

PENGARUH MINYAK ATSIRI KAPULAGA (*Amomum cardamomum*) TERHADAP KADAR METIL MERKAPTAN YANG DIHASILKAN BAKTERI *Porphyromonas gingivalis* (Kajian *In Vitro*)

Nuning Wahyu Utami*, Ivan Arie Wahyudi**, & Sri Larnani**

*Pendidikan Dokter Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

**Bagian Biomedika Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRAK

Latar belakang: Halitosis disebabkan pembentukan senyawa-senyawa sulfur atau *Volatile Sulfur Compound (VSC)* oleh bakteri. Metil merkaptan merupakan komponen *VSC* yang paling dominan menyebabkan bau pada halitosis. Agen antibakteri digunakan untuk mengatasi halitosis dengan cara menurunkan kadar metil merkaptan yang dihasilkan bakteri. Minyak atsiri kapulaga (*Amomum cardamomum*) diduga memiliki khasiat anti bakteri. **Tujuan** penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh minyak atsiri kapulaga (*Amomum cardamomum*) terhadap kadar metil merkaptan yang dihasilkan *Porphyromonas gingivalis*. **Metode penelitian:** Setiap sumuran pada *microplate* ditetesi minyak atsiri kapulaga (*Amomum cardamomum*) konsentrasi minyak atsiri kapulaga 0% (kontrol negatif), 6,25%, 12,5%, 25%, 50%. Selanjutnya setiap sumuran yang telah ditetesi minyak atsiri kapulaga berbagai konsentrasi, kemudian ditetesi suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada media TSB dan diinkubasi anaerob selama 48 jam. Tiap perlakuan menggunakan sampel sebanyak 5 sehingga sumuran yang dibutuhkan sebanyak 25. Setelah itu, semua sumuran ditetesi metionin dan DTNB kemudian diinkubasi anaerob selama 12 jam. Hasil inkubasi tersebut kemudian dilihat absorbansi metil merkaptan dengan *microplate reader*. **Hasil penelitian:** Absorbansi kadar metil merkaptan yang dihasilkan pada minyak atsiri kapulaga 0%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50% secara berurutan adalah 1,38, 0,217, 0,215, 0,204, 0,196. Minyak atsiri kapulaga (*Amomum cardamomum*) berpengaruh terhadap kadar metil merkaptan yang dihasilkan *Porphyromonas gingivalis*. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok minyak atsiri kapulaga konsentrasi 0% sebagai kontrol negatif dengan minyak atsiri kapulaga 6,25%, 12,5%, 25%, 50% dan tidak ada perbedaan bermakna antara minyak atsiri kapulaga konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%. **Kesimpulan:** Minyak atsiri kapulaga (*Amomum cardamomum*) dapat menurunkan kadar metil merkaptan yang dihasilkan bakteri *Porphyromonas gingivalis*. *Maj Ked Gi*; Juni 2012; 19(1): 17-20

Kata kunci: Kapulaga (*Amomum cardamomum*), *Porphyromonas gingivalis*, metil merkaptan.

ABSTRACT

Background: Halitosis is caused by the formation of sulfur compounds or *Volatile Sulfur Compound (VSC)* by bacteria. Methyl mercaptan is the main compound that causes halitosis. Antibacterial agents are often used to treat halitosis by reducing level of methyl mercaptan produced by bacteria. One of the antibacterial agents derived from natural plant oil is cardamom (*Amomum cardamomum*). **The objective** of this study was to determine the effect of essential oil of cardamom (*Amomum cardamomum*) on methyl mercaptan level produced by *Porphyromonas gingivalis*. **Method:** Essential oil of cardamom (*Amomum cardamomum*) was expelled on every well on *microplate* in concentration of 0% (as negative control), 6.25%, 12.5%, 25%, 50%. All wells that have been expelled with cardamom essential oil in different concentration then etched with *Porphyromonas gingivalis* bacterial suspension in TSB media and were incubated anaerobically for 48 hours. Each treatment group had 5 samples so that 25 wells were needed. After that, all the wells etched with DTNB methionine and were incubated anaerobically for 12 hours. The results of those incubation were observed the absorbance of methyl mercaptan with *microplate reader*. **Result:** Absorbantion level of methyl mercaptan were produced cardamom essential oil in concentration 0%, 6.25%, 12.5%, 25%, 50% in sequence 1.38, 0.217, 0.215, 0.204, 0.196. The essential oil of cardamom (*Amomum cardamomum*) affected the levels of methyl mercaptan produced *Porphyromonas gingivalis*. There was significant difference between group of cardamom essential oils in concentration 0% as negative control with group of cardamom essential oil in concentration 0%, 6.25%, 12.5%, 25%, 50%, and no significant difference between the groups of cardamom essential oil in concentration of 6.25%, 12.5%, 25%, 50%. **Conclusion:** The essential oil of cardamom (*Amomum cardamomum*) could decrease methyl mercaptan level produced by *Porphyromonas gingivalis*. *Maj Ked Gi*; Juni 2012; 19(1): 17-20

