

## Perbedaan Daya Antibakteri Ekstrak Kulit Koko (Theobroma cacao) dan NaOCl 2,5% terhadap *Porphyromonas gingivalis*

### (The Difference between Antibacterial Activity Of Cocoa Husk Extract (Theobroma cacao) And NaOCl 2.5% Against *Porphyromonas gingivalis*)

Tamara Yuanita<sup>1</sup>, Rifatul Jannah,<sup>2</sup> Edhie Arif Pasetyo<sup>1</sup>, Setyabudi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departement of Conservative, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya

<sup>2</sup>Student of Dentistry, Faculty of Dentistry, Airlangga University, Surabaya

#### ABSTRACT

**Background:** Since pulp infection plays an important role in the development of periradicular lesions, endodontic treatment should be directed to eliminate bacterial and their products. However, currently 20% of cases of apical periodontitis are not resolved after root canal treatment and therefore required for new root canal disinfection. The most commonly used irrigation material today is NaOCl 2.5%. However, NaOCl has negative effects, including being toxic when the material is injected into the periradicular tissue causing extensive pain, bleeding and swelling. Until now, many drugs come from plants that are still produced from plant extracts. One of the plants that can be utilized is cocoa (*Theobroma cacao*). Cocoa contains active compounds, such as saponins, tannins, alkaloids, flavonoids, aromatic terpenoids, theobromins and other metabolites. Cocoa husk has been studied to have an antibacterial effect on *Porphyromonas gingivalis* which is the main bacterial cause of apical periodontal. However, the difference in antibacterial activity between cocoa husk extract and NaOCl 2.5% against *Porphyromonas gingivalis* has not been studied. **Purpose:** The aim of this study is to compare antibacterial activity of cocoa husk extract and NaOCl 2.5% against *Porphyromonas gingivalis*. **Method:** This research was a laboratory experimental study. *Porphyromonas gingivalis* were swabbed to nutrient agar medium. Consequently, cocoa husk extract 25% and NaOCl 2.5% were placed in wells of 5mm diameter and nutrient agar medium. The diameter of the zone of inhibition around the test materials was measured after 24 hours. **Result:** Cocoa husk extract has lower mean inhibitory zone diameter (14.22) than NaOCl 2.5% (16.06). **Conclusion:** Cocoa husk extract has lower antibacterial activity against *Porphyromonas gingivalis* compared to NaOCl 2.5%.

**Key words:** cocoa husk extract; NaOCl 2.5%; *Porphyromonas gingivalis*.

**Korespondensi (Correspondence):** Tamara Yunita, Lecture of Departement Conservative Dentistry, Faculty of Dentistry, Airlangga University. Jln. Prof. Dr. Moestopo 47 Surabaya 60132, Indonesia. E-mail: tamara-y@fkg.unair.ac.id

#### PENDAHULUAN

Berdasarkan data Riskesdas 2013<sup>1</sup>, 25,9% penduduk Indonesia mengalami permasalahan gigi dan mulut termasuk penyakit periodontitis apikal. Periodontitis apikal adalah sebuah lesi inflamasi akut atau lesi inflamasi kronis di sekitar apeks gigi yang disebabkan infeksi pulpa dan sistem saluran akar.<sup>2</sup> Lesi ini merupakan lesi gabungan endodontik-periodontal (endo-perio) yang ditandai dengan adanya hubungan antara poket

periodontal dan pulpa gigi. Migrasi bakteri dari poket periodontal melalui tubula dentin, lateral kanal atau foramen apikal ke saluran akar di gigi yang terkena menyebabkan peradangan pulpa dan sebaliknya.<sup>3</sup>

*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) adalah bakteri batang anaerob gram negatif berpigmen hitam<sup>4</sup> yang berhubungan dengan penyakit kerusakan jaringan periodontal dan salah satu penyebab utama infeksi endodontik.<sup>3</sup>

