

Isolasi, Identifikasi, Karakterisasi, dan Uji Antibiofilm Derivat Asam Galat dari Kulit Batang *Sterculia quadrifida* R.Br

Isolation, Identification, Characterization, and Antibiofilm Test of Gallic Acid Derivatives from *Sterculia quadrifida* R.Br Stem Bark

Rollando

Jurusan Farmasi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Ma Chung, Malang, Indonesia

**E-mail: ro.llando@machung.ac.id*

Diterima: 25 Maret 2017

Direvisi: 13 Juni 2017

Disetujui: 17 Juli 2017

Abstrak

Faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) digunakan secara empiris oleh penduduk Nusa Tenggara Timur untuk mengobati hepatitis, tifus, maag, dan digunakan sebagai pemulih stamina. Informasi senyawa aktif yang terkandung di dalam kulit batang faloak secara spesifik belum dipublikasi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui senyawa aktif yang terdapat di dalam kulit batang faloak yang dapat digunakan sebagai antibiofilm. Ekstraksi menggunakan metode sokletasi, isolasi menggunakan metode isolasi bertingkat, elusidasi menggunakan penggabungan informasi dari spektra NMR dan LC-MS, dan uji aktivitas penghambatan biofilm dilakukan menggunakan metode mikrodilusi terhadap biofilm yang terbentuk pada *microplate flat flexible U-bottom PVC 96 wells* dengan pewarnaan menggunakan *crystal violet* 1%. Hasil isolasi diperoleh 3 derivat asam galat yang diberi nama isolat 1, isolat 2, dan isolat 3. Uji penghambatan pembentukan biofilm menunjukkan isolat 1 memiliki IC_{50} sebesar 46,87 $\mu\text{g/mL}$, isolat 2 memiliki IC_{50} sebesar 45,87 $\mu\text{g/mL}$, dan isolat 3 memiliki IC_{50} sebesar 42,65 $\mu\text{g/mL}$. Hasil uji biofilm menunjukkan bahwa isolat 1-3 mempunyai daya penghambatan biofilm yang tinggi.

Kata kunci: Faloak; Isolat; Derivat asam galat; Antibiofilm

Abstract

Faloak (Sterculia quadrifida R.Br) is used empirically by residents of Timor island to treat hepatitis, typhoid, ulcers, and to restore stamina. Information of active compound contained in the bark of faloak specifically unpublished. This study aims to determine the active compound contained in faloak bark that can be used as antibiofilm. The extraction was performed by soxletation method, the isolation was performed by gradient isolation method, the elusidation was performed by merging information from NMR and LC-MS spectra analysis. The biofilm inhibition activity test was performed by microdilution method formed on flat bottom flexible microplate U-bottom PVC 96 wells with staining using 1% crystal violet. The isolation process obtained 3 gallic acid derivatives, named isolate 1, isolate 2, and isolate 3. Test of inhibition of biofilm formation showed isolate 1 has IC_{50} of 46,87 $\mu\text{g/mL}$, isolate 2 has IC_{50} of 45,87 $\mu\text{g/mL}$, and isolate 3 has IC_{50} 42,65 $\mu\text{g/mL}$. The biofilm test results showed that isolates 1-3 had high biofilm inhibition potency.

Keywords: Faloak; Isolate; Gallic acid derivative; Antibiofilm

PENDAHULUAN

Ramuan kulit batang faloak telah lama dimanfaatkan oleh masyarakat Nusa Tenggara Timur (NTT) sebagai tanaman obat.¹ Secara empiris, air rebusan kulit batang tumbuhan faloak digunakan masyarakat NTT sebagai obat hepatitis, tifus, maag, dan sebagai pemulih stamina.^{1,2} Pada penelitian terdahulu diketahui bahwa ekstrak etanol kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella thypi*, dan *Candida albicans* yang menguatkan adanya potensi antibiotik.^{1,3} Uji golongan senyawa kimia menyatakan bahwa ekstrak aseton, etil asetat, metanol, dan n-heksana dari kulit batang tumbuhan faloak memiliki senyawa flavonoid, fenolik, tanin, dan terpenoid.¹

