

- - - - -

Efek Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum Basilicum L.*) Sebagai Agen Penghambat Pembentukan Biofilm *Streptococcus Mutans*

The Effect Of An Essential Oils Basil Leaves (*Ocimum Basilicum L.*) As An Inhibitor Agent For Formation Of *Streptococcus Mutans* Biofilms

Like Rosita Dwi Susanto¹, Archadian Nuryanti², Ivan Arie Wahyudi²

¹ Pendidikan Dokter Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gajah Mada

² Bagian Biomedika, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Gajah Mada

Abstrak

Kemangi (*Ocimum basilicum L.*) merupakan tanaman yang sering digunakan untuk obat tradisional. Kandungan eugenol dalam minyak atsiri daun kemangi memiliki efek antibakteri terhadap bakteri Gram positif. *Streptococcus mutans* adalah bakteri anaerobik fakultatif Gram positif di dalam rongga mulut yang banyak ditemukan dalam plak biofilm. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum L.*) sebagai agen penghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans*. Penelitian ini dimulai dari penagadaan daun kemangi, kemudian dilakukan destilasi uap air hingga didapat minyak atsiri. Konsentrasi minyak atsiri yang digunakan dalam penelitian ini adalah 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%, dan 0,0625% dengan menggunakan pelarut PEG 400 2,5%. Uji agen penghambat pembentukan biofilm dilakukan pada *microplate round bottom 96 wells* dengan pewarnaan kristal violet 0,5%. Pembacaan nilai absorbansi menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 595nm. Data yang didapat diolah menggunakan rumus penghambatan pembentukan biofilm. Daya penghambatan pembentukan biofilm dinyatakan sebagai nilai IC₅₀ yang dianalisis menggunakan metode Probit pada program *SPSS versi 16*. Hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi minyak atsiri daun kemangi 0,0625%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, dan 1% dapat menghambat pembentukan biofilm *S. mutans* sebesar 4,451%, 40,121%, 80,416%, 88,586%, dan 94,812%. Kesimpulan dari penelitian ini adalah minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum L.*) memiliki efek sebagai agen penghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* dengan IC₅₀ pada konsentrasi 0,168%.

Kata kunci : kemangi, penghambatan, biofilm, *Streptococcus mutans*, IC₅₀

Abstract

Basil (*Ocimum basilicum L.*) is a plant that is widely used for traditional medicine. Eugenol content in the essential oils of basil leaves have antibacterial effect against Gram-positive bacteria. *Streptococcus mutans* is an anaerobic facultative Gram-positive bacteria in the oral cavity which is most commonly found in biofilms. The aim of the research was to identify the effect of an essential oils basil leaves (*Ocimum basilicum L.*) as an inhibitor agent for formation of *Streptococcus mutans* biofilms. This research started from the collection of kg basil leaves, then distilled using steam distillation method until gotten the essential oils. Essential oils were prepared in this research at the concentration of 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, and 0.0625% using PEG 400 2.5% as suspending agent. Biofilm formation inhibition test carried out with *microplate round bottom 96 wells* then stained with crystal violet 0,5 %. Absorbance values reading was using *microplate reader* with wavelengths 595nm. The data was processed using the formula of inhibition biofilms formation. The ability of inhibition biofilms formation was determined as a value of the IC₅₀ wich was analyzed by Probit method on the program *SPSS 16*. The results of research showed that at the concentration of 0.0625%, 0.125%, 0.25%, 0.5%, and 1% essential oils basil leaves can inhibits 4.451%, 40.121%, 80.416%, 88.586%, and 94.812% *S. mutans* biofilms formation. As conclusion, essential oils basil leaves (*Ocimum basilicum L.*) had the ability as an inhibitor agent for formation of *Streptococcus mutans* biofilms that indicated by the IC₅₀ of 0.168%.