*gingivalis* merupakan salah satu agen etiologi dan agen patogen dalam inisiasi lesi gabungan endo-perio.<sup>5</sup> Prevalensi keberadaan bakteri *P. gingivalis* lesi endo-perio mencapai 12,1% - 39,4%.<sup>6</sup> Prognosis lesi endo-perio bergantung pada kesuksesan terapi endodontik yang dilanjutkan perawatan periodontal.<sup>4</sup> Sejak infeksi pulpa memainkan peran penting dalam perkembangan lesi periradikuler, perawatan endodontik harus diarahkan untuk mengeliminasi bakteri, produk bakteri dan substrat saluran akar.<sup>7</sup>

Tujuan utama perawatan saluran akar adalah membersihkan bagian dalam rongga pulpa dan mengisi dengan bahan pengisi.<sup>8</sup> Eliminasi mikroorganisme dengan irigasi saluran akar adalah langkah penting dalam kesuksesan terapi endodontik.<sup>9</sup> Selain itu, irigasi juga berfungsi untuk mengurangi gesekan antara instrumen dan dentin, meningkatkan efektivitas pemotongan *file*, melarutkan jaringan organik dan jaringan anorganik, mendinginkan *file* dan gigi.<sup>10</sup> Akan tetapi, pada saat ini 20% kasus periodontitis apikal tidak terselesaikan setelah perawatan saluran akar dan oleh karena itu diperlukan perbaruan disinfeksi saluran akar.<sup>11</sup>

Saat ini, disinfektan permukaan seperti sodium hipoklorit (NaOCl) digunakan untuk membersihkan dan disinfeksi saluran akar.<sup>10</sup> Bahan ini merupakan antiseptik dan pelumas murah yang biasa digunakan pada pengenceran antara 0,5% sampai 5,25%. Klorin bebas NaOCl melarutkan jaringan vital dan jaringan nekrotik dengan merusak protein menjadi asam amino.<sup>12</sup> Akan tetapi, Bahan irigasi ini mempunyai kekurangan, antara lain bersifat toksik ketika diirigasikan sampai ke jaringan periradikuler<sup>12</sup> sehingga menyebabkan rasa sakit, pendarahan, serta pembengkakan atau *oedema* yang luas.<sup>13</sup>

Sampai saat ini, beberapa obat yang banyak digunakan berasal dari tanaman yang masih diproduksi dari ekstrak tanaman. Produk alami lebih baik dengan efek samping yang minimal dibandingkan

produk sintetis.<sup>14</sup> Salah satu tanaman yang dapat dimanfaatkan adalah kakao. *Theobroma cacao*, dikenal populer sebagai kakao, adalah tumbuhan hijau yang termasuk dalam famili *Malvaceae*.<sup>15</sup> Kakao adalah sebuah tanaman pertanian dan ekonomi yang tumbuh di beberapa daerah tropis termasuk Indonesia. Biji kakao merupakan bagian utama buah kakao dan bahan utama dalam pembuatan coklat.<sup>16</sup> Kakao menjadi tumbuhan *ethnomedicinal* yang penting sejak diketahui memiliki komposisi kimia unik lebih dari lima ratus senyawa yang berbeda. Di antara senyawa tersebut dilaporkan berkontribusi terhadap kesehatan manusia, ada antioksidan, antiinflamasi, antikariogenik, immunomodulator, vasodilatator dan analgesik, serta memiliki aktivitas antimikroba.<sup>17</sup> Kakao mengandung senyawa aktif, berupa saponin, tannin, alkaloid, flavonoid, terpenoid aromatik, teobromin dan banyak metabolit lain. Ada banyak penelitian yang mendukung kekayaan manfaat kakao.<sup>15</sup>