Mulut merupakan tempat berkumpulnya berbagai jenis bakteri. Bakteri yang terdapat di dalam mulut antara lain *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus epidermis*, dan *Streptococcus viridians*.⁴ Bakteri di dalam mulut dapat menyebabkan karies pada gigi dan yang menjadi aktor utamanya adalah bakteri *Streptococcus mutans*. Bakteri yang resisten terhadap kondisi asam tersebut mampu membuat plak gigi atau biofilm.⁵

Biofilm merupakan kumpulan sel mikroorganisme, khususnya bakteri, yang melekat erat di suatu permukaan yang disertai dengan bahan-bahan organik dan diselimuti oleh matriks polimer ekstraseluler yang dikeluarkan oleh bakteri.⁶ Kontrol plak adalah penyingkiran plak mikrobial dan pencegahan terhadap akumulasinya ke permukaan gigi dan sekitarnya. Kontrol plak juga menghambat pembentukan kalkulus.⁷ Plak dapat dihilangkan dengan pembersihan secara mekanik dan penghambatan secara kimiawi. Pembersihan secara mekanis dapat dilakukan dengan menyikat gigi, sedangkan secara kimiawi dapat dilakukan dengan

obat kumur. Salah satu tujuan menyikat gigi yaitu menghambat pertumbuhan bakteri plak.⁸ Penggunaan obat tradisional secara umum dinilai lebih aman karena memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit daripada obat modern.⁹

Penelitian antibiofilm ini menggunakan bakteri *S. mutans* karena merupakan bakteri yang dominan dalam pembentukan plak gigi dan salah satu bakteri utama penyebab karies gigi. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui senyawa aktif pada kulit batang faloak yang mempunyai aktivitas penghambatan biofilm terhadap bakteri *S. mutans*.

METODE

Desain penelitian ini adalah eksperimental laboratorium dengan rancangan penelitian acak lengkap. Kegiatan yang dilakukan adalah pembuatan ekstrak metanol kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br), fraksinasi, isolasi, identifikasi struktur kimia, dan uji antibiofilm.

Alat dan bahan

Peralatan yang digunakan adalah autoklaf (AC-300AE, Tiyoda Manufacturing Co. Ltd, Jepang), kotak aseptis, *microtiter plate 96-well* (Bio-Rad, USA), inkubator (Sakura, Jepang), oven, Erlenmeyer (Pyrex), plat KLT (Merck), chamber KLT (Camag, Swis), *Laminar Air Flow cabinet* (FARRco), LC-MS (Mariner Biospectrometry System ESI, Jepang) dan spektrometer NMR (Delta 2 400 MHz untuk ¹H-NMR dan 100 MHz untuk ¹³C-NMR, Jerman). Bahan yang digunakan adalah kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br), bakteri *Streptococcus mutans* (ATTC 23287, USA), *Brain Heart Infusion* (Difco), metanol (Merck), n-heksana (Merck), etil asetat (Merck), n-butanol (Merck), FeCl₃ (Merck), DMSO (Merck), dan akuades.

Prosedur kerja

Sampling bahan dan determinasi

Kulit batang falোক (*Sterculia quadrifida* R.Br) diperoleh dari Balai Penelitian Kehutanan Kupang dan dideterminasi di laboratorium farmakognosi fitokimia Universitas Ma Chung, Malang, Indonesia. Pengambilan sampel kulit batang falोक dilakukan dengan mengambil kulit pada batang dengan diameter 30-40 cm.

Ekstraksi dan isolasi

Kulit batang falोक sebanyak 2 kg yang telah kering dibuat serbuk, dilakukan proses ekstraksi dengan Soxhlet menggunakan pelarut metanol sebanyak 8 liter selama 24 jam. Filtrat yang diperoleh dievaporasi dengan suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak kental dan dikeringkan hingga diperoleh bobot yang tetap. Sebanyak 50 gram ekstrak dilarutkan menggunakan 300 mL akuades.

Larutan ekstrak difraksinasi menggunakan n-heksana (3x100 mL), etil asetat (3x100 mL), dan n-butanol (3x100 mL) secara berurutan. Masing-masing fraksi dikeringkan pada suhu 40°C hingga diperoleh bobot fraksi yang tetap. Fraksi etil asetat (25,3 g) digunakan untuk dilakukan pemisahan menggunakan metode kromatografi kolom (3,0x50 cm) dengan fase diam silika gel. Pemisahan menggunakan fase gerak n-heksana:etil asetat dengan konsep gradien dari perbandingan 100:0 hingga 0:100 dan setiap fraksi ditampung menggunakan vial.