Key words: Cardamom (*Amomum cardamomum*), *Porphyromonas gingivalis*, methyl mercaptan.

PENDAHULUAN

Halitosis merupakan kejadian umum yang dikeluarkan semua kelompok umur dan merupakan

masalah kesehatan gigi dan mulut yang banyak dikeluarkan oleh masyarakat. Halitosis sering disebut juga sebagai bau mulut. Kata halitosis berasal dari *halitus* (bahasa Latin) yang artinya nafas dan *-osis* (bahasa

Yunani) yang artinya kondisi abnormal. Halitosis digunakan untuk menggambarkan bau busuk yang berasal dari mulut. Bau mulut juga dikenal dengan beberapa nama lain yaitu ozostomia, stomatodysodia, halitosis (baik halitosis patologis maupun fisiologis), *fetor oris*, dan *fetor ex ore*.^{1,2}

Halitosis disebabkan aktivitas bakteri pada sisa makanan dan sel-sel epitel yang terdapat pada rongga mulut serta akan menghasilkan *Volatile Sulfur Compound (VSC)*. Gas-gas VSC umumnya terdiri dari H₂S (hidrogen sulfid), CH₃SH (metil merkaptan), dan (CH₃)₂S (dimetil sulfid). Metil merkaptan merupakan komponen gas yang paling menyebabkan bau pada halitosis.^{3,4} Terdapat 3 asam amino utama yang menghasilkan VSC yaitu L-cystein menghasilkan H₂S, L-methionine menghasilkan CH₃SH, dan L-cistine menghasilkan (CH₃)₂S.⁵

Bakteri yang berperan dalam produksi VSC penyebab halitosis adalah *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis*, *Treponema denticola*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Atopobium parvulum*, *Campylobacter rectus*, *Desulfovibrio sp.*, *Eikenella corrodens*, *Eubacterium sulci*, *Fusobacterium sp.*, dan *Peptostreptococcus micros*.³ *Porphyromonas gingivalis* merupakan bakteri yang menghasilkan (CH₃)₂S (metil merkaptan) yang cukup banyak pada serum manusia.⁶ Penelitian yang telah dilakukan menguji kemampuan *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Escherichia coli* dan 2 strain *Porphyromonas gingivalis* dalam pembentukan metil merkaptan yang berasal dari metionin. Kedua strain bakteri *Porphyromonas gingivalis* menghasilkan metil merkaptan paling banyak dibandingkan dengan *Fusobacterium nucleatum*, sedangkan *Actinobacillus actinomycetemcomitans* dan *Escherichia coli* tidak menghasilkan metil merkaptan.⁷

Tanaman kapulaga di Indonesia terdiri dari dua jenis yaitu kapulaga lokal (*Amomum cardamomum*) dan kapulaga sabrang (*Elettaria cardamomum*).⁸ Tanaman kapulaga termasuk dalam rempah-rempah yang memiliki berbagai macam manfaat, diantaranya dimanfaatkan sebagai obat.⁹ Berdasarkan penelitian yang dilakukan didapatkan hasil bahwa ekstrak kapulaga dapat menghambat pertumbuhan aktivitas bakteri Gram negatif *Escherichia coli*. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa kapulaga mempunyai daya antibakteri.¹⁰