Hirao *et al.*<sup>18</sup> telah melakukan pengujian efek antibakteri kakao pada bakteri periodontal, yaitu *P. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* dan *Prevotella intermedia*, yang dibandingkan dengan efek pada *indigenous oral streptococci*. Pengujian unit pembentukan koloni atau *colony forming unit assay* (CFU assay) yang menunjukkan kakao pada konsentrasi 1.0% (w/v) dan 3.0% (w/v) mengurangi viabilitas sel bakteri dengan signifikan pada ketiga bakteri tersebut. *P. gingivalis* menunjukkan kerentanan paling nyata terhadap kakao dan musnah total dengan inkubasi kakao 3.0% (w/v) selama satu jam. Perbedaan daya antibakteri antara ekstrak kulit kakao dan NaOCl terhadap *P. gingivalis* belum pernah diteliti. Hal tersebut yang mendasari perlu dilakukan penelitian mengenai perbedaan daya antibakteri ekstrak kulit kakao dengan NaOCl 2,5% dalam membunuh bakteri *P. gingivalis*.

## METODE DAN BAHAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris *in vitro* menggunakan rancangan penelitian *post test only control group designs*. Penelitian ini dilakukan di Laboratorium *Research Center*, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga pada bulan Agustus-September 2016. Sampel penelitian ini adalah *Phorphyromonas gingivalis* 33277 yang didapat dari Laboratorium *Research Center*, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Airlangga dan dikultur dalam media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB). Besar sampel minimal yang memenuhi syarat untuk dianalisa ditentukan dengan rumus Freederer sebesar enam belas tiap kelompok perlakuan.

Pembuatan ekstrak kulit koko dilakukan di Fakultas Farmasi Universitas Khatolik Widya Mandala. Ekstrak kulit koko diekstrak menggunakan pelarut ethanol 96%. *P. gingivalis* dibuat dari stok yang berasal dari kultur dengan membuat suspensi koloni *P. gingivalis* dimasukkan kedalam *anaerobic jar* dalam suasana anaerob dan diinkubasi didalam inkubator pada suhu kamar 37°C selama 24 jam, kemudian diamati kekeruhannya untuk disetarakan dengan standar 0,5 *McFarland* ( $1,5 \times 10^8$  CFU/ml).

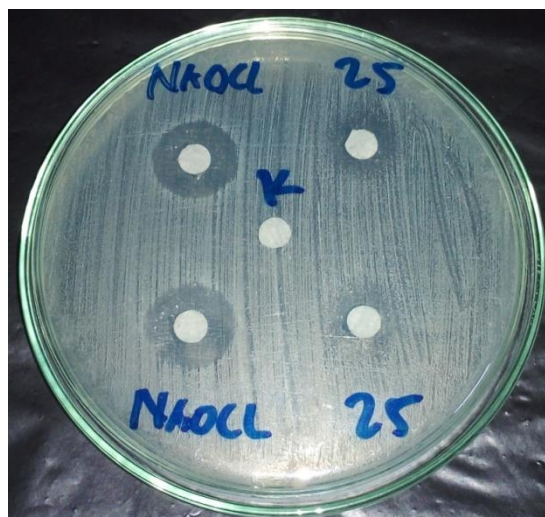
Penentuan perbedaan daya antibakteri ekstrak kulit koko dan NaOCl 2,5% dilakukan dengan metode difusi. Disediakan dua tabung berisi NaOCl 2,5% dan ekstrak kulit koko 25% yang merupakan konsentrasi bunuh minimal yang didapat dari penelitian pendahuluan. Pengambilan satu ose *P. gingivalis* dari stok, kemudian dimasukkan pada tabung BHIB, diinkubasi selama 24 jam pada

suasana anaerob di dalam *anaerobic jar* dengan suhu 37°C. Kultur *P. gingivalis* yang sudah tumbuh pada tabung BHIB distandarkan setara standar 0,5 *McFarland*. Kultur *P. gingivalis* ditanam pada media *nutrient agar* yang telah dibagi menjadi empat bagian dengan metode *spreading*. Satu *petridish nutrient agar* digunakan untuk empat bahan uji yang berbeda, yaitu sebanyak seperempat bagian. Setelah dibagi, masing-masing bagian diberikan bahan coba dan kontrol diletakkan pada tengah-tengah *petridish nutrient agar*. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam di dalam *anaerobic jar* dan dilakukan pengamatan zona hambat.

