against *Klebsiella pneumoniae* isolated from several vegetables. *International Food Research Journal.* 22(5): 1770-1776.
- Teow, S. Y., K. Liew, S. A. Ali, A. S. B. Khoo, dan S. C. Peh. 2016. Antibacterial Action of Curcumin against *Staphylococcus aureus*: A Brief Review. *Journal of Tropical Medicine.* p. 1-10
- Topcuoglu N., E. Bozdoğan, O. Aktoren, dan G. Kulekci. 2013. Presence of Oral Bacterial Species in Primary Endodontic Infections of Primary Teeth. *The Journal of Clinical Pediatric Dentistry.* 38(2): 155-160.
- Torabinejad, M. dan Richard EW. 2009. *Endodontics: Principle and Practice* 4th Edition. <https://books.google.co.id/books?id=bbuYu0IX-EwC&printsec>. [Diakses pada 10 April 2017]. p. 204-214.
- Trombetta, D., F. Castelli, M. G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, dan G. Bisignano. 2005. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(6): 2474-2478.

- Upadhyaya, P. M. G., KL Ravikumar, dan BL Umapathy. 2009. Review of Virulence Factors of Enterococcus: An Emerging Nosocomial Pathogen. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 27(4): 301-305.
- Zaidan, M. R., A. N. Rain, A. R. Badrul, A. Adlin, A. Norazah, dan I. Zakiah. 2005. In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Tropical Biomedicine*. 22(2): 165-170.
- Zehnder, M. 2006. Root Canal Irrigants. *J Endod*. 32: 389–398.
- Zenati, F., F. Benbelaid, A. Khadir, C. Bellahsene, dan M. Bendahou. 2014. Antimicrobial effects of three essential oils on multidrug resistant bacteria responsible for urinary infections. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 4(11): 15-18.
- Zengin, H. dan A. H. Baysal. 2014. Antibacterial and Antioxidant Activity of Essential Oil Terpenes against Pathogenic and Spoilage-Forming Bacteria and Cell Structure-Activity Relationships Evaluated by SEM Microscopy. *Molecules*. 19: 17773-17798.

**LAMPIRAN**

**A. Pembuatan Kontrol Negatif**

Pembuatan kontrol negatif larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5% dibuat berdasarkan penghitungan:

- a. Volume DMSO 10%  $= \frac{10}{100} \times 2000 \mu\text{l}$   
 $= 200 \mu\text{l}$
- b. Volume Tween 80  $= \frac{0,5}{100} \times 2000 \mu\text{l}$   
 $= 10 \mu\text{l}$
- c. Volume akuades steril yang dibutuhkan  
 $= 2000 \mu\text{l} - (\text{Volume DMSO 10\%} + \text{Volume Tween 80 0,5\%})$   
 $= 2000 \mu\text{l} - (200 \mu\text{l} + 10 \mu\text{l})$   
 $= 1790 \mu\text{l}$

**B. Pembuatan Perlakuan Minyak Atsiri**

- a. Konsentrasi 75%  $= \frac{75}{100} \times 500 \mu\text{l}$   
 $= 375 \mu\text{l}$
- b. Konsentrasi 50%  $= \frac{50}{100} \times 500 \mu\text{l}$   
 $= 250 \mu\text{l}$
- c. Konsentrasi 25%  $= \frac{25}{100} \times 500 \mu\text{l}$   
 $= 125 \mu\text{l}$

**C. Data Hasil Pengukuran Diameter Zona Hambat**

**C.1 *Enterococcus faecalis***

Rerata Diameter (mm)

Petridish	K-	K+	K++	RT25	RT50	RT75	RT100
1	0,00	19,28	18,18	8,41	8,58	9,75	11,30
2	0,00	17,40	15,18	8,65	8,92	10,06	11,87
3	0,00	16,40	15,08	8,30	8,81	9,84	10,62
4	0,00	17,33	17,23	7,33	7,85	8,47	9,03

## C.2 *Fusobacterium nucleatum*

Rerata Diameter (mm)

Petridish	K-	K+	K++	RT25	RT50	RT75	RT100
1	0,00	18,90	20,07	8,91	9,06	9,80	10,93
2	0,00	19,08	19,52	8,65	8,99	9,05	10,99
3	0,00	17,37	18,75	8,09	8,81	9,26	10,15
4	0,00	18,32	18,61	8,49	8,93	10,49	10,93

## D. Analisis Data

### D.1 *Enterococcus faecalis*

#### D.1.1 Hasil Uji Normalitas dengan Uji *Shapiro Wilk*

Tests of Normality<sup>a</sup>

sample	Kolmogorov-Smirnov <sup>b</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
zonahambat kontrol +	,317	4	.	,906	4	,461
kontrol ++	,290	4	.	,862	4	,267
konsentrasi 25%	,337	4	.	,848	4	,219
konsentrasi 50%	,283	4	.	,861	4	,264
konsentrasi 75%	,370	4	.	,792	4	,089
konsentrasi 100%	,222	4	.	,943	4	,670

a. zonahambat is constant when sample = kontrol -. It has been omitted.

b. Lilliefors Significance Correction

#### D.1.2 Hasil Uji Homogenitas dengan *Levene Test*

Test of Homogeneity of Variances

zonahambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,408	6	21	,017

D.1.3 Hasil Uji Non Parametrik dengan Uji *Kruskal Wallis*

**Kruskal-Wallis Test**

**Ranks**

sample	N	Mean Rank
zonahambat kontrol -	4	2,50
kontrol +	4	25,50
kontrol ++	4	23,50
konsentrasi 25%	4	7,75
konsentrasi 50%	4	10,25
konsentrasi 75%	4	14,25
konsentrasi 100%	4	17,75
Total	28	

**Test Statistics<sup>a,b</sup>**

	zonahambat
Chi-Square	24,911
df	6
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:  
sample

D.1.4 Hasil Uji Beda Antar Kelompok Perlakuan dengan Uji *Mann Whitney*

a. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Kontrol positif (*ChKM*)

**Ranks**

	Sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2,50	10,00
	kontrol +	4	6,50	26,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,460
Asymp. Sig. (2-tailed)	,014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.



