

Pengaruh Ekstrak Etanol Tangkai *Begonia multangula* Blume Terhadap Biofilm Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 6514

Effect Etanol Extract of The Stalk *Begonia multangula* Blume Against Biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 6514

Haidy Lailatun Nabila¹, Dwi Nur Indah Sari¹, Rinawati Satrio^{1*}, Nur Amalia Choironi², Maulina Triani¹, Christiana Cahyani Prihastuti¹, Restian Febi Andini¹

¹ Departement of Dentistry, Faculty of Medicine, University of Jenderal Soedirman, Dr Gumbreg Street Number 1 Mersi, Purwokerto, 53112, Indonesia

² Pharmaceutical Biology Laboratory, Department of Pharmacy, Jendral Soedirman University, Karangwangkal Purwokerto Campus, 53123, Indonesia

email: haidynabila88@gmail.com, rinawati.satrio@unsoed.ac.id

(tanggal diterima: 19-05-2022, tanggal disetujui: 06-09-2022)

INTISARI

Periodontitis agresif merupakan salah satu jenis penyakit gigi dan mulut yang menyerang jaringan periodontal dengan perkembangan penyakit dan kerusakan yang sangat cepat. Pencegahan periodontitis agresif dapat dilakukan dengan mencegah terbentuknya biofilm bakteri gigi. Salah satu bakteri tersebut adalah *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Tangkai *Begonia multangula* Blume diketahui memiliki aktivitas antibakteri, tetapi aktivitasnya terhadap biofilm *A. actinomycetemcomitans* belum diketahui. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui aktivitas antibiofilm ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume terhadap bakteri *A. actinomycetemcomitans*.

Penelitian ini terdiri dari 5 kelompok perlakuan ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume (6,25, 12,5, 25, 50 dan 100%), kontrol negatif (akuades steril) dan kontrol positif (CHX 0,2%). Pengukuran biofilm dilakukan menggunakan *microtiter plate biofilm assay* pada panjang gelombang 620 nm dengan pewarna kristal violet. Uji statistik *one way ANOVA* dan *post hoc LSD* dilakukan untuk menganalisis perbedaan ketebalan biofilm tiap perlakuan.

Hasil menunjukkan bahwa ketebalan biofilm pada perlakuan ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume semakin rendah seiring dengan peningkatan konsentrasi. Penghambatan biofilm tertinggi terdapat pada konsentrasi ekstrak 100% (74,92%) dengan *Minimum Biofilm Inhibition Concentration* 50 (MBIC₅₀) terdapat pada konsentrasi ekstrak 25% (54,42%). Uji statistik menunjukkan adanya perbedaan signifikan ($p \leq 0,05$) pada pemberian ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume konsentrasi 6,25, 12,5, 25, 50 dan 100% dengan kontrol negatif serta tidak ada perbedaan signifikan ($p \geq 0,05$) pada perlakuan konsentrasi 50 dan 100% jika dibandingkan dengan kontrol positif dengan Simpulan penelitian ini ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume memiliki aktivitas antibiofilm terhadap bakteri *A. actinomycetemcomitans*.

Kata kunci : *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*; *Begonia multangula* Blume; Biofilm; Periodontitis agresif

ABSTRACT

Aggressive periodontitis is a type of periodontitis with rapid disease progression and destruction. One of the causes of aggressive periodontitis is the presence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm. Prevention of biofilm formation is one way to prevent aggressive periodontitis. The stalk of *B. multangula* Blume has antibacterial activity and has the potential to be used as an antibiofilm. This research aimed to determined antibiofilm activity of etanol extract of the stalk *B. multangula* Blume against *A. actinomycetemcomitans*.



This research used 5 concentration of extract (6,25, 12,5, 25, 50 and 100%), negative control (qquades sterile) and positive control (CHX 0,2%). Inhibition biofilm test using microtiter plate biofilm assay with crystal violet staining at anaerobic incubation for 24 hours and using microplate reader at 620 nm. One way ANOVA and post hoc LSD were used to analyze the differences in antibiofilm activity.

The result showed inhibition biofilm activity of *A. actinomycetemcomitans* by the extract increased as increasing of the concentration. The highest biofilm inhibition was at 100% (74,92%) of the extract concentration and Minimum Biofilm Inhibition Concentration 50 (MBIC₅₀) against *A. actinomycetemcomitans* was found at 25% (54,42%) of the extract concentration. There were significant difference ($p \leq 0,05$) between treatment group of etanol extract (concentration 6,25, 12,5, 25, 50, and 100%) with negative control and there were no significant difference ($p \geq 0,05$) in the positive control with 50 and 100% of the extract concentration. This study concluded that there was an antibacterial activity etanol extract of the stalk *B. multangula* Blume against inhibition biofilm of *A. actinomycetemcomitans*.

Keyword : Aggregatibacter actinomycetemcomitans; Aggressive Periodontitis; Begonia multangula Blume; Biofilm

1. PENDAHULUAN

Periodontitis merupakan penyakit inflamasi kronis yang dapat mempengaruhi jaringan pendukung gigi, mengurangi perlekatan jaringan periodontal hingga menyebabkan kehilangan gigi [1]. Salah satu jenis periodontitis yang memiliki perkembangan penyakit dan kerusakannya sangat cepat adalah periodontitis agresif. Periodontitis agresif dapat menyebabkan hilangnya perlekatan jaringan ikat dan kerusakan tulang alveolar yang lebih cepat dari periodontitis kronis walaupun dengan faktor etiologi yang minimal [2]. Bakteri spesifik dan dominan yang dapat menyebabkan periodontitis agresif yaitu *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [3].