Dari jumlah 10 fraksi, fraksi 4 yang diperoleh dari perbandingan fase gerak 30%etil asetat:n-heksana, difraksinasi dengan metode kromatografi kolom menggunakan pelarut yang sama. Hasil pemisahan akhir, diperoleh isolat 1 (25 mg) dari penguapan solven 10% etil asetat:n-heksana. Fraksi 5 yang diperoleh dari perbandingan fase gerak 40% etil asetat:n-heksana difraksinasi kembali menggunakan kromatografi kolom LH-20 dengan fase gerak metanol sehingga

diperoleh isolat 2 (23 mg) dan isolat 3 (39 mg).

Uji antibiofilm

Uji penghambatan biofilm dilakukan dengan metode mikrodilusi. Bakteri disiapkan dengan membuat suspensi dalam media *Brain Heart Infusion* dan menggunakan standar *McFarland V* (15×10^5 CFU/mL) kemudian dilakukan pengenceran kadar masing-masing isolat yaitu 100 µg/mL, 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, dan 6,25 µg/mL dengan DMSO sebagai pelarut. Kontrol pelarut dalam uji ini adalah DMSO sedangkan kontrol positif yang digunakan adalah Listerine®. Larutan uji diletakkan pada *microplate flexible U bottom 96 wells*, dengan volume total 100 µL tiap sumuran menggunakan *micropipet*.

Pengujian dilakukan terhadap 1 *plate* uji dan 1 *plate* blanko. *Plate* uji berisi larutan isolat uji dengan penambahan suspensi bakteri 10% v/v, sedangkan *plate* blanko berisi larutan isolat dengan penambahan saline 10% v/v tanpa ditambahkan suspensi bakteri. *Microplate flexible U bottom 96 wells* ditutup dengan kertas parafilm kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu inkubator 36,6°C. *Microplate flexible U bottom 96 wells* dikeluarkan dari inkubator kemudian bahan uji dibuang dan dicuci dengan air mengalir sebanyak 3 kali. *Microplate flexible U bottom 96 wells* dikeringkan kemudian dalam tiap sumuran ditambahkan pewarna kristal violet 1% dalam air distilasi sebanyak 125 µL dan didiamkan selama 15 menit. *Microplate flexible U bottom 96 wells* dicuci lagi dengan air mengalir 3 kali, didiamkan selama 15 menit. Kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 200 µL dan didiamkan selama 15 menit.¹²

Selanjutnya dipindahkan 150 µL larutan dalam *microplate flexible U bottom 96 wells* ke *microplate flat-bottom 96 wells* menggunakan *micropipet multichannel*. Hasil uji berupa *Optical Density* (OD) dibaca dengan alat *microplatereader*.

Analisis data

Nilai KHM₉₀ merupakan konsentrasi terendah isolat yang masih mampu menghambat per tumbuhan *S. mutans* sebanyak 90%. Persentase penghambatan dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ penghambatan} = \left[1 - \frac{\text{OD Sampel uji} - \text{OD Blanko sampel}}{\text{OD Pelarut uji} - \text{OD Blanko pelarut}} \right] \times 100\%$$

Daya penghambatan dengan IC₅₀ yaitu konsentrasi isolat yang masih dapat menghambat pembentukan biofilm sebanyak 50%. Rumus % penghambatan dihitung dengan cara:

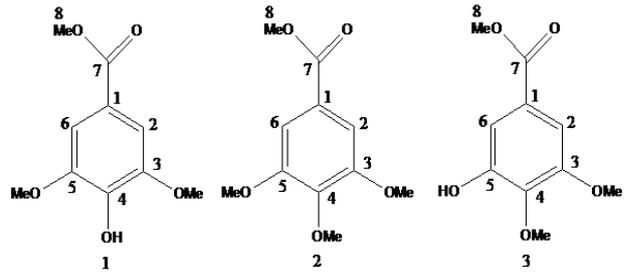
$$\% \text{ penghambatan} = \left[1 - \frac{\text{OD Sampel uji} - \text{OD Blanko sampel}}{\text{OD Pelarut uji} - \text{OD Blanko pelarut}} \right] \times 100\%$$