- b. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Kontrol positif (*Cresophene*)

Ranks

	Sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2,50	10,00
	kontrol ++	4	6,50	26,00
	Total	8		

Test Statistics<sup>a</sup>

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,460
Asymp. Sig. (2-tailed)	,014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample  
b. Not corrected for ties.

- c. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 25%

Ranks

	Sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2,50	10,00
	konsentrasi 25%	4	6,50	26,00
	Total	8		

Test Statistics<sup>a</sup>

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,460
Asymp. Sig. (2-tailed)	,014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample  
b. Not corrected for ties.

- d. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak 50%

Ranks				
	Sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2,50	10,00
	konsentrasi 50%	4	6,50	26,00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,460
Asymp. Sig. (2-tailed)	,014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample  
 b. Not corrected for ties.

- e. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 75%

Ranks				
	Sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2,50	10,00
	konsentrasi 75%	4	6,50	26,00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,460
Asymp. Sig. (2-tailed)	,014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample  
 b. Not corrected for ties.

- f. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak 100%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2,50	10,00
	konsentrasi 100%	4	6,50	26,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,460
Asymp. Sig. (2-tailed)	,014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample  
 b. Not corrected for ties.

- g. Kontrol positif (*ChKM*) : Kontrol positif (*Cresophene*)

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol +	4	5,50	22,00
	kontrol ++	4	3,50	14,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	14,000
Z	-1,155
Asymp. Sig. (2-tailed)	,248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,343 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample  
 b. Not corrected for ties.

- h. Kontrol positif (*ChKM*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 25%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol +	4	6,50	26,00

konsentrasi 25%	4	2,50	10,00
Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

i. Kontrol positif (*ChKM*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 50%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol +	4	6,50	26,00
	konsentrasi 50%	4	2,50	10,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

j. Kontrol positif (*ChKM*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 75%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol +	4	6,50	26,00
	konsentrasi 75%	4	2,50	10,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

k. Kontrol positif (*ChKM*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 100%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol +	4	6,50	26,00
	konsentrasi 100%	4	2,50	10,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

l. Kontrol positif (*Cresophene*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 25%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol ++	4	6,50	26,00
	konsentrasi 25%	4	2,50	10,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000

Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample
- b. Not corrected for ties.

m. Kontrol positif (*Cresophene*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 50%

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol ++	4	6,50	26,00
	konsentrasi 50%	4	2,50	10,00
Total		8		

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample
- b. Not corrected for ties.

n. Kontrol positif (*Cresophene*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 75%

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol ++	4	6,50	26,00
	konsentrasi 75%	4	2,50	10,00
Total		8		

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample
- b. Not corrected for ties.

o. Kontrol positif (*Cresophene*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 100%

Ranks				
	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol ++	4	6,50	26,00
	konsentrasi 100%	4	2,50	10,00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

p. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 25% : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 50%

Ranks				
	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	konsentrasi 25%	4	3,50	14,00
	konsentrasi 50%	4	5,50	22,00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	zonahambat
Mann-Whitney U	4,000
Wilcoxon W	14,000
Z	-1,155
Asymp. Sig. (2-tailed)	,248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,343 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

q. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 25% : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 75%

Ranks				
	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks

zonahambat	konsentrasi 25%	4	2,75	11,00
	konsentrasi 75%	4	6,25	25,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	1,000
Wilcoxon W	11,000
Z	-2,021
Asymp. Sig. (2-tailed)	,043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,057 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

r. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 25% : minyak Atsiri Rimpang Temulawak 100%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	konsentrasi 25%	4	2,50	10,00
	konsentrasi 100%	4	6,50	26,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

s. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 50% : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 75%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	konsentrasi 50%	4	3,25	13,00
	konsentrasi 75%	4	5,75	23,00
	Total	8		



**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	3,000
Wilcoxon W	13,000
Z	-1,443
Asymp. Sig. (2-tailed)	,149
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,200 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

t. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 50% : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 100%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	konsentrasi 50%	4	2,50	10,00
	konsentrasi 100%	4	6,50	26,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,309
Asymp. Sig. (2-tailed)	,021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

u. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 75% : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 100%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	konsentrasi 75%	4	3,25	13,00
	konsentrasi 100%	4	5,75	23,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	3,000

Wilcoxon W	13,000
Z	-1,443
Asymp. Sig. (2-tailed)	,149
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,200 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

## D.2 *Fusobacterium nucleatum*

### D.2.1 Hasil Uji Normalitas dengan Uji *Shapiro Wilk*

#### Tests of Normality<sup>a</sup>

sample	Kolmogorov-Smirnov <sup>b</sup>			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
zonahambat kontrol +	,235	4	.	,909	4	,479
kontrol ++	,262	4	.	,912	4	,491
konsentrasi 25%	,198	4	.	,984	4	,926
konsentrasi 50%	,184	4	.	,981	4	,910
konsentrasi 75%	,228	4	.	,940	4	,652
konsentrasi 100%	,423	4	.	,691	4	,009

a. zonahambat is constant when sample = kontrol -. It has been omitted.

b. Lilliefors Significance Correction

### D.2.2 Hasil Uji Homogenitas dengan *Levene Test*

#### Test of Homogeneity of Variances

zonahambat

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
3,857	6	21	,009

### D.2.3 Hasil Uji Non Parametrik dengan Uji *Kruskal Wallis*

#### Kruskal-Wallis Test

#### Ranks

sample	N	Mean Rank
zonahambat kontrol -	4	2,50
kontrol +	4	23,50
kontrol ++	4	25,50
konsentrasi 25%	4	6,75
konsentrasi 50%	4	10,50
konsentrasi 75%	4	14,50
konsentrasi 100%	4	18,25
Total	28	

Test Statistics<sup>a,b</sup>

	zonahambat
Chi-Square	25,852
df	6
Asymp. Sig.	,000

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable:  
sample

D.2.4 Hasil Uji Beda Antar Kelompok Perlakuan dengan Uji *Mann Whitney*

a. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Kontrol positif (*ChKM*)

Ranks

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2.50	10.00
	kontrol +	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics<sup>a</sup>

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

b. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Kontrol positif (*Cresophene*)

Ranks

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2.50	10.00
	kontrol ++	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics<sup>a</sup>

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000

Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample
- b. Not corrected for ties.