Kapulaga mengandung saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri.¹¹ Biji tanaman kapulaga mengandung minyak atsiri, dimana dalam minyak atsirinya terdiri atas senyawa alfa bornel, dan beta kamfer.¹² Tumbuhan kapulaga mengandung minyak atsiri sineol, terpeniol, dan borneol.¹³ Sediaan dalam bentuk minyak atsiri mempunyai aktivitas antimikroba terhadap bakteri patogen.¹⁰ Kapulaga dikenal sebagai ekspectoran sekaligus antibakteri. Beberapa penelitian menunjukkan bahwa rahasia khasiat ini

berasal dari kandungan minyak atsiri sineol.¹⁴ Tujuan penelitian adalah untuk mengetahui pengaruh minyak atsiri kapulaga (*Amomum cardamomum*) terhadap kadar metil merkaptan yang dihasilkan oleh bakteri *Porphyromonas gingivalis*.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan koloni bakteri *Porphyromonas gingivalis* yang telah dibiakkan oleh Laboratorium Mikrobiologi Balai Laboratorium Kesehatan (BLK) Ngadinegaran, Yogyakarta. Dalam penelitian ini terdiri atas 5 kelompok perlakuan yaitu minyak atsiri kapulaga 0% (sebagai kontrol negatif), minyak atsiri kapulaga dengan konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50%, masing-masing kelompok terdiri dari 5 sampel sehingga keseluruhan terdapat 25 sampel.

Determinasi tumbuhan kapulaga dilakukan di bagian analisis tumbuhan alam di Laboratorium Unit II Bagian Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pembuatan minyak atsiri kapulaga dilakukan di Laboratorium Penelitian dan Pengujian Terpadu (LPPT) Unit III Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pembuatan minyak atsiri kapulaga dilakukan dengan menggunakan metode destilasi uap air. Pengenceran minyak atsiri kapulaga dilakukan dengan menggunakan pelarut PEG 5% (Polietilenglikol) sehingga mendapatkan konsentrasi sebesar 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50%.

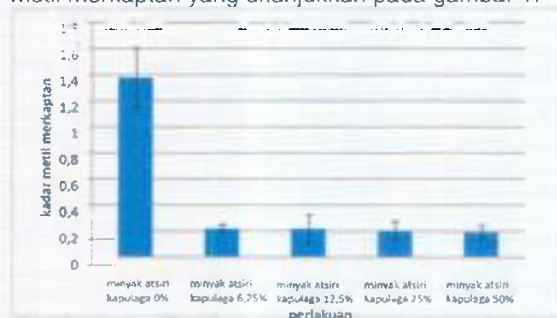
Penelitian ini menggunakan suspensi bakteri *Porphyromonas gingivalis* pada media TSB dan disetarakan dengan standar Mc Farland 0,5 (10⁸ CFU/ml). Sebanyak 30 µl suspensi bakteri ditumbuhkan pada *microplate 96 wells* yang berisi minyak atsiri kapulaga dengan berbagai konsentrasi (6,25%, 12,5%, 25%, 50%) dan minyak atsiri kapulaga 0% (sebagai kontrol negatif) sebanyak 30 µl, kemudian diinkubasi dibawah kondisi anaerobik pada inkubator selama 48 jam. Hasil inkubasi antara bakteri dan minyak atsiri dengan berbagai konsentrasi, dan bakteri dengan minyak atsiri kapulaga 0% (kontrol negatif) ditambahkan 30 µl metionin 0,6% dan 30 µl DTNB 0,006%. Larutan reagen DTNB dibuat dengan melarutkan reagen tersebut dengan larutan buffer yang terdiri dari NaOH 0,1M dan EDTA 0,001M pada pH 7,27. Kemudian dilakukan inkubasi lagi pada kondisi anaerob selama 12 jam setelah penambahan metionin dan reagen DTNB pada setiap sumuran tersebut. Hasil inkubasi ini berupa metil merkaptan yang dapat diukur dengan melihat absorbansi intensitas warna kuning menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 415 nm. Warna kuning ini merupakan hasil reaksi antara reagen DTNB dengan metil merkaptan yang dihasilkan pada penelitian ini. Reagen DTNB akan bereaksi dengan gugus thiol bebas dan menghasilkan senyawa TNB dengan ditandainya warna kuning.

