

Research Report

Perbedaan Efektivitas Daya Antibakteri Ekstrak Daun Mimba (*Azadirachta Indica A. Juss*) dibanding NaOCl 2,5% Terhadap *Enterococcus Faecalis*

(*The Difference of Antibacterial Effectiveness of Neem Leaf Extract (Azadirachta Indica A. Juss) than NaOCl 2,5% against Enterococcus Faecalis*)

Setian Fitri Sayekti,¹ Agus Subiwahjudi² and Edhie Arif Prasetyo²

¹Mahasiswa Program Sarjana Kedokteran Gigi

²Staff Departemen Konservasi

Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Airlangga

Surabaya-Indonesia

ABSTRACT

Background. *Enterococcus faecalis* is often found in persistent endodontic infection. Its high prevalence, about 24-77%, is due to resistance and virulence of these bacteria. NaOCl is commonly use as irrigation material, but it has toxicity effect and can irritate periapical tissues. Therefore, some studies to find natural materials that have antibacterial properties as an alternative root canal medicament need to be done. Neem (*Azadirachta Indica A. Juss*), also known as wonder tree for centuries has antibacterial properties, proven in the preliminary study which has been done that the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) is 65% and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) is 70%. **Purpose.** The aim of this study was to compare the effectiveness of antibacterial activity of the Neem leaf extract (*Azadirachta Indica A. Juss*) than NaOCl 2,5% against *Enterococcus faecalis*. **Methods.** This study is an experimental laboratory with post test only control group design using *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Agar diffusion test was used to check the antimicrobial activity of 65% Neem leaf extract, 70% Neem leaf extract and NaOCl 2,5% by measuring the inhibition zone diameter of each treatment. **Result.** Diameter of bacterial inhibition zone formed Neem leaf extract is greater than NaOCl 2,5%. **Conclusion.** The antibacterial activity of Neem extract is greater than NaOCl 2,5% against *Enterococcus faecalis*.

Keywords: *Neem leaf extract (Azadirachta Indica A. Juss)*, NaOCl, *Enterococcus faecalis*

Korespondensi (*Correspondence*): Setian Fitri Sayekti, Student of Dentistry, Department of Conservative Faculty of Dentistry, Airlangga University. Jln. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: setianfitrisayekti@gmail.com

PENDAHULUAN

Perawatan saluran akar (PSA) merupakan perawatan endodontik yang paling banyak dilakukan. PSA dikatakan berhasil apabila dalam waktu observasi minimal satu tahun tidak ada keluhan dan lesi periapikal yang ada berkurang atau tetap. Keberhasilan perawatan endodontik tergantung pada beberapa faktor yaitu faktor host, preparasi, mikroorganisme dan lain-lain.¹ Dalam banyak kasus, kegagalan perawatan saluran akar merupakan akibat persistensi mikroorganisme. Mikroorganisme yang berkolonisasi di sistem saluran akar memainkan peranan penting dalam terbentuknya lesi periradikuler.² Mikroorganisme yang sering ditemukan pada saluran akar didominasi oleh bakteri anaerob. Sejumlah

penelitian melaporkan bahwa bakteri masih mungkin bertahan hidup setelah bahan pengisian saluran akar diaplikasikan.³

Bakteri *Enterococcus faecalis* secara umum ditemukan pada infeksi endodontik persisten. Prevalensi infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini mencapai angka 24-77%. Selain itu *Enterococcus faecalis* banyak ditemukan pada gigi yang dirawat saluran akarnya dengan prevalensi sebesar 30-90%.⁴ *Enterococcus faecalis* adalah bakteri anaerob fakultatif gram positif berbentuk kokus, Bakteri ini mempunyai kemampuan penetrasi ke dalam tubuli dentin sehingga memungkinkan terhindar dari instrumentasi alat-alat preparasi dan bahan irigasi yang digunakan selama preparasi biomekanik.