- c. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak 25%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2.50	10.00
	konsentrasi 25%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample
- b. Not corrected for ties.

- d. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak 50%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2.50	10.00
	konsentrasi 50%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

e. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak 75%

Ranks				
	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2.50	10.00
	konsentrasi 75%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.460
Asymp. Sig. (2-tailed)	.014
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

f. Kontrol negatif (Larutan DMSO 10% + Tween 80 0,5%) : Ekstrak minyak atsiri rimpang temulawak 100%

Ranks				
	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol -	4	2.50	10.00
	konsentrasi 100%	4	6.50	26.00
	Total	8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.477
Asymp. Sig. (2-tailed)	.013
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

g. Kontrol positif (*ChKM*) : Kontrol positif (*Cresophene*)

Ranks				
	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol +	4	3.50	14.00
	kontrol ++	4	5.50	22.00
Total		8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	zonahambat
Mann-Whitney U	4.000
Wilcoxon W	14.000
Z	-1.155
Asymp. Sig. (2-tailed)	.248
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.343 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample
- b. Not corrected for ties.

h. Kontrol positif (*ChKM*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 25%

Ranks				
	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol +	4	6.50	26.00
	konsentrasi 25%	4	2.50	10.00
Total		8		

Test Statistics <sup>a</sup>	
	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample
- b. Not corrected for ties.

i. Kontrol positif (*ChKM*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 50%

Ranks				
	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol +	4	6.50	26.00
	konsentrasi 50%	4	2.50	10.00

Total	8		
-------	---	--	--

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

j. Kontrol positif (*ChKM*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 75%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol +	4	6.50	26.00
	konsentrasi 75%	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

k. Kontrol positif (*ChKM*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak100%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol +	4	6.50	26.00
	konsentrasi 100%	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000

Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample
- b. Not corrected for ties.

l. Kontrol positif (*Cresophene*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 25%

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol ++	4	6.50	26.00
	konsentrasi 25%	4	2.50	10.00
Total		8		

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample
- b. Not corrected for ties.

m. Kontrol positif (*Cresophene*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 50%

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol ++	4	6.50	26.00
	konsentrasi 50%	4	2.50	10.00
Total		8		

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

- a. Grouping Variable: sample



b. Not corrected for ties.

n. Kontrol positif (*Cresophene*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 75%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol ++	4	6.50	26.00
	konsentrasi 75%	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

o. Kontrol positif (*Cresophene*) : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 100%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	kontrol ++	4	6.50	26.00
	konsentrasi 100%	4	2.50	10.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

p. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 25% : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 50%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	konsentrasi 25%	4	2,75	11,00
	konsentrasi 50%	4	6,25	25,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	1,000
Wilcoxon W	11,000
Z	-2,021
Asymp. Sig. (2-tailed)	,043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,057 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

q. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 25% : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 75%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	konsentrasi 25%	4	2.50	10.00
	konsentrasi 75%	4	6.50	26.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.309
Asymp. Sig. (2-tailed)	.021
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

r. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 25% : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 100%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	konsentrasi 25%	4	2.50	10.00
	konsentrasi 100%	4	6.50	26.00

Total	8	
-------	---	--

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	.000
Wilcoxon W	10.000
Z	-2.323
Asymp. Sig. (2-tailed)	.020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

s. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 50% : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 75%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	konsentrasi 50%	4	2,75	11,00
	konsentrasi 75%	4	6,25	25,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	1,000
Wilcoxon W	11,000
Z	-2,021
Asymp. Sig. (2-tailed)	,043
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,057 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

t. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 50% : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 100%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	konsentrasi 50%	4	2,50	10,00
	konsentrasi 100%	4	6,50	26,00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

	zonahambat
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	10,000
Z	-2,323
Asymp. Sig. (2-tailed)	,020
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,029 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

b. Not corrected for ties.

- u. Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 75% : Minyak Atsiri Rimpang Temulawak 100%

**Ranks**

	sample	N	Mean Rank	Sum of Ranks
zonahambat	konsentrasi 75%	4	2.75	11.00
	konsentrasi 100%	4	6.25	25.00
	Total	8		

**Test Statistics<sup>a</sup>**

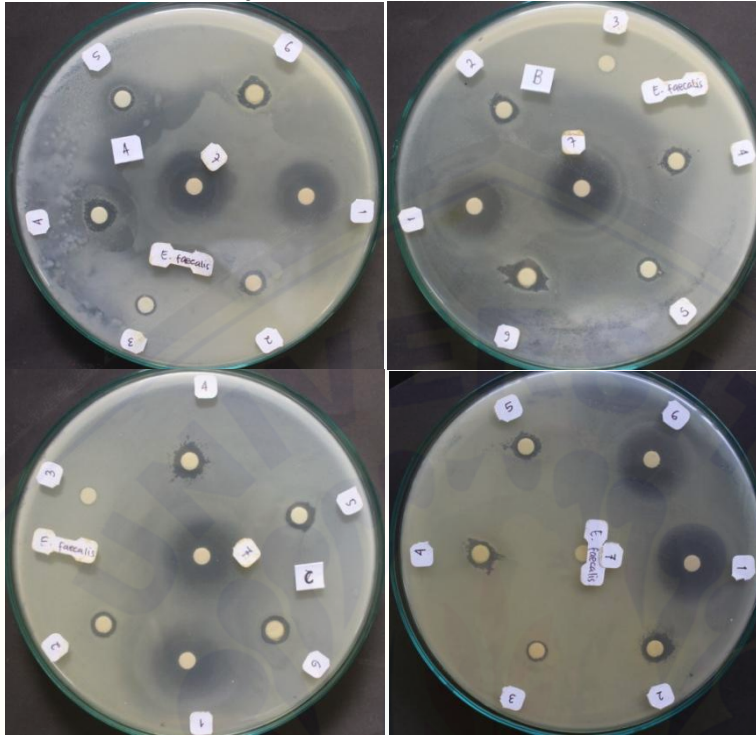
	zonahambat
Mann-Whitney U	1.000
Wilcoxon W	11.000
Z	-2.033
Asymp. Sig. (2-tailed)	.042
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	.057 <sup>b</sup>