Nilai IC₅₀ ditentukan dengan metode probit menggunakan program *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versi 17. Digunakan analisis probit untuk mencari konsentrasi yang mampu membunuh 50% sampel (*Inhibitory Concentration 50*). Analisis probit digunakan untuk menguji tingkat konsentrasi terhadap respon sampel.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Isolat 1-3 mempunyai bentuk kristal yang berwarna putih. Isolat dielus menggunakan fase gerak etil asetat-asam format-etanol (65:15:20, v/v/v), setelah disemprot menggunakan reagen FeCl₃ setiap spot tunggal menunjukkan warna merah yang menunjukkan adanya senyawa fenolik. Struktur dari isolat 1-3 yang diisolasi dari kulit batang falok (*Sterculia quadrifida* R.Br) dielusidasi menggunakan data LC-MS, spektra 1-D, dan 2-D NMR. Spektra ¹H dan ¹³C NMR dari isolat 1 menunjukkan bahwa senyawa tersebut adalah turunan dari asam galat (Gambar 1).

Spektra menunjukkan adanya 2 proton metin pada δH/δC [7,31 d (2H), J = 2,0 Hz)/108,2, CH-2/6], gugus metoksi pada δH/δC [3,87 s (6H)/56,8, CH-3/5-Ome; 3,86 s (3H)/52,5, Me-8], dan 5 karbon kuartener pada δC 167,9 (C-7), 149,1 (C-3



Gambar 1. Struktur derivat asam galat. (1) isolat 1, (2) isolat 2, (3) isolat 3

dan 5), 142,0 (C-4), 121,3 (C-1). Posisi gugus metoksi dideterminasi menggunakan spektra ¹³C-NMR dan spektrum HMBC. Isolat 2 secara garis besar menyerupai isolat 1. Perbedaan ditemukan pada gugus metoksi pada atom C-4 mengikat gugus hidroksi pada senyawa 1. Isolat 3 secara struktur menyerupai senyawa 1, perbedaan ditemukan pada posisi gugus hidroksi dan metoksi.

Uji kuantitatif antibiofilm dilakukan menggunakan metode mikrodilusi dengan alat *microtiter plate polystyrene 96 wells flexible* yang melengkung pada bagian bawah. Pengujian ini dapat berupa *matrix quantification assay* yang dilakukan pada pewarnaan spesifik komponen-komponen matriks yaitu menggunakan kristal violet. Prinsip kerja uji penghambatan biofilm adalah setelah diinkubasi tidak langsung dibaca tapi diberi perlakuan dengan pemberian zat pewarna yaitu kristal violet.

Pewarnaan dengan menggunakan kristal violet telah dimodifikasi guna meningkatkan keakuratannya dan memungkinkan identifikasi biofilm secara kuantitatif. Kristal violet merupakan pewarna dasar yang mengikat molekul bermuatan negatif dan polisakarida dalam matriks ekstraseluler yang mewarnai sel yang masih hidup, mati, dan matriks biofilm. Tiap sumur diberi kristal violet kemudian dibuang dan dicuci dengan air mengalir maka kristal violet akan tetap melekat pada bagian yang terdapat biofilm. Cara ini dapat mendeteksi biofilm secara kuantitatif melalui pembentukan cincin berwarna ungu pada alat *microtiter plate polystyrene 96 wells flexible*.

Hasil penghambatan pertumbuhan biofilm ditunjukkan pada tabel 1-3. Data dari tabel 1-3 memperlihatkan bahwa isolat 1-3 mempunyai daya hambat maksimal pada konsentrasi isolat 100 µg/mL. Listerine® digunakan sebagai kontrol pembanding karena merupakan obat kumur yang telah beredar di pasaran dan banyak digunakan oleh masyarakat. Hasil optimasi penggunaan Listerin® menunjukkan bahwa konsentrasi Listerin® 45% v/v sudah dapat menghambat pembentukan biofilm >98% sehingga ditetapkan dalam penelitian ini konsentrasi yang digunakan sebesar 45% v/v. Kontrol pembanding Listerine® 45% dalam uji antibiofilm menunjukkan daya penghambatan pertumbuhan dengan rata-rata sebesar 99.28%. Berdasarkan data tabel 1-3, isolat 1-3 menunjukkan KHM₉₀ pada konsentrasi 100 µg/mL. Setelah diperoleh data % penghambatan, nilai IC₅₀ ditentukan dengan metode probit menggunakan program *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) versi 17.