Pada beberapa kasus bahkan ditemukan bahwa *Enterococcus faecalis* merupakan satu-satunya bakteri yang ada pada saluran akar yang sudah diobturasi dengan lesi periradikuler.¹

NaOCl merupakan bahan irigasi utama yang belum dapat digantikan oleh bahan lainnya. Selain mempunyai daya antibakteri yang luas, juga mampu melarutkan jaringan lunak atau organik yang tidak dimiliki bahan irigasi lainnya. Tetapi bahan tersebut tidak dapat melarutkan smear layer dan dapat menghambat perlekatan sealer berbahan dasar resin.¹ Walaupun NaOCl secara in vitro sangat efektif dan benar-benar mengurangi populasi bakteri didalam saluran akar dan didalam tubulus dentin, ternyata bakteri didalam saluran akar tidak pernah hilang secara total. Kekurangan lain dari NaOCl adalah toksisitasnya. Larutan ini mampu merusak jaringan dan memiliki akses ke jaringan periradikuler dalam jumlah yang sedikit.⁵ NaOCl memiliki berbagai kekurangan yaitu mengiritasi jaringan periapikal, menodai instrumen, membakar jaringan sekitar, ketidakmampuan menghilangkan smear layer, mengurangi modulus elastik dan kekuatan lentur dentin.⁶ Konsentrasi NaOCl yang biasa digunakan adalah 0,5% sampai 5,25%. Sedangkan konsentrasi umum yang direkomendasikan adalah 2,5% karena dapat menurunkan aktivitas sitotoksik dan memiliki daya antibakteri.⁷

Manusia telah menggunakan obat-obatan herbal untuk menjaga kesehatan dan mengobati penyakit mereka selama beberapa ribu tahun, tetapi hanya sedikit yang diuji menggunakan ilmu pengetahuan modern.⁸ Seiring berkembangnya penggunaan tanaman obat dalam dunia kesehatan dengan semboyan “back to nature”, keingintahuan masyarakat terhadap khasiat dan manfaat tanaman obat semakin berkembang.⁹ Pencarian komponen bioaktif dari tanaman obat menjadi pilihan karena memiliki sifat biodegradabel, aman dan memiliki efek samping rendah.¹⁰

Azadirachta indica secara umum dikenal sebagai mimba, telah menarik perhatian dunia beberapa tahun terakhir karena sifat medisnya yang luas. Lebih dari 140 komponen telah diidentifikasi dari bagian tanaman mimba. Daun mimba berperan sebagai immunomodulator, antiinflamasi, antihiperlipidemik, antiulser, antifungal, antibakterial, antiviral, antioksidan, antimutagenik dan antikarsinogenik.¹¹ Tanaman mimba mengandung beberapa kandungan aktif yaitu alkaloid, tannin, minyak penting dan

flavonoid yang memiliki daya antibakteri. Mimba digunakan sejak jaman dahulu untuk meningkatkan kebersihan mulut dan mencegah gigi berlubang, penyakit gingiva dan periodontitis. Daun mimba mulai dieksplorasi dalam studi klinis terkontrol dalam bidang kedokteran gigi. Mimba dapat memainkan peranan penting dalam kesehatan gigi di masa depan.¹²

Tanaman mimba dikenal sebagai “wonder tree for centuries” di subkontinen India. Mimba dianggap tidak berbahaya bagi manusia, hewan, burung dan serangga yang telah disetujui oleh Agensi proteksi lingkungan US untuk digunakan pada tanaman pangan. Sekarang ini, ekstrak mimba banyak digunakan sebagai obat-obatan herbal.¹³ Beberapa variasi daya antibakteri pada bagian tubuh tanaman mimba telah dilaporkan sebelumnya. Ekstrak daun mimba memiliki daya antibakteri yang lebih kuat dibandingkan dengan batang dan biji dari tumbuhan ini.¹⁰

Pada penelitian pendahuluan dilakukan uji antibakteri untuk mencari KHM dan KBM ekstrak daun mimba dan didapatkan hasil KHM 65% dan KBM 70%. Berdasarkan beberapa penelitian yang telah ada dan berdasarkan hasil penelitian pendahuluan, maka peneliti tertarik untuk membuktikan perbedaan daya antibakteri ekstrak daun mimba dibanding NaOCl 2,5% terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*. Penelitian ini bertujuan untuk menemukan solusi larutan irigasi yang tepat untuk membunuh bakteri *Enterococcus faecalis* pada saluran akar dengan melakukan uji in vitro membandingkan efektivitas daya antibakteri ekstrak daun mimba (*Azadirachta Indica A. Juss*) dibanding NaOCl 2,5% terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.