Pembacaan hasil intensitas warna kuning dibandingkan pada berbagai perlakuan yaitu antara minyak atsiri kapulaga konsentrasi 0%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%. Semakin tinggi intensitas warna kuning yang dihasilkan maka semakin banyak pula metil merkaptan yang dihasilkan dari metabolisme bakteri *Porphyromonas gingivalis* dengan metionin. Begitu pula sebaliknya, semakin rendah intensitas warna kuning yang dihasilkan maka semakin sedikit pula jumlah metil merkaptan yang dihasilkan.

HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

HASIL

Hasil penelitian ini merupakan data kuantitatif berupa kadar metil merkaptan yang diukur dengan menggunakan *microplate reader* pada kelompok perlakuan, yaitu kontrol negatif (minyak atsiri kapulaga 0%), dan minyak atsiri kapulaga (konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%). Berdasarkan hasil penghitungan kadar metil merkaptan yang dihasilkan dengan menggunakan *microplate reader*, diperoleh data rerata dan simpangan baku hasil absorbansi kadar metil merkaptan yang ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 1. Gambaran Rerata Absorbansi Kadar Metil Merkaptan Pada Kelompok Minyak Atsiri Kapulaga 0%;6,25%;12,5%; 25%;50%

Berdasarkan uji normalitas dengan menggunakan metode *Saphiro-Wilk* (taraf kepercayaan 95%) semua data terdistribusi normal ($p > 0,05$). Uji homogenitas varian dilakukan dengan uji *Levene* (taraf kepercayaan 95%) dan didapatkan nilai signifikansi sebesar 0,000. Hal ini menunjukkan bahwa data penelitian yang tidak homogen ($p < 0,05$). Data penelitian yang diperoleh terdistribusi normal akan tetapi tidak homogen, maka uji Anava satu jalur tidak dapat dilakukan karena syarat dapat dilakukan uji tersebut adalah data terdistribusi normal dan homogen. Oleh karena itu, dilakukan transformasi data agar homogen. Setelah dilakukan transformasi data, dilakukan uji homogenitas varian dengan uji *Levene* (taraf kepercayaan 95%) terhadap data yang telah ditransformasikan. Hasil dari uji homogenitas varian terhadap data yang sudah ditransformasikan dida-

patkan nilai signifikansi sebesar 0,375. Nilai signifikansi menunjukkan bahwa data sudah homogen ($p > 0,05$). Selanjutnya dapat dilakukan uji Anava satu jalur karena data berdistribusi normal dan homogen. Berdasarkan hasil uji Anava satu jalur dapat dilihat bahwa perlakuan yang diberikan antar kelompok memiliki perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji *LSD (Least Significant Different)* dengan taraf kepercayaan 95% terhadap absorbansi kadar metil merkaptan. Ada perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$) antara kelompok minyak atsiri kapulaga 0% dengan kelompok minyak atsiri kapulaga pada semua konsentrasi yaitu konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50%. Tidak ada perbedaan yang signifikan ($p > 0,05$) antar kelompok minyak atsiri kapulaga konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50%.

PEMBAHASAN

Metionin digunakan sebagai sumber karbon dan nitrogen oleh bakteri.¹⁵ Bakteri akan mengubah metionin dengan menggunakan enzim methionase (METase) yang merupakan *pyridoxal-5-phosphate (PLP) depending enzyme* menjadi beberapa senyawa, diantaranya alfa-ketobutirat, metil merkaptan, dan amonia.¹⁶

Metil merkaptan pada penelitian ini diukur dengan menggunakan suatu reagen yang bernama DTNB 5-5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid). Reagen ini merupakan reagen yang digunakan untuk menghitung adanya gugus thiol (-SH) pada suatu senyawa.¹⁷ Reaksi yang terjadi antara DTNB dengan gugus thiol bebas (-SH) yang terikat pada ikatan protein adalah sebagai berikut: $DTNB + R-SH \rightarrow TNB + RS-TNB$. Berdasarkan reaksi tersebut, apabila DTNB bereaksi dengan senyawa metil merkaptan (CH_3SH) maka reaksi yang terjadi adalah sebagai berikut: $DTNB + CH_3-SH \rightarrow TNB + CH_3S-TNB$.¹⁸ Senyawa TNB (2-nitro-5-thiobenzoic acid) inilah yang menyebabkan terjadinya warna kuning.¹⁹ Senyawa TNB yang terbentuk dapat digunakan untuk mendeteksi kadar gugus thiol yang terdapat pada suatu senyawa. Jumlah TNB yang dihasilkan sebanding dengan jumlah gugus thiol pada suatu senyawa yang dideteksi. Apabila TNB yang dihasilkan banyak maka dapat diartikan bahwa kadar gugus thiol pada suatu senyawa tersebut juga banyak begitu juga sebaliknya.²⁰