a. Grouping Variable: sample

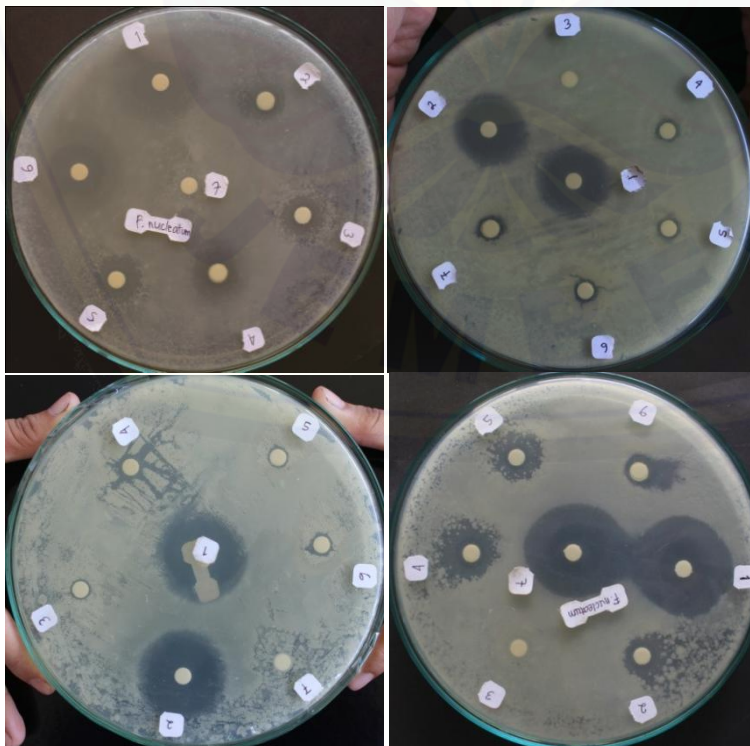
b. Not corrected for ties.

**E. Foto Hasil Penelitian**

**E.1 *Enterococcus faecalis***

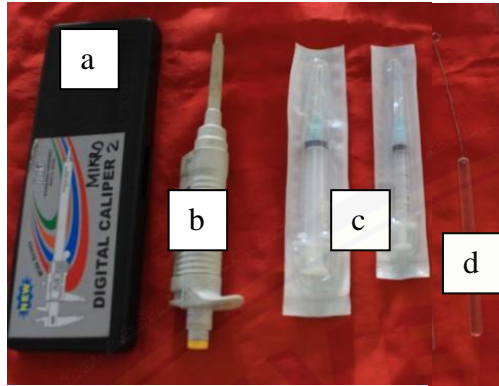


**E.2 *Fusobacterium nucleatum***

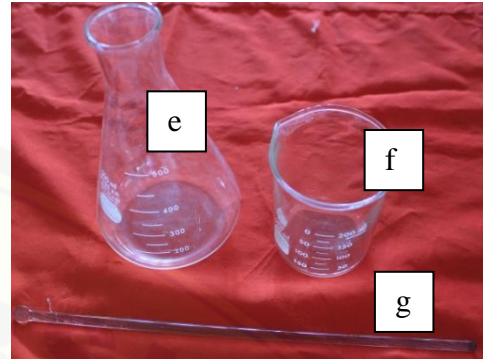


**F. Foto Alat dan Bahan Penelitian**

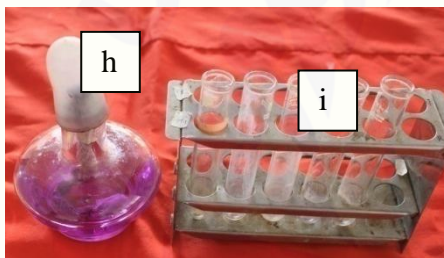
**F.1 Alat Penelitian**



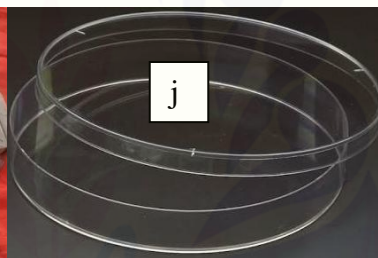
a. Jangka sorong digital  
 b. Mikropipet  
 c. Disposable syringe  
 d. Ose



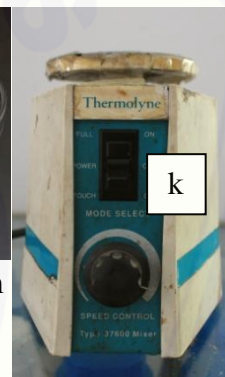
e. Tabung erlenmeyer  
 f. Gelas ukur  
 g. Spatula