Key words : basil, inhibitory, biofilm, *Streptococcus mutans*, IC₅₀

Pendahuluan

Streptococcus adalah bakteri anaerobik fakultatif, yang merupakan agen utama dalam metabolisme plak. Banyaknya spesies bakteri yang ditemukan pada plak gigi, dari semuanya itu hanyalah *Streptococcus mutans* yang menunjukkan hubungan yang jelas dengan awal pembentukan karies gigi¹. Sifat *acidogenic* dan *aciduric* (berhubungan dengan toleransi terhadap asam) *Streptococcus mutans*, bersama dengan kemampuannya untuk mensintesis glukon ekstraseluler, merupakan faktor utama dalam pembentukan biofilm kariogenik². Telah terbukti bahwa jumlah *Streptococcus mutans* yang lebih dari 10^5 cfu/ml di saliva berhubungan dengan resiko karies yang tinggi³.

Biofilm bakteri merupakan komunitas mikrobial yang kompleks yang ditemukan pada semua permukaan mukosa manusia dan hewan. Komunitas bakteri yang tinggal di dalam tubuh manusia terdiri atas puluhan sampai ratusan spesies yang berbeda atau *phylotypes*, seperti yang terlihat di usus, vagina, dan *oral biofilm*. Perubahan pada ekologi biofilm dapat menyebabkan radang usus, vaginitis, dan karies gigi. Interaksi antar spesies bakteri yang berada dalam biofilm berpengaruh terhadap komposisi dari komunitas. Sebagai akibatnya, perubahan dari populasi mikroorganisme berpengaruh baik menjadi biofilm yang menguntungkan atau sebaliknya mengakibatkan suatu penyakit. Komunitas bakteri dalam keadaan menguntungkan, membatasi bakteri yang berpotensi bahaya dari kolonisasi, atau melindungi *host* dari penyakit. Namun, beberapa penyakit yang disebabkan mikroorganisme muncul pada saat kondisi *host* sedang sehat, dan pergeseran populasi dapat berefek padavirulensi spesies⁴.

Kemangi merupakan tanaman yang memiliki banyak manfaat, antara lain sebagai obat, pestisida nabati, penghasil minyak atsiri, sayuran dan minuman penyegar [5]. Tanaman kemangi memiliki khasiat merangsang penyerapan, peluruh keringat (*diaphoretic*), diuretik, pelancar peredaran darah, penghilang rasa sakit (analgesik), dan pembersih racun⁶.

Minyak atsiri merupakan salah satu metabolit sekunder yang dihasilkan oleh tanaman tingkat tinggi dan mempunyai peranan penting bagi tanaman itu sendiri maupun bagi kehidupan manusia. Minyak atsiri mempunyai aktivitas farmakologis yang beragam antara lain analgesik, antipiretik, antiseptik, dan banyak juga yang memiliki aktivitas antibakteri dan antijamur yang kuat⁷. Minyak atsiri daun kemangi tersusun atas senyawa hidrokarbon, alkohol, ester, phenol (eugenol 1-19 %, iso-eugenol), eter phenolat (metil clavicol 3-31%, metil eugenol 1-9%), oksida dan keton⁸. Minyak atsiri daun kemangi mengandung eugenol yang merupakan turunan senyawa fenol yang memiliki efek antiseptik dan bekerja dengan merusak membran sel bakteri⁹.

Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui efek minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) sebagai agen penghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans*. Hasil yang diperoleh dari penelitian ini diharapkan dapat memberikan sumbangan informasi mengenai kegunaan tumbuhan kemangi (*Ocimum basilicum* L.) sebagai agen antiplak.

Metodologi Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) didapat dari Imogiri, bakteri *Streptococ-*

cus mutans, media BHI, sukrosa 2%, standar McFarland V $\{(15 \times 10^8) \text{ CFU/ml}\}$, minyak atsiri daun kemangi, pelarut PEG 400, *chlorhexidine gluconate* 0,2% Minosep®, larutan saline, aquadest steril, kristal violet 0,5%, etanol 96%.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi rangkaian alat destilasi uap air, *micropipet* Socorex® ukuran 5-50 μl , 50-200 μl , *blue tip*, *yellow tip*, *white tip*, *syringe* 1ml Terumo®, tabung *ependorf*, tabung *Falcon*®, *laminar air flow*, lampu bunsen, *microplate round bottom 96wells* Iwaki®, *microplate flatbottom 96wells* Iwaki®, tabung reaksi, inkubator, autoklaf, spidol, dan *Bio-rad microplate reader Benchmark*.

