

IDENTIFIKASI DAN UJI SENSITIFITAS ISOLAT BAKTERI DARI PLAK GIGI PASIEN DENGAN TUMPATAN AMALGAM DI PUSKESMAS TIKALA BARU MANADO TERHADAP ANTIBIOTIK GOLONGAN SEFALOSPORIN (CEFIXIME) DAN LINKOSAMIDA (LINKOMISIN)

Yuni Wahyunita¹⁾, Fatimawali¹⁾, Sri Sudewi¹⁾

¹⁾Program Studi Farmasi FMIPA UNSRAT Manado, 95115

ABSTRACT

Diseases that often occur in the oral cavity and teeth are caries and periodontal disease. The main cause is the excessive accumulation of dental plaque, one attempt to control dental plaque is done by inhibiting the growth of bacteria using antibiotics. This study aims to determine the level of bacterial sensitivity isolated and identified from dental plaque against cephalosporin (cefixime) and linkosamide (lyncomycin) class antibiotics. This research was conducted by taking samples of dental plaque from 3 patients at Tikala Baru Community Health Center Manado for made the isolation and identification. The result obtained from 15 isolated bacteria were Brucella sp., Staphylococcus sp., and Phenylobacterium sp. The identified bacteria were 100% sensitive to cefixime antibiotics and 80% resistant to antibiotic lyncomycin.

Keywords : Dental plaque, bacteria, identification, sensitive, cefixime, lyncomycin

ABSTRAK

Penyakit yang sering terjadi pada rongga mulut dan gigi adalah karies dan penyakit periodontal. Penyebab utamanya yaitu adanya penimbunan plak gigi yang berlebihan, salah satu usaha untuk mengontrol plak gigi dilakukan dengan menghambat pertumbuhan bakteri menggunakan antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan tingkat sensitifitas bakteri yang diisolasi dan diidentifikasi dari plak gigi terhadap antibiotik golongan sefalosporin (cefixime) dan golongan linkosamida (linkomisin). Penelitian ini dilakukan dengan mengambil sampel plak gigi dari 3 pasien di puskesmas Tikala Baru Manado untuk dilakukan isolasi dan idntifikasi. Hasil penelitian didapatkan dari 15 bakteri yang diisolasi adalah bakteri Brucella sp., Staphylococcus sp dan Phenylobacterium sp.. Bakteri yang teridentifikasi yaitu 100% sensitif terhadap antibiotik cefixime dan 80% resisten terhadap antibiotik linkomisin.

Kata kunci : Plak gigi, bakteri, identifikasi , sensitif , cefixime, linkomisin

PENDAHULUAN

Kesehatan rongga mulut merupakan bagian integral dari kesehatan dan kesejahteraan tubuh secara umum yang sangat berpengaruh terhadap kualitas hidup seseorang (Putri, 2012). Salah satu bagian utama dari rongga mulut adalah gigi. Perawatan penting dilakukan untuk menjaga kesehatan gigi, apabila gigi tidak dirawat dengan baik, maka tidak menutup kemungkinan gigi akan berlubang hingga gigi menjadi copot, sehingga tambalan gigi merupakan salah satu cara untuk memperbaiki kerusakan gigi agar gigi bisa kembali ke bentuknya semula dan bisa kembali berfungsi dengan baik. Tambalan yang umum digunakan adalah dengan tambalan amalgam (Ramadhan, 2010).

Gigi yang telah mengalami kerusakan akan menyebabkan penyakit pada rongga mulut seperti karies dan penyakit periodontal (Soebroto, 2009). Plak merupakan Proses awal terjadinya penyakit pada gigi. Plak gigi disebabkan oleh bakteri seperti *Streptococcus mutans* (Pratiwi, 2005). Salah satu usaha untuk mengontrol plak gigi dapat dilakukan dengan menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara menggunakan antibiotik. Salah satu terapi yang digunakan yaitu dengan antibiotik cefixim dari golongan sefalosporin dan linkomisin dari antibiotik golongan linkosamid. Sefalosporin adalah antibiotik spektrum luas yang efektif terhadap beberapa jenis bakteri dan kuman anaerob (Katzung, 2007), sedangkan antibiotik golongan linkosamid yaitu linkomisin merupakan antibiotik yang memiliki spektrum kerja lebih sempit dan

hanya bekerja pada kuman gram positif dan kuman anaerob (Tjay, 2007).