A. actinomycetemcomitans merupakan bakteri Gram negatif, bersifat fakultatif anaerob, dan banyak ditemukan di rongga mulut manusia, seperti plak supragingiva, plak subgingiva, saliva, mukosa bukal, gingiva, permukaan dorsum dan lateral dari lidah, palatum durum dan tonsil [4]. Bakteri *A. actinomycetemcomitans* bersifat oportunistik dan memiliki faktor virulensi seperti leukotoksin, *cytolethal distending toxin* (CDT), lipopolisakarida (LPS) dan *Heat Shock Proteins* (HSP) yang mendukung kemampuannya bertahan hidup dalam rongga mulut serta menghindari sistem pertahanan *host* sehingga dapat menyebabkan destruksi jaringan periodontal hingga kehilangan tulang alveolar [3,5]. Selain itu, *A. actinomycetemcomitans* memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm yang dapat melindungi bakteri dari respon imun *host* sehingga menyebabkan pelepasan mediator inflamasi yang kontinyu dan menyebabkan kerusakan jaringan periodontal [2]. Hal ini akan menyebabkan meningkatnya inflamasi subgingival dan pembentukan poket periodontal sebagai proses terjadinya periodontitis [1].

Pencegahan terjadinya periodontitis dapat dilakukan dengan mencegah pembentukan biofilm dengan meningkatkan *oral hygiene*. *Chlorhexidine gluconate* (CHX) sering digunakan sebagai agen antimikroba untuk mengurangi plak gigi.



Namun, penggunaan *chlorhexidine gluconate* dapat memberikan beberapa efek samping antara lain menyebabkan *stain* pada gigi, memiliki efek yang merugikan pada jaringan vital hingga menyebabkan perkembangan hipersensivitas [6]. Oleh karena itu, penggunaan bahan herbal dapat dijadikan sebagai alternatif yang efektif dalam menghambat patogen dan tidak memiliki efek samping [7].

Beberapa penelitian sudah dilakukan mengenai penggunaan bahan herbal yang mampu memberikan efek terhadap pembentukan biofilm *A.actinomycescomitans*, salah satunya adalah *Matricaria chamomilla* yang memiliki kandungan saponin, alkaloid, fenol, flavonoid dan tanin [7]. Tanaman lain yang memiliki potensi sebagai antibiofilm adalah *Begonia multangula* Blume. *B. multangula* Blume merupakan tanaman yang dapat ditemukan di kawasan perhutanan daerah Jawa dan Bali [8]. *B. multangula* Blume dapat ditemukan di Kebun Raya Baturaden, Jawa Tengah dan memiliki kandungan senyawa anti mikroba yang berpotensi untuk dikembangkan sebagai tumbuhan obat [9]. Ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume memiliki kandungan fitokimia yaitu, saponin, alkaloid, fenol, flavonoid dan tanin [10]. Potensi kandungan fitokimia ekstrak tersebut memiliki efek antibakteri yang mampu menghambat pembentukan biofilm bakteri *A. actinomycescomitans*. Namun demikian, penelitian mengenai efek antibiofilm tangkai *B. multangula* Blume terhadap *A. actinomycescomitans* belum pernah diteliti. Oleh karena itu, peneliti tertarik untuk meneliti lebih lanjut mengenai ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume terhadap penghambatan pembentukan biofilm *A. actinomycescomitans*. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui aktivitas antibiofilm ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume terhadap penghambatan pembentukan biofilm *A. actinomycescomitans*.

2. METODE PENELITIAN

2.1. ALAT DAN BAHAN

Alat yang digunakan pada penelitian ini antara lain, cawan petri, jarum ose, bunsen, gelas ukur, tabung reaksi (Pyrex), rak tabung reaksi, inkubator CO₂, timbangan digital (AND), autoklaf (All American), mikropipet, 96-well flat bottom microplate, aluminium foil, tabung erlenmeyer (Pyrex), hotplate stirrer (Clever), microplate reader (Elisa Reader 270), oven, blender, toples kaca, rotary evaporator, kertas saring, dan penangas air.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain, tangkai *B. multangula* Blume dewasa, isolat bakteri *A. actinomycescomitans* ATCC 6514, etanol 96%, kristal violet 1%, *de Man Ragosa and Sharpe* (MRS) agar (HiMedia), *Brain Heart Infusion* (BHI) broth (HiMedia), akuades steril, larutan standar McFarland 0,5, alkohol 70%, *chlorhexidine gluconate* 0,2%, *phosphate buffer saline* (PBS), isopropanol 5%, FeCl₃, HCl 2N, larutan Dragendroff dan serbuk Mg.



2. 2. CARA KERJA

Ethical Clearance

Ethical clearance didapatkan dari Komite Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman dengan nomor surat 219/KEPK/X/2021 kerja dituliskan se jelas mungkin.

Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat berbahan kaca dan logam menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Alat yang menggunakan bahan plastik dibersihkan menggunakan alkohol 70% [11].

Pembuatan Ekstrak Etanol Tangkai *B. multangula* Blume

Tangkai *B. multangula* Blume diambil dari Kebun Raya Baturaden kemudian dilakukan determinasi tanaman di Laboratorium Biologi Farmasi Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Purwokerto untuk memastikan tanaman yang digunakan adalah tangkai *B. multangula* Blume. Tangkai *B. multangula* Blume selanjutnya diekstraksi dengan cara maserasi. Tangkai dicuci sampai bersih kemudian dipotong dengan ketebalan 1-2 mm. Potongan tangkai dijemur dibawah sinar matahari tidak langsung selama ±10 jam. Hasil penjemuran kemudian dioven selama ± 10 menit dengan suhu 70°C. Tangkai yang telah kering dihaluskan menggunakan blender. Sebanyak 10 g tangkai yang sudah dihaluskan direndam dalam 100 mL akuades dan 100 mL etanol 96% selama 3x24 jam pada suhu ruang tanpa cahaya matahari. Pergantian pelarut dilakukan selama 24 jam pertama dan kedua dengan menyaring filtrat terlebih dahulu. Hasil saringan pertama, kedua dan ketiga disatukan ke dalam wadah untuk diuapkan pelarutnya menggunakan penangas 70°C hingga diperoleh ekstrak sebanyak setengah dari volume awal. Ekstrak yang di dapatkan dilakukan uji pH dengan menggunakan kertas pH universal dengan nilai yang diharapkan pada pH 6-7. Ekstrak dilakukan uji bebas etanol dengan memasukkan sampel ekstrak ke dalam tabung reaksi yang ditambahkan asam asetat dan asam sulfat kemudian dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol jika tidak terdapat bau ester yang khas dari etanol [10]. Selanjutnya dilakukan pembuatan konsentrasi ekstrak 6,25, 12,5, 25, 50 dan 100% dengan ditimbang ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume kental kemudian dilarutkan dengan akuades steril [12,13].

