

# Aktivitas antibiofilm ekstrak etanol kulit bawang merah (*Allium cepa L.*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: penelitian eksperimental laboratoris

Alya Ghina Rosyada<sup>1\*</sup>  
Christiana Cahyani Prihastuti<sup>1</sup>  
Dwi Nur Indah Sari<sup>1</sup>  
Setiawati<sup>1</sup>  
Meylida Ichsyani<sup>1</sup>  
Anindita Laksitasari<sup>1</sup>  
Restian Febi Andini<sup>1</sup>  
Aris Aji Kurniawan<sup>1</sup>

## ABSTRAK

**Pendahuluan:** Permasalahan gigi banyak disebabkan oleh biofilm bakteri di dalam rongga mulut. Salah satu bakteri penyusun biofilm yaitu *Staphylococcus aureus* merupakan jenis bakteri Gram positif yang bersifat patogen oportunistik serta memiliki mekanisme pembentukan biofilm yang kompleks. Kulit bawang merah mengandung senyawa fitokimia seperti flavonoid, saponin, fenol, tanin, alkaloid, dan steroid yang dilaporkan bersifat antibiofilm sehingga berpotensi sebagai alternatif obat kumur. Penelitian ini bertujuan menganalisis aktivitas antibiofilm ekstrak etanol kulit bawang merah (EKBM) konsentrasi 6,25, 12,5, 25, 50, dan 100% dalam menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*. **Metode:** Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratoris *in vitro* dengan rancangan penelitian *posttest-only control group design*. Jumlah sampel ditentukan berdasarkan berdasarkan jumlah repetisi yang *acceptable* dan lazim dilakukan pada eksperimen berbasis sel termasuk untuk pengujian antibiofilm, yaitu minimal 3 ulangan per kelompok. Sampel penelitian ini berjumlah 10 di setiap kelompok. Ekstrak dibuat menggunakan metode maserasi etanol 96% dengan perendaman selama 15 hari. Kontrol positif penelitian *Chlorhexidine gluconate* (CHG) 0,2% dan kontrol negatif *dimethyl sulfoxide* (DMSO) 1%. Penghambatan pembentukan biofilm diukur menggunakan *Microtiter Plate Assay* (MPA) dengan panjang gelombang 595 nm. Data dianalisis dengan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *post hoc Mann-Whitney*. **Hasil:** Persentase penghambatan biofilm tertinggi pada EKBM 25% (92,86+1,45%), hasil ini masih lebih rendah daripada kelompok kontrol positif (94,74+0,56%) secara bermakna dengan nilai  $p=0,002$  ( $p<0,05$ ). Tidak terdapat perbedaan pengaruh yang bermakna dengan nilai  $p=0,850$  ( $p>0,05$ ) antara persentase penghambatan pembentukan biofilm oleh EKBM 12,5% (92,74+0,98%) dengan EKBM 25%. **Simpulan:** Penghambatan pembentukan biofilm oleh EKBM terhadap biofilm *S. aureus* paling efektif pada konsentrasi 12,5%.

## Kata kunci

*allium cepa L.*, biofilm, kulit bawang merah, *Staphylococcus aureus*.

<sup>1</sup>Departemen Farmakologi,  
Fakultas Kedokteran Universitas  
Jenderal Soedirman, Indonesia

\*Korespondensi  
Email | [alyaghinarsyd@gmail.com](mailto:alyaghinarsyd@gmail.com)

Submisi | 26 Oktober 2022  
Revisi | 19 January 2023  
Penerimaan | 25 April 2023  
Publikasi Online | 30 April 2023  
DOI: [10.24198/jkg.v35i1.42451](https://doi.org/10.24198/jkg.v35i1.42451)

Sitasi | Rosyada AG, Prihastuti CC, Sari DNI, Setiawati, Ichsyani M, Laksitasari A, Andini RF, Kurniawan AA. Aktivitas antibiofilm ekstrak etanol kulit bawang merah (*Allium cepa L.*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *J Ked Gi.* 2023;35(1):33-40.  
DOI: [10.24198/jkg.v35i1.42451](https://doi.org/10.24198/jkg.v35i1.42451)



Copyright: © 2023 oleh penulis, diserahkan ke Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran untuk open akses publikasi dibawah syarat dan ketentuan dari Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## Anti-biofilm activity of shallot peel ethanol extract (*Allium cepa L.*) in inhibiting the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923: experimental laboratory study

## ABSTRACT

**Introduction:** Many dental and medical problems are caused by bacterial biofilms in the oral cavity. One of the bacteria that form biofilm is *Staphylococcus aureus*. This bacterium is a type of Gram-positive bacteria which is an opportunistic pathogen in the oral cavity and has a complex biofilm formation mechanism. Shallot peel contains phytochemical compounds such as flavonoids, saponins, phenols, tannins, alkaloids, and steroids which are reported to be antibiofilms so that they have the potential as an alternative mouthwash. This study aims to analyze the antibiofilm activity of shallot peel ethanol extract (SPEE) with a concentration of 6.25%; 12.5%; 25%; 50%; and 100% in inhibiting the formation of *S. aureus* biofilms. **Methods:** This research is an *in vitro* experimental laboratory study with the *posttest-only control group* research design. The samples are determined based on the number of repetitions that are acceptable and are commonly carried out in cell-based experiments including for testing antibiofilm, which is at least 3 replications per group. Each group consisted of 10 samples. Extracts were made using the 96% ethanol maceration method with immersion for 15 days. Positive control of this study was *chlorhexidine gluconate* (CHG) 0.2% and negative control in the form of *dimethyl sulfoxide* (DMSO) 1%. Inhibition of biofilm formation is measured using the *Microtiter Plate Assay* (MPA) with a wavelength of 595 nm. The data from MPA readings was analyzed statistically with the *Kruskal-Wallis* test and *post hoc mann-whitney* test. **Results:** The highest percentage of biofilm inhibition was in SPEE 25% (92.86+1.45%) but this result was still significantly lower than the positive control group (94.74+0.56%) with  $p\text{-value}=0.002$  ( $p<0.05$ ). There was no significant difference with  $p\text{-value}=0.850$  ( $p>0.05$ ) between the inhibition percentage of biofilm formation of SPEE 12.5% (92.74+0.98%) and SPEE 25% statistically. **Conclusion:** The most effective inhibition of biofilm formation by SPEE against *S. aureus* biofilms was found at a concentration of 12.5%.

## Keywords

*allium cepa L.*, biofilm, shallot peel, *Staphylococcus aureus*.