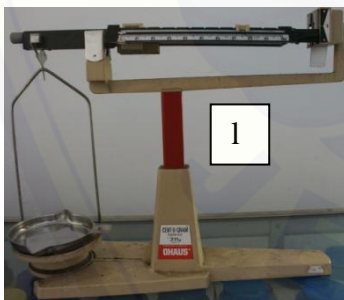
h. Bunsen  
 i. Tabung reaksi



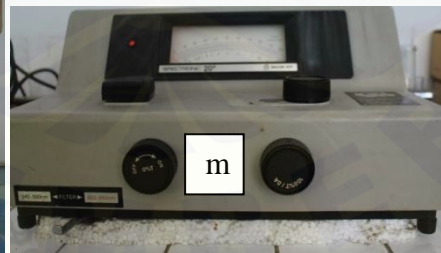
j. Petridish diameter 15 mm



k. Thermolyne



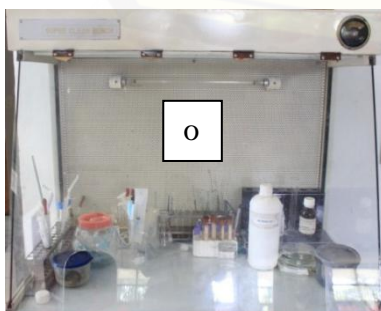
l. Timbangan ohaus



m. Spektrofotometer



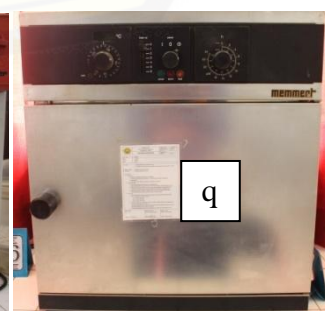
n. Desikator



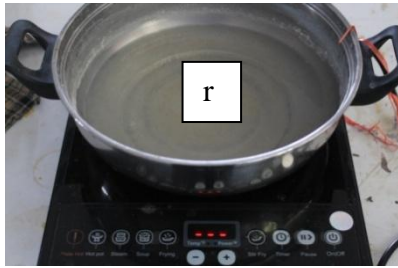
o. Laminar flow



p. inkubator



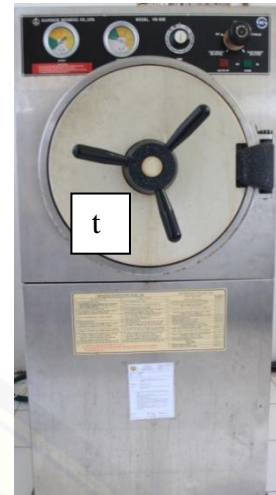
q. Oven



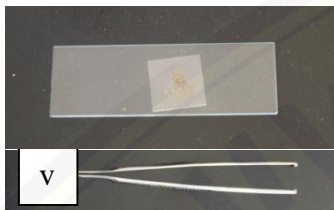
r. Kompor listrik



s. Satu set alat destilasi uap



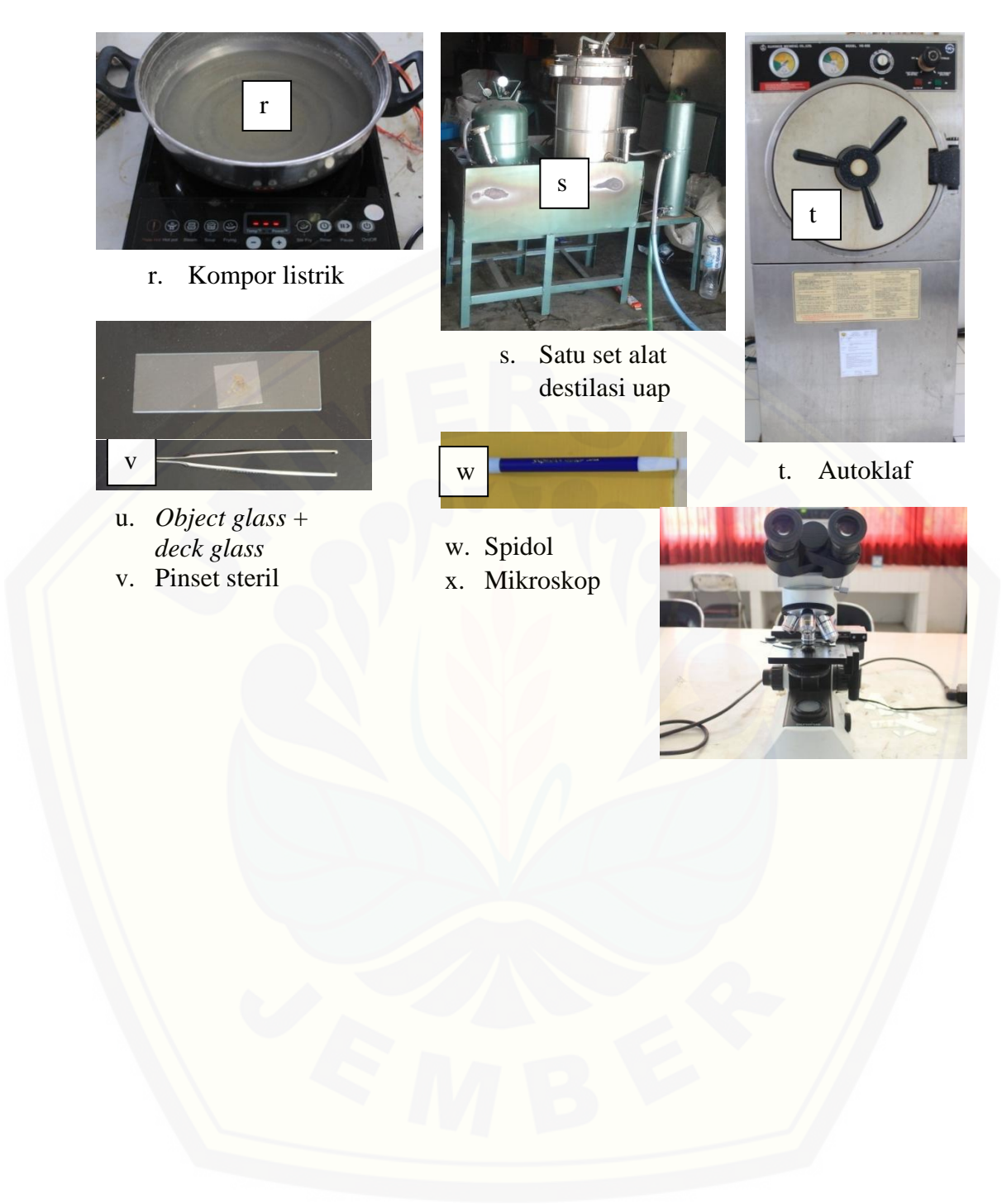
t. Autoklaf



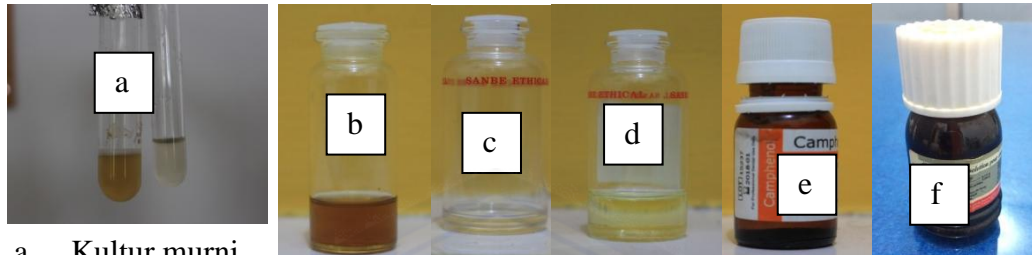
u. *Object glass +  
deck glass*  
v. Pinset steril



w. Spidol  
x. Mikroskop



## F.2 Bahan Penelitian



a. Kultur murni bakteri

- b. Minyak atsiri rimpang temulawak  
 c. Dimetil sulfoksida (DMSO)  
 d. Tween 80  
 e. *ChKM*  
 f. *Cresophene*

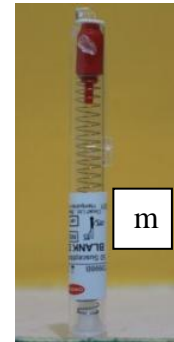


- g. Larutan saline  
 h. MH-A (*Mueller Hinton-Agar*)  
 i. MH-B (*Mueller Hinton-Broth*)  
 j. Alkohol  
 k. Akuades steril





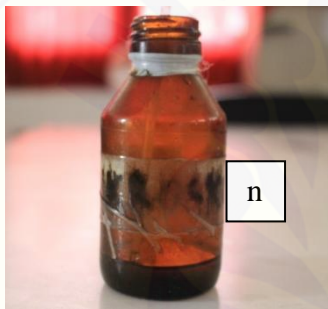
l



m

m. Kertas cakram diameter 5 mm

l. Bahan pewarnaan Gram (*Crystal violet, Iodine, Decolorizer Solution, Safranin*)



n

n. Minyak imersi



o

o. Swab steril



p

p. Kapas



q

q. Kertas penyaring



r

r. Tip mikropipet



## G. Surat Keterangan

### G.1 Identifikasi Tanaman Temulawak

Kode Dokumen : FR-AUK-064  
Revisi : 0



**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI  
POLITEKNIK NEGERI JEMBER  
LABORATORIUM TANAMAN**

Jalan Mastrip Kotak Pos 164 Jember - 68101 Telp. (0331) 333532 - 333534 Fax. (0331) 333531  