BAHAN DAN METODE

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental laboratoris in-vitro dengan rancangan penelitian *Post Test Only Control Group Design*. Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga, Surabaya, pada bulan Juli – Oktober 2015. Sampel yang digunakan adalah bakteri *Enterococcus faecalis* tipe ATCC (*American Type Culture Collection*) 29212. Bakteri didapatkan dari stok Balai Besar Laboratorium Kesehatan (BBLK) Surabaya dan dibiakkan menggunakan *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) dalam tabung reaksi. Besar sampel minimal yang memenuhi syarat untuk dianalisa

ditentukan dengan rumus Federer, yaitu sebanyak 9 replikasi sampel.

Penelitian dimulai dengan pembuatan ekstrak daun mimba di Badan Penelitian dan Konsultasi Industri (BPKI) Ketintang Surabaya. Daun mimba dicuci bersih lalu diangin-anginkan, kemudian dikeringkan dengan oven dengan suhu 40°C sampai kering angin atau layu, diremas dan dihaluskan kemudian dimaserasi dengan larutan etanol 96% sebanyak 50 ml dan diambil filtratnya dengan penyaringan. Hasil saringan diuapkan dalam *rotatory vacuum evaporation* dengan suhu 40°C. Pada akhir proses ini didapatkan ekstrak murni bebas etanol.

Bakteri *Enterococcus faecalis* disiapkan terlebih dahulu kemudian dilakukan pembiakan dalam media BHIB. Biakan *Enterococcus faecalis* dengan suspensi 0,5 Mc farland ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) dimasukkan ke dalam *anaerobic jar* dalam suasana anaerob dan diinkubasi dalam suhu kamar (37°C) selama 24 jam. Uji antimikrobal adalah suatu uji sensitivitas suatu bahan atau obat terhadap bakteri, dengan melihat zona hambatan. Diameter zona hambatan adalah garis tengah daerah disekitar *paper disk* yang tidak terdapat pertumbuhan mikroorganisme yang ditandai dengan daerah (zona) jernih, diukur dengan alat jangka sorong dengan ketelitian 0,5 dalam satuan mm.

Penelitian dilakukan pada tiga kelompok perlakuan. Kelompok I adalah 65% ekstrak daun mimba (KHM), kelompok II adalah 70% ekstrak daun mimba (KBM) dan kelompok III adalah NaOCl 2,5%. Disiapkan *petridish* yang berisi Media Nutrient Agar dan *paper disk* steril yang dibuat dari kertas saring dengan diameter 5 mm. *Petridish* tersebut dibagi menjadi empat bagian yang ditandai dengan spidol dibalik *petridish*. Masing-masing bagian untuk kelompok I, II, III dan kontrol negatif (aquadest). *Enterococcus faecalis* diinokulasi pada *petridish* tersebut menggunakan mikropipet sebanyak 0,1 ml kemudian diratakan menggunakan *spreader*. Setelah merata, letakkan *paper disk* yang telah ditetesi oleh bahan yang akan diuji pada permukaan yang telah dibagi. *Paper disk* pertama ditetesi kelompok I (65% ekstrak daun mimba), *paper disk* kedua ditetesi kelompok II (70% ekstrak daun mimba) dan *paper disk* ketiga ditetesi kelompok III (NaOCl 2,5%) masing-masing sebanyak 10 µL dengan menggunakan mikropipet. *Petridish* tersebut diinkubasi 37°C selama 2×24 jam. Kemudian dilakukan pembacaan zona hambatan.

Parameter yang digunakan untuk mengukur daya hambat yaitu dengan mengukur garis tengah (diameter) zona terang disekitar *paper disk*. Diameter zona hambat dilakukan menggunakan jangka sorong (ketelitian 0,5 mm). Cara mengukur dilakukan dengan membalik lempeng *petridish* sehingga bagian bawah menghadap ke atas dan diletakkan di atas lampu agar seluruh daerah dapat dilihat dengan jelas. Pengamatan dilakukan pada daerah jernih disekeliling *paper disk* yang berisi tiga bahan uji dan satu bahan kontrol negatif. Pengukuran dilakukan pada dua bagian yang mempunyai garis tengah terpanjang dan bagian yang mempunyai garis tengah terpendek. Hasil penelitian pada kedua bagian ini diambil rata-ratanya.