## PENDAHULUAN

Biofilm oral adalah lapisan beberapa koloni bakteri yang menempel pada seluruh permukaan mulut.<sup>1</sup> Salah satu bakteri dalam biofilm oral adalah *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*). *Staphylococcus aureus* adalah bakteri Gram-positif dengan beberapa mekanisme pembentukan biofilm, yaitu dengan memproduksi matriks polisakarida, protein adhesin, enzim, dan toksin yang mempermudah agregasi bakteri, menghindari respon imun inang atau agen antimikroba, serta membentuk biofilm dalam pembuluh darah manusia.<sup>2,3</sup>

Akumulasi biofilm oral dapat menyebabkan berbagai penyakit gigi dan mulut seperti gingivitis, periodontitis, nekrosis jaringan, dan infeksi pada jaringan akibat akumulasi biofilm pada dental biomaterial dalam rongga mulut.<sup>4-7</sup> Akumulasi biofilm oral juga dapat menyebabkan permasalahan kesehatan sistemik seperti bakteremia, koinfeksi Covid-19, infeksi nosokomial, dan resistensi antibiotik.<sup>8-11</sup>

Permasalahan yang disebabkan oleh biofilm oral dapat dicegah melalui terapi mekanis (menyikat gigi dan *dental flossing*) dan terapi adjuvan (obat kumur).<sup>12</sup> *Gold standard* bahan obat kumur yaitu *chlorhexidine* (CHX). *Chlorhexidine gluconate* (CHG) 0,2% merupakan salah satu konsentrasi yang sering digunakan sebagai obat kumur.<sup>13</sup> Namun, penggunaan CHX dalam jangka panjang dapat menyebabkan efek samping buruk seperti gangguan pengecap, *staining*/pewarnaan pada jaringan rongga mulut, mulut kering, bau mulut, peningkatan akumulasi kalkulus, erosi gigi, serta peningkatan risiko diabetes dan hipertensi.<sup>14-16</sup>

Bahan alam banyak dilaporkan berpotensi sebagai agen antibiofilm alami karena mengandung senyawa-senyawa antibiofilm seperti flavonoid, saponin, tanin, alkaloid, steroid, terpenoid, fenol, dan glikosida yang memiliki kemampuan untuk merusak polisakarida bakteri. Penelitian mengenai penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus* oleh tanaman teh (*Camellia sinensis*) menunjukkan bahwa kandungan asam tanat (*tannic acid*) dapat meningkatkan kadar protein *isaA*. Protein ini merupakan protein penghambat pembentukan biofilm pada *S. aureus*.<sup>17</sup> Ekstrak tanaman *Alnus japonica* juga dilaporkan mengandung *quercetin* dan asam tanat yang berperan sebagai antibiofilm *S. aureus* utama dengan cara mengurangi ekspresi gen *icaA* dan *icaD*. Hasil menunjukkan bahwa ekstrak *Alnus japonica* konsentrasi 20 µg ml<sup>-1</sup> dapat menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* hingga >70%, hasil ini lebih baik daripada konsentrasi yang lain yaitu 1 µg ml<sup>-1</sup>, 5 µg ml<sup>-1</sup>, 10 µg ml<sup>-1</sup>, dan 50 µg ml<sup>-1</sup>.<sup>18</sup>

Penelitian penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus* oleh ekstrak etanol tanaman *Hungarian propolis* juga pernah dilakukan. Hasilnya adalah ekstrak dengan *total flavonoids content* (TFC) tertinggi yaitu 273,2 ± 10,2 mg CAE/g DW memiliki penghambatan biofilm tertinggi pula.<sup>19</sup> Mekanisme kerja senyawa-senyawa bahan alam tersebut mirip dengan mekanisme kerja CHG 0,2% dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *S. aureus*. Mekanisme kerja antibiofilm senyawa-senyawa bahan alam tersebut secara garis besar adalah mengganggu atau merusak polisakarida bakteri melalui ikatan kimiawinya dengan gen atau protein pembentuk biofilm, sedangkan mekanisme kerja CHG 0,2% yaitu merusak polisakarida ekstraseluler dan glikoprotein melalui ikatan kationik CHG 0,2% di membran sel bakteri.<sup>20</sup> Bahan alam lain yang telah diteliti mengandung senyawa-senyawa di atas adalah kulit bawang merah.<sup>21,22</sup>

Penelitian terdahulu terkait aktivitas antibakteri ekstrak etanol 96% kulit bawang merah yang dimaserasi selama 3 hari dan selama 5 hari dengan pengulangan maserasi sebanyak 3 kali menunjukkan adanya zona hambat pertumbuhan bakteri *S. aureus* oleh ekstrak.<sup>23,24</sup> Ekstrak etanol 96% kulit bawang merah yang dimaserasi selama 5 hari dan diulang sebanyak 3 kali memiliki aktivitas antibakteri yang lebih baik daripada maserasi selama 3 hari, hal ini dibuktikan dengan zona hambat yang lebih luas.<sup>24</sup> Penelitian untuk mengetahui aktivitas antibiofilm ekstrak etanol kulit bawang merah terhadap biofilm bakteri *S. aureus* perlu dilakukan guna mengembangkan penelitian terdahulu. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas antibiofilm ekstrak etanol kulit bawang merah konsentrasi 6,25, 12,5, 25, 50, dan 100% dalam menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*. Kondisi bakteri dalam bentuk biofilm lebih menggambarkan kondisi bakteri yang sesungguhnya di dalam rongga mulut daripada bentuk planktonik bakteri di alam bebas sehingga hasil penelitian ini dapat menjadi acuan untuk pembuatan obat kumur.

## METODE

Jenis penelitian eksperimental laboratoris *in vitro* dengan rancangan penelitian *posttest-only control group design*. Penelitian dilaksanakan di beberapa laboratorium Universitas Jenderal Soedirman pada Maret-Mei 2022 dengan rincian Laboratorium Biologi Lingkungan Fakultas Biologi untuk determinasi tumbuhan, Laboratorium Biologi Farmasi dan Farmasetika Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan untuk pembuatan ekstrak, Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran untuk pemberian perlakuan, dan Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran untuk pembacaan *microplate*.