Penelitian diawali dengan identifikasi tanaman untuk memastikan bahwa tanaman yang digunakan benar tanaman kemangi. Kemudian dilakukan destilasi uap air untuk mendapatkan minyak atsiri. Daun kemangi dipetik kemudian dicuci hingga bersih. Daun kemangi yang telah dicuci tersebut kemudian dipotong-potong. Potongan-potongan kecil tersebut kemudian dimasukkan ke atas ang-sang dandang destilasi yang sudah berisi air sebanyak 6 liter yang dihubungkan dengan alat pendingin (kondensor) yang terhubung dengan alat pemisah minyak atsiri (penampung destilat). Pemanasan dilakukan di atas kompor gas selama 6 jam dengan suhu 100°C.

Langkah selanjutnya adalah uji agen penghambat pembentukan biofilm. Uji ini menggunakan metode mikrodilusi. Bakteri disiapkan dengan membuat suspensi dalam media BHI dan digunakan standar McFarland V $\{(15 \times 10^8) \text{ CFU/ml}\}$. Kemudian dilakukan pengenceran serial dari larutan stok 4% dengan konsentrasi dari masing-masing minyak atsiri: 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125%,

0,0625% dalam media BHI + sukrosa 2%. Sebagai kontrol pelarut digunakan PEG 400 2,5% dan kontrol positif digunakan *chlorhexidine gluconate* 0,12% Minosep®. Larutan uji diletakkan pada *microplate round bottom 96wells*, dengan volume total 100 μl tiap sumuran dengan menggunakan *micropipet*. Sumuran uji berisi larutan minyak atsiri uji dengan penambahan suspensi bakteri 10%, sedangkan sumuran blanko berisi larutan minyak atsiri uji dengan penambahan saline 10% tanpa ditambahkan suspensi bakteri. *Microplate round bottom 96wells* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu inkubator 37°C. *Microplate round bottom 96wells* dikeluarkan dari inkubator kemudian larutan uji dibuang dan dicuci dengan air mengalir sebanyak 3 kali. *Microplate round bottom 96wells* dikeringkan kemudian dalam setiap sumuran ditambahkan pewarna kristal violet 0,5% sebanyak 150 μl dan didiamkan selama 15 menit. *Microplate round bottom 96wells* dicuci lagi dengan air mengalir 3 kali, didiamkan selama 15 menit. Kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 200 μl dan didiamkan selama 15 menit. Tahap akhir adalah sebanyak 150 μl larutan dalam *microplate round bottom 96wells* dipindahkan ke *microplate flat bottom 96 wells* dengan menggunakan *syringe* 1ml. Hasil uji berupa *optical density* (OD) dibaca dengan alat *Bio-rad microplate reader Benchmark* dengan panjang gelombang 595nm, di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM¹⁰.

Daya penghambatan pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* ditunjukkan dengan harga IC_{50} yaitu konsentrasi minyak atsiri yang dapat menghambat pembentukan biofilm sebanyak 50%. Rumus yang digunakan untuk menghitung persen penghambatan adalah sebagai berikut¹⁰ :

$$\% \text{ penghambatan} = \left[1 - \left(\frac{OD \text{ sampel} - OD \text{ blanko sampel}}{OD \text{ pelarut} - OD \text{ blanko pelarut}} \right) \right] \times 100$$

Dengan keterangan: OD sampel: *Optical density* minyak atsiri + PEG 400 + suspensi bakteri; OD blanko sampel: *Optical density* minyak atsiri + PEG 400 + saline; OD pelarut: *Optical density* kontrol pelarut PEG 400 + suspensi bakteri; OD blanko pelarut: *Optical density* kontrol pelarut PEG 400 + saline. Harga IC₅₀ didapat dari analisis metode Probit pada program SPSS versi 16.