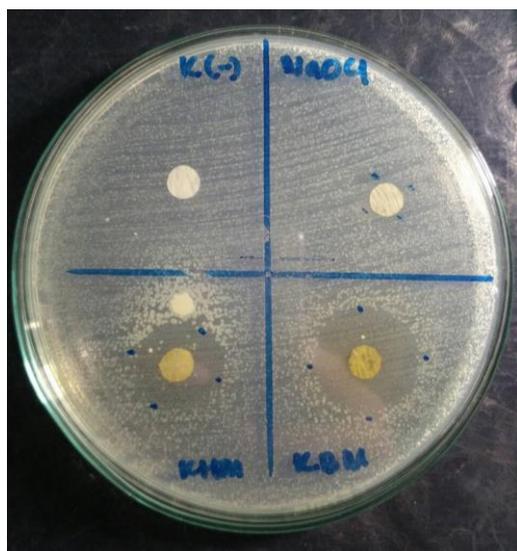
Pengolahan data menggunakan analisis statistik uji normalitas *Kolmogorov-Smirnov* untuk melihat apakah data yang didapat berdistribusi normal, kemudian dilakukan uji homogenitas varians menggunakan tes *Levene* untuk menguji kesamaan varians dari beberapa sampel. Uji parametric menggunakan *oneway annova test* untuk melihat signifikansi perbedaan jumlah koloni bakteri antar kelompok penelitian.

HASIL

Sebelum dilakukan penelitian utama, dilakukan penelitian pendahuluan yaitu penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) ekstrak daun mimba. Dilakukan metode dilusi pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, kontrol positif, dan kontrol negatif. Pada uji yang pertama didapatkan hasil KHM pada konsentrasi 50% dan KBM pada konsentersasi 100%. Karena range masih terlalu besar maka dilakukan pengenceran kembali dengan range yang lebih kecil yaitu pada konsentrasi 100%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 65%, 60%, 55%, dan 50% kemudian dilakukan inkubasi dan pengecekan *streak* kembali. Berdasarkan data yang didapat maka diketahui konsentrasi 65% adalah sebagai KHM daun mimba dan konsentrasi 70% sebagai KBM ekstrak daun mimba.

Setelah didapatkan KHM dan KBM ekstrak daun mimba, kemudian dilakukan penelitian utama yaitu menguji perbandingan daya antibakteri 65% ekstrak daun mimba (KHM), 70% ekstrak daun mimba (KBM) dan NaOCl 2,5% terhadap *Enterococcus faecalis* dengan metode difusi. Dilakukan

replikasi sebanyak 9 kali dan didapatkan hasil sebagai berikut



Gambar 1. Hasil perbandingan uji daya antibakteri KHM 65% ekstrak daun mimba, KBM 70% ekstrak daun mimba dan NaOCl 2,5% terhadap *Enterococcus faecalis* dengan metode difusi.

Zona hambat bakteri yang dibentuk oleh ekstrak daun mimba tampak lebih luas dibandingkan dengan NaOCl 2,5%. Hasil rerata pengukuran diameter zona hambat ekstrak daun mimba dan NaOCl 2,5% menunjukkan adanya perbedaan yang cukup besar. Pengukuran rata-rata diameter zona hambat menggunakan jangka sorong dari NaOCl 2,5% adalah 8,86 mm sedangkan pada KHM 65% ekstrak daun mimba sebesar 17,44 mm sedangkan pada KBM 70% ekstrak daun mimba sebesar 21,08 mm.

Analisa data yang pertama menggunakan *Kolmogorov-Smirnov Test* untuk mengetahui data yang diperoleh berdistribusi normal atau tidak. Hasil uji normalitas dengan uji *Kolmogorov Smirnov* pada 65% ekstrak daun mimba, 70% ekstrak daun mimba dan NaOCl 2,5% mempunyai nilai $p > \alpha 0.05$ yang berarti data berdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas varians sampel digunakan uji *Levene's Test*. Didapatkan bahwa nilai $p = \alpha 0,774$ ($p > \alpha 0,05$), yang berarti kelompok pengukuran tersebut memiliki varians yang homogen.