Populasi penelitian adalah bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dan sampel penelitian ini berupa biofilm *S. aureus* ATCC 25923 yang ditumbuhkan dalam *microplate*. Sampel dibagi menjadi 8 kelompok, yaitu kelompok perlakuan ekstrak etanol kulit bawang merah (EKBM 6,25, 12,5, 25, 50, dan 100%), kontrol positif (CHG 0,2%), kontrol negatif (DMSO 1%), dan kontrol pertumbuhan. Setiap kelompok sampel memiliki 5 pengulangan dalam satu *microplate*. Penelitian diulang pada *microplate* lain di hari yang berbeda untuk mengonfirmasi konsistensi data. Jumlah pengulangan ini disesuaikan dengan jumlah repetisi yang *acceptable* dan lazim pada eksperimen berbasis

sel termasuk eksperimen antibiofilm, yaitu minimal 3 ulangan per kelompok, jumlah yang lebih banyak diperbolehkan untuk melihat konsistensi hasil perlakuan dan jika sumber daya memadai.<sup>25,26</sup>

Alat penelitian yang digunakan adalah neraca digital, tabung Erlenmeyer, tabung reaksi dan rak, *petri dish*, *plastic wrap*, jarum ose, *handscoon*, *microplate*, *microtiter plate reader*, inkubator, kertas saring, oven, *rotary vacuum evaporator*, *waterbath*, mikropipet, mikrotips, *object glass*, mikroskop cahaya, dan autoklaf. Bahan yang digunakan pada penelitian ini antara lain kultur bakteri *S. aureus* ATCC 25923, kulit bawang merah, etanol 96%, DMSO 1%, CHG 0,2%, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, kalium dikromat, kloroform, logam magnesium, FeCl<sub>3</sub> 1%, kapas, arang jerap (*activated charcoal*), asam asetat anhidrida, kloroform amoniak, reagen Mayer, *Congo red agar*, *trypticase soy broth*, glukosa, akuades, PBS, isopropanol, kristal violet 1%, larutan lugol, alkohol aseton, safranin, NaCl, dan asam asetat *glacial*.

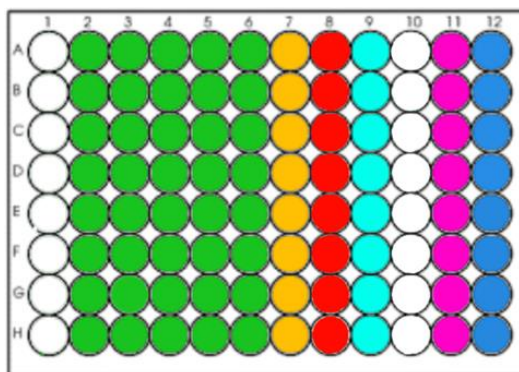
Penelitian dimulai dengan pembuatan ekstrak metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dan direndam selama 15 hari, ekstrak yang selesai direndam kemudian dikentalkan menggunakan *rotary vacuum evaporator* dan *waterbath*. Ekstrak kental diencerkan menggunakan DMSO 1% untuk membuat EKBM konsentrasi 6,25%, 12,5, 25, 50, dan 100%. Uji kandungan fitokimia pada ekstrak dilakukan dengan cara memasukkan EKBM sebanyak 0,05 g ke dalam tabung reaksi serta ditambahkan 5 mL kloroform dan 5 mL akuades. Tabung reaksi dikocok kuat dan didiamkan hingga terbentuk 2 lapisan yaitu lapisan atas (air) dan lapisan bawah (kloroform).<sup>27</sup>

Uji flavonoid dilakukan dengan mengambil lapisan air sebanyak 1-2 tetes, ditambahkan sedikit logam magnesium dan 1-2 tetes asam klorida pekat. Ekstrak positif flavonoid ditandai dengan larutan berwarna kuning-jingga hingga kemerahan. Uji fenol dilakukan dengan meneteskan lapisan air ke plat tetes lalu ditambahkan larutan FeCl<sub>3</sub> 1% sebanyak 1-2 tetes. Ekstrak positif fenol ditandai dengan larutan berwarna hijau keunguan atau hitam. Uji saponin dilakukan dengan mengambil lapisan air kemudian dikocok kuat dalam tabung reaksi. Ekstrak positif saponin ditandai dengan adanya busa selama 3-5 menit.

Uji terpenoid dan steroid dilakukan dengan mengambil lapisan kloroform sebanyak 2-3 tetes dan dimasukkan ke dalam 3 lubang plat tetes. Satu tetes asam asetat anhidrida ditambahkan ke lubang 1, lalu 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat ditambahkan ke lubang 2, dan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat ditambahkan ke lubang 3. Warna merah pada lubang 2 dan 3 menandakan ekstrak mengandung terpenoid dan warna hijau atau biru di lubang 1 dan 3 menandakan ekstrak mengandung steroid.

Uji tanin dilakukan dengan mengambil lapisan air kemudian ditambahkan larutan gelatin. Ekstrak positif tanin ditandai dengan adanya endapan putih. Uji alkaloid dilakukan dengan mengambil ekstrak sebanyak 0,05 g ditambahkan ke dalam 5 mL kloroform amoniak 0,05 M lalu diaduk dan disaring. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 N sebanyak 1 mL dikocok dan ditunggu hingga membentuk 2 lapisan. Lapisan atas diambil lalu ditetesi 2 tetes reagen Mayer. Ekstrak positif alkaloid ditandai dengan adanya endapan putih.

Sampel penelitian disiapkan dengan menumbuhkan bakteri *S. aureus* ATCC 25923 dalam MCRA (*modified Congo red agar*) dan diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator bersuhu 37°C untuk melihat pembentukan biofilm. Pembentukan biofilm pada MCRA ditandai dengan adanya koloni berwarna hitam. Warna hitam sebagai indikator pembentukan biofilm berasal dari produksi *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA) oleh *S. aureus* yang berfungsi sebagai perekat setiap *coccus* bakteri sehingga menjadi koloni.<sup>28</sup> Hasil subkultur dilakukan pewarnaan Gram untuk mengonfirmasi bakteri *S. aureus* melalui ciri-ciri morfologinya, yaitu bakteri berbentuk kokus bergerombol seperti anggur dan berwarna keunguan oleh kristal violet saat diamati pada mikroskop. Hasil subkultur dibuat menjadi suspensi bakteri sesuai standar McFarland 0,5 (~1,5 x 10<sup>8</sup> CFU/mL) dengan pengenceran menggunakan larutan fisiologis NaCl 0,9%.<sup>29</sup> Uji penghambatan pembentukan biofilm dilakukan dengan cara menanam media TSBG 2,5% (*trypticase soy broth* +glukosa 2,5%) dan larutan uji sesuai dengan denah *microplate* (Gambar 1).