E-mail : [Polije@polije.ac.id](mailto:Polije@polije.ac.id) Web Site : <http://www.Polije.ac.id>

#### SURAT KETERANGAN IDENTIFIKASI TANAMAN

No: 01/ PL17.3.1.02/LL/2018

Menindaklanjuti surat dari Wakil Dekan I Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember No: 4301/UN25.8.TL/2017 perihal Permohonan Identifikasi Tanaman dan berdasarkan hasil pengamatan pada spesimen tumbuhan yang dikirimkan ke Laboratorium Tanaman, Jurusan Produksi Pertanian, Politeknik Negeri Jember oleh:

Nama : Nakhita Lintang Syafira  
NIM : 141610101085  
Jur/Fak/PT : Fakultas Kedokteran Gigi/ Universitas Jember

maka dapat disampaikan hasilnya bahwa spesimen tersebut di bawah ini (terlampir) adalah:  
*Kingdom/Regnum: Plantae; Devisio: Spermatophyta; Subdevisio: Magnoliophyta; Kelas: Liliopsida(Monocotyledoneae); Ordo: Zingiberales; Famili: Zingiberaceae; Genus: Curcuma; Spesies: Curcuma xanthorrhiza, Roxb*

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sebagaimana mestinya.

Jember, 24 Januari 2018

Ka. Laboratorium Tanaman

Ir. Lilik Mastuti, MP

NIP. 195808201987032001

**G.2 Identifikasi Bakteri *E. faecalis* dengan Pewarnaan Gram**

LABORATORIUM MIKROBIOLOGI  
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER

**SURAT KETERANGAN**

No. 0132 / MIKRO / S.KET / 2018

Sehubungan dengan keperluan identifikasi mikroorganisme, maka kami menerangkan bahwa mahasiswa berikut :

Nama : Nakhita Lintang Syafira  
NIM : 141610101085  
Fakultas : Kedokteran Gigi  
Keperluan : Penelitian

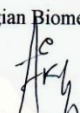
Telah melakukan uji identifikasi terhadap isolat bakteri *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan hasil coccus, Gram positif dan tidak terkontaminasi.