Uji Flavonoid

Ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume diambil sebanyak 5 ml kemudian ditambahkan 2 ml HCl 2N, serbuk Mg dan amil alkohol kemudian dikocok dan dibiarkan hingga memisah. Jika terdapat perubahan warna menjadi jingga atau kuning pada lapisan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid [14].



Uji Tanin

Sebanyak 3 ml ekstrak yang diekstraksi akuades panas kemudian disaring dan didinginkan. FeCl_3 dimasukkan sebanyak 3 tetes. Jika terdapat perubahan warna menjadi biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya fenol [15].

Uji Saponin

Sebanyak 5 ml ekstrak dikocok secara vertikal pada tabung reaksi selama 10 detik dan ditambahkan HCl 2 N. Pembentukan buih menyerupai sarang lebah setinggi 1-10 cm yang stabil selama 10-15 menit maka menunjukkan adanya saponin [14].

Uji Fenol

Sebanyak 3 ml ekstrak yang diekstraksi akuades panas kemudian disaring dan didinginkan. FeCl_3 dimasukkan sebanyak 3 tetes. Jika terdapat perubahan warna menjadi biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya fenol [15].

Uji Alkaloid

Larutan ekstrak sebanyak 3 ml dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit. Residu larutan ditambahkan 5 ml HCl 2N kemudian didinginkan dan disaring. Sampel yang telah dingin ditambahkan reagen Dragendroff sebanyak 3 tetes. Jika terdapat endapan jingga menandakan terdapat kandungan alkaloid [16].

Pembuatan Media

Pembuatan media *de Man Ragosa and Sharpe* (MRS) agar sebanyak 62 gram MRSA dilarutkan dalam 1 L akuades kemudian dihomogenkan menggunakan *hotplate stirrer*. Sterilisasi media menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Media yang sudah steril dituang ke cawan petri sebanyak 15 ml [17].

Pembuatan media *Brain Heart Infusion* (BHI) broth sebanyak 37 gram BHIB dilarutkan dalam 1 L akuades kemudian dihomogenkan menggunakan *hotplate stirrer*. Sterilisasi media menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C dan tekanan 2 atm. Media yang sudah steril dituang ke tabung reaksi sebanyak 10 ml [18].

Peremajaan Bakteri

Bakteri *A. actinomycetemcomitans* dilakukan peremajaan dalam MRSA dengan metode *streak plate* kemudian dilakukan inkubasi secara anaerob menggunakan inkubator CO_2 pada suhu 37°C selama 24 jam. Morfologi koloni bakteri *A. actinomycetemcomitans* pada medium MRSA berwarna putih kekuningan dan memiliki permukaan cembung

Suspensi Bakteri

Pembuatan suspensi bakteri *A. actinomycetemcomitans* dalam BHIB. Satu ose bakteri dari kultur bakteri MRSA diambil dan dimasukkan ke dalam larutan BHIB 2



ml pada tabung reaksi steril. Bakteri dihomogenkan menggunakan vortex. Tabung reaksi tersebut dimasukkan ke dalam desicator kemudian diinkubasi secara anaerob menggunakan inkubator CO₂ selama 24 jam dengan suhu 37°C. Suspensi tersebut dibandingkan secara visual dengan konsentrasi 0,5 standar Mc Farland (1,5 x 10⁸ CFU/ml) yang dilakukan oleh 2 orang pengamat. Suspensi bakteri dilakukan dilusi 1:100 dengan media yang baru [19,20].

Uji Pembentukan Biofilm

Uji pembentukan biofilm dilakukan dengan metode *microtitter plate biofilm assay* menggunakan kristal violet sebagai pewarna sel-sel yang masih hidup atau mati dan matriks biofilm. Sebanyak 150 µL BHIB dan 50 µL suspensi bakteri *A. actinomycetemcomitans* dimasukkan ke dalam 96-well *flat bottom microplate* sebagai kontrol uji. Sebanyak 200 µL BHIB sebagai kelompok kontrol. Inkubasi dilakukan secara anaerob pada suhu 37°C dengan waktu inkubasi 24 jam. Setelah proses inkubasi selesai, isi dari 96-well *flat bottom microplate* dikeluarkan dan dicuci tiga kali dengan 200 µL PBS menggunakan mikropipet dan dikeringkan selama 15 menit. Larutan kristal violet 1% dimasukkan sebanyak 200 µL dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Isi larutan dalam 96-well *flat bottom microplate* dibuang dan dicuci dengan air deionisasi dan dibiarkan kering pada suhu ruang. Setelah 96-well *flat bottom microplate* kering, 200 µL isopropanol dimasukkan kedalam 96-well *flat bottom microplate* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Prosedur selanjutnya dilakukan pengukuran densitas optik (DO) menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 620 nm [21]. Uji pembentukan biofilm dilakukan dengan ulangan sebanyak 3 kali.

Berdasarkan Ruchi *et al.* [21] hasil DO dapat dihitung nilai *DO cut off* dengan rumus sebagai berikut :

$$DO\ cut = DO\ kontrol + (3 \times standar\ deviasi\ DO\ kontrol)$$

$$DO\ suspensi = DO\ uji - DO\ cut$$

Berdasarkan Ruchi *et al.* [21] hasil perhitungan DO suspensi dilakukan interpretasi dalam kategori, sebagai berikut :

- a. *Non biofilm producer* yaitu nilai DO suspensi ≤ DO cut
- b. *Weak biofilm producer* yaitu nilai DO cut < DO suspensi ≤ 2x DO cut
- c. *Moderate biofilm producer* yaitu nilai 2x DO cut < DO suspensi ≤ 4x DO cut
- d. *Strong biofilm producer* yaitu nilai 4x DO cut ≤ DO suspensi

Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm

Uji penghambatan pembentukan biofilm dilakukan dengan metode *microtitter plate biofilm assay* menggunakan kristal violet. Sebanyak 130 µL BHIB dimasukkan ke dalam 96-well *flat bottom microplate*. Sebanyak 20 µL suspensi bakteri *A. actinomycetemcomitans* dimasukkan ke dalam 96-well *flat bottom microplate*. Ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume juga dimasukkan sebanyak 50 µL dengan masing-masing konsentrasi 6,25, 12,5, 25, 50, dan 100% kedalam 96-well *flat bottom microplate* serta 50 µL akuades steril sebagai kontrol negatif dan 50 µL *clorhexidine gluconat* 0,2% sebagai kontrol positif. Inkubasi dilakukan secara



anaerob pada suhu 37°C dengan waktu inkubasi 24 jam. Setelah proses inkubasi selesai, isi dari *96-well flat bottom microplate* dikeluarkan dan dicuci tiga kali dengan 200 µL PBS menggunakan mikropipet dan dikeringkan selama 15 menit. Larutan kristal violet 1% dimasukkan sebanyak 200 µL dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Isi larutan dalam *96-well flat bottom microplate* dibuang dan dicuci dengan air deionisasi dan dibiarkan kering pada suhu ruang. Setelah *96-well flat bottom microplate* kering, 200 µL isopropanol dimasukkan kedalam *96-well flat bottom microplate* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Prosedur selanjutnya dilakukan pengukuran densitas optik (DO) menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 620 nm dan dilakukan dengan 2 orang pengamat [2,20,22]. Uji penghambatan biofilm dilakukan dengan ulangan sebanyak 3 kali. Berdasarkan Dinda *et al.* [2,20,22] persentase penghambatan pembentukan biofilm dihitung menggunakan rumus:

$$\% \text{ penghambat: } \frac{\text{DO Kontrol Pertumbuhan} - \text{DO Sampel}}{\text{DO Kontrol Pertumbuhan}} \times 100\% \quad [18]$$

Penentuan MBIC 50

Penentuan *Minimum Biofilm Inhibition Concentration* 50 (MBIC50) dilakukan dengan menentukan konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat minimal 50% dari hasil uji pembentukan biofilm [23].

3. HASIL DAN PEMBAHASAN

Hasil uji fitokimia yang dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa antibakteri ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume tersaji pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil uji fitokimia ekstrak

Senyawa Fitokimia	Hasil Uji	Pustaka
Flavonoid	+	[16]
Tanin	+	[15]
Saponin	+	[16]
Fenol	+	[15]
Alkaloid	+	[16]

Sumber : Data primer, 2021

Hasil uji fitokimia menunjukkan ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume mengandung senyawa golongan flavonoid, tanin, saponin, fenol, dan alkaloid. Peran etanol sebagai pelarut *universal* yang dapat menarik senyawa polar, semi-polar dan non-polar sehingga dapat menarik berbagai senyawa pada simplisia [24]. Hal ini sesuai dengan penelitian Ghani [10] bahwa ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume memiliki kandungan flavonoid, tanin, saponin, fenol dan alkaloid. Senyawa tersebut merupakan senyawa metabolit sekunder yang berfungsi sebagai ketahanan tanaman terhadap patogen [25]. Selain itu, senyawa-senyawa tersebut telah lama diketahui berperan sebagai antibakteri pada produk herbal [26].

Uji pembentukan biofilm digunakan untuk mengukur kemampuan adhesi isolat bakteri pada substrat atau dinding *well* pada *microtiter plate* sehingga membentuk koloni bakteri. Uji pembentukan biofilm dapat membantu



mengidentifikasi jenis bakteri yang beresiko tinggi dan membantu penentuan pencegahan atau pengobatan yang tepat [27]. Uji pembentukan biofilm *A. actinomycetemcomitans* pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan *microplate reader* pada densitas optik 620 nm setelah dilakukan inkubasi secara anaerob pada suhu 37°C selama 24 jam. Prosedur ini dilakukan tiga kali pengulangan dengan hasil dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Nilai DO pembentukan biofilm

Kelompok Perlakuan	Rerata DO	Pustaka
Kelompok uji : Suspensi <i>A. actinomycetemcomitans</i>	1,72±0,05	[21]
Kelompok kontrol : Media BHIB	0,17 ± 0,07	[21]

Sumber : Data primer yang diolah, 2021

Hasil perhitungan pembentukan biofilm *A. actinomycetemcomitans* didapatkan nilai DO *cut* sebesar 0,38 dan DO suspensi sebesar 1,34. Berdasarkan hasil uji tersebut pembentukan biofilm *A. actinomycetemcomitans* termasuk kategori *moderate biofilm producer* karena memenuhi $2x DO\ cut < DO\ suspensi \leq 4x DO\ cut$.

Aktivitas antibiofilm *A. actinomycetemcomitans* pada penelitian ini dilakukan dengan metode *microtiter plate biofilm assay* menggunakan kristal violet. Kristal violet mengikat muatan negatif pada permukaan molekul dan polisakarida dari matriks ekstraseluler, sehingga kristal violet tetap melekat setelah dilakukan pencucian dengan air. Kristal violet mewarnai sel-sel yang masih hidup atau mati dan matriks biofilm. Penggunaan kristal violet menunjukkan kuantitas massa biofilm [23]. Menurut Malik *et al.* [5] kemampuan bakteri *A. actinomycetemcomitans* dalam membentuk biofilm menunjukkan perannya yang penting dalam proses terjadinya periodontitis agresif. Oleh karena itu, pencegahan terhadap pembentukan biofilm bakteri menjadi salah satu cara untuk mencegah terjadinya periodontitis agresif.