Hasil Dan Pembahasan

Hasil identifikasi tanaman di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan, Fakultas Biologi, UGM, Yogyakarta, menyatakan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah benar tanaman kemangi (*Ocimum Basilicum* L.). Tanaman kemangi sebanyak 50 ikat kemudian diambil daun urutan ketiga hingga kelima dari pucuk teratas. Daun seberat 3,66kg didestilasi dengan metode uap air sehingga didapat minyak atsiri sebanyak 2,1ml.

Hasil uji penghambatan pembentukan biofilm dapat dilihat dalam Tabel I. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) mampu menghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans*. Dari tabel tersebut terlihat bahwa semakin besar konsentrasi, semakin tinggi pula daya hambat pembentukan biofilmnya. Hasil analisis Probit menunjukkan bahwa konsentrasi minyak atsiri daun kemangi yang dapat menghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* sebanyak 50% adalah 0,168%.

Tabel I. Data uji minyak atsiri daun kemangi sebagai agen penghambat pembentukan biofilm

Kadar minyak atsiri (%)	% penghambatan pembentukan biofilm				
	Replikasi 1	Replikasi 2	Replikasi 3	Replikasi 4	Rerata ± SD
1	91,358	95,087	96,475	96,330	94,812 ± 2,386
0,5	90,258	89,925	90,641	83,519	88,586 ± 3,390
0,25	63,985	71,321	93,011	93,347	80,416 ± 15,039
0,125	15,445	53,980	89,502	1,555	40,121 ± 39,694
0,0625	0,044	3,059	12,387	2,314	4,451 ± 5,444
Kontrol +	84,319	85,188	69,218	-	79,575 ± 8,980
Kontrol -	0,380	0,591	0,296	-	0.422 ± 0.152

Larutan uji setelah dilakukan inkubasi selama 24jam, cairan yang ada di dalam *wells* dibuang kemudian dicuci 3x, hal ini dimaksudkan untuk menghilangkan bahan-bahan lain yang ada di dalam *wells* agar yang tersisa hanyalah biofilm yang menempel di dinding *wells*. Biofilm yang menempel ini kemudian diwarnai oleh kristal violet 0,5%. Metode pewarnaan kristal violet telah secara luas digunakan untuk menghitung biofilm bakteri, serta merupakan metode pewarnaan yang murah dan cepat dibanding metode kuantifikasi biofilm lainnya¹¹. Pada protokol untuk kuantifikasi biofilm statis dalam *microtitter plate* menyebutkan bahwa kristal violet tidak hanya mewarnai sel, namun juga setiap material yang menempel pada permukaan *plate*, termasuk komponen matriks. Penambahan etanol untuk melarutkan kristal violet yang telah mewarnai biofilm yang menempel, kemudian larutan dipindah ke *microtitter plate* yang baru dan dibaca absorbansinya menggunakan *microplate reader*¹².

Pelarut yang dipakai untuk melarutkan minyak atsiri daun kemangi adalah PEG 400 2,5%, hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya [8], yang membandingkan beberapa pelarut yang kemudian didapat hasil bahwa pelarut PEG 2,5% dapat mencampur minyak atsiri daun kemangi dengan baik membentuk sistem emulsi yang baik dan jernih dibanding dengan pelarut lainnya. *Polyethylene glycol* atau PEG merupakan polieter hidrofilik yang netral, digunakan dalam berbagai kegunaan dan aplikasi termasuk sebagai agen non toksik, pelumas non imunogenik, atau sebagai pembawa dalam formulasi farmasi¹³. PEG memiliki karakteristik hidrofilik karena ikatan hidrogen yang terkandung didalamnya¹⁴. PEG tidak akan berikatan dengan *Streptococcus mutans* sebab *Streptococcus mutans*

bersifat hidrofobik. Interaksi hidrofobik memainkan peranan penting dalam perlekatan mikroorganisme ke berbagai permukaan dan memfasilitasi pembentukan biofilm¹⁵. Oleh karena itu setelah inkubasi, saat cairan dalam *plate* dibuang, *Streptococcus mutans* yang telah menempel pada dinding *plate* tetap menempel dan tidak ikut terbang.