Efektivitas ekstrak kulit koko dalam menghambat pertumbuhan koloni *P. gingivalis* diketahui dengan menggunakan analisa *Independent T-test* dikarenakan penelitian menguji dua sampel yang tidak berhubungan secara langsung. Data penelitian ini menggunakan taraf kemaknaan 5% ( $\alpha = 0.05$ ).

## HASIL

Penelitian ini menguji perbedaan daya antibakteri ekstrak kulit koko dan NaOCl 2,5% dengan metode difusi. Pada penelitian ini ada satu kelompok konsentrasi ekstrak koko 25% yang merupakan konsentrasi bunuh minimal ekstrak koko, kelompok NaOCl 2,5% dan kelompok kontrol negatif (*Aqua*). Terdapat enam belas replikasi kelompok ekstrak koko 25% dan NaOCl 2,5%, serta delapan kali replikasi kelompok kontrol. Pengukuran diameter daya hambat pada penelitian ini dilakukan oleh tiga orang pengamat. Dari penelitian yang dilakukan, terlihat hasil seperti gambar di bawah ini.



**Gambar 1.** Gambaran perbedaan zona hambat pada ekstrak kulit koko 25%, NaOCl 2.5% dan Aqua sebagai kontrol negatif terhadap *P. gingivalis*.

**Tabel 1.** Nilai rerata dan standar deviasi diameter zona hambat antibakteri ekstrak kulit koko 25% dan NaOCl 2,5%.

Kelompok	N	Rata-Rata Diameter Zona Hambat (mm)	Std. Deviation
kelompok NaOCl 2,5%	16	16.063	0.11533
kelompok Koko 25%	16	14.228	0.14612

Sebelum dilakukan uji analisis antar kelompok hasil penelitian diameter zona hambat *P. gingivalis* pada NaOCl 2,5% dan ekstrak kulit koko 25%, dilakukan uji normalitas data terlebih dahulu pada masing-masing kelompok dengan menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk melihat distribusi normal. Hasil uji statistik *Shapiro-Wilk* menunjukkan bahwa data pada kelompok NaOCl 2,5% dan ekstrak kulit koko 25% memiliki nilai signifikansi  $p > 0,05$ . Hal ini menunjukkan bahwa data-data tersebut berdistribusi normal.

Selanjutnya dilakukan uji homogenitas dengan *Levene Test* yang apabila didapatkan nilai  $p > 0,05$  berarti data homogen. Berdasarkan hasil uji homogenitas didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,06 yang berarti kedua kelompok konsentrasi tersebut homogen. Kemudian, dilakukan analisis dengan *Independent Test* untuk menguji perbedaan rata-rata jika kelompok sampel yang diuji hanya ada dua buah kelompok dari populasi yang berbeda.

**Tabel 2.** Uji *Independent Test* daya antibakteri ekstrak kulit koko 25% dan NaOCl 2,5%.

Kelompok	Signifikan
Kelompok Ekstrak Koko 25%	0,000
Kelompok NaOCl 2,5%	

**Tabel 2** menunjukkan bahwa hasil uji statistik *Independent Test* menunjukkan bahwa data pada kelompok NaOCl 2,5% dan ekstrak kulit koko 25% memiliki nilai signifikansi 0,000. Nilai signifikan  $p < 0,05$  sehingga  $H_0$  ditolak,  $H_1$  diterima yang berarti ada perbedaan pada kedua kelompok sampel.