Hasil pengamatan biofilm *A. actinomycetemcomitans* dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Nilai DO penghambatan biofilm

Konsentrasi ekstrak (%)	Rerata DO
6,25	0,67 ±0,02
12,5	0,54 ±0,15
25	0,45 ±0,14
50	0,33 ±0,06
100	0,30 ±0,05
Kontrol Positif	0,25 ±0,03
Kontrol Negatif	0,99 ±0,32

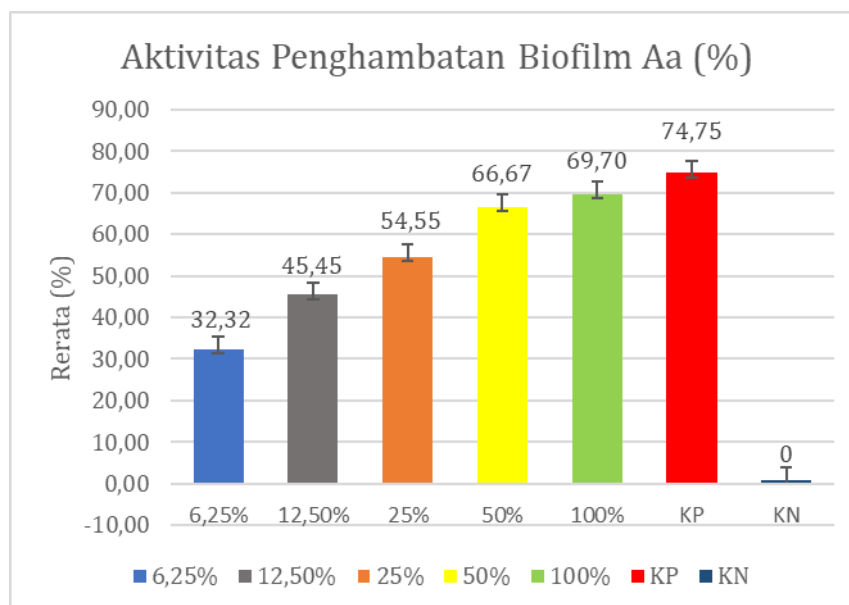
Sumber : Data primer, 2021

Hasil uji penghambatan biofilm *A. actinomycetemcomitans* pada kelompok perlakuan menunjukkan nilai DO semakin rendah seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume. Nilai DO tertinggi pada kelompok perlakuan terdapat pada konsentrasi 6,25% dengan nilai rerata 0,67 ±



0,02, sedangkan nilai DO terendah terdapat pada konsentrasi 100% dengan nilai rerata $0,30 \pm 0,05$. Hal ini menunjukkan aktivitas penghambatan pada tiap konsentrasi ekstrak berbeda dan semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin tinggi aktivitas penghambatannya. Namun, aktivitas penghambatan biofilm pada konsentrasi ekstrak 100% tampak lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif (*clorhexidine gluconat* 0,2%). Hal ini dapat diketahui dari nilai DO konsentrasi 100% masih lebih tinggi dibandingkan dengan nilai DO kelompok kontrol positif (*clorhexidine gluconat* 0,2%) dengan nilai rerata $0,25 \pm 0,03$. Sebaliknya, nilai DO konsentrasi 6,25% lebih rendah dibandingkan nilai DO pada kelompok kontrol negatif dengan nilai rerata $0,99 \pm 0,32$. Hal ini membuktikan adanya pengaruh pemberian ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume terhadap penghambatan biofilm bakteri *A. actinomycescomitans*.

Hasil nilai DO selanjutnya dilakukan perhitungan persentase aktivitas antibiofilm ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume terhadap penghambatan pembentukan biofilm *A. actinomycescomitans* yang dapat dilihat pada grafik.



Grafik 1. Persentase Penghambatan Pembentukan Biofilm *A. actinomycescomitans*

Keterangan :

KP : Kontrol Positif, KN : Kontrol Negatif

Grafik 1 menunjukkan aktivitas antibiofilm ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume terhadap biofilm *A. actinomycescomitans* meningkat seiring dengan bertambahnya konsentrasi. Rerata penghambatan pada konsentrasi ekstrak 100% sebesar 69,70% sedikit lebih rendah dibandingkan dengan rerata penghambatan Kontrol Positif sebesar 74,75%. Ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume dengan konsentrasi 100% memiliki nilai penghambatan biofilm paling tinggi dibandingkan dengan konsentrasi ekstrak lain. Hal ini sejalan dengan penelitian Ghani [10] menunjukkan konsentrasi 100% ekstrak etanol tangkai *B.*

multangula Blume memiliki nilai penghambatan biofilm paling tinggi terhadap bakteri *F. nucleatum* dibandingkan konsentrasi lainnya.

Kandungan flavonoid dalam ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume yang diduga berperan sebagai antibiofilm dan antibakteri. Flavonoid memiliki sifat semipolar [28]. Flavonoid sebagai antibiofilm berperan dengan menghambat ekspresi gen spesifik bakteri terhadap pembentukan biofilm dan menurunkan fungsi hidrofobik bakteri. Penurunan fungsi hidrofobik bakteri selanjutnya akan mempengaruhi penurunan kemampuan adhesi sel sehingga tidak terjadi pembentukan biofilm [29].

Aktivitas antibiofilm ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume terhadap bakteri *A. actinomycetemcomitans* kemungkinan juga dipengaruhi adanya senyawa saponin pada ekstrak. Saponin dapat mempengaruhi sistem biofilm dalam dua aspek. Aspek yang pertama, saponin dapat menurunkan tegangan permukaan dalam larutan air dan membentuk misel hingga mencapai titik kritis menyebabkan terjadinya perubahan makromolekul yang dapat menyebabkan degradasi dinding sel hingga menyebabkan disrupsi membran sitoplasma dan kebocoran sel. Aspek yang kedua saponin dapat mengikat permukaan sterol dalam membran sel eukariotik sehingga menyebabkan perforasi dan pecahnya membran sel yang menyebabkan sistem biofilm runtuh [30].

Hasil penelitian ini menunjukkan ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume juga mengandung tanin, suatu senyawa yang telah lama diketahui memiliki aktivitas sebagai antibiofilm dan antibakteri. Peran tanin dalam menghambat biofilm dengan menurunkan permukaan lapisan peptidoglikan dan meningkatkan interaksi komponen bioaktif tanin dengan reseptor sel adhesi yang menyebabkan ketidakseimbangan potensial elektrisitas sel bakteri serta menghambat sintesis senyawa adhesi intrasel polisakarida [31].