Hasil penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa terdapat pengaruh antara minyak atsiri kapulaga (*Amomum cardamomum*) terhadap kadar metil merkaptan yang dihasilkan bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Hal ini menunjukkan bahwa minyak atsiri kapulaga (*Amomum cardamomum*) memiliki efek antibakteri. Hasil uji Anava satu jalur yang telah dilakukan didapat hasil bahwa terdapat perbedaan yang bermakna terhadap kadar metil merkaptan yang dihasilkan antara kelompok minyak atsiri kapulaga 0% dengan kelompok minyak atsiri kapulaga

berbagai konsentrasi.

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa kadar metil merkaptan yang dihasilkan antara kelompok minyak atsiri kapulaga 0% dengan kelompok minyak atsiri kapulaga pada konsentrasi yang berbeda 6,25%, 12,5%, 25%, 50% memiliki perbedaan yang bermakna. Hal ini disebabkan karena minyak atsiri bersifat sebagai antibakteri sehingga dapat menurunkan metil merkaptan yang dihasilkan bakteri. Kapulaga dikenal sebagai salah satu tanaman yang dapat bersifat antibakteri.¹⁴ Komponen utama minyak atsiri kapulaga lokal (*Amomum cardamomum*) adalah sineol.¹² Zat aktif yang diduga berfungsi sebagai agen antibakteri pada minyak atsiri kapulaga adalah sineol. Kandungan minyak atsiri sineol pada kapulaga merupakan zat yang berfungsi sebagai agen antibakteri.¹⁴ Sifat antibakteri sineol dapat dilihat dengan adanya mekanisme penurunan toleransi bakteri terhadap NaCl.⁴³ Penurunan toleransi bakteri terhadap NaCl menunjukkan adanya kerusakan pada membran sel. Kerusakan membran sel akan menyebabkan perubahan osmosis sel.²⁴ Membran sel memelihara integritas komponen-komponen seluler sehingga apabila terjadi kerusakan pada membran akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau kematian sel.²⁵

Hasil yang didapatkan pada penelitian menunjukkan bahwa metil merkaptan yang dihasilkan antar kelompok minyak atsiri kapulaga konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, dan 50% tidak terdapat perbedaan yang bermakna. Hal ini juga membuktikan bahwa daya antibakteri minyak atsiri kapulaga pada konsentrasi yang berbeda memiliki perbedaan yang tidak bermakna. Minyak atsiri kapulaga pada konsentrasi yang lebih kecil memiliki aktivitas antibakteri yang hampir sama dengan minyak atsiri kapulaga pada konsentrasi yang lebih besar.

KESIMPULAN

Minyak atsiri kapulaga (*Amomum cardamomum*) dapat menurunkan kadar metil merkaptan yang dihasilkan bakteri *Porphyromonas gingivalis*. Pengaruh minyak atsiri pada konsentrasi berbeda terhadap kadar metil merkaptan yang dihasilkan tidak berbeda secara bermakna.