#### PEMBAHASAN

Prevalensi keberadaan bakteri *P. gingivalis* lesi endo-perio mencapai 12,1% - 39,4%.<sup>6</sup> Hal ini disebabkan karena berbagai faktor ketahanan dan virulensi dari *P. gingivalis*. *P. gingivalis* diketahui memproduksi repertoar atau faktor virulensi yang bisa berpenetrasi di *gingiva* dan menyebabkan kerusakan jaringan secara langsung maupun tidak langsung dengan menginduksi inflamasi. Bakteri ini dapat berkolonisasi dan bertahan hidup pada lesi endo-perio melalui sejumlah faktor persisten, khususnya pembentukan biofilm dengan *fimbriae* yang merupakan pensinyalan dan perekat multifungsi biofilm mikroba dan jaringan *host*.<sup>3</sup> Patogen ini menggunakan besi untuk membentuk heme yang memiliki peran penting dalam pertumbuhan dan virulensi. *Fimbriae P. gingivalis* mengganggu pensinyalan seluler melalui protein atau integrin matriks ekstraseluler di daerah jaringan periodontal. Selain itu, *fimbriae* tersebut dapat mengikat enzim saliva, protein ekstraseluler dan bakteri komensal serta juga secara kuat melekat pada integrin- $\alpha 5\beta 1$  seluler.<sup>5</sup>

Dalam penelitian ini, digunakan bahan irigasi NaOCl karena bahan ini merupakan bahan irigasi yang paling sering digunakan. Akan tetapi, NaOCl mempunyai

kekurangan, antara lain bersifat toksik ketika bahan irigasi ini diinjeksikan sampai ke jaringan periradikular<sup>12,13</sup> sehingga menyebabkan rasa sakit, pendarahan, serta pembengkakan atau *oedema* yang luas.<sup>13</sup> Konsentrasi NaOCl yang sering digunakan pada pengenceran antara 0,5% sampai 5,25%. Konsentrasi yang lebih tinggi tidak dianjurkan karena efek toksisitas bahan ini yang lebih besar dan dapat mengiritasi jaringan.<sup>12</sup> Konsentrasi yang paling direkomendasikan dalam penggunaan klinis adalah 2,5%<sup>19</sup> sehingga pada penelitian ini dipilih NaOCl 2,5% sebagai pembanding. Dengan dilakukan penelitian ini, diharapkan ekstrak kulit koko dapat dipertimbangkan menjadi bahan alternatif NaOCl sebagai bahan irigasi saluran akar yang umum digunakan.

Penentuan perbedaan daya antibakteri ekstrak kulit koko dengan daya antibakteri NaOCl 2,5% terhadap *P. gingivalis* dilakukan secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan stok bakteri *P. gingivalis*. Stok bakteri tersebut diinkubasi selama 24 jam dalam media BHIB dan disamakan dengan standar 0,5 McFarland. Pada penelitian ini, dilakukan uji antibakteri ekstrak kulit koko terhadap *P. gingivalis* terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi bunuh minimal (KBM) dengan metode penipisan seri (*serial dilution*) dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, dan 0,78%.

Hasil uji antibakteri tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kulit koko dengan konsentrasi 100%, 50%, 25% dan kontrol negatif tidak menunjukkan pertumbuhan bakteri *P. gingivalis*,

sedangkan ekstrak kulit koko dengan konsentrasi 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, dan kontrol positif menunjukkan adanya pertumbuhan bakteri *P. gingivalis*. Data tersebut menunjukkan ekstrak kulit koko pada konsentrasi 25% diduga sebagai KBM karena pada konsentrasi tersebut tidak ada pertumbuhan bakteri *P. gingivalis*. Ekstrak kulit koko pada konsentrasi 12,5% sebagai konsentrasi hambat minimal (KHM) karena pada konsentrasi tersebut mulai ada pertumbuhan *P. gingivalis*.