Menurut Jawtz (2004) pemilihan antibiotik yang kurang tepat dapat menimbulkan dampak negatif yaitu timbulnya resistensi bakteri dan efektifitas antibiotik rendah terhadap bakteri tertentu. Resistensi bakteri terhadap antibiotik mempunyai arti klinis yang amat penting. Suatu bakteri yang awalnya peka terhadap suatu antibiotik, setelah beberapa tahun kemudian dapat resisten, dan berakibat pada sulitnya proses pengobatan karena sulit memperoleh antibiotik yang dapat membasmi bakteri tersebut. Berdasarkan hal diatas di ambil sampel berupa plak gigi untuk di identifikasi dan dilakukan isolasi bakteri untuk mengetahui kepekaan bakteri pada plak gigi terhadap antibiotik golongan sefalosporin (cefixime) dan linkosamid (linkomisin).

METODOLOGI PENELITIAN

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian yaitu : Cawan Petri (*Normax*), Vial sampel plak gigi, Lampu Busen, Incubator (*Incucell*), Alumunium Foil, Tabung reaksi (*Pyrex*), Kaca Objek, Mikroskop (*Olympus*), Jarum öse, Erlenmeyer (*Approx*), Gelas Ukur, Gelas Kimia, Rak Tabung reaksi, Pipet Tetes, Plastik Wrap, Kapas, Kasa, Tissue, Timbangan Analitik, Pinset, Laminar air flow (*Biotek*), Termometer, Autoklaf (ALP), mikropipet (*Ecopipette*), L-Glass, Vortex, Mistar berskala dan Alat fotografi.

Bahan yang digunakan dalam penelitian yaitu : Sampel Plak gigi , Alkohol 96%, Aquadest, Cristal Violet, NaCl 0,9 %,

H₂SO₄, BaCl₂, Safranin, Luria Bertani Agar dan Yeast extract (*Oxoid*), Simmon's Citrate Agar (*Oxoid*), Lysine Iron Agar (*Oxoid*), Triple Sugar Iron Agar (*Oxoid*), *Nutrien Broth (Oxoid)* Antibiotik golongan sefalosporin (cefixime) dan golongan linkosamida (linkomisin).

Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian Deskriptif Analisis Laboratorium yaitu suatu pengujian yang dilakukan di laboratorium.

Preparasi Sampel

Pengambilan sampel dilakukan dengan cara mengambil plak gigi pada 3 pasien yang menggunakan tumpatan amalgam di Puskesmas Tikala Baru Kota Manado. Plak gigi tersebut diambil dengan menggunakan alat sonde dan dimasukan ke dalam vial steril yang berisi NaCl 0,9 % sebanyak 5 mL dan diberi label identitas pasien dan di bawa ke laboratorium mikrobiologi jurusan farmasi.

Sterilisasi Alat

Alat-alat yang digunakan terlebih dahulu disterilkan menggunakan autoklaf dengan cara alat-alat gelas yang akan digunakan dalam penelitian di bungkus menggunakan alumunium foil kemudian dimasukkan kedalam autoklaf. Autoklaf dihidupkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Sedangkan jarum öse dan pinset dan *L-Glass* dipijarkan dengan pembakaran diatas api langsung (Ortez, 2005).

Pembuatan Media

a. Media *Luria Bertani* (LB)

Media LB dibuat dengan menimbang tripton sebanyak 2 gram, NaCl sebanyak 2 gram, *yeast extract* sebanyak 1 gram dan *Agar bacteriological* sebanyak 3 gram, kemudian dimasukan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan bersama dengan aquadest sebanyak 300 mL hingga homogen. Kemudian disterilkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian dituangkan pada masing-masing cawan petri sebanyak 20 mL dan didinginkan hingga memadat. Media ini digunakan sebagai media pertumbuhan bakteri (Pangastuti, 2002).

b. Media Agar Miring

Tripton ditimbang sebanyak 0.5 gram, NaCl sebanyak 0.5 gram, *yeast extract* sebanyak 0.25 gram dan *agar bacteriological* sebanyak 0.75 gram kemudian dimasukan ke dalam Erlenmeyer dan dilarutkan bersama aquadest sebanyak 50 mL kemudian dihomogenkan. Kemudian di sterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Kemudian dimasukan ke dalam masing-masing tabung reaksi sebanyak 5 mL dan didinginkan pada suhu ruangan dan biarkan hingga memadat pada kemiringan 30°.