DAFTAR PUSTAKA

1. Redaksi Kompas, *Bau Mulut Tak Sebatas Urusan Kosmetik*, <http://lipsus.kompas.com/jalanjalan/read/2008/01/10/23132650/Bau.Mulut.Tak.Sebatas.Urusan.Kosmetik>, diunduh tanggal 3/12/11
2. Gupta, P.V., *Differential Diagnosis of Dental Disease*, Jaypee Brothers Medical Publishers, NewDelhi, 2008:201
3. Ongole, R., Shenoy, N., Halitosis: Much Beyond Oral Malodor, *Kathmandu University Medical Journal.*, 2010, 8(2): 269-270
4. Kotz, J.C., Treichel, P.M., Weaver, G.C., Townsend, J.R., , *Chemistry & Chemical Reactivity*, 7th edition, Brooks/Cole, Belmont, 2010:541
5. Djaya, A., Halitosis, *Dental Lintas Mediatama*, Jakarta, 2000:21
6. Persson, S., Edlund, M. B., Claesson, R., Carlsson, J., The Formation of Hydrogen Sulfide and Methyl Mercaptan by Oral Bacteria., *Oral Microbiol Immunol.*, 1990, 5: 195-201 (Abstr.), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2082242>, 3/12/2011
7. Yoshimura, M., Nakano, Y., Yamashita, Y., Oho, T., Saito, T., Koga, T., , Formation of Methyl Mercaptan from L-Methionine by *Porphyromonas gingivalis*., *American Society for Microbiology*, 2000, 6(12): 6915
8. Falah, R.N., *Budidaya Kapulaga*, http://www2.bbpp-lembang.info/index.php?option=com_content&view=article&id=246&Itemid=304, diunduh tanggal 13/10/2011
9. Hemawati, R., *Ragam Manfaat Kapulaga*, <http://www.mediaindonesia.com/mediahidupsehat/index.php/read/2009/08/07/1466/9/Ragam-Manfaat-Kapulaga>, diunduh tanggal 4/12/2011
10. Mapiliandri, I., Herawati, Irawan, C., Widijantie, N., Aktivitas Antimikroba dari Oleoresin Beberapa Tanaman Rempah, *Warta Akrab.*, 2008, 19:1-2
11. Maryani, H., dan Suharmati, *Tanaman Obat untuk Mengatasi Penyakit pada Usia Lanjut*, Agromedia Pustaka, Jakarta, 2003:28
12. Sudiarto dan Yusron, M., Kapulaga *Amomum compactum* Maton, dalam Supriadi (ed): *Tumbuhan Obat Indonesia Penggunaan dan Khasiatnya*, Pustaka Populer Obor, Jakarta, 2001:43
13. Tampubolon, O.T., *Tumbuhan Obat Bagi Pecinta Alam*, Bhartara Karya Aksara, Jakarta, 1981:61
14. Redaksi Tribun Timur, *Inilah Herbal Penangkal Bau Mulut*, <http://202.146.4.121/printnews/artikel/124250>, diunduh tanggal 16/11/2011
15. Laakso, S., Soderling, E., Nurmiikko, V., Methionine Degradation by *Pseudomonas fluorescens* UK1 and Its Methionine-utilizing Mutant, *Journal of General Microbiology.*, 1976, 94:305-312 (Abstr.)
16. Veronese, F.M., *PEGylated Protein Drugs: Basic Science and Clinical Applications*, Birkhauser Verlag, Basel, 2009:264
17. Sen, K.C., Packer, L., Hanninen, O., *Handbook of Oxidant and Antioxidants in Exercise*, 2000:449
18. Landino, L.M., Protein Thiol Modification By Peroxynitrite Anion and Nitric Oxide Donors , dalam Cadenas, E., Packer, L. (ed): *Methods in Enzymology*, volume 440, Elsevier, California, 2008:103
19. Scope, R.K., *Protein Purification*, Springer, New York, 1994:63
20. Black, S.D., *Ellman's Reagent/dtnb (Protocol)*, <http://www.bio.net/bionet/mm/methods/1994-October/020180.html>, diunduh tanggal 17/04/2012
21. Ma'mun, Karakteristik Beberapa Minyak Atsiri Famili Zingiberaceae dalam Perdagangan, *Bul.Litro.*, 2006, 17(2):94
22. Carson, C.F., Mee, B.J., Riley, T.V., Mechanism of Action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) Oil on *Staphylococcus aureus* Determined by Time-Kill, Lysis, Leakage, and Salt Tolerance Assays and Electron Microscopy, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.*, 2002, 46(6):1918
23. Iandolo, J.J., Ordal, Z.J., Repair of Thermal Injury of *Staphylococcus aureus*, *Journal of Bacteriology.*, 1966, 91(1):134-142 (Abstr)
24. Pelczar, M.J., Chan, E.C.S., *Dasar-Dasar Mikrobiologi*, UI Pres, Jakarta, 1988:453, 457