Hasil penelitian ini menunjukkan terdapat kandungan fenol dan alkaloid dalam ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume yang kemungkinan dapat berperan sebagai antibakteri. Mekanisme antibakteri fenol dengan menginaktivasi protein pada membran sel, merusak membran sitoplasma dan menyebabkan kebocoran pada inti sel [32]. Alkaloid memiliki mekanisme antibakteri dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk utuh dan menyebabkan kematian sel. Alkaloid juga dapat menyebabkan perubahan keseimbangan genetik pada rantai DNA bakteri hingga mendorong terjadinya lisis [33]. Selain itu, fenol dan alkaloid juga memberikan efek sinergistik dan mempengaruhi aktivitas antioksidan [34].

Hasil uji statistic *one way ANOVA* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan adanya pengaruh perlakuan penambahan ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume terhadap pembentukan biofilm bakteri *A. actinomycetemcomitans*. Hal ini diperkuat dengan adanya hasil uji *post hoc* yang menunjukkan perbedaan signifikan ($p \leq 0,05$) antar perlakuan ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume konsentrasi 6,25, 12,5, 25, 50, dan 100% dengan kontrol negatif.



Hasil uji *post hoc* lainnya menunjukkan tidak ada perbedaan signifikan ($p \geq 0,05$) antar perlakuan ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume konsentrasi 50 dan 100% dengan kontrol positif berupa *chlorhexidine gluconate* 0,2%. Hal ini mungkin terjadi karena ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume pada konsentrasi 50 dan 100% memiliki aktivitas penghambatan pertumbuhan biofilm yang sepadan dengan kemampuan *chlorhexidine gluconate* 0,2%. Namun, persentase penghambatan biofilm *A. actinomycetemcomitans* konsentrasi ekstrak 100% masih lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif yaitu *chlorhexidine gluconate* 0,2%. Hal ini sejalan dengan penelitian Diana *et al.* [35] yang menunjukkan *chlorhexidine gluconate* 0,2% mampu menghambat pembentukan biofilm *A. actinomycetemcomitans* lebih baik daripada konsentrasi 100% ekstrak etanol *Curcuma xanthorrhiza*. Ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume berpotensi untuk dijadikan sebagai alternatif bahan antiseptik sebagai pencegahan penyakit periodontitis agresif. Namun, perlu dilakukan pengembangan lebih lanjut pada penelitian ini.

Pemilihan *chlorhexidine gluconate* 0,2% sebagai kontrol positif dikarenakan larutan tersebut sering digunakan sebagai obat kumur untuk mengontrol biofilm atau plak gigi sehingga mencegah terjadinya karies pada gigi [36]. *Chlorhexidine gluconate* juga diketahui menjadi *gold standard* dari antiseptik untuk rongga mulut. Pada penelitian ini kontrol positif mampu menghambat pembentukan biofilm *A. actinomycetemcomitans* sebesar 74,75%.

Chlorhexidine gluconate merupakan antibakteri *broad spectrum*. *Chlorhexidine* yang mengikat dinding sel bakteri akan menyebabkan perubahan dan kerusakan struktur permukaan sel yang menyebabkan terjadinya ketidakseimbangan osmotik. Hal tersebut akan menyebabkan keluarnya sitoplasma yang menyebabkan kematian sel [37].

Konsentrasi *Minimum Biofilm Inhibition Concentration* 50 (MBIC₅₀) dilakukan dengan menentukan konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat minimal 50% dari pembentukan biofilm [23]. Hasil uji penelitian ini mendapatkan nilai MBIC₅₀ terlihat pada konsentrasi 25% atau 0,250 µg/ml dengan nilai 54,55%. Teanpaisan *et al.* [38] melakukan penelitian mengenai ekstrak tanaman herbal Thailand yaitu ekstrak etanol *Piper betle* pada pertumbuhan biofilm *A. actinomycetemcomitans* dan didapatkan nilai MBIC₅₀ 0,100 µg/ml dengan persentase penghambatan sebesar 60%. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol *Piper betle* memiliki kemampuan menghambat pembentukan biofilm *A. actinomycetemcomitans* yang lebih tinggi daripada ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume.

Penelitian sebelumnya mengenai antibiofilm ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume telah dilakukan terhadap beberapa bakteri Gram negatif. Penelitian Ghani [10] menunjukkan bahwa ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume pada konsentrasi 100% dapat menghambat biofilm bakteri *F. nucleatum* sebesar 78,12% dan memiliki nilai MBIC₅₀ 25%. Penelitian Gusri [39] menunjukkan bahwa ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume pada konsentrasi 100% dapat menghambat biofilm bakteri *P. gingivalis* sebanyak 82,5% dan memiliki nilai MBIC₅₀



50%. Hasil penelitian ini, ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume pada konsentrasi 100% dapat menghambat biofilm bakteri *A. actinomycetemcomitans* 69,70% dan memiliki nilai MBIC₅₀ 25%. Hal ini kemungkinan disebabkan oleh beberapa faktor salah satunya perbedaan penggunaan pelarut konsentrasi dan sensitifitas bakteri terhadap ekstrak. Larutan yang digunakan untuk membuat konsentrasi ekstrak dalam penelitian Ghani [10] dan Gusri [39] adalah DMSO 1%, sedangkan pada penelitian ini menggunakan akuades steril. Penggunaan DMSO dinilai lebih efektif dalam melarutkan senyawa ekstrak dibandingkan akuades steril. Hal ini sejalan dengan penelitian Rachmawaty *et al.* [40] yang menyatakan bahwa ekstrak daun *Piper crocatum* dengan pelarut DMSO lebih efektif dalam menghambat bakteri *S. aureus* dibandingkan dengan pelarut ekstrak akuades steril. Terkait sensitifitas bakteri, penelitian ini menunjukkan bahwa bakteri *A. actinomycetemcomitans* kurang sensitif terhadap ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume dibandingkan dengan bakteri *P. gingivalis* dan *F. nucleatum*. Hal ini sesuai dengan penelitian Sulistyani *et al.* [41] yang melakukan uji antibiofilm ekstrak kelopak bunga rosela (*Hibiscus sabdariffa*) terhadap bakteri patogen rongga mulut diantaranya bakteri *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* dan *F. nucleatum*. Hasil penelitian tersebut menyatakan bahwa bakteri *A. actinomycetemcomitans* kurang sensitif dibandingkan dengan bakteri *P. gingivalis* dan *F. nucleatum* dikarenakan bakteri *A. actinomycetemcomitans* memiliki kemampuan untuk memodulasi faktor virulensi serta kemampuan adaptasi sel yang baik untuk tumbuh pada kondisi yang terbatas [41].