**Gambar 1.** Denah *microplate*. (Sumber: dokumentasi pribadi)

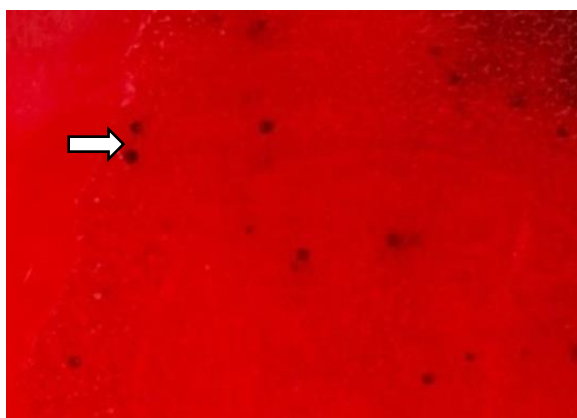
**Keterangan:** 2 A-H = 50 µL TSBG 2,5%+50 µL suspensi bakteri+100 µL ekstrak konsentrasi 100%; 3 A-H = 50 µL TSBG 2,5%+50 µL suspensi bakteri+100 µL ekstrak konsentrasi 25%; 4 A-H = 50 µL TSBG 2,5%+50 µL suspensi bakteri+100 µL ekstrak konsentrasi 12,5%; 5 A-H = 50 µL TSBG 2,5%+50 µL suspensi bakteri+100 µL ekstrak konsentrasi 6,25%; 6 A-H = 50 µL TSBG 2,5%+50 µL suspensi bakteri+100 µL ekstrak konsentrasi 100%; 7 A-H = 50 µL TSBG 2,5%+50 µL suspensi bakteri+100 µL CHG 0,2%; 8 A-H = 50 µL TSBG 2,5%+50 µL suspensi bakteri+100 µL DMSO 1%; 9 A-H = 100 µL TSBG 2,5% + 100 µL suspensi bakteri (kontrol pertumbuhan); 11 A-H = 200 µL isopropanol (blanko penelitian); 12 A-H = 200 µL media TSBG 2,5% (kontrol media steril)

*Microplate* diinkubasi selama 48 jam dalam inkubator bersuhu 37°C. Pencucian *microplate* dilakukan setelah inkubasi yaitu menggunakan larutan PBS steril sebanyak 3x, kemudian *wells microplate* diwarnai kristal violet 1% selama 15 menit, dicuci kembali menggunakan PBS steril sebanyak 3x, dan dilanjutkan pencucian menggunakan isopropanol selama 15 menit sesaat sebelum pembacaan *microplate*. *Microplate* yang telah dicuci kemudian dibaca menggunakan *microplate reader* dengan panjang gelombang 595 nm. Hasil pembacaan *microplate reader* berupa nilai OD (*optical density*) diolah menggunakan 2 rumus. Rumus pertama yaitu rumus perhitungan kekuatan pembentukan dan perlekatan biofilm.

Hasil perhitungan tersebut kemudian dikategorikan berdasarkan ketentuan apabila nilai OD suspensi  $\leq$  OD *cut* maka bakteri dikategorikan sebagai *non biofilm producer*, apabila nilai OD *cut*  $<$  OD suspensi  $\leq$  2x OD *cut* maka bakteri dikategorikan sebagai *weak biofilm producer*, apabila nilai 2x OD *cut*  $<$  OD suspensi  $\leq$  4x OD *cut* maka bakteri dikategorikan sebagai *moderate biofilm producer*, apabila nilai 4x OD *cut*  $\leq$  OD suspensi ka bakteri dikategorikan sebagai *strong biofilm producer*.<sup>30</sup> Rumus kedua yaitu rumus perhitungan persentase penghambatan pembentukan biofilm.<sup>31</sup>

## HASIL

Uji kandungan fitokimia menunjukkan bahwa EKBM mengandung senyawa kimia berupa flavonoid, saponin, fenol, tanin, alkaloid, dan steroid. Hasil uji Gram subkultur *S. aureus* ATCC 25923 menunjukkan bahwa bakteri yang diamati merupakan Gram positif dengan bakteri berbentuk *coccus* bergerombol. Media MCRA menunjukkan pertumbuhan koloni berwarna hitam pekat dengan permukaan halus yang menandakan bahwa bakteri telah membentuk biofilm dengan kekuatan pembentukan yang kuat (Gambar 2). Pembentukan biofilm *S. aureus* ATCC 25923 pada *microplate* tersaji sebagai nilai OD pada Tabel 1.

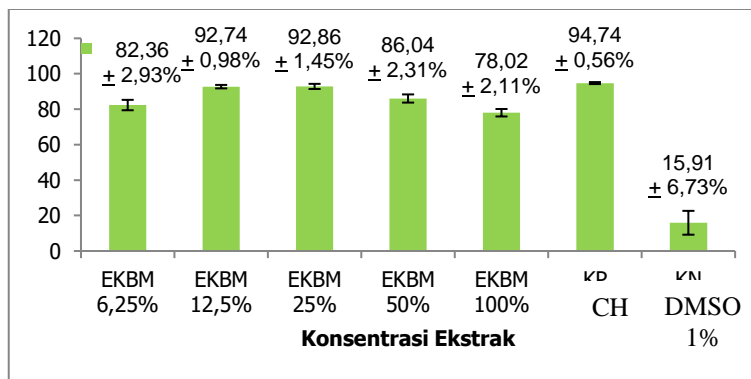


**Gambar 2.** Koloni *S. aureus* ATCC 25923 yang membentuk biofilm. (Sumber: dokumentasi pribadi)

**Tabel 1.** Hasil rerata nilai OD

Kelompok	n	Rerata Nilai OD	Standar Deviasi
EKBM 6,25%	10	0,535	0,089
EKBM 12,5%	10	0,220	0,030
EKBM 25%	10	0,217	0,044
EKBM 50%	10	0,424	0,070
EKBM 100%	10	0,667	0,064
CHG 0,2%	10	0,160	0,017
DMSO 1%	10	2,551	0,204
Kontrol Pertumbuhan	10	3,034	0,325
Kontrol Media Steril	10	0,051	0,003

Nilai OD kemudian dihitung menggunakan rumus OD *cut* dan OD suspensi untuk mengetahui kekuatan pembentukan dan perlekatan biofilm *S. aureus*. Nilai OD *cut* dan OD suspensi yang dihasilkan memenuhi kriteria  $4x$  OD *cut*  $\leq$  OD suspensi sehingga *S. aureus* ATCC 25923 dapat dikategorikan sebagai *strong biofilm producer*. Hasil nilai OD yang diolah menggunakan rumus persentase penghambatan pembentukan biofilm dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Persentase penghambatan biofilm *S. aureus*. (Sumber: dokumentasi pribadi)

Nilai persentase penghambatan biofilm dianalisis secara statistik menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-Wallis* dengan tingkat kepercayaan 95% ( $p < 0,05$ ) karena syarat uji parametrik tidak terpenuhi. Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan terdapat perbedaan signifikan antarkelompok dengan  $p\text{ value} = 0,000$  ( $p < 0,05$ ). Uji *post hoc Mann-Whitney* dilakukan untuk melihat adanya perbedaan signifikan antara tiap kelompok. Hasil uji *Mann-Whitney* dapat dilihat pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Hasil uji Mann-Whitney