Setelah didapatkan KBM ekstrak kulit koko, dilakukan penelitian untuk mengetahui perbedaan daya antibakteri ekstrak kulit koko dengan NaOCl 2,5% terhadap *P. gingivalis*. Penelitian ini dilakukan secara *in vitro* dengan metode difusi. Metode ini dilakukan dengan carakertas saring lima milimeter yang ditetesi dengan konsentrasi antibiotik yang sudah diketahui dan ditempatkan pada *plate agar* yang telah diinokulasi dengan kultur bakteri yang akan diuji. *Plate agar* diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kerentanan terhadap antibiotik ditentukan dengan mengukur zona hambat di sekitar kertas saring. Penelitian dengan metode difusi ini dilakukan dengan enam belas replikasi. Hasil penelitian ini menunjukkan rata-rata zona hambat untuk ekstrak kulit koko 25% terhadap *P. gingivalis* sebesar 14,22 mm dan rata-rata zona hambat NaOCl 2,5% terhadap *P. gingivalis* sebesar 16,06 mm. Dengan demikian, NaOCl 2,5% memiliki daya antibakteri lebih besar dibandingkan ekstrak kulit koko. Hal ini menunjukkan bahwa hasil penelitian tidak sesuai dengan hipotesis.

Ekstrak kulit koko mampu membunuh *P. gingivalis* karena efek sinergis kandungan senyawa-senyawa yang terdapat pada ekstrak kulit koko yang memiliki daya antibakteri. Kulit koko (*Theobroma cacao*) memiliki kandungan senyawa aktif yaitu saponin, tannin, alkaloid, flavonoid.<sup>15</sup> Alkaloid dapat menghambat sintesis dinding sel yang akan

menyebabkan lisis pada sel sehingga sel akan mati.<sup>20</sup> Saponin meningkatkan permeabilitas membran dapat, menyebabkan denaturasi protein membran sehingga membran sel lisis.<sup>21</sup> Tanin menghambat bakteri dengan menginaktifkan adhesin sel mikroba, enzim yang menyebabkan transport protein terganggu pada lapisan dalam sel mikroba.<sup>22</sup> Tanin memiliki sifat spasmolitik yaitu mengkerutkan dinding sel atau membran sel bakteri sehingga mengganggu permeabilitas sel bakteri itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas sel bakteri, maka sel bakteri tidak dapat melakukan aktivitas sehingga terhambat atau mati.<sup>23</sup> Flavonoid berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Sebagian besar struktur dinding sel bakteri dan membran sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak. Ketidakstabilan pada dinding sel dan membran sitoplasma bakteri menyebabkan fungsi permeabilitas sel bakteri menjadi terganggu yang akan berakibat pada lolosnya makromolekul dan ion dari sel bakteri. Sel bakteri akan menjadi kehilangan bentuk dan terjadi lisis.<sup>24</sup>

Daya NaOCl 2,5% lebih besar dibandingkan ekstrak kulit koko kemungkinan karena persentase kandungan senyawa-senyawa aktif ekstrak kulit koko seperti flavonoid, saponin, alkaloid dan tannin pada konsentrasi bunuh minimal sebesar 25% lebih rendah dibandingkan dengan ekstrak kulit koko 100%. Hal ini menyebabkan daya antibakteri ekstrak kulit koko menurun dibandingkan ekstrak kulit koko murni. Oleh karena itu, daya antibakteri ekstrak kulit koko 25% lebih kecil dibandingkan NaOCl 2,5%.