Uji penghambatan pembentukan biofilm menunjukkan isolat 1 memiliki IC₅₀ sebesar 46,87 µg/mL, isolat 2 memiliki IC₅₀ sebesar 45,87 µg/mL, dan isolat 3 memiliki IC₅₀ sebesar 42,65 µg/mL. Hasil pengujian antibiofilm isolat 1-3 menunjukkan adanya *dose dependant activity* yang ditunjukkan dengan meningkatnya aktivitas sesuai kenaikan konsentrasi.

Derivat asam galat (isolat 1-3) merupakan golongan senyawa fenolik, yang mampu bekerja melalui penghambatan enzim oleh senyawa yang teroksidasi, kemungkinan melalui reaksi dengan gugus sulfhidril atau melalui interaksi yang non spesifik dengan protein mikroorganisme.¹⁰

Polifenol juga dapat menyebabkan denaturasi protein bakteri. Tanin yang merupakan senyawa polifenol diketahui memiliki kemampuan aktivitas transpeptidase peptidoglikan sehingga mengganggu pembentukan dinding sel kemudian sel tidak dapat menahan tekanan osmotik internal yang dapat mencapai 5-20 atmosfer.¹¹ Tekanan ini cukup untuk

memecah sel apabila dinding sel dirusak. Kerusakan pada membran ataupun dinding sel menyebabkan keluarnya berbagai komponen penting dari dalam sel bakteri yaitu protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain yang berasal dari sitoplasma dan sel bakteri akan mengalami lisis.¹²

Tabel 1. Data persen penghambatan biofilm isolat 1 dan Listerine®

No	Perlakuan	Konsentrasi	Penghambatan Petumbuhan Biofilm
1	Isolat 1	100 µg/mL	96.55 % (94.66 – 98.94)
2	Isolat 1	50 µg/mL	53.18 % (46.88 – 59.96)
3	Isolat 1	25 µg/mL	27.65 % (23.11 - 29.86)
4	Isolat 1	12.5 µg/mL	6.62 % (3.13 – 8.98)
5	Isolat 1	6.25 µg/mL	1.19 % (0.98- 2.39)
6	Listerine®	45 % b/v	99.93 % (98.87- 99.99)

*Signifikan pada level P < 0,05

Tabel 2. Data persen penghambatan biofilm isolat 2 dan Listerine®

No	Perlakuan	Konsentrasi	Penghambatan Petumbuhan Biofilm
1	Isolat 2	100 µg/mL	97.34 % (95.87 – 98.99)
2	Isolat 2	50 µg/mL	51.67 % (47.98 – 53.52)
3	Isolat 2	25 µg/mL	25.76 % (23.55 - 27.64)
4	Isolat 2	12.5 µg/mL	7.87 % (4.44 – 9.87)
5	Isolat 2	6.25 µg/mL	2.92 % (1.13- 3.45)
6	Listerine®	45 % b/v	98.76 % (97.98- 99.45)

*Signifikan pada level P < 0,05

Tabel 3. Data persen penghambatan biofilm isolat 3 dan Listerine®

No	Perlakuan	Konsentrasi	Penghambatan Petumbuhan Biofilm
1	Isolat 3	100 µg/mL	98.99 % (95.87 – 99.98)
2	Isolat 3	50 µg/mL	59.14 % (54.98 – 61.33)
3	Isolat 3	25 µg/mL	28.15 % (25.13 - 30.98)
4	Isolat 3	12.5 µg/mL	7.22 % (5.16 – 9.99)
5	Isolat 3	6.25 µg/mL	2.45 % (1.87- 3.13)
6	Listerine®	45 % b/v	99.14 % (98.98- 99.87)