Pengujian daya penghambatan pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* memberikan nilai IC₅₀ sebesar 0,168%, IC₅₀ adalah konsentrasi dimana minyak atsiri dapat menghambat 50% pembentukan biofilm. Nilai IC₅₀ sering digunakan untuk uji penghambatan pembentukan biofilm. Semakin kecil nilai IC₅₀ maka semakin efektif pula sampel tersebut dalam menghambat pembentukan biofilm¹⁶.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan hubungan linier antara konsentrasi minyak atsiri dengan daya hambat pembentukan biofilm. Atau dengan kata lain semakin tinggi konsentrasi minyak atsiri, semakin besar pula daya hambat pembentukan biofilmnya. Biofilm yang seharusnya terbentuk dan menempel pada dinding *plate* dihambat pembentukannya oleh minyak atsiri. Mekanisme penghambatannya masih belum diketahui secara pasti. Minyak atsiri daun kemangi mengandung eugenol. Eugenol diyakini memiliki aktivitas antibiofilm¹⁷. Hidrokarbon monoterpena seperti eugenol dapat menginaktifkan enzim, bereaksi dengan aktivitas membran sel, atau mengganggu fungsionalitas material genetik, produksi energi, dan sintesis komponen struktur¹⁸. Kemampuan eugenol dalam menginaktifkan enzim ini, kemungkinan menyebabkan terganggunya aktivitas enzim glukosiltransferase yang digunakan *Streptococcus mutans* untuk mensintesis sukrosa dalam media menjadi glukukan. Glukan merupakan media

perlekatan bakteri, apabila jumlahnya sedikit, mengakibatkan pembentukan biofilm terhambat¹⁰.

Senyawa fenol pada minyak atsiri daun kemangi memiliki aktivitas antibakteri, hal ini mengakibatkan terganggunya komunikasi “*quorum sensing*” pada koloni bakteri untuk membentuk biofilm¹⁰. Kemungkinan mekanismenya dimulai dari pertumbuhan bakteri yang dihambat oleh senyawa fenol yang mengakibatkan jumlah bakteri berkurang sehingga kemampuan koloni bakteri untuk saling berkomunikasi dalam “*quorum sensing*” menjadi terhambat. Hal ini membuat terganggunya produksi lapisan eksopolisakarida (EPS) oleh bakteri yang berfungsi untuk menjaga integritas biofilm, sehingga berakibat terhambatnya pembentukan biofilm.

Rumus persentase penghambatan yang digunakan merupakan modifikasi dari rumus Quave¹⁰. Rumus tersebut menghitung *optical density* pada jam ke-0 dan jam ke-18 setelah inkubasi. Hal ini tidak dapat dilakukan oleh peneliti, sebab proses pembacaan *optical density* dilakukan di laboratorium Parasitologi Fakultas Kedokteran UGM sedangkan penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan UGM, sehingga membutuhkan waktu antara selesai inkubasi (saat dikeluarkan dari inkubator) dengan pembacaan *optical density*. Kemungkinan hal ini berpengaruh terhadap hasil yang didapat, dimana hasil yang didapat oleh peneliti adalah tidak begitu homogen.

Penelitian ini memberi hasil standar deviasi yang tinggi pada konsentrasi minyak atsiri 0,125% dan 0,0625% yang disebabkan oleh *range* hasil yang terlalu jauh. Persentase penghambatan pembentukan biofilm dengan *range* yang jauh ini kemungkinan dikarenakan pipeting bakteri *Streptococcus mutans*

yang tidak sama jumlahnya atau ada yang tertinggal pada tip. Hal ini mengakibatkan hasil yang didapat nilainya bervariasi.

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat diambil kesimpulan bahwa minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) memiliki efek sebagai agen penghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* dengan IC₅₀ pada konsentrasi 0,168%.

