

**AKTIVITAS ANTIBAKTERI DAN PENGHAMBATAN BIOFILM EKSTRAK METANOL KULIT BATANG *Hibiscus tiliaceus* TERHADAP PERTUMBUHAN BAKTERI *Streptococcus mutans***

**Wati Lukaraja<sup>1</sup>, Widya Lessy<sup>1</sup>, Cecilia Anna Seumahu<sup>1\*</sup>, Anneke Pesik<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Jurusan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Pattimura, Indonesia

\*Corresponding Author e-mail: ceciliaseumahu@gmail.com

**ABSTRAK**

Karies gigi merupakan penyakit infeksi yang terjadi di rongga mulut diawali oleh terbentuknya plak gigi atau biofilm. Penelitian ini bertujuan untuk menguji daya hambat dan penghambatan biofilm dari ekstrak kulit batang pohon waru (*Hibiscus tiliaceus*). Metode uji yang digunakan adalah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sedangkan analisis penghambatan biofilm menggunakan spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 580 nm dengan standard McFarlandII (6x10<sup>8</sup> CFU/ml). Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak metanol kulit batang pohon waru pada konsentrasi kecil 0,5% dapat menghambat dan membunuh bakteri *Streptococcus mutans* ditunjukkan dengan jumlah koloni yang tumbuh semakin sedikit dengan nilai 3,34 x 10<sup>7</sup> CFU/ml pada koloni yang tumbuh di konsentrasi ekstrak 2% dan 1%. Penghambatan biofilm ditunjukkan dengan nilai absorbansi yang semakin menurun karena konsentrasi ekstrak yang meningkat sehingga terjadinya pembentukan biofilm semakin sedikit..

*Keywords* : biofilm, plak gigi, *Streptococcus mutans*, tumbuhan waru

**PENDAHULUAN**

Karies gigi merupakan penyakit infeksi umum yang sering terjadi dikalangan masyarakat diawali oleh terbentuknya plak gigi atau biofilm di rongga mulut [1]; [2]. Biofilm adalah 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 [3]. Kontrol plak adalah penyingkiran plak mikrobial dan pencegahan terhadap akumulasinya ke permukaan gigi dan sekitarnya [4].

*Streptococcus mutans* merupakan bakteri anaerob fakultatif gram positif yang dapat menghasilkan asam laktat sebagai bagian dari hasil metabolisme dan berguna untuk hidup bakteri tersebut. *Streptococcus mutans* memiliki kemampuan untuk mengikat sukrosa pada permukaan gigi dengan pembentukan glukon tidak larut air dan polisakarida yang membantu dalam mengikat bakteri pada gigi [5]. *Streptococcus mutans* dapat menurunkan atau mempertahankan pH mulut pada nilai wajar asam, yang menyebabkan kondisi yang menguntungkan untuk metabolismenya sendiri dan tidak menguntungkan bagi spesies lain yang hidup berdampingan. Penurunan pH yang disebabkan oleh *Streptococcus mutans* dapat memfermentasi gula menjadi asam. Asam ini menempel pada email gigi yang menyebabkan terjadinya demineralisasi jaringan pada gigi dan kavitas pada gigi [6].

*Streptococcus mutans* merupakan flora normal dalam rongga mulut yang dapat berubah menjadi patogen bila terjadi peningkatan jumlah koloni yang berlebihan. Dalam bidang kedokteran gigi, *Streptococcus mutans* berperan penting dalam pembentukan karies. Pencegahan karies dan penyakit periodontal dengan cara melakukan peningkatan kesehatan gigi telah menjadi tujuan utama dalam dunia kedokteran gigi sejak diketahui plak gigi merupakan faktor yang mendominasi penyebab hilangnya gigi [7].