4. KESIMPULAN

Simpulan dari hasil penelitian ini yaitu, ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume mampu menghambat pembentukan biofilm *A. actinomycetemcomitans* dan tidak ditemukan konsentrasi paling efektif dalam menghambat biofilm namun hanya didapatkan konsentrasi paling tinggi untuk menghambat pembentukan biofilm bakteri *A. actinomycetemcomitans* yaitu ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume dengan konsentrasi 100%. MBIC₅₀ dari ekstrak etanol tangkai *B. multangula* Blume terdapat pada konsentrasi 25%.

5. UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan terimakasih kepada LPPM Universitas Jenderal Soedirman yang telah membantu membiayai penelitian ini melalui Skema Riset Penelitian Kompetitif Universitas Jenderal Soedirman tahun 2021.

6. DAFTAR PUSTAKA

- [1] Kriswandini IL, Berniyati T, Tyas PNB. Detection of Biofilm Proteins from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Induced by Glucose, Lactose, Soy Protein, and Iron Along with Protein Density Analysis. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences* 2020;16(4):12-16.
- [2] Christabel PF, Hernando M, Sutanto CA, Parisihni K. Exploration of *Chlorella* sp. as antibacterial to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm. *IOP Conference Series: Earth and*



- Environmental Science, Institute of Physics Publishing 2019;217. DOI: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/217/1/012040>.
- [3] Ridhwana L, Panjaitan FUA, Wasiaturrahmah Y. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kasturi (*Mangifera casturi*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Jurnal Kedokteran Gigi* 2020;4(2):49-55.
- [4] Llama-Palacios A, Potupa O, Sánchez MC, Figuero E, Herrera D, Sanz M. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Growth in Biofilm versus Planktonic State: Differential Expression of Proteins. *Journal of Proteome Research* 2017;16:3158–67. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00127>.
- [5] Malik R, Changela R, Krishan P, Gugnani S, Bali D. Virulence factors of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* - A status update. *Journal of the International Clinical Dental Research Organization* 2015;7:137. DOI : <https://doi.org/10.4103/2231-0754.164390>.
- [6] Widyarman A, Suhaim O, Nandary D, Theodora C. Pomegranate juice inhibits periodontal pathogens biofilm In Vitro. *Scientific Dental Journal* 2018;2:101. DOI: <https://doi.org/10.26912/sdj.v2i3.2572>.
- [7] Nurrahman HF, Widyarman AS. Effectiveness of *Matricaria chamomilla* Essential Oil on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Treponema denticola* Biofilms. *Indonesian Dental Association Journal of Indonesian Dental Association*. 2020. DOI: <https://doi.org/10.32793/jida.v3i2.563>.
- [8] Siregar HM, Purwanto RS, Sudarmono, Agusta A. Pengungkapan potensi obat pada tiga jenis begonia terpilih (*B. muricata* Blume. *B. multangula* Blume. *B. "Bacem Kebo"*) melalui uji antibakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Prosiding Seminar Nasional Sains 2*. 2009.
- [9] Efendi M. Begonia alam di Kebun Raya Baturaden, Jawa Tengah. *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia* 2019;5. DOI: <https://doi.org/10.13057/psnmbi/m050103>.
- [10] Ghani MH. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Tangkai Begonia *Multangula Blume* Terhadap Penghambatan Pembentukan Biofilm *Fusobacterium nucleatum* Penyebab Periodontitis Kronis. Skripsi. Purwokerto: Jenderal Soedirman University. 2021 (Tidak dipublikasikan).
- [11] Ahmad S. Efek ekstrak etanol daun teh hijau sebagai penghambat pembentukan biofilm pada bakteri *Burkholderia cepacia* secara in vitro. Tugas Akhir. Malang : Brawijaya University. 2017.
- [12] Nor TA, Indriarini D, Koamesah Smj. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Pepaya (*Carica papaya L*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichiacoli* secara in vitro. *Cendana Medical Journal* 2018;15:327–37.



- [13] Wulandari D, Isna D, Asih J. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Suruhan (*Peperomia pellucida* L. Kunth) terhadap *Klebsiella pneumoniae* Antibacterial Activity of Suruhan Leaf Extract (*Peperomia pellucida* L. Kunth) against *Klebsiella pneumoniae*. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2017;15:33-9.
- [14] Ningsih D, Harsono SB, Kusumawati AD, Mahmudah DN. Efek Antihiperlipidemia Kombinasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella dan Ekstrak Daun Bawang Kucai. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2017;14:1-8.
- [15] Putra GMD, Satriawati DA, Astuti NKW, Yadnya-Putra AAGR. Standarisasi Dan Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol 70% Daun Jeruk Limau (*Citrus amblycarpa* (Hassk.) Osche). *Jurnal Kimia* 2018;12(2):187-194.
- [16] Marliana SD, Suryanti V, Suyono. Skrining Fitokimia dan Analisis Kromatografi Lapis Tipis Komponen Kimia Buah Labu Siam (*Sechium edule* Jacq. Swartz.) dalam Ekstrak Etanol. *Biofarmasi*. 2005;3(1): 26-31.
- [17] Ismail, Y.S., Yulvizar, C. Putriani. Isolasi, Karakterisasi dan Uji Aktivitas Antimikroba Bakteri Asam Laktat dari Fermentasi Biji Kakao (*Theobroma cacao* L.). *Jurnal Bioleuser* 2017;1(2): 45-53.
- [18] Yunus R, Mongan R. Cemaran Bakteri Gram Negatif pada Jajanan Siomay di Kota Kendari. *Medical Laboratory Technology Journal* 2017;3:87-92.
- [19] Pargaputri AF, Munadzirah E, Indrawati R. Antibacterial effects of *Pluchea indica* Less leaf extract on *E. faecalis* and *Fusobacterium nucleatum* (in vitro). *Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi)* 2017;49:93. DOI: <https://doi.org/10.20473/j.djmg.v49.i2.p93-98>.
- [20] Dinda AP, Asnani A, Anjarwati DU. The Activities of *Streptomyces W-5A* as Antibacterial and Antibiofilm towards Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* 2983, *Scitepress* 2021:109-115. DOI: <https://doi.org/10.5220/0010488601090115>.
- [21] Ruchi T, Sujata B, Anuradha D. Comparison of Phenotypic Methods for the Detection of Biofilm Production in Uro-Pathogens in a Tertiary Care Hospital in India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2015;4(9): 840-849.
- [22] Oettinger-Barak O, Dashper SG, Catmull D v., Adams GG, Sela MN, Machtei EE, et al. Antibiotic susceptibility of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* JP2 in a biofilm. *Journal of Oral Microbiology* 2013;5. DOI: <https://doi.org/10.3402/jom.v5i0.20320>.
- [23] Hamzah H, Pratiwi SUT, Hertiani T. Efficacy of thymol and eugenol against polymicrobial biofilm. *Indonesian Journal of Pharmacy* 2018;29:214-21. DOI: <https://doi.org/10.14499/indonesianjpharm29iss4pp221>.
- [24] Saptarini O. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanolik Daun Patikan Kebo (*Euphorbia hirta* Linn) dan Herba Rumput Mutiara (*Hydeotis*