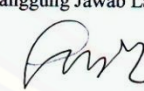

Jember, 2017

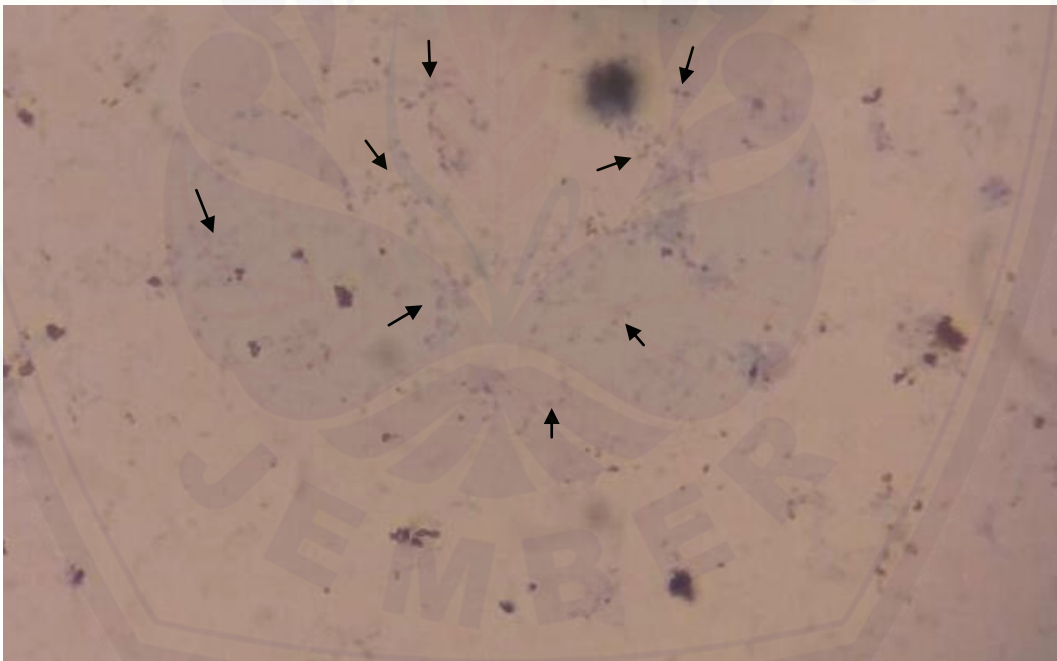
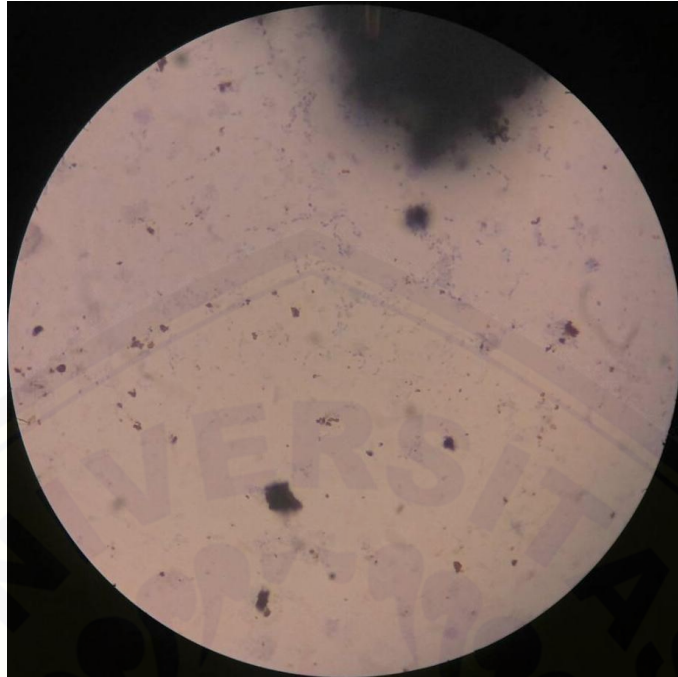
Mengetahui,

Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi

Penanggung Jawab Lab. Mikrobiologi

  
drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed  
NIP 198006032006042002

  
drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes  
NIP 197608092005012002 



Gambaran hasil pewarnaan Gram dari sel bakteri *E. faecalis* dengan perbesaran 1000x tampak sel berwarna keunguan, berbentuk kokus bulat atau ovoid, dan berantai pendek (tanda panah).

### G.3 Identifikasi Bakteri *F. nucleatum* dengan Pewarnaan Gram



LABORATORIUM MIKROBIOLOGI  
BAGIAN BIOMEDIK KEDOKTERAN GIGI  
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI  
UNIVERSITAS JEMBER

#### SURAT KETERANGAN

No. 0133 / MIKRO / S.KET / 2018

Sehubungan dengan keperluan identifikasi mikroorganisme, maka kami menerangkan bahwa mahasiswa berikut :

Nama : Nakhita Lintang Syafira  
NIM : 141610101085  
Fakultas : Kedokteran Gigi  
Keperluan : Penelitian

Telah melakukan uji identifikasi terhadap isolat bakteri *Fusobacterium nucleatum* dengan menggunakan pengecatan Gram dan diamati secara mikroskopis menunjukkan hasil bacillus, Gram negatif dan tidak terkontaminasi.