Biofilm merupakan kelompok atau komunitas mikroorganisme yang telah melekat dengan sendirinya pada suatu permukaan dalam lingkungan yang lembab dan ditemukan dalam lingkungan yang cukup aliran

nutrisi. Pertumbuhan biofilm melalui tahapan sebagai berikut perlekatan bakteri pada substrat, pertumbuhan bakteri, pembelahan sel bakteri, kolonisasi di lingkungan sekitar dan pembentukan biofilm. Bakteri ini tidak bekerja secara individual untuk membentuk biofilm, tetapi berkumpul menjadi rantai yang panjang untuk membantu mengawali tahap awal pembentukan biofilm. Biofilm yang sudah matang merupakan struktur heterogenous kompleks pada keadaan dorman dan koloni bakteri tumbuh aktif dengan enzim, produk yang diekskresikan, dan bagian kecil saluran pembentukan dari seluruh struktur. Pada beberapa kasus akan membentuk struktur seperti pilar [8]. Plak gigi terbentuk dengan melibatkan fermentasi yang dilakukan oleh bakteri utama penyebab karies yakni *Streptococcus mutans* yang mampu memproduksi *glukosil transferase* (GTF) yang dapat mengubah sukrosa menjadi glukosa dan selanjutnya membentuk plak gigi [9]. Plak dapat dihilangkan dengan pembersihan secara mekanik dan penghambatan secara kimiawi [10]. 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 [11].

Penggunaan obat tradisional secara umum dinilai lebih aman karena memiliki efek samping yang relatif lebih sedikit dibandingkan dengan obat modern [12]. Beberapa tanaman diketahui dapat dimanfaatkan sebagai bahan pencegahan dan terapi penyakit gigi dan mulut diantaranya adalah ekstrak daun teh segar [13], ekstrak bunga cengkih [14], ekstrak kunyit [15]. Selain itu juga terdapat tumbuhan waru yang termasuk dalam kelas Magnoliopsida dikenal masyarakat hanya sebagai tumbuhan liar, hanya dibiarkan begitu saja sehingga pemanfaatannya sebagai obat masih kurang. Akan tetapi tumbuhan ini mempunyai banyak manfaat sebagai obat tradisional, pendingin bagi sakit demam, membantu pertumbuhan rambut, obat batuk, obat diare berdarah/berlendir dan amandel. Masyarakat di Kecamatan Ambalau, Kabupaten Buru Selatan, Maluku menggunakan kulit batang pohon waru sebagai obat sakit gigi. Dalam pengobatannya, kulit batang pohon waru dikikis secukupnya kemudian ditempelkan pada gigi yang sakit. Di kota Ambon tumbuhan ini banyak terdapat di sepanjang pantai Jazirah Leihitu. Uji fitokimia telah dilakukan untuk mengevaluasi efek farmakologis ekstrak etanol daun dan kulit kayu tumbuhan ini untuk aktivitas sitotoksik, antibakteri, analgesik dan neurofarmakologis. Uji antibakteri ekstrak daun *H. tiliaceus* tidak menunjukkan aktivitas antibakteri sedangkan ekstrak kulit kayu menunjukkan aktivitas penghambatan terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Staphylococcus epidermidis* [16]. Kandungan flavonoid pada tumbuhan *H. tiliaceus* menghambat proses aktivitas glukosiltransferase yang berperan penting dalam pembentukan karies gigi, sedangkan tannin menonaktifkan enzim glukosiltransferase dan molekul adhesi (protein permukaan pada sel bakteri) [17] [18].

Mekanisme ini dapat disebabkan oleh adanya akumulasi komponen lipofilat yang terdapat pada dinding sel atau membran sel, menyebabkan perubahan komposisi penyusun dinding sel, kerja antibakteri dari masing-masing senyawa metabolit sekunder berbeda-beda. Senyawa metabolit sekunder menghambat pertumbuhan bakteri dimulai dengan merusak dinding sel. Senyawa flavonoid dapat menembus peptidoglikan yang bersifat polar karena flavonoid juga bersifat polar, sedangkan disisi lain senyawa fenol merusak dinding bakteri dengan memutuskan ikatan peptidoglikan, pada bakteri gram positif dinding sel mengandung 90% peptidoglikan serta lapisan tipis asam teikoat dan asam teikuronat yang bermuatan negatif [3]. Mekanisme penghambatan bakteri oleh senyawa fenol dapat mengganggu komponen penyusun peptidoglikan sel bakteri, sehingga lapisan sel tidak terbentuk secara utuh. Senyawa alkaloid bekerja dengan menghambat sintesis dinding sel [19].