Untuk melihat adanya signifikansi perbedaan antar kelompok perlakuan, dilakukan uji perbandingan mean dengan *One-Way ANOVA* sebab data yang ada berdistribusi normal. Selain itu dalam penelitian ini bertujuan untuk membandingkan antar tiga kelompok pengukuran. Diperoleh $p = 0,000$ ($p < 0,05$) yang menunjukkan

bahwa ada perbedaan yang signifikan antar kelompok konsentrasi dan menunjukkan adanya perbedaan efektivitas. Selanjutnya dilakukan uji *Multiple Comparisons* menggunakan *Post Hoc Test* untuk mengetahui kelompok data mana yang memiliki perbedaan.

Tabel 1. Mean diameter zona hambat (Hasil uji *Multiple Comparisons* menggunakan *Post Hoc Test*)

Kelompok	Mean
NaOCl 2.5%	8.8450 mm
KHM 65%	17.4475 mm
KBM 70%	21.1538 mm

PEMBAHASAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris untuk membandingkan perbedaan daya antibakteri antara ekstrak daun mimba dibanding dengan NaOCl 2,5%. Penelitian dilakukan menggunakan bakteri *Enterococcus faecalis* karena bakteri ini banyak ditemukan pada infeksi endodontik persisten dengan prevalensi yang cukup besar yaitu 24-77%. Persistensi mikroorganisme dalam saluran akar dapat mengakibatkan kegagalan perawatan saluran akar. *Enterococcus faecalis* memiliki kemampuan penetrasi kedalam tubuli dentin dimana tidak semua bakteri memiliki kemampuan seperti ini. Selain itu bakteri ini juga memiliki faktor virulensi sehingga mampu bertahan hidup pada saluran akar. Hal ini memungkinkan terhindar dari instrumentasi alat preparasi dan bahan irigasi.

Dalam penelitian ini digunakan bahan irigasi NaOCl karena bahan ini merupakan bahan irigasi utama yang belum dapat digantikan oleh bahan lainnya.¹ Namun NaOCl masih memiliki beberapa kekurangan diantaranya tidak mampu menghilangkan smear layer dan tidak bisa menghilangkan bakteri dalam saluran akar secara total. Konsentrasi NaOCl yang dapat digunakan adalah 0,5% sampai 5,2%. Dalam sebuah penelitian dijelaskan bahwa tidak ada perbedaan daya antibakteri yang signifikan antara 1%, 2,5% dan 5%.² Konsentrasi yang lebih tinggi tidak dianjurkan karena NaOCl efek toksisitasnya juga lebih besar dan dapat mengiritasi jaringan. Konsentrasi NaOCl yang paling direkomendasikan dalam penggunaan klinis adalah 2,5%. Sehingga dalam penelitian ini dipilih

bahan irigasi NaOCl 2,5% sebagai pembanding. Dengan dilakukannya penelitian ini diharapkan bahwa ekstrak daun mimba dapat dipertimbangkan sebagai bahan sterilisasi saluran akar selain NaOCl yang selama ini sudah umum digunakan.

Penelitian ini menggunakan metode difusi, yaitu dengan membandingkan daya antibakteri antara ekstrak daun mimba dan NaOCl 2,5%. Metode ini membutuhkan waktu yang relatif singkat untuk mengamati zona hambat bakteri yang terbentuk, selain itu alat yang digunakan juga cukup sederhana dan mudah diperoleh. Hasil penelitian ini dapat diketahui dengan cara mengukur diameter zona hambat pertumbuhan bakteri menggunakan jangka sorong. Terbentuknya zona hambat tersebut menunjukkan adanya daya antibakteri bahan tersebut terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.