Selain itu, NaOCl dapat menghambat pertumbuhan *P. gingivalis* dengan cara oksidasi ion klorin. NaOCl terionisasi dalam air menjadi  $\text{Na}^+$ , ion hipoklorit dan ion  $\text{OCl}^-$  membentuk keseimbangan dengan asam hipoklorus ( $\text{HOCl}$ ).<sup>10</sup>  $\text{HOCl}$  memiliki sifat antibakteri lebih baik dibandingkan  $\text{OCl}^-$ . Ion hidroksil

merusak baik membran lipid bakteri dan DNA serta pH tinggi menyebabkan denaturasi protein dan merusak kondisi sel yang ideal. Ion klorin merusak ikatan peptida sehingga merusak protein.<sup>25</sup> NaOCl memiliki banyak sifat sebagai agen antimikroba yang ideal dan cepat bekerja. Selain itu, bahan ini memiliki spektrum yang luas.<sup>25</sup> NaOCl bersifat antimikrobial yang baik terhadap bakteri

gram positif, bakteri gram negatif, jamur, spora, virus.<sup>13</sup> Semakin tinggi konsentrasi NaOCl, semakin toksik terhadap jaringan hidup. Oleh karena itu, penggunaan NaOCl sebagai bahan antibakteri dibatasi dibatasi pada konsentrasi tertentu. NaOCl pada konsentrasi 2,5% tidak menunjukkan perbedaan daya antibakteri yang signifikan dibandingkan dengan konsentrasi yang lebih tinggi.<sup>4</sup>

## DAFTAR PUSTAKA

1. Riset Kesehatan Dasar (Riskesdas), Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Kementerian RI tahun 2013, Diakses: 19 Oktober 2017, dari [www.depkes.go.id/resources/download/genera/Hasil%20Riskesdas%202013.pdf](http://www.depkes.go.id/resources/download/genera/Hasil%20Riskesdas%202013.pdf), 2013, p. 110.
2. Correia-Sousa, J., Madureira, A.R., Carvalho, M.F., Teles, A.M. and Pina-Vaz, I., Apical periodontitis and related risk factors: Cross-sectional study. *Revista Portuguesa de Estomatologia, Medicina Dentária e Cirurgia Maxilofacial*, 2015, 56(4), 226-232.
3. Pourhajibagher, M., Chiniforush, N., Raoofian, R., Ghorbanzadeh, R., Shahabi, Sand Bahador, A., Effects of sub-lethal doses of photo-activated disinfection against *Porphyromonas gingivalis* for pharmaceutical treatment of periodontal-endodontic lesions, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2016, 16, 50-53.
4. Rôças, IN and Siqueira, JF, Comparison of the in vivo antimicrobial effectiveness of sodium hypochlorite and chlorhexidine used as root canal irrigants: a molecular microbiology study, *Journal of endodontics*, 2011, 61(1), 5-13.
5. Mysak, J, Podzimek, S, Sommerova, P, Lyuya-Mi, Y, Bartova, J, Janatova, T, Prochazkova, J and Duskova, J, *Porphyromonas gingivalis*: major periodontopathic pathogen overview, *Journal of immunology research*, 2014, vol. 2014.
6. Puig-Silla, M, Dasí-Fernánde, F, Montiel-Company, JM and Almerich-Silla, JM, Prevalence of fimA genotypes of *Porphyromonas gingivalis* and other periodontal bacteria in a Spanish population with chronic periodontitis, *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, 2012, 17(6), 1047.
7. Demiryürek, EÖ, Kalyoncuoğlu, E, Duran, E, Çoban, AY and Çaycı, YT, Efficacy of different instrumentation techniques on reducing *Enterococcus faecalis* infection in experimentally infected root canals, *Journal of Dental Sciences*, 2014, 9(1), 23-28.
8. Erhan, E and Mustafa, G, A Root Canal Therapy on the Maxillary First Molar Tooth with Five Canals: A Case Report, *Open Journal of Stomatology*, 2015, 5(4), 102.
9. Silveira, LFM, Silveira, CF, Martos, J and de Castro, LAS, Evaluation of the different irrigation regimens with sodium hypochlorite and EDTA in removing the smear layer during root canal preparation, *Journal of Microscopy and Ultrastructure*, 2013, 1(1), 51-56.
10. Haapasalo, M, Shen, Y, Wang, Z and Gao, Y, Irrigation in endodontics, *British dental journal*, 2014, 216(6), 299-303.
11. Van Der Waal, SV, Oonk, CA, Nieman, SH, Wesselink, PR, De Soet, JJ and Crielaard, W, Additional disinfection with a modified salt solution in a root canal model, *Journal of dentistry*, 2015, 43(10), 1280-1284.
12. American Association Endodontics, Endodontic (colleagues of excellence), 2011, Chicago, Available from: [https://www.aae.org/uploadedfiles/publications\\_and\\_research/endodontics\\_colleagues\\_for\\_excellence\\_newsletter/rootcanalirrigantsdisinfectants.pdf](https://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/endodontics_colleagues_for_excellence_newsletter/rootcanalirrigantsdisinfectants.pdf).
13. Lam, TSK, Wong, OF and Tang, SYH, A case report of sodium hypochlorite, *Hong*