*Signifikan pada level P < 0,05

Metabolisme sakarida *S.mutans* dilaporkan dapat dihambat oleh asam galat.¹³ Asam galat memiliki daya penghambatan pada pertumbuhan bakteri kariogenik dan periodontopatik dan secara signifikan menghambat pembentukan biofilm dari *S.mutans* secara *in vitro*.¹⁴ Asam galat dan asam tanat pada konsentrasi 40 µg/mL menunjukkan efek penghambatan yang signifikan pada pembentukan biofilm dari *S.mutans* dengan cara menghambat enzim glukosiltransferase dan fruktosiltransferase.¹⁵ Namun, efek penghambatan pembentukan biofilm oleh asam galat dipengaruhi oleh tingkat nutrisi, suhu, dan kondisi perawatan.

KESIMPULAN

Isolasi senyawa aktif dari kulit batang faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br) menghasilkan tiga isolat yang merupakan derivat dari asam galat. Uji penghambatan pembentukan biofilm menunjukkan ketiganya memiliki aktivitas antibiofilm. Isolat 1 memiliki IC₅₀ sebesar 46,87 µg/mL, isolat 2 memiliki IC₅₀ sebesar 45,87 µg/mL, dan isolat 3 memiliki IC₅₀ sebesar 42,65 µg/mL.

UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Program Studi Farmasi Universitas Ma Chung yang telah memberikan dukungan dan membantu sarana prasarana dalam penelitian ini.

DAFTAR RUJUKAN

1. Siswadi, Rianawati H, Saragih G, Hadi, D. The potency of faloak's (*Sterculia quadrifida*R.Br) active compounds as natural remedy. Prosiding Seminar International, Kementrian Kehutanan bagian Penelitian dan Pengembangan Hutan, Bogor. 2013;4-10.
2. Fabianus R. Aktivitas anticendawan zat ekstraktif faloak (*Sterculia comosa* Wallich). Jurnal Kehutanan IPB. 2012;67(2):6-11.
3. Rollando. Penelusuran potensi aktivitas antibakteri dan antioksidan fraksi kulit pohon faloak (*Sterculia quadrifida* R.Br). Jurnal Kefarmasian. 2016;4:1-5.
4. Shakh MAR, Ohara-Nemoto T, Ono Y, Shimoyama S, Kimura TK, Nemoto K. In vitro processing of glutamyl endopeptidaseproenzymes from *Enterococcus faecalis* and importance of N-terminal residue in enzyme catalysis, *Advances in Biochemistry*. 2013; 1(5): 73-80.
5. Darby ML, Margaret MW. *Dental hygiene: theory and practice*, 3rd ed. Elsevier, London. 2010. H. 3,16
6. Madigan MT, Martinko JM, Brock TD. *Brock. Biology of Microorganisms*. 14th Ed. New Jersey: Pearson Prentice. 2014;617-619.
7. Eke PI, Dye BA, Wei L, Thornton-Evans GO, Genco RJ. Prevalence of periodontitis in adults in the United States. *Dent Res*. 2010;91(10):914-20.
8. Arinda A, Rahardjo P, Triwardani A., Perbedaan efektivitas obat kumur yang mengandung cengkeh dengan obat kumur chlorexidine gluconat 0.2% dalam menghambat pembentukan plak. *Orthodontic Dental Journal*. 2012;01:22-25.
9. Raina L. *Ensiklopedi tumbuhan berhasiat obat*. Jakarta: Salemba Medika. 2011;13-19.
10. Daglia, M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr. Opin. Biotechnol*. 2012;23:174–181
11. Quideau S, Deffieux D, Douat-Casassus C, Pouysegou, L. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl*. 2011;50:586–621.
12. Cushnie TP, Lamb AJ. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2011;38:99–107.
13. Ren Z, Chen L, Li J, Li Y. Inhibition of *Streptococcus mutans* polysaccharide synthesis by molecules targeting glycosyltransferase activity. *J. Oral Microbiol*. 2016;8:31-95.
14. Kang, MS, Oh JS, Kang IC, Hong SJ, Choi CH. Inhibitory effect of methyl gallate and gallic acid on oral bacteria. *J. Microbiol*. 2008;46:744–750.
15. Krzyściak W, Jurczak A, Kościelniak D, Bystrowska B, Skalniak A. The virulence

of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. 2014;33:499–515.