Sampai saat ini, penelitian tentang uji ekstrak kulit batang pohon waru sebagai antibakteri penyebab karies gigi belum pernah dilakukan. Berdasarkan data empiris yang diperoleh dari masyarakat Ambalau Kabupaten Buru Selatan yang menggunakan kulit batang pohon waru untuk mengobati gigi yang sakit, maka dilakukan penelitian secara komprehensif tentang aktivitas antibakteri dan penghambatan biofilm ekstrak kulit batang pohon waru terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*.

## METODE

### Alat dan Bahan

Alat yang digunakan adalah alat maserasi, autoklaf, cawan petri, erlenmeyer, gelas ukur, beker gelas, incubator, incubator shaker, lampu spiritus, Laminar Air Flow (LAF), lemari pendingin, ose bulat, oven, pinset, pisau, rotary evaporator, tabung reaksi, timbang analitik, mikro pipet, hot plate, spektrofotometri UV-VIS, colony counter. Bahan yang digunakan adalah kulit batang pohon waru, metanol, Nutrient Agar (NA), aluminium foil, Nutrient Broth (NB), NaCl, DMSO, Tween 80, Listerine citrus, tissue, dan bakteri *Streptococcus mutans*.

## Prosedur penelitian

Penelitian dilakukan dengan beberapa tahap yaitu pengambilan sampel, pembuatan ekstrak metanol kulit batang pohon waru, pembuatan media, peremajaan bakteri. Pengambilan sampel dilakukan dengan memilih pohon yang telah dewasa dan tanpa membandingkan dengan daerah lain. Pohon waru ditebang, dikuliti bagian batang, dipotong kecil – kecil dan dikering-anginkan. Ekstraksi dilakukan dengan cara maserasi, sebanyak 500 g simplisia dimaserasi dengan pelarut metanol 96% sampai seluruh bagian simplisia tertutup pelarut, diaduk dan diendapkan selama 4 hari, kemudian disaring sehingga diperoleh filtrat. Filtrat dipekatkan dengan rotary evaporator pada suhu 50 °C hingga diperoleh ekstrak kental sebanyak 250 g [20]. Peremajaan bakteri yang diperoleh dari laboratorium Program Studi Pendidikan Biologi Universitas Muhammadiyah Purwokerto, dilakukan dalam media Nutrien Agar miring, diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1x24 jam. Selanjutnya biakan uji yang berasal dari biakan murni, di ambil 1 ose kemudian diinokulasi dengan cara digoreskan pada media Nutrien Agar selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 1x24 jam dan diukur serapan bakteri dengan spektrofotometri UV-VIS pada panjang gelombang 580 nm.

## Pengujian antimikroba

### 1) Pengujian KHM (Konsentrasi Hambat Minimum)

Sebanyak 2 g ekstrak kulit batang pohon waru ditambahkan DMSO 0,2 ml sebagai pelarut, kemudian tambahkan aquades sebanyak 9 ml menggunakan mikropipet, dibuat larutan stok ekstrak metanol kulit batang pohon waru 2%. Pengujian KHM dilakukan dengan membuat lima konsentrasi ekstrak metanol kulit batang pohon waru yaitu 2%; 1%; 0,5%; 0,25% dan 0,125%, tiap konsentrasi dibuat mencapai ukuran 10 ml, kemudian tambahkan 0,1 ml bakteri *Streptococcus mutans*, di inkubasi pada incubator shaker selama 1x24 jam pada suhu 37 °C, RPM 280 (agar oksigen yang larut lebih banyak) dan diamati tingkat kekeruhannya pada panjang gelombang 580 nm [21].

### 2) Pengujian KBM (Konsentrasi Bunuh Minimum)

Medium NA sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam cawan petri kemudian dibiarkan memadat. Selanjutnya pengenceran (jumlah sel bakteri di lakukan pengenceran dari  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-6}$  untukantisipasi jika pertumbuhan sel bakteri menumpuk sehingga diencerkan sampai pada  $10^{-6}$ ) serial kadar pada media NaCl yang telah dimasukan 1 ml pada NaCl 9 ml dan 0,1 ml bakteri uji pada NaCl 9,9 ml. Bakteri yang telah ditambahkan ekstrak dan bakteri disebar pada media untuk uji KHM. Hasil uji KHM tersebut di ambil 100  $\mu$  lalu disebar pada media NA, selanjutnya diinkubasi selama 1x24 jam pada suhu 37 °C dan hitung jumlah koloni bakteri yang tumbuh. Nilai KBM ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan mikroba pada konsentrasi terendah [21].