No.	Kelompok (n = 10)	<i>p-value</i> Uji <i>Mann-Whitney</i>						
		EKBM 6,25%	EKBM 12,5%	EKBM 25%	EKBM 50%	EKBM 100%	CHG 0,2%	DMSO 1%
1.	EKBM 6,25%	-	0,000*	0,000*	0,013*	0,002*	0,000*	0,000*
2.	EKBM 12,5%	0,000*	-	0,850	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*
3.	EKBM 25%	0,000*	0,850	-	0,000*	0,000*	0,002*	0,000*
4.	EKBM 50%	0,013*	0,000*	0,000*	-	0,000*	0,000*	0,000*
5.	EKBM 100%	0,002*	0,000*	0,000*	0,000*	-	0,000*	0,000*
7.	CHG 0,2%	0,000*	0,000*	0,002*	0,000*	0,000*	-	0,000*
8.	DMSO 1%	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	-

Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan persentase penghambatan biofilm yang signifikan ( $p < 0,05$ ) antara seluruh kelompok ekstrak dengan kelompok kontrol negatif dan seluruh kelompok ekstrak dengan kelompok positif ( $p < 0,05$ ), tetapi tidak ada perbedaan yang signifikan antara kelompok konsentrasi 12,5 dengan 25%.

## PEMBAHASAN

Hasil uji kandungan fitokimia menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit bawang merah pada penelitian ini mengandung senyawa flavonoid, fenol, saponin, steroid, tanin, dan alkaloid. Hasil ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang melaporkan bahwa ekstrak etanol kulit bawang merah mengandung flavonoid, fenol, saponin, alkaloid, steroid, terpenoid, dan tanin.<sup>23,24</sup> Penelitian ini menunjukkan uji terpenoid negatif, hal ini mungkin terjadi karena terdapat faktor internal dan faktor eksternal yang memengaruhi kandungan suatu tanaman. Faktor internal dapat berupa gen suatu tanaman yang dapat berbeda dari satu varietas dengan varietas lain meskipun masih dalam spesies tanaman yang sama. Faktor eksternal seperti ketinggian tanah, cahaya, suhu, kelembapan, pH tanah, dan unsur hara dalam tanah juga dapat memengaruhi kandungan fitokimia suatu tanaman.<sup>32</sup>

Hasil subkultur bakteri *S. aureus* ATCC 25923 pada media MCRA menunjukkan pembentukan koloni berwarna hitam pekat dengan konsistensi yang kering dan permukaan yang halus (Gambar 2), hal ini menandakan bahwa *S. aureus* ATCC 25923 merupakan bakteri pembentuk biofilm yang kuat. Hasil pengamatan koloni tersebut didukung dengan hasil perhitungan nilai OD *cut* yang menunjukkan nilai 0,06 dan OD suspensi sebesar 2,974. Hasil ini memenuhi syarat nilai  $4 \times OD\text{ cut} \leq OD\text{ suspensi}$  yang merupakan indikator nilai untuk *strong biofilm producer*.<sup>30</sup>

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa rerata persentase penghambatan biofilm tertinggi terdapat pada kelompok kontrol CHG 0,2% (Gambar 3). Hal ini sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menyebutkan bahwa CHG 0,2% merupakan agen antibiofilm efektif bagi *S. aureus*.<sup>33,34</sup> Mekanisme aksi CHG 0,2% dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri yaitu melalui ikatan kationik CHG 0,2% dengan polisakarida ekstraseluler dan glikoprotein di membran sel bakteri.<sup>20</sup> *Chlorhexidine* tersusun dari dua cincin 4-klorofenil dan dua gugus biguanida yang dihubungkan oleh rantai heksametilena.<sup>35</sup> Gugus klorin pada setiap cincin fenol akan memberikan aktivitas

kationik pada CHX.<sup>20</sup> Muatan positif ini akan menarik CHX ke permukaan bermuatan negatif di dalam rongga mulut seperti pelikel saliva pada gigi, serta berbagai komponen biofilm seperti polisakarida ekstraseluler dan glikoprotein bakteri. *Chlorhexidine* juga dapat berikatan pada permukaan bakteri pada bagian gugus fosfat asam teikoat pada bakteri Gram-positif. Ikatan-ikatan tersebut mengganggu kestabilan membran sel bakteri.<sup>36</sup>

Rerata persentase penghambatan biofilm terendah ada pada kelompok DMSO 1% (Gambar 3). Hal ini sesuai dengan penelitian yang menyatakan bahwa DMSO pada konsentrasi 1% tidak memiliki daya antimikroba sehingga pertumbuhan *S. aureus* ATCC 25923 pada media pertumbuhan dapat berlangsung tanpa hambatan ditandai dengan nilai OD yang besar.<sup>37</sup> Rerata persentase penghambatan biofilm *S. aureus* ATCC 25923 oleh kelompok perlakuan ekstrak lebih tinggi dan berbeda secara bermakna dengan kelompok DMSO 1%. Hal ini membuktikan bahwa terdapat zat aktif dalam ekstrak yang berperan dalam menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* ATCC 25923.

Efek penghambatan pembentukan biofilm dari EKBM berasal dari kandungan senyawa fitokimia di dalamnya. Efek antibiofilm flavonoid terhadap biofilm *S. aureus* adalah menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* melalui interferensi fisik. Kehadiran senyawa flavonoid secara fisik dapat mengganggu proses penjangkaran *BAP* (*biofilm-associated protein*) dan polimerisasi BAP.<sup>38</sup> Efek tanin yaitu menurunkan produksi *slime* biofilm, mengurangi ekspresi gen *icaA* dan *icaD* sehingga produksi polisakarida terganggu, dan menghambat regulator *quorum-sensing* RNAIII.<sup>39</sup> Efek fenol yaitu mengganggu metabolisme sel bakteri.<sup>40</sup> Penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol kulit bawang merah mengandung saponin jenis steroid. Saponin dapat dibedakan menjadi dua kelompok yaitu steoridal saponin dan triterpenoidal saponin. Efek antibiofilm saponin steroidal yaitu mengganggu stabilitas matiks ekstraseluler polisakarida dan menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* melalui ikatan dengan sisi aktif enzim *mannitol dehydrogenase* dan *eDNA* yang berperan dalam sintesis alginat, alginat merupakan komponen utama penyusun matriks ekstraseluler polisakarida.<sup>41,42</sup> Efek alkaloid yaitu mereduksi gen-gen inisiator pembentuk biofilm, menghambat *quorum-sensing*, dan menurunkan faktor-faktor regulator pembentuk biofilm.<sup>43</sup>