Daftar Pustaka

1. Fischetti, V.A., 2006, Gram-Positive Pathogens, *ASM Press*, Washington, 335, 561.
2. Koo, H., 2003, Inhibition of *Streptococcus Mutans* Biofilm Accumulation and Polysaccharide Production by Apigenin and Tt-Farnesol, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol.52: 782–789.
3. Leal, S.C., Mickenautsch, S., 2010, Salivary *Streptococcus Mutans* Count and Caries Outcome – a Systematic Review, *J Minim Interv Dent.*, Vol. 3 (4): 137-147.
4. Kreth J., Zhang Y., Herzberg M.C., 2008, Streptococcal Antagonism in Oral Biofilms: *Streptococcus sanguinis* and *Streptococcus gordonii* Interference with *Streptococcus mutans*, *Journal of Bacteriology*, Vol. 190 (13): 4632-4640.
5. Hadipoentyanti, E., Wahyuni, S., 2008, Keragaman Selasih (*Ocimum* Spp.) Berdasarkan Karakter Morfologi, Produksi dan Mutu Herba, *Jurnal Littri* 14(4): 141 – 148.

6. Hariana, A., 2008, Tumbuhan Obat dan Khasiatnya, Seri 2, Penerbit Swadaya, Depok, 26.
7. Mukhtar, M.H., Adnan, A.Z., Pitra M.W., 2007, Uji Sitotoksitas Minyak Atsiri Daun Kamangi (*Ocimum Basilicum L.*) dengan Metoda Brine Shrimp Lethality Bioassay, *J. Sains Tek Far.*, Vol. 12 (1): 1-4.
8. Maryati, Fauzia, R.T., Rahayu, T., 2007, Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum Basilicum L.*) terhadap *Staphylococcus Aureus* dan *Escherichia Coli*, *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, Vol. 8, No. 1, 2007: 30 – 38.
9. Siswandono, S., 1995, Prinsip-Prinsip Rancangan Obat, Universitas Airlangga, Surabaya, 249-251.
10. Ardani, M., Sylvia, U.T.P., Hertiani, T., 2010, Efek Campuran Minyak Atsiri Daun Cengkeh dan Kulit Batang Kayu Manis sebagai Antiplak Gigi, *Majalah Farmasi Indonesia* 21 (3): 191-201.
11. Li, X., Yan, Z., Xu, J., 2003, Quantitative Variation of Biofilms Among Strains in Natural Populations of *Candida albicans*, *Microbiology* 149: 353-362.
12. Narisawa, N., Furukawa, S., Ogihara, H., Yamasaki, M., 2005, Estimation of the Biofilm Formation of *Escherichia coli* K-12 by the Cell Number, *Journal of Bioscience and Bioengineering* Vol. 99 (1): 78-80.
13. Fee, C.J., Alstine, J.M.V., 2005, PEG-Proteins: Reaction Engineering and Separation Issues, Department of Materials and Process Engineering University of Waikato, Hamilton, 3.
14. Kao, M.J., Tien, D.C., Jwo, C.S., Tsung, T.T., 2005, The Study of Hydrophilic Characteristics of Ethylene Glycol, *Journal of Physics: Conference Series* 13: 442-445.
15. Tahmourespour, A., Kermanshahi, R.K., Salehi, R., Nabinejad, A., 2008, The Relationship between Cell Surface Hydrophobicity and Antibiotic Resistance of Streptococcal Strains Isolated from Dental Plaque and Caries, *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, Vol. 10 (4): 251-255.
16. Hertiani, T., Pratiwi, S.U.T., Kuswahyuning, R., Irianto, I.D.K., Adityaningrum, D., Pranoto, B., Ardani, M., Prasasti, D., 2009, Eksplorasi Minyak Atsiri Sebagai Alternatif Bahan Aktif Pasta Gigi Anti Plak Berdasarkan Aktivitas Antibakteri dan Inhibitor Biofilm Pada *Streptococcus mutans* Secara In Vitro, *Laporan Penelitian, Fakultas Farmasi UGM*, Yogyakarta, 32.
17. Niu, C., Gilbert, E.S., 2004, Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 70 (12): 6951-6956.
18. Davidson, P.M., 2001, Chemical Preservatives and Naturally Antimicrobial Compounds sit Celikel, N., Kavas, G., 2008, Antimicrobial Properties of Some Essential Oils Against Some Pathogenic Microorganisms, *Czech J. Food Sci.*, Vol. 26 (3): 174-181.