## Penghambatan Biofilm

Penghambatan biofilm dilakukan dengan metode mikrodilusi. Bakteri dibuat suspensi dalam media *Nutrient Broth* (NB) dan digunakan standar *McFarlandII* ( $6 \times 10^8$  CFU/ml) kemudian dilakukan pengenceran serial kadar masing-masing ekstrak kulit batang waru yaitu 0,18% b/v; 0,091% b/v; dan 0,023% b/v dengan larutan *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) sebagai pelarut. Kontrol positif digunakan *Listerine* citrus [1], dan tween 80 sebagai kontrol plak. Sebanyak 3 ml larutan uji diletakan pada tabung dan pengujian dilakukan terhadap 1 tabung uji dan 1 tabung blanko.

- 1) Tabung uji berisi larutan ekstrak uji dengan penambahan suspensi bakteri 10% v/v, sedangkan tabung blanko berisi larutan ekstrak dengan penambahan larutan salin 10% v/v tanpa ditambahkan suspensi bakteri. Tabung dimasukan kedalam spektrofotometer setelah itu diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu inkubator 36,6 °C.
- 2) Tabung dikeluarkan dari inkubator kemudian larutan uji dibuang dan dicuci dengan air mengalir sebanyak 3 kali dan dikeringkan.
- 3) Tiap tabung ditambahkan pewarna kristal violet 1% dalam air destilasi sebanyak 125  $\mu$ l dan diamkan selama 15 menit, kemudian dicuci lagi dengan air mengalir 3 kali dan didiamkan selama 15 menit. Kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 200  $\mu$ l dan didiamkan selama 15 menit.
- 4) Hasil uji berupa optical density (OD) dibaca dengan alat spektrofotometri pada panjang gelombang 580 nm.

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Uji KHM ekstrak metanol kulit batang waru terhadap bakteri *Streptococcus mutan*

Hasil uji pendahuluan untuk penentuan konsentrasi hambat minimum (KHM) ekstrak metanol kulit batang pohon waru menggunakan metode dilusi erlenmeyer secara serial. Beberapa perlakuan konsentrasi

2%; 1%; 0,5%; 0,25% yang telah ditambahkan suspensi bakteri *Streptococcus mutans* dan ekstrak metanol kulit batang pohon waru setelah diinokulasi pada incubator shaker selama 1x24 jam dengan suhu 37 °C, RPM 280 dan di bandingkan dengan antibiotik Ciprofloxacin sebagai kontrol (+), kontrol media sebagai kontrol negatif, diamati kekeruhan sampel uji (Tabel 1).

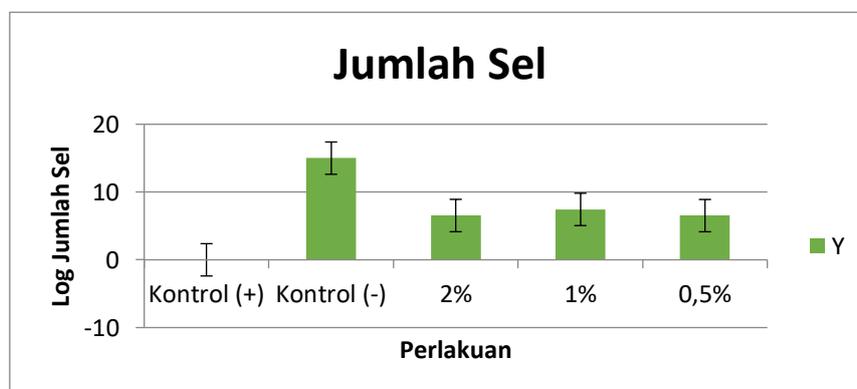
Tabel 1. Tingkat kekeruhan media Nutrien Broth bakteri *Streptococcus mutans* pada berbagai konsentrasi ekstrak kulit batang pohon waru