Rerata persentase penghambatan biofilm pada kelompok perlakuan ekstrak etanol kulit bawang merah mengalami peningkatan dari konsentrasi 6,25% hingga konsentrasi 25%, kemudian menurun hingga konsentrasi 100%. Kelompok konsentrasi 25% memiliki rerata persentase penghambatan biofilm tertinggi dan kelompok konsentrasi 100% memiliki rerata persentase penghambatan biofilm terendah (Gambar 3). Hal ini dapat dikarenakan semakin banyak kandungan senyawa kimia dalam ekstrak (konsentrasi tinggi pada batas tertentu) maka semakin tinggi juga efek antimikroba yang diberikan, tetapi apabila kandungan senyawa yang terlarut dalam ekstrak terlalu banyak (konsentrasi terlalu tinggi) maka dapat menyebabkan kejenuhan sehingga berpengaruh pada daya antimikroba suatu ekstrak.<sup>44</sup>

Variasi konsentrasi ekstrak memiliki peran pada proses penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus*. Konsentrasi ekstrak berpengaruh pada afinitas senyawa fitokimia untuk berpenetrasi ke reseptor-reseptor di dinding sel bakteri. *Quorum-sensing* merupakan proses komunikasi antar-bakteri untuk beragregasi dan membentuk biofilm. Proses *quorum-sensing* pada bakteri *S. aureus* diinisiasi oleh transkripsi *accessory gene regulator* (*Agr*) yang diaktivasi oleh glukosa menjadi *autoinducing peptide* (*AIP*). *AIP* akan mengaktivasi *Agr* yang lain untuk melanjutkan proses *quorum-sensing*. Senyawa-senyawa fitokimia dalam ekstrak dapat berikatan pada sisi aktif *Agr* dan menghambat kinerja *Agr* dalam menginduksi *quorum-sensing*.<sup>45,46</sup> Jumlah senyawa fitokimia yang terlarut dalam ekstrak setidaknya harus berimbang dengan jumlah reseptor yang ada sehingga penetrasi senyawa fitokimia ke sisi aktif reseptor dapat berlangsung optimal dan memberikan efek penghambatan biofilm yang baik. Zat terlarut dalam ekstrak yang terlalu banyak, misalnya pada ekstrak dengan konsentrasi yang makin besar dapat menyebabkan zat tersebut sulit berpenetrasi ke reseptor yang jumlahnya terbatas karena zat-zat yang berdesakan. Zat terlarut dalam ekstrak yang terlalu sedikit juga tidak optimal dalam memberikan efek obat karena jumlah zat yang berpenetrasi ke reseptor kurang.<sup>47</sup>

Hasil penelitian ini menunjukkan adanya peningkatan rerata persentase hambat biofilm yang bermula dari konsentrasi 6,25% hingga mencapai puncak pada konsentrasi 25%, kemudian terjadi penurunan rerata persentase hambat biofilm berturut-turut dari konsentrasi 50% hingga konsentrasi 100%. Hasil ini sesuai dengan teori kurva hiperbolik tentang hubungan konsentrasi dan efek obat yang menyatakan bahwa semakin tinggi konsentrasi obat maka efek obat juga akan semakin tinggi, tetapi setelah mencapai efek maksimal pada konsentrasi tertentu (konsentrasi optimal), efek obat akan menurun pada konsentrasi yang lebih tinggi dari konsentrasi optimal.<sup>47</sup>

Analisis statistik pada penelitian ini menunjukkan tidak terdapat perbedaan pengaruh yang bermakna ( $p > 0,05$ ) antara ekstrak etanol kulit bawang merah konsentrasi 25% dengan konsentrasi 12,5% (Tabel 2). Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak etanol kulit bawang merah konsentrasi 12,5% merupakan konsentrasi yang paling efektif di antara kelompok perlakuan ekstrak dalam menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* meskipun belum dapat menyamai efektivitas CHG 0,2% sebagai kontrol positif ( $p > 0,05$ ).

Penelitian-penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa senyawa fitokimia tumbuhan berpotensi menjadi agen antibiofilm alami *S. aureus*. Penelitian ini juga menunjukkan keberadaan senyawa fitokimia serupa dalam ekstrak etanol kulit bawang merah yang berpotensi sebagai agen antibiofilm dalam menghambat pembentukan biofilm *S. aureus*. Penelitian tentang efek ekstrak etanol kulit bawang merah pada bakteri *S. aureus* yang pernah dilakukan sebelumnya adalah meliputi penelitian daya antibakteri, antioksidan, dan antiinflamasi yang menggunakan sampel bakteri dalam kondisi planktonik. Hasil persentase penghambatan pembentukan biofilm pada penelitian ini dapat menambah wawasan dan menjadi acuan untuk penelitian mendatang yang melibatkan rongga mulut karena kondisi biofilm lebih mencerminkan kondisi rongga mulut daripada kondisi planktonik suatu bakteri.

Keterbatasan dalam penelitian ini yaitu terdapat ekstrak pada konsentrasi tinggi (EKBM 50 dan 100%) yang tidak larut sempurna oleh DMSO 1% dikarenakan adanya kejenuhan sehingga diperlukan proses sonifikasi pada ekstrak. Saran untuk penelitian selanjutnya yaitu diperlukan proses sonifikasi pada ekstrak di penelitian mendatang untuk memastikan semua senyawa fitokimia larut sempurna sehingga efek penghambatan pembentukan biofilm yang dihasilkan tidak bias akibat senyawa fitokimia yang kurang larut dan diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas ekstrak etanol kulit bawang merah terhadap sel epitel rongga mulut untuk memastikan keamanan penggunaan topikal sebagai obat kumur.

## SIMPULAN

Ekstrak etnol kulit bawang merah memiliki aktivitas antibiofilm berupa penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus* ATCC 25923 karena mengandung senyawa fitokimia seperti flavonoid, saponin, fenol, tanin, alkaloid, dan steroid. Aktivitas penghambatan pembentukan biofilm meningkat seiring dengan peningkatan konsentrasi dan mencapai puncak pada konsentrasi 25% namun tidak terdapat perbedaan pengaruh yang bermakna antara konsentrasi 12,5% dengan 25%. Aktivitas penghambatan pembentukan biofilm semua kelompok ekstrak lebih rendah daripada CHG 0,2% dan lebih tinggi daripada DMSO 1% secara bermakna. Konsentrasi ekstrak etanol kulit bawang merah yang paling efektif dalam menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* ATCC 25923 adalah 12,5% namun efektivitasnya belum sama dengan efektivitas CHG 0,2%.

**Ucapan terima kasih:** Terima kasih kami sampaikan pada Universitas Jenderal Soedirman yang telah membantu penelitian ini melalui hibah penelitian dosen Skema Peningkatan Kompetensi untuk tahun anggaran 2022 serta segenap pihak Laboratorium Biologi Lingkungan Fakultas Biologi, Laboratorium Biologi Farmasi dan Farmasetika Fakultas Ilmu-Ilmu Kesehatan, Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman atas bantuan teknis yang telah mendukung keberlangsungan penelitian.