Inokulasi Bakteri Pada Media

Sampel plak gigi dilakukan pengenceran sebanyak 4 kali. Selanjutnya dipipet menggunakan micropipet sebanyak 1000 µL Suspensi bakteri pada masing-masing pengenceran dan dituangkan kedalam cawan petri yang telah berisi media *Luria Bertani Agar*. Selanjutnya cawan petri ditutup dan dibungkus menggunakan plastic Wrap. Kemudian di inkubasi dalam inkubator pada suhu 35-36°C, diamati

setelah 18 jam diinkubasi. Tetapi dapat direinkubasi tambahan selama 24 jam jika pada pertumbuhannya kurang dari perkiraan atau hanya terdapat sedikit koloni (Vandepitte, 2010).

Isolasi Bakteri

Setiap koloni yang telah tumbuh pada media LB diambil menggunakan jarum ose untuk dipindahkan ke media agar miring untuk mendapatkan isolate bakteri dengan membentuk garis zig-zag selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 35-36°C selama \pm 18-24 jam (Vandepitte, 2010).

Identifikasi Bakteri

a. Uji Biokimia

Identifikasi bakteri secara uji biokimia menggunakan uji indol, uji katalase, uji H₂S, uji fermentasi karbohidrat, uji lysine, dan uji sitrat.

b. Uji Morfologi

Kaca objek dibersihkan dengan kapas yang telah diberi alkohol lalu diberi label. Biakan bakteri pada nutrient agar miring di ambil dengan menggunakan jarum ose, kemudian di totolkan pada bagian tengah kaca objek sampai merata dan ditambahkan satu tetes NaCl 0,9%. Preperat selanjutnya difikasi di atas lampu Bunsen. Sediaan yang sudah direkatkan diwarnai dengan Kristal violet selama 1 menit. Kemudian Kristal violet dicuci pada air mengalir dan diganti dengan larutas lugol (larutan J2+KJ) dibiarkan selama 1 menit. Larutan lugol di bilas dengan alkohol 96% selama 1 menit. Selanjtnya sediaan dicuci dengan air dan diwarnai dengan safarin selama 1 menit. Sediaan dicuci pada air

yang mengalir, dikeringkan dan diperiksa di mikroskop dengan penambahan minyak imersen. (Fatimawali, 2016).

c. Uji Fisologi

Uji fisiologi dilakukan dengan Uji Motilitas yang bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri yang diuji dapat melakukan pergerakan atau tidak.

Uji Kepekaan Bakteri Terhadap Antibiotik

a. Pembuatan Larutan Mc Farland 0,5

Larutan H₂SO₄ 1% sebanyak 99,5 mL dicampurkan dengan larutan BaCl₂ 1,175% sebanyak 0,5 mL dalam Erlenmeyer. Kemudian dikocok sampai terbentuk larutan yang keruh. Kekeruhan ini dipakai sebagai standar kekeruhan suspense bakteri uji (Bresson, 2004)

b. Pembuatan suspensi Bakteri Uji

Bakeri uji yang telah diinokulasi diambil dengan jarum ose steril lalu disuspensikan ke dalam tabung yang berisi 5 mL larutan NaCl 0,9% hingga diperoleh kekeruhan yang sama dengan standar kekeruhan larutan Mc. Farland 0,5. Perlakuan yang sama dilakukan pada setiap jenis bakteri uji.

c. Penanaman Cakram Antibiotik

Dipipet suspense bakeri uji sebanyak 200 μ g. Dan dituangkan ke seluruh permukaan media LB. Selanjutnya diratakan menggunakan L-Glass dan didiamkan selama 5 menit. Tempatkan cakram cefixim obat golongan sefalosporin 5 μ g dan linkomysin 2 μ g. Pada permukaan media LB. Cakram antibiotik ditekan menggunakan pinset agar dapat menempel secara sempurna di permukaan agar.

Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 C selama 18-24 jam. Dibuat tiga kali ulangan pada cawan petri yang berbeda (Kumala, 2010).

d. Pengukuran dan penetapan zona hambat

Setelah diinkubasi, diamati zona pertumbuhan bakteri disekitar cakram antibiotik. Koloni bakteri yang sensitive terhadap antibiotik cefixim dan linkomisin dilihat dengan adanya zona hambatan berupa daerah bening disekitar cakram antibiotik. Daerah hambatan antibiotik terhadap pertumbuhan bakteri diukur menggunakan mistal berskala atau jangka sorong dengan satuan mm. kemudian zona hambatan dibandingkan berdasarkan pedoman *Clinical and Laboratory Standars Instutute (CLSI)*.

Tabel 1. Zona Hambat berdasarkan CLSI

Nama Obat	Sensitif	Intermediet	Resisten
Cefixime	≥19	16-18	≤15
Linkomisin	≥15	10-14	≤9

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil pemurnian ini didapatkan 15 isolat bakteri dan di beri kode. Setelah di lakukan pemurnian, bakteri yang berkembang diinokulasi kembali ke media agar miring yang akan digunakan sebagai kultur stok dari kelima belas bakteri Bakteri diregenerasi setiap dua minggu sekali dengan cara yang sama

Tabel 2. Kode isolat

Pasien	Isolat	Kode
	10 ¹ 1	1
	10 ² 1	2
I	10 ³ 1	3
	10 ^{4A} 1	4
	10 ^{2A} 2	5
	10 ^{2B} 2	6
II	10 ³ 2	7
	10 ^{4A} 2	8
	10 ^{4B} 2	9
	10 ¹ 3	10
	10 ² 3	11
III	10 ^{3A} 3	12
	10 ^{3B} 3	13
	10 ^{4A} 3	14
	10 ^{4B} 3	15

Identifikasi Bakteri

a. Uji Fisologi

Hasil pengujian Motilitas pada lima belas isolat bakteri menunjukkan bahwa ke lima belas isolat bakteri tersebut menunjukkan hasil negatif, hal ini disebabkan tidak adanya penyebaran pertumbuhan bakteri di sekitar permukaan media. Bakteri dikatakan motil jika adanya pertumbuhan melebar atau penyebaran yang berwarna putih seperti akar disekitar inokulasi.

b. Uji biokimia

Tabel 3. Hasil Pengujian Biokimia

Kode Isolat	Indol	Sitrat	H ₂ S	Fermentasi Karbohidrat				Lisin	Katalase
				G	L	S	Gas		
1	-	+	+	+	-	-	-	+	+
2	-	+	+	-	-	-	-	+	+
3	-	+	-	+	-	-	+	+	+
4	-	+	+	+	-	-	-	+	+
5	-	+	-	+	-	-	+	+	+
6	-	+	-	+	-	-	+	+	+
7	-	+	-	+	-	-	-	+	+
8	-	+	-	+	-	-	+	+	+
9	-	+	-	+	-	-	+	+	+
10	-	+	-	+	-	-	+	+	+
11	-	+	+	-	-	-	-	+	+
12	-	+	-	+	-	-	+	+	+
13	-	+	-	+	+	+	+	+	+
14	-	+	-	+	-	-	+	+	+
15	-	+	-	+	-	-	+	+	+

c. Uji Morfologi

Pada penelitian uji pewarnaan gram ini dilakukan dan dilihat pada mikroskop, dan hasil ke lima belas bakteri menunjukkan bentuk kokus. 10 Isolat bakteri menunjukkan sel bakteri gram positif dalam bentuk kokus sedangkan 5 isolat bakteri menunjukkan sel bakteri gram negatif dalam bentuk kokus.