Konsentrasi	Tingkat Kekeruhan Media Pertumbuhan Bakteri <i>Streptococcus mutans</i>
2%	Keruh / Ada bakteri yang tumbuh
1%	Keruh / Ada bakteri yang tumbuh
0,5%	Keruh / Ada bakteri yang tumbuh
0,25%	Keruh / Ada bakteri yang tumbuh
Kontrol (+)	Bening / Tidak ada bakteri yang tumbuh
Kontrol (-)	Keruh / Ada bakteri yang tumbuh

Hasil penghambatan ini sulit di evaluasi karena hasil pengenceran secara dilusi erlenmeyer pada konsentrasi 2%–0,25% menunjukkan tingkat kekeruhan yang sama. Hal ini disebabkan oleh warna dasar ekstrak metanol kulit batang pohon waru berwarna coklat tua. Maka untuk mengetahui pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak kulit batang pohon waru terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dilakukan metode sebar pada media Nutrien Agar dengan menambahkan 0,1 ml dari hasil dilusi yang telah dilakukan pengenceran pada media NaCl. Sedangkan pada kontrol (-) dan kontrol (+) di ambil 0,1 ml untuk di sebar pada media Nutrien Agar. Menurut Taslihan (1986) bahwa medium yang keruh berarti bakteri masih dapat tumbuh sehingga antibiotik tidak efektif, sedangkan bila medium jernih berarti antibiotik efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

#### Uji lanjut KBM dari ekstrak metanol kulit batang pohon waru

Hasil uji pendahuluan dilakukan uji lanjut untuk mengetahui konsentrasi bunuh minimum (KBM) menggunakan konsentrasi ekstrak metanol kulit batang pohon waru dari hasil uji KHM yaitu pada semua konsentrasi untuk bakteri *Streptococcus mutans*. Hasil ini menjelaskan bahwa konsentrasi bunuh minimum (KBM) ditentukan jika pada media Natrium Agar pertumbuhan bakteri semakin sedikit atau tidak ada pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. Hasil pengamatan uji konsentrasi bunuh minimum (KBM) konsentrasi ekstrak metanol kulit batang pohon waru terhadap pertumbuhan koloni bakteri *Streptococcus mutans* pada media Nutrien Agar pada tiap konsentrasi dapat lihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Pengaruh konsentrasi ekstrak metanol kulit batang pohon waru terhadap jumlah sel bakteri *Streptococcus mutans*

Ket: Y = Log Jumlah Sel (Log Nilai CFU/ml X 10<sup>7</sup>)

X = Perlakuan pada tiap konsentrasi

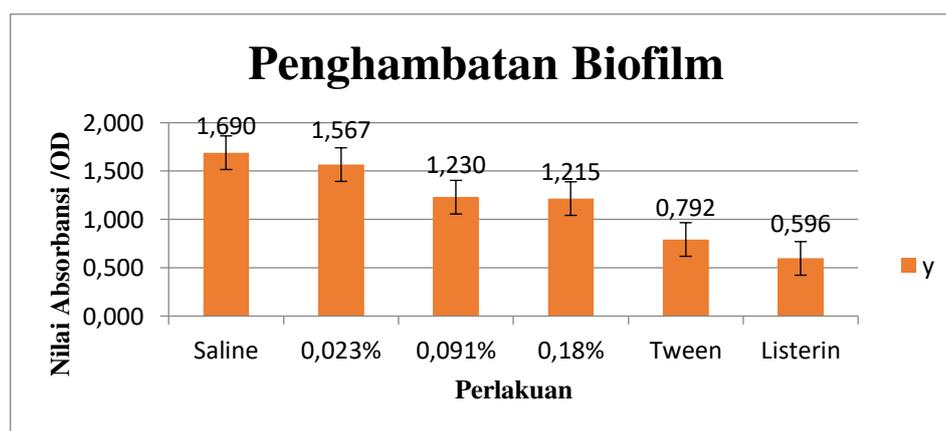
Kontrol (-) = TBUD

Kontrol (+) = 0

Hasil uji KBM dengan perhitungan jumlah koloni yang tumbuh pada tiap konsentrasi untuk memperoleh nilai CFU/ml yang didapatkan dari konsentrasi 2%, 1%, 0,5% dan dua kontrol positif dan negatif. Pada kontrol positif tidak ada pertumbuhan sel bakteri karena antibiotik sangat efektif, pada kontrol negatif jumlah sel yang tumbuh sangat banyak, sedangkan pada konsentrasi 0,5% nilai pertumbuhan sel lebih kecil dari konsentrasi 2% dan 1% (Gambar 1).