**Kontribusi Penulis:** Konseptualisasi, RAG dan SDWI; metodologi, PCC dan SS; perangkat lunak, KAA; validasi, DWI, PCC, Setiawati, IM; analisis formal, LA, IM; investigasi, ARF; sumber daya, SDWI dan RAG; kurasi data, KAA; penulisan—penyusunan draft awal, RAG dan SS; penulisan—tinjauan dan penyuntingan, PCC dan IM; visualisasi, LA; supervisi, ARF, KAA; administrasi proyek, RAG, LA; perolehan pendanaan, SDWI, ARF.

**Pendanaan:** Penelitian ini didanai oleh Lembaga Penelitian dan Pengabdian Kepada Masyarakat Universitas Jenderal Soedirman dengan nomor kontrak T/750/UN23.18/PT.01.03/2022

**Persetujuan Etik:** Penelitian ini telah mendapatkan izin dari Komisi Etik Penelitian Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman dengan nomor 009/KEPK/PE/V/2022.

**Pernyataan Ketersediaan Data:** Ketersediaan data penelitian akan diberikan izin oleh seluruh peneliti melalui korespondensi email dengan tetap memperhatikan etika dalam penelitian.

**Konflik Kepentingan:** Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan

## DAFTAR PUSTAKA

- Newman MG, Takei HH, Klokkevold PR, Carranza FA. Newman and Carranza's Clinical Periodontology 13<sup>th</sup> Ed. Philadelphia: Elsevier; 2018. p.112.
- Homenta H. Infeksi biofilm bakterial. Jurnal E-Biomedik. 2016;4(1):1–11.
- Zapotoczna M, O'Neill E, O'Gara JP. Untangling the diverse and redundant mechanisms of *Staphylococcus aureus* biofilm formation. PLoS Pathogens. 2016;12(7):1–6. DOI: [10.1371/journal.ppat.1005671](https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005671).
- Chapple ILC, Mealey BL, Van Dyke TE, Bartold PM, Dommisch H, Eickholz P, et al. Periodontal health and gingival diseases and conditions on an intact and a reduced periodontium: Consensus report of workgroup 1 of the 2017 World Workshop on the Classification of Periodontal and Peri-Implant Diseases and Conditions. J Periodontol. 2018;89(1):74–84. DOI: [10.1002/JPER.17-0719](https://doi.org/10.1002/JPER.17-0719).
- Herrera D, Retamal-Valdes B, Alonso B, Feres M. Acute periodontal lesions (periodontal abscesses and necrotizing periodontal diseases) and endo-periodontal lesions. Journal of Periodontology. 2018;89(1):85–102. DOI: [10.1002/JPER.16-0642](https://doi.org/10.1002/JPER.16-0642).
- Abebe GM. Oral biofilm and its impact on oral health, psychological and social interaction. Internat J Oral Dent Health. 2021;7(1):1-11. DOI: [10.23937/2469-5734/1510127](https://doi.org/10.23937/2469-5734/1510127).
- Zochniak AM, Jarzynka S, Iwanska A, Storm K, Iwanczyk B, Bartel M, et al. Biofilm formation on dental implant biomaterials by *Staphylococcus aureus* strains isolated from patients with cystic fibrosis. MDPI. 2021;14(8):1-15. DOI: [10.3390/ma14082030](https://doi.org/10.3390/ma14082030).
- McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, Edwards G. *Staphylococcus aureus* and the oral cavity: An overlooked source of carriage and infection?. American Journal of Infection Control. 2015;43(1):35–37. DOI: [10.1016/j.ajic.2014.09.015](https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.09.015).
- Dhotre SV, Davane MS, Nagoba BS. Periodontitis, bacteremia and infective endocarditis: A review study. Archives of Pediatric Infectious Diseases. 2017; 5(3):1-8. DOI: [10.5812/pedinfec.41067](https://doi.org/10.5812/pedinfec.41067).
- Zhu X, Ge Y, Wu T, Zhao K, Chen Y, Wu B, et al. Co-infection with respiratory pathogens among covid-2019 cases. Virus Research. 2020; 285(2020): 198005. DOI: [10.1016/j.virusres.2020.198005](https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198005).
- Jee SC, Kim M, Sung JS, Kadam A. Efficient biofilms eradication by enzymatic-cocktail. MDPI Polymers. 2020; 12(12): 1–13. DOI: [10.3390/polym12123032](https://doi.org/10.3390/polym12123032).
- Mitha S, Elnaem MH, Koh M, En C, Babar MG, Siddiqui J, et al. Use and perceived benefits of mouthwash among Malaysian adults: An exploratory insight. Journal of Advanced Oral Research. 2016;7(3):7-14. DOI: [10.1177/2229411220160302](https://doi.org/10.1177/2229411220160302).
- Deus FP, Ouanounou A. Mouthwashes and their use in dentistry: A review. Web Oral Health. Diakses pada 4 Februari 2022. Tersedia pada: <https://www.oralhealthgroup.com/features/mouthwashes-and-their-use-in-dentistry-a-review/>.
- Preshaw PM. Mouthwash use and risk of diabetes. Br Dent J. 2018;225(10):923-926. DOI: [10.1038/sj.bdj.2018.1020](https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.1020).
- Jeddy N, Ravi S, Radhika T, Lakshmi LJS. Comparison of the efficacy of herbal mouth rinse with commercially available mouth rinses: A clinical trial. Journal of oral and maxillofacial pathology JOMFP. 2018;22(3):332–334. DOI: [10.4103/jomfp.JOMFP\\_303\\_18](https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_303_18).
- Alhathloul SM, Ali AHM. Effect of using mouthwash solution on commensal flora of the oral cavity among female students in Qassim University. Journal of Biosciences and Medicines. 2020;8(3):135-142. DOI: [10.4236/ibm.2020.83012](https://doi.org/10.4236/ibm.2020.83012).
- David EP, Martin NR, Parzych KR, Rickard AH, Underwood A, Boles BR. Tannic acid inhibits *Staphylococcus aureus* surface colonization in an IsaA-dependent manner. Infect Immun. 2013;81(2):496-504. DOI: [10.1128/IAI.00877-12](https://doi.org/10.1128/IAI.00877-12).