- Kong Journal of Emergency Medicine*, 2010,17(2), 174-175.
14. Nwonkonkwo and DC, Okeke, GN, The Chemical Constituents and Biological Activities of Stem Bark Extract of *Theobroma cacao*, *Global Journal*, 2014,14(4), 35-40.
  15. Abraham, J, Singh,N, Datta, S, Dey, A, and Chowdhury, AR. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Theobroma cacao* extracts. *Der Pharmacia Lettre*, 2015, 7 (7):287-294.
  16. Adi-Dako O, Ofori-Kwakye K, Frimpong Manso S, Boakye-Gyasi ME, Sasu C, Pobee M. Physicochemical and antimicrobial properties of cocoa pod husk pectin intended as a versatile pharmaceutical excipient and nutraceutical. *Journal of pharmaceutics*.2016, 2016.
  17. Santos RX, Oliveira DA, Sodr  GA, Gosmann G, Brendel M, Pungartnik C. Antimicrobial activity of fermented theobroma cacao pod husk extract. *Genetics and Molecular Research*. 2014, 13(3):7725-35.
  18. Hirao, C, Nishimura, E, Kamei, M, Ohshima, T and Maeda, N, Antibacterial effects of cocoa on periodontal pathogenic bacteria, *Journal of Oral Biosciences*, 2010,52(3), 283-291.
  19. Aubut, V, Pommel, L, Verhille, B, Orsi re, T, Garcia, S, About, I and Camps, J, Biological properties of a neutralized 2.5% sodium hypochlorite solution, *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, 2010,109(2), 120-125.
  20. Gonz lez-Lamothe, R, Mitchell, G, Gattuso, M, Diarra, MS, Malouin, F and Bouarab, K, Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens, *International Journal of Molecular Sciences*, 2009, 10(8), 3400-3419.
  21. Sudji, IR, 2015, *Bioactivity of Steroid and Triterpenoid Saponins: Influence on Membrane Permeability and Drug Absorption*, Dr Dissertation, Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany, pp. 12-25.
  22. Hakim, MD, Tjahjaningsing, W, Susarno and Abdillah, AA, The effect of red algae (*Kappaphycus alvarezii*) against the total number of bacteria and organoleptic value of mackerel (*Rastrelliger sp.*), *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*,2015,7(1), 106.
  23. Hariyati, T, Jekti, DSD and Andayani, Y.,Pengaruh ekstrak etanol daun jambu air (*Syzygium aqueum*) terhadap bakteri isolat klinis, *E-Journal Pendidikan IPA*,2015, 1(2),35.
  24. Nanin, DR, 'Daya antibakteri tumbuhan majapahit (*Crescentia cujete L.*) terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus*', *Jurusan Biologi Fakultas Matematika Ilmu Pengetahuan Alam Institut Teknologi Sepuluh Nopember*, 2010,p. 9.
  25. Darcey, J, Jawad, S, Taylor, C, Roudsari, RV and Hunter, M, Modern Endodontic Principles Part 4: Irrigation, *Dental update*, 2016,43(1), 20.