### Uji Penghambatan Biofilm dari ekstrak metanol kulit batang pohon waru

Uji penghambatan biofilm dilakukan beberapa konsentrasi ekstrak dan kontrol dengan metode dilusi tabung dengan mengukur absorbansi pada tiap konsentrasi dan kontrol yang telah diberi perlakuan diukur absorbansi menggunakan spektrofotometri UV-VIS dengan panjang gelombang 580 nm. Hasil pengukuran absorbansi atau OD (Optical Density) dari tiap konsentrasi pada pengujian penghambatan biofilm menggunakan beberapa konsentrasi ekstrak dan dua kontrol positif dapat dilihat pada Gambar 2. Nilai OD pada konsentrasi 0,18% b/v lebih kecil dibandingkan konsentrasi ekstrak 0,023% b/v dan 0,091% b/v, hal ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin kecil pembentukan biofilm bakteri *Streptococcus mutans*.



Gambar 2. Hasil uji penghambatan biofilm ekstrak metanol kulit batang pohon waru

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa ekstrak metanol kulit batang pohon waru sangat berpengaruh sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dengan adanya tingkat kekeruhan pada Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan jumlah pertumbuhan koloni bakteri pada Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) sehubungan dengan adanya peningkatan konsentrasi ekstrak metanol kulit batang pohon waru. KHM pada bakteri *Streptococcus mutans* 1%, sedangkan KBM pada bakteri *Streptococcus mutans* 0,5% yang ditunjukkan dengan adanya penurunan pertumbuhan koloni bakteri 50% dari asal sub biakan. Efek antibakteri dari ekstrak tanaman yang lain juga telah dilakukan diantaranya ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Peningkatan konsentrasi ekstrak daun binahong pada uji KHM bakteri *Staphylococcus aureus* dengan konsentrasi 25%, sedangkan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* pada konsentrasi 50%. Uji KBM bakteri *Staphylococcus aureus* pada konsentrasi 50% sedangkan pada bakteri *Pseudomonas aeruginosa* konsentrasi 100% terjadi penurunan pertumbuhan bakteri 99,9% dari inokulum asal biakan (1). Selain itu terdapat tanaman serih (*Cymbopogon nardus* L.) yang dapat menghambat bakteri *Streptococcus mutans* pada uji KHM 90%, konsentrasi ekstrak 0,18% ditunjukkan dengan nilai 108,36% sedangkan aktivitas penghambatan biofilm pada IC50 diperoleh nilai 0.137% (1).

### KESIMPULAN

Pengujian konsentrasi hambat minimum ekstrak metanol kulit batang pohon waru pada konsentrasi 2%, 1% dan 0,5% terdapat kekeruhan pada media Nutrien Broth yang menunjukkan bahwa terdapat bakteri yang tumbuh. Sedangkan pada uji lanjut konsentrasi bunuh minimum (KBM) menunjukkan adanya aktivitas

antibakteri dari ekstrak metanol kulit batang pohon waru terhadap bakteri *Streptococcus mutans*, nilai KBM ditunjukkan dengan adanya penurunan jumlah koloni pada konsentrasi 0,5%. Uji penghambatan biofilm dengan konsentrasi 0,18% b/v mampu menghambat pembentukan biofilm dengan nilai OD 1,215 yang menunjukkan semakin rendah nilai absorbansinya maka semakin kecil pembentukan biofilm.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih kepada Direktorat Pembelajaran dan Kemahasiswaan, Direktorat Pendidikan Tinggi melalui Program Kreativitas Mahasiswa (PKM) tahun 2020 untuk bantuan biaya penelitian.