Tabel 4. Hasil pewarnaan gram

Kode Isolat	Bentuk	Bakteri Gram
1	Kokus	Positif
2	Kokus	Positif
3	Kokus	Positif
4	Kokus	Negatif
5	Kokus	Positif
6	Kokus	Negatif
7	Kokus	Positif
8	Kokus	Positif
9	Kokus	Negatif
10	Kokus	Positif
11	Kokus	Positif
12	Kokus	Positif
13	Kokus	Positif
14	Kokus	Negatif
15	Kokus	Negatif

Hasil Identifikasi Bakteri

Dari identifikasi bakteri yang meliputi uji biokimia, uji morfologi dan uji fisiologi diperoleh semua hasil ini digabungkan dan digunakan untuk menentukan bakteri yang terkandung pada masing-masing isolat bakteri, penentuan bakteri dilakukan dengan membandingkan hasil uji yang diperoleh dengan data-data yang terdapat dalam buku *Bergey's Manual Determinative of Bacteriology*.

Tabel 5. Hasil Identifikasi Bakteri

Kode Isolat	Hasil identifikasi bakteri
1	<i>Staphylococcus</i> sp.
2	<i>Staphylococcus</i> sp.
3	<i>Staphylococcus</i> sp.
4	<i>Brucella</i> sp.
5	<i>Staphylococcus</i> sp.
6	<i>Phenylobacterium</i> sp.
7	<i>Staphylococcus</i> sp.
8	<i>Staphylococcus</i> sp.

9	<i>Phenylobacterium</i> sp.
10	<i>Staphylococcus</i> sp.
11	<i>Staphylococcus</i> sp.
12	<i>Staphylococcus</i> sp.
13	<i>Staphylococcus</i> sp.
14	<i>Phenylobacterium</i> sp.
15	<i>Phenylobacterium</i> sp.

Uji Kepekaan Antibiotik

Tingkat kepekaan bakteri dibedakan menjadi 3 yaitu, sensitif dimana bakteri yang bersifat sensitif adalah jika terbentuk zona bening disekitar cakram antibiotik. Bakteri bersifat resisten jika tidak terbentuk zona bening disekitar cakram antibiotik. Sedangkan akan bersifat intermediet jika terbentuk zona bening dengan diameter yang kecil disekitar cakram antibiotik. Daerah hambatan antibiotik terhadap pertumbuhan bakteri diukur menggunakan mistar berskala atau jangka sorong dengan satuan mm. Kemudian zona hambatan dibandingkan berdasarkan pedoman *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*.

Table 6. Hasil pengukuran zona hambat

Kode isolat	Cefixim		Linkomisin	
	Rata-rata	Kepekaan	Rata-rata	kepekaan
1	28	S	7,8	R
2	25,3	S	7,8	R
3	23,1	S	8,1	R
4	23	S	12	I
5	25,3	S	8,6	R
6	29,6	S	10,3	I
7	25,3	S	9	R
8	20,1	S	7,8	R
9	22	S	12,8	I
10	27	S	7,6	R
11	27,1	S	9,5	R
12	28	S	8	R
13	25,6	S	9,1	R
14	26,3	S	8,3	R
15	27,1	S	9,1	R

Tabel 7. Persentase kepekaan bakteri dari isolat plak gigi terhadap antibiotik Cefixime dan Linkomisin.

Antibiotik	S	I	R	Persentase (%)		
				S	I	R
Cefixime	15	0	-	100%	0	0
Linkomisin	-	3	12	0	20%	80%

pada Tabel 7. menunjukkan bahwa antibiotik cefixime memiliki tingkat sensitifitas sebesar 100 % tidak menunjukkan adanya intermediet dan resisten terhadap antibiotik . hal ini dapat menunjukkan bahwa antibiotik cefixime bisa membunuh pertumbuhan bakteri yang diisolasi dari plak gigi. Dimana antibiotik cefixime tersebut dapat membunuh bakteri dengan cara menghambat sintesa dinding sel bakteri karena tanpa adanya dinding sel maka bakteri akan mati, selain itu cefixim juga memiliki spectrum kerja yang lebih luas dan aktif terhadap bakteri gram positif dan gram negatif (Tjay,2007) sedangkan linkomisin memiliki tingkat intermediet 20% dan resisten sebesar 80%. Resistensi terhadap linkomisin terjadi karena linkomisin memiliki spectrum kerja yang lebih sempit dan hanya bekerja pada gram positif (Tjay, 2007). Resistensi dapat terjadi dikarenakan antibiotik golongan Linkosamida (lincomisin) ini bekerja dengan menghambat sintesa protein organisme yang berikatan pada subunit 50S ribosom mikroba dengan tempat ikatan, aktivitas antibakteri dan cara kerjanya seperti makrolid. Mutasi pada kromosom menimbulkan resistensi karena

tidak terjadi ikatan pada subunit 50S ribosom (Sugiarto, 2009).