Hasil dari uji difusi menunjukkan bahwa zona hambat bakteri yang paling besar dimiliki oleh 70% ekstrak daun mimba, kemudian 65% ekstrak daun mimba dan yang terakhir NaOCl 2,5%. Analisa data pertama dilakukan uji normalitas pada masing-masing kelompok dengan menggunakan uji *Kolmogorov Smirnov* untuk melihat apakah distribusinya normal, dan didapatkan $p > \alpha$ 0.05 yang berarti data berdistribusi normal. Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan *Levene Test* dan didapatkan nilai $p > \alpha$ 0.05 yang berarti data pada penelitian ini homogen variansnya. Untuk melihat adanya signifikansi perbedaan antar kelompok perlakuan, dilakukan uji perbandingan mean dengan *One-Way ANOVA* sebab data yang ada berdistribusi normal dan homogen. Diperoleh $p = 0.000$ ($p < 0.005$) yang menunjukkan bahwa H_0 ditolak, yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antar kelompok konsentrasi. Data hasil uji statistik *Post Hoc Test* menunjukkan bahwa 70% ekstrak daun mimba (KBM) dapat membunuh hampir 2,5 kali lebih banyak *Enterococcus faecalis* dibanding NaOCl 2,5%. Sedangkan 65% ekstrak daun mimba (KHM) dapat membunuh hampir 2 kali lebih banyak *Enterococcus faecalis* dibanding NaOCl 2,5%.

Hambatan pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* oleh karena ekstrak daun mimba disebabkan oleh kandungan senyawa kimia yang terkandung didalamnya. Ekstrak daun mimba mengandung polyphenol, flavonoid, tannin, alkaloid, saponin dan terpenoid. Senyawa polyphenol memiliki daya antibakteri melawan bakteri patogen dalam jumlah besar. Oksidasi

polyphenol akan menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri.¹⁴ Senyawa flavonoid akan merusak struktur lipid dari DNA sehingga inti sel bakteri akan lisis dan mati.¹⁵ Tannin akan menghambat metabolisme sel, mengganggu sintesa dinding sel dan protein dengan mengganggu aktivitas enzim.¹⁶ Senyawa alkaloid bekerja dengan cara merusak DNA bakteri. Hal ini menyebabkan sel bakteri mengalami hambatan untuk bereplikasi karena replikasi sel bakteri terhambat akhirnya menyebabkan kematian bakteri.¹⁷ Senyawa saponin merupakan surfaktan yang dapat menurunkan tegangan permukaan yang mengakibatkan lisisnya sel bakteri.¹⁸ Senyawa-senyawa ini bekerjasama secara sinergis untuk membunuh bakteri

NaOCl menghambat pertumbuhan bakteri *Enterococcus faecalis* dengan cara melepaskan gugus klorin. Klorin bebas dalam NaOCl akan memecah protein menjadi asam amino.⁷ Klorin merupakan agen pengoksidasi yang kuat memberikan sifat antibakteri dengan menghambat enzim-enzim bakteri. Ion hydroxyl dalam NaOCl akan bertindak terhadap protein membran sehingga protein membrane mengalami denaturasi.¹⁹

Berdasarkan hasil dan pembahasan maka dapat disimpulkan bahwa daya antibakteri ekstrak daun mimba (*Azadirachta Indica A. Juss*) lebih besar dibanding NaOCl 2,5% terhadap bakteri *Enterococcus faecalis*.

Berdasarkan penelitian perbedaan daya antibakteri ekstrak daun mimba dibanding NaOCl 2,5% terhadap *Enterococcus faecalis*, maka diharapkan adanya penelitian lebih lanjut tentang uji efektivitas antibakteri ekstrak daun mimba secara *in vivo*, uji toksisitas dan uji antibiofilm. Penelitian lebih lanjut berfungsi agar kelak ekstrak daun mimba dapat dipertimbangkan sebagai salah satu alternatif bahan irigasi saluran akar. Selain sebagai bahan irigasi saluran akar, diharapkan adanya penelitian lebih lanjut mengenai penggunaan ekstrak daun mimba sebagai bahan sterilisasi saluran akar.

DAFTAR PUSTAKA

1. Mulyawati E.2011, Peran Bahan Disinfeksi pada Perawatan Saluran Akar, Majalah Kedokteran Gigi Ed, 18 (2): p.205-208.
2. Siqueira JF, Rocas IN, Favieri A.2000, Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%,