## DAFTAR PUSTAKA

- [1] Dewi Z.Y, Nur A dan Hertriani T. 2015. Efek antibakteri dan penghambatan biofilm ekstrak sereh (*Cymbopogon nardus* L.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. *Maj Ked Gi Ind* 1(2): 136–141.
- [2] Darby M.L dan Margaret M.W. 2010. Dental hygiene: theory and practice, 3rd ed. Elsevier, London.
- [3] Madigan M.T, Martinko J.M and Brock T.D. 2014. Brock Biology of Microorganisms. 14<sup>th</sup> Ed. New Jersey: Pearson Prentice.
- [4] Eke P.I, Dye B.A, Wei L. Thornton-Evans G.O and Genco R.J. 2012. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010. *J Dent Res* 91(10): 914–20.
- [5] Simon L. 2007. The Role of *S. mutans* and Oral Ecology in the Formation of Dental Caries. *Lethbridge Undergraduate Research Jour* 2(2):1–6.
- [6] Putri A.V.A.A, Hafida N dan Megawati N. 2017. Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Daun Stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) Pada Konsentrasi 5%, 10%, 20%, 40% dan 80% Terhadap *Streptococcus mutans* (*in vitro*). *Jurnal Ilmu Kedokteran Gigi* 1(1):9–14.
- [7] Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, Jabra-Rizk MA. 2013. *Streptococcus mutans*, *Candida albicans*, and The Human Mouth: A Sticky Situation. *PLoS One Pathog* 9(10):1–5.
- [8] Armitage JP. 2005. Understanding the Development and Formation of Biofilm. [http://www. maths-inmedicine.org/uk/2005/biofilm](http://www.maths-inmedicine.org/uk/2005/biofilm) di akses tanggal 8 Januari 2020.
- [9] Shu Xu J, Li Y, Cao X and Cui Lun. 2013. The Effect of Eugenol on the Cariogenic Properties of *Streptococcus mutans* and Dental Caries Development in Rats. *Experimental and Therapeutic Medicine* 5(6):1667–1670.
- [10] Arinda A, Rahardjo P dan Triwardani A. 2012 Perbedaan efektivitas obat kumur yang mengandung cengkeh dengan obat kumur chlorexidine gluconat 0.2% dalam menghambat pembentukan plak. *Orthodontic Dental Journal* 1(1):22–25.
- [11] Diah K. 2012. Kontrol plak kemikal dalam pencegahan gingivitis dan periodontitis. *Periodontic Journa*. 1(02):1–6.
- [12] Raina L. 2011. Ensiklopedi tumbuhan berkasiat obat. Jakarta: Salemba Medika: 13–19.
- [13] Dyah S, Depi P, Handian E.K. 2011. Pengaruh Pasta Gigi Ekstrak Daun Teh (*Camelia sinensis* L) Terhadap Jumlah Koloni *Streptococcus sp.* Pada Permukaan Gigi. *Jurnal Kedokteran Gigi* 8(1):44–50.
- [14] Nurhayati, Kuswiyanto, Karta P. 2017. Pengaruh Estrak Bunga Cengkeh (*Syzygium aromaticum*) Terhadap Zona Hambat Jamur *Tricophyton rubrum*. *Jurnal Laboratorium Khatulistiwa* 1(1):26–32.
- [15] Nyoman ICK, Gusti A.S.P, Gusti A.F.N.S. 2019. Uji efektivitas ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans*. *Intisari Sains Medis* 10(3):462–467.
- [16] Awal, S.M.A, Sonia N, Sonia N, Tauhidur R.N and Shaikh J.U. 2016. Evaluation of pharmacological activity of *Hibiscus tiliaceus*. *SpringerPlus* 5(1209): 2–6.
- [17] Mohanraj R. 2014. Plant based antibacterial agents. *Resign* 661(2):1–19.
- [18] Kumar S, Pandey AK. 2013. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *Scientific World Journal* (2013):1–16.

- [19] Lamothe RG, Mitchell G, Gattuso M, Diarra MS, Malouin F and Bouarab K, 2009. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens. *International Journal Science* 10: 3400–3419.
- [20] Jamal R. 2010. Kimia Bahan Alam. Prinsip–Prinsip Dasar Isolasi dan Identifikasi. Penerbit Universitas Baiturrahmah. Padang.
- [21] Khunaifi, M., 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Skripsi. Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Fakultas Sains dan Teknologi, Malang.