Jember, 2018

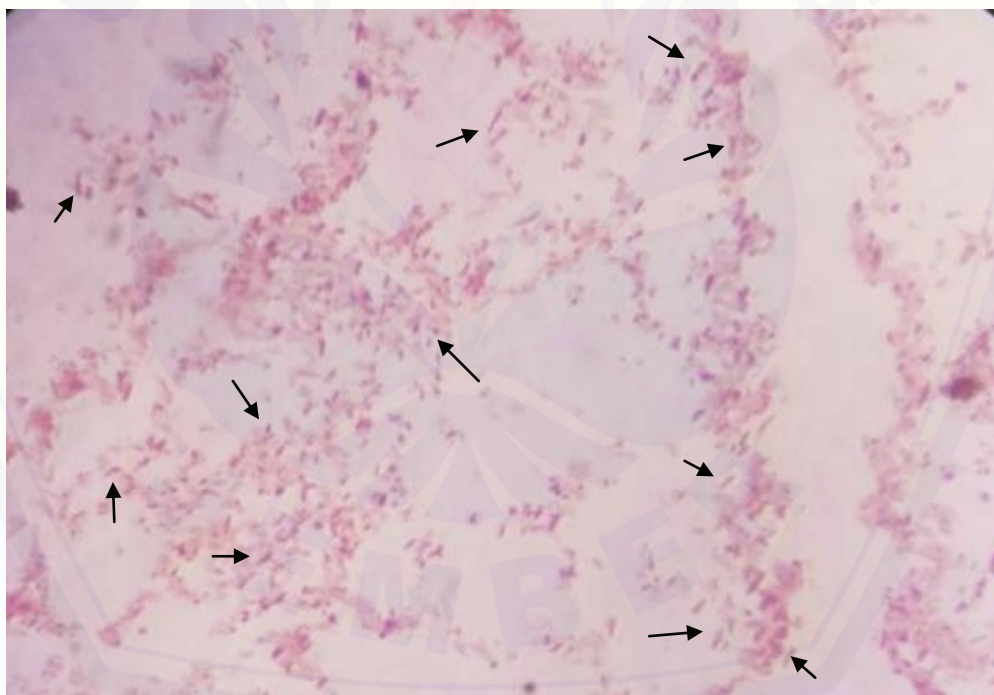
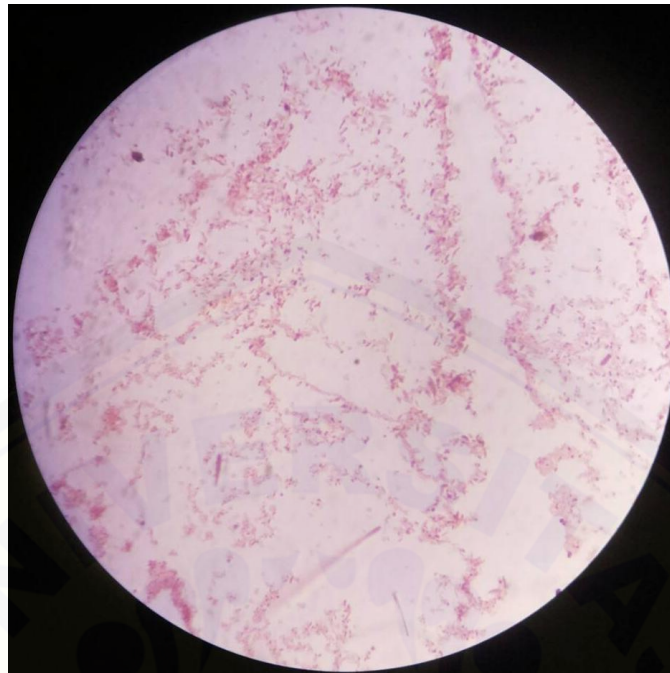
Mengetahui,

Kepala Bagian Biomedik Kedokteran Gigi

Penanggung Jawab Lab. Mikrobiologi


  
drg. Amandia Dewi Permana Shita, M.Biomed  
NIP 198006032006042002

  
drg. Pujiana Endah Lestari, M.Kes  
NIP 197608092005012002 



Gambaran hasil pewarnaan Gram dari sel bakteri *F. nucleatum* dengan perbesaran 1000x tampak sel berwarna merah, berbentuk batang (gelondong) dengan kedua ujung yang runcing (tanda panah).

**G.4 Pembuatan Ekstrak Minyak Atsiri Rimpang Temulawak**

**KEMENTERIAN RISET, TEKNOLOGI, DAN PENDIDIKAN TINGGI**  
**POLITEKNIK NEGERI JEMBER**  
**LABOTARIUM ALAT MESIN PERTANIAN**

**Nomor :**

**Perihal :** Permohonan ijin fasilitas laboratorium  
Kegiatan Mahasiswa Penelitian

Berdasarkan surat saudara nomor : 3469 / UN25.8.TL / 25 tanggal 11 oktober 2017, Kami Kepala laboratorium Alat mesin Pertanian Politeknik Negeri Jember memberikan ijin dan penggunaan alat Destilasi sistim uap air kapasitas 4 kg kepada mahasiswa dibawah ini :

Nama : Nakhita Lintang Syafira  
NIM : 141610101085  
Semester/Tahun : 2017/2018  
Fakultas : Kedokteran Gigi Universitas Jember  
Alamat : Jln.Baturaden I No. 52 Jember  
Judul Penelitian : Daya Antibakteri Ekstrak Minyak Atsiri Rimpang Temulawak  
(*Curcuma xanthorrhiza*) Terhadap Pertumbuhan *Enterococcus faecalis* dan *Fusobacterium nucleatum*

Waktu Pelaksanaan: Oktober 2017 s/d Selesai

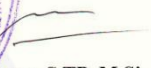
Tempat pelaksanaan :  
Laboratorium Alat Mesin Pertanian Politeknik Negri Jember

Alat :  
Timbangan digital, Kunci pas, obeng, Alat destilasi uap dan air skala laboratorium kapasitas 4 kg.

Bahan :  
Rimpang Temulawak Segar

Demikian surat permohonan ijin kami buat atas perhatiannya disampaikan terima kasih.

Jember, 30 Oktober 2017  
Ka. Lab Alat Mesin Pertanian

  
**Amal Bahariawan, S.TP, M.Si**  
NIP. 19680911 199603 1 002

Data Hasil Destilasi sistim uap dan air dengan Bahan Rimpang Temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) segar.

No	Berat Bahan	Hasil Destilasi Minyak Atsiri
1.	Rimpang Temulawak segar yang diiris dengan ketebalan 1 s/d 2 mm , seberat 4 kg	Volume minyak atsiri 9 ml. Warna minyak atsiri kuning kecoklatan dan jernih. Aroma minyak atsiri menyengat.

Jember, 30 Oktober 2017  
Ka. Lab Alat Mesin Pertanian



Amal Bahariawan. S.TP. M.Si  
NIP. 19680911-199603 1 002