- 2,5% dan 5,25% sodium hypochlorite, *Journal of Endodontic* 26: 331-334
3. Siqueira, JF 2001, *Aetiology of Root Canal Treatment Failure: Why Well Treated Teeth Can Fail*, *International Endodontic Journal*, 34: 1-10. p.1.
 4. Stuart, Charles H, Schwartz, Scott A, Beson, Thomas J, Owartz CB 2006. *Enterococcus faecalis: Its role in Root Canal Treathment Failure and Current Concepts in Treatment*. *JOE* vol 32 no 2:93-8.
 5. Walton R & Torabinejad M 2008, *Prinsip & Praktik Ilmu Endodonsia*, 3rd ed. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta.
 6. Garg P, Tyagi SP, Sinha DJ, Singh UP, Malik V, Maccune ER 2015, *Comparisson of antimicrobial efficacy of propolis, Morinda citrifolia, Azadirachta indica, triphala, green tea poliphenols and 5,25% sodium hypochlorite agains Enterococcus faecalis biofilm*, *Saudi endodontic journal*, Vol 4 issue 3 122-127, p.123.
 7. Torabinejad M & Walton R 2009, *Endodontics principles and practice*, 4th ed, Elsevier Saunders.
 8. Ghonmode WN, Balsaraf OD, Tambe VH, Saujanya KP, Patil AK, Kakde DD 2013. *Comparison of the antibacterial efficiency of neem leaf extracts, grape seed extracts and 3% sodium hypochlorite against E. faecalis – An in vitro study*, Department of conservative dentistry & endodontics, SMBT Dental college & hospital, Sangamner, Maharashta, India.
 9. Arivazhagan, S, Balasenthil, S, Nagini S 2000, *Garlic and neem leaf extracts enhance hepatic glutathione and glutathione dependent enzyme during N-methyl-N-nitro-N- Herbal Remedies of Azadirachta indica and its Medical Application nitrosoguanine (MNNG-induced dastrict carsinogenesis in rats*, *Phytotherapy Research*, Pubmed online 14 (4): 291-293.
 10. Adyanthaya S, Pai V, Jose M 2014, *Antimicrobial potency of the extracts of the twigs of Azadirachta indica (neem): an in vitro study*, *Journal of Medical Plants Studies*; 2(6): 53-57.
 11. Subapriya R, Bhuvanewari V, Nagini S 2005, *Ethanolic Neem (Azadirachta indica) Leaf Extract Induces Apoptosis in the Hamster Buccal Pouch Carcinogenesis Model by Modulation of Bcl-2, Bim, Caspase 8 and Caspase 3*, *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol 6: 515-520. p. 515.
 12. Lekshmi, NJCP, Sowmia N, Viveka S, Brindha R, Jeeva S 2012. *The inhibiting effect of Azadirachta indica against dental pathogens*, *Pelagia Research Library, Asian Journal of Plants Science and Research*, 2 (1): 6-10, p. 9.
 13. Bhowmik D, Chiranjib, Yadav J, Tripathi KK, Kumar S 2010, *Journal of chemical and pharmaceutical research*, 2 (1): 62-72 p.62.
 14. Karou D, Dicko M, Simpore J, Traore A 2005, *Antioxidant and antibacterial activities of poliphenols from ethnoedicinal plants of Burkia Faso*, *Journal of Biotechnology* Vol. 4 (8), p. 823-828.
 15. Gunawan, I Wayan A. 2009. *Potensi Buah Pare (Momordica charantia L) Sebagai antibakteri Salmonella typhimurium*. Fakultas Keguruan dan Ilmu Pendidikan Universitas Mahasaraswati Denpasar.
 16. Hayati EK, Fasyah G, Sa'adah L 2010. *Fraksinasi dan Identifikasi Senyawa Tanin pada Daun Belimbing Wuluh (Averrhoa bilimbi L.)*, *Jurnal kimia* 4 (2), hal. 193-200.
 17. Hardie JM & Whiley RA. 1997. *Classification and Overview of the General Streptococcus and Enterococcus*. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*. London: Department of Oral Microbiology, St. Bartholomeus and The Royal Londn School of Medicineand Dentistry, Queen Mary and Westfield college p. 83.
 18. Jatmika A, 1998, *Aplikasi Enzim Lipase Dalam Pengolahan Minyak Sawit dan Minyak Inti Sawit untuk Produk Pangan*, *Warta Pusat Penelitian kelapa Sawit*. 6(1), p.31-37.
 19. Mohammadi Z 2008, *Sodium hypochlorite in endodotics: an update review*, *International Dental Journal* 58: 329-341.