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, Bakteri yang teridentifikasi dari plak gigi pasien dengan tumpatan amalgam di puskesmas Tikala Baru Manado adalah jenis bakteri *Staphylococcus* sp., *Brucella* sp., dan *Phenylobacterium* sp., dan Bakteri yang sensitif terhadap Cefixime adalah *Staphylococcus* sp., *Brucella* sp., *Phenylobacterium* sp., dan tidak terdapat bakteri yang resisten ataupun intermediet terhadap cefixime. Bakteri yang resisten terhadap linkomisin adalah *Staphylococcus* sp., dan *Phenylobacterium* sp., intermediet terhadap linkomisin adalah *Brucella* sp., dan *Phenylobacterium* sp., dan tidak terdapat bakteri yang sensitif terhadap linkomisin.

SARAN

1. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, perlu di pertimbangkan kembali penggunaan linkomisin pada infeksi di dalam mulut terutama pa gigi karena ada beberapa bakteri seperti *Staphylococcus* sp., dan *Phenylobacterium* sp., yang telah resisten terhadap antibiotik tersebut.
2. Perlu dilakukan penelitian kembali dengan menggunakan antibiotik yang berbeda dan sampel yang lebih banyak untuk mengetahui antibiotik yang tepat digunakan sebagai terapi antibiotik pada masalah plak gigi.

DAFTAR PUSTAKA

- Bresson, W. dan Borges, M.T. 2004. Delivery Methods for Introducing Endophytic Bacteria into Maize. *Biocontrol*. **49**: 315-322.
- Clinical dan Laboratory Standart Institute. 2016. *Performance Standart for Antimicrobial Suspencebility Tessting : Seventeenth Informational Supplement. M100-S17. 27(1)* : 35
- Fatimawali, 2016. *Toksikologi: Detoksifikasi Merkuri*. Unsrat Press, Manado
- Jawetz, Melnick, dan Adelbergs. 2004. *Mikrobiologi Kedokteran Ed 23*. Jakarta : Penerbit Buku Kedokteran EGC page 233, 235, Jakarta.
- Katzung, B. G. 2007. *Basic & Clinical Pharmacology, Tenth Edition*. United States : Lange Medical Publications.
- Kumala, S., D.A.M. Pasanema, dan Mardiasuti. 2010. Pola Resistensi Antibiotik Terhadap Isolat Bakteri Sputum Penderita Tersangka Infeksi Saluran Nafas Bawah. *Jurnal Farmasi Indonesia*. **5**: 24-32.
- Ortez, J.H. 2005. *Disk Diffusion Testing in Manual of Antimicrobial Susceptibility Testing*. American Society For Microbiology, America.
- Putri, A. 2012. *Hubungan Tingkat Pendidikan Ibu, Pendapatan Keluarga, Kecukupan Protein dan Zinc dengan Stunting (Pendek) pada Balita Usia 6-35 Bulan di Kecamatan Tembalang Kota Semarang*. *Jurnal Kesehatan Masyarakat (JKM)*. Volume 1, Nomor 2, Tahun 2012, Halaman 617 – 626.
- Pratiwi, S. 2008. *Mikrobiologi Farmasi*. Erlangga, Jakarta.
- Ramadhan. 2010. *Serba-serbi Kesehatan Gigi dan Mulut*. Bukune, Jakarta.

Tjay, T.H., dan K. Rahardja. 2007. *Obat-obat Penting Khasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya. Edisi ke VI.* PT Elex Media Komputindo, Jakarta.

Vandepitte. J., 2005. *Prosedur Laboratorium Dasar Untuk Bakteriologis Klinis.* Edisi 2. Buku Kedokteran EGC, Jakarta.