- carymbosa L) terhadap Bakteri Penyebab Pneumonia. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2011;8:1-6.
- [25] Perangin-Angin Y, Purwaningrum Y, Asbur Y, Rahayu MS, Nurhayati. Pemanfaatan Kandungan Metabolit Sekunder yang dihasilkan Tanaman pada Cekaman Biotik. *Agriland* 2019;7(1) : 39-47.
- [26] Haqqe N, Putri S, Nurdiwiyati D, Lestari S, Ramdhan B, Efendi M, et al. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Tangkai dan Daun Begonia Multangula Blume. terhadap *Porphyromonas Gingivalis* Antibacterial Activity of Begonia multangula Blume. Stem and Leaf Extract on *Porphyromonas gingivalis*. *Jurnal Biologi Universitas Andalas (J Bio UA)* 2019;7:51-8.
- [27] di Domenico EG, Toma L, Provot C, Ascenzioni F, Sperduti I, Prignano G, et al. Development of an in vitro assay, based on the biofilm ring test®, for rapid profiling of biofilm-growing bacteria. *Frontiers in Microbiology* 2016;7. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01429>.
- [28] al Huda BH, Susanti H, Sugihartini N. Purification effect on Organoleptic Profile, Yield, Total Phenol and Total Flavonoids from 96% Ethanol Extract of Moringa (*Moringa oleifera*. L) leaves. *Jurnal Farmasi Indonesia* 2020;17(2):188-198.
- [29] Górnaiak I, Bartoszewski R, Króliczewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews* 2019;18:241-72. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>.
- [30] Dong S, Yang X, Zhao L, Zhang F, Hou Z, Xue P. Antibacterial activity and mechanism of action saponins from *Chenopodium quinoa* Willd. husks against foodborne pathogenic bacteria. *Industrial Crops and Products* 2020;149. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112350>.
- [31] Lahiri D, Dash S, Dutta R, Nag M. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *Journal of Biosciences* 2019;44. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9868-4>.
- [32] Novita W. Uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih (*Piper betle* L) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* secara in vitro. *Jambi Medical Journal* 2016;4(2):140-155.
- [33] Kining E, Falah S, Nurhidayat N. The in vitro antibiofilm activity of water leaf extract of papaya (*Carica papaya* L.) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Biochemistry* 2016;2(3):150-163.
- [34] Krisridwany A, Tatra R, Primasari DS. Perbandingan Total Flavonoid dan Aktivitas Antioksidan Fraksi Etil Asetat Biji Kelor (*Moringa oleifera* L.) dan Biji Kecipir (*Psophocarpus tetragonolobus* L.). *Jurnal Farmasi Indonesia* 2022;19(1):98-109.
- [35] Diana R, Joenoes H, Djais AA. The effect of curcuma xanthorrhiza ethanol extract on the viability of streptococcus mutans and aggregatibacter actinomycetemcomitans (Dental biofilm research: In vitro study). *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*



- 2017;10:30–3. DOI:
<https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10s5.23087>.
- [36] Kunarti S, Subiwahjudi A, Dewi Tamara Yuanita R. Comparison of IPMP, Chlorine Dioxide and Chlorhexidine Gluconat Contained in Mouthwashes for Reducing Exopolysaccharide on Streptococcus Mutans Biofilms. 2017.
- [37] Gary Kaplowitz by J, Cortell M. 4 CE credits Chlorhexidine: A Multi-Functional Antimicrobial Drug A Peer-Reviewed Publication Written Educational Objectives. 2008.
- [38] Teanpaisan R, Kawsud P, Pahumunto N, Puripattanavong J. Screening for antibacterial and antibiofilm activity in Thai medicinal plant extracts against oral microorganisms. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 2017;7:172–7. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.06.007>.
- [39] Gusri A. Aktivitas antibakteri ekstrak etanol tangkai begonia (*Begonia multangula* Blume) terhadap penghambatan pembentukan biofilm *Porphyromonas gingivalis* secara in vitro. Skripsi. Purwokerto: Jenderal Soedirman University. 2021. (Tidak dipublikasikan).
- [40] Juliantina Rachmawaty F, Mahardika Akhmad M, Hikmah Pranacipta S, Nabila Z, Muhammad A. Optimasi Ekstrak Etanol Daun Sirih Merah (*Piper Crocatum*) sebagai Antibakteri terhadap Bakteri *Staphylococcus Aureus*. *Mutiara Medika: Jurnal Kedokteran Dan Kesehatan* 2018;18. DOI: <https://doi.org/10.18196/mm.180109>.
- [41] Sulistyani H, Fujita M, Miyakawa H, Nakazawa F. Effect of roselle calyx extract on in vitro viability and biofilm formation ability of oral pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2016;9:119–24. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.01.020>.