18. Lee JH, Park JH, Cho HS, Joo SW, Cho MH, Lee J. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. *Biofouling*. 2013;29(5):491-99. DOI: [10.1080/08927014.2013.788692](https://doi.org/10.1080/08927014.2013.788692).
19. Bouchelaghem S, Das S, Naorem RS, Czuni L, Papp G, Kocsis M. Evaluation of total phenolic and flavonoid contents, antibacterial and antibiofilm activities of hungarian propolis ethanolic extract against *Staphylococcus aureus*. *MDPI Molecules*. 2022;27(2):1-18. DOI: [10.3390/molecules27020574](https://doi.org/10.3390/molecules27020574).
20. Łukomska-Szymańska M, Sokołowski J, Łapińska B. Chlorhexidine – mechanism of action and its application to dentistry. *Journal of Stomatology*. 2017;70(4):405–417.
21. Septiani, Dewi EN, Wijayanti I. Aktivitas antibakteri ekstrak lamun (*Cymodocea rotundata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*. 2017;13(1):1-6. DOI: [10.14710/ijfst.13.1.1-6](https://doi.org/10.14710/ijfst.13.1.1-6).
22. Dwicahyani T, Sumardianto, Rianingsih L. Uji bioaktivitas ekstrak teripang keling *Holothuria atra* sebagai antibakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Pengolahan dan Bioteknologi Hasil Perikanan*. 2018;7(1):15–24. Tersedia pada: <https://ejournal3.undip.ac.id/index.php/jpbhp/article/view/20384>.
23. Misna, Diana K. Aktivitas antibakteri ekstrak kulit bawang merah (*Allium cepa L.*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *GALENIKA Journal of Pharmacy*. 2016; 2(2): 138-144. DOI: [10.22487/j24428744.2016.v2.i2.5990](https://doi.org/10.22487/j24428744.2016.v2.i2.5990).
24. Octaviani M, Fadhli H, Yuneistya E. Uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol dari kulit bawang merah (*Allium cepa L.*) dengan metode difusi cakram. *Pharm Sci Res*. 2019;6(1):62–68. DOI: [10.7454/psr.v6i1.4333](https://doi.org/10.7454/psr.v6i1.4333).
25. Li F, Weir MD, Fouad FA, Xu H. Effect of salivary pellicle on antibacterial activity of novel antibacterial dental adhesive using a dental plaque microcosm biofilm model. *Dental Materials*. 2014;30(2014):182-191. DOI: [10.1016/j.dental.2013.11.004](https://doi.org/10.1016/j.dental.2013.11.004).
26. Kulaga E, Ploux L, Balan L, Schrodj G, Roucoules V. Mechanically responsive antibacterial plasma polymer coatings for textile biomaterials. *Plasma Process Polym*. 2014; 11(2014): 63-79. DOI: [10.1002/ppap.201300091](https://doi.org/10.1002/ppap.201300091).
27. Syafitri NE, Bintang M, Falah S. Kandungan fitokimia, total fenol, dan total flavonoid ekstrak buah harendong (*Melastoma affine D. Don*). *Current Biochemistry*. 2014; 1(3): 105-115. Tersedia pada: <https://journal.ipb.ac.id/index.php/cbj/article/view/17419>.
28. Hou W, Sun X, Wang Z, Zhang Y. Biofilm-forming capacity of *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa* from ocular infections. *IOVS*. 2012;53(9):5624-5631. DOI: [10.1167/iovs.11-9114](https://doi.org/10.1167/iovs.11-9114).
29. Sarudji S, Chusniati S, Tyasningsih W, Handijatno D. Petunjuk Praktikum Penyakit Infeksius Progam S-1 Kedokteran Hewan Departemen Pendidikan Nasional. Surabaya: Universitas Airlangga. Diakses pada 4 Februari 2022. Tersedia pada: <https://fkh.unair.ac.id/newsite/images/pps12018.pdf>.
30. Singh AK, Prakash P, Achra A, Singh GP, Das A, Singh RK. Standardization and classification of in vitro biofilm formation by clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Global Infectious Diseases*. 2017;9(3):93-101. DOI: [10.4103/igid.igid\\_91\\_16](https://doi.org/10.4103/igid.igid_91_16).
31. Nikolic M, Vasic S, Durdevic J, Stefanovic O, Comic L. Antibacterial and anti-biofilm activity of ginger (*Zingiber officinale* (Roscoe)) ethanolic extract. *Kragujevac J Sci*. 2014;36:129-136. DOI: [10.5937/KqJSci1436129N](https://doi.org/10.5937/KqJSci1436129N).
32. Katuuk RHH, Wanget SA, Tumewu P. Pengaruh perbedaan ketinggian tempat terhadap kandungan metabolit sekunder pada gulma babadotan (*Ageratum conyzoides L.*). *Cocos e-Journal Unsrat*. 2019;1(4):1-6. DOI: [10.35791/cocos.v1i4.24162](https://doi.org/10.35791/cocos.v1i4.24162).
33. Abdallah WA, Abakar MAA. Effect of chlorhexidine and sodium hypochlorite on *Staphylococcus aureus* biofilm. *J Prevent Infect Contr*. 2017;3(1):1-6. Tersedia pada: <https://www.primescholars.com/articles/effect-of-chlorhexidine-and-sodium-hypochlorite-on-staphylococcus-aureus-biofilm-97116.html>.
34. Evangelina IA, Syafitri FU, Mardiaty E, Laviana A. Daya antibakteri fraksi etil asetat daun kemangi (*Ocimum basilicum*) terhadap *Streptococcus mutans* ATCC 25175 pada clear retainer. *Padjajaran Journal of Dental Researchers and Students*. 2021;5(2):97-104. DOI: [10.24198/pjdrs.v5i2.28065](https://doi.org/10.24198/pjdrs.v5i2.28065).
35. Elkerbout T, Slot D, Van Loveren C, Van der WG. Will a chlorhexidine-fluoride mouthwash reduce plaque and gingivitis? *Int. J. Dent. Hyg*. 2019;17:3-15. DOI: [10.1111/ijdh.12329](https://doi.org/10.1111/ijdh.12329).
36. Gupta J, Thomas M, Radhakrishna M, Srikant N, Ginjupalli K. Effect of silver diamine fluoride-potassium iodide and 2% chlorhexidine gluconate cavity cleansers on the bond strength and microleakage of resin-modified glass ionomer cement. *J. Conserv. Dent*. 2019;22(2):201–206. DOI: [10.4103/jcd.jcd\\_485\\_18](https://doi.org/10.4103/jcd.jcd_485_18).
37. Rahmi M, Putri DH. Aktivitas antimikroba DMSO sebagai pelarut ekstrak alami. *Serambi Biologi*. 2020;5(2):56-58. DOI: [10.24036/5909RF00](https://doi.org/10.24036/5909RF00).
38. Matilla-Cuenca L, Gil C, Cuesta S, Rapun-Araiz B, Ziemyte M, Mira A, Lasa I, Valle J. Antibiofilm activity of flavonoids on staphylococcal biofilms through targeting BAP amyloids. *Nature*. 2020;10(18968):1-12. DOI: [10.1038/s41598-020-75929-2](https://doi.org/10.1038/s41598-020-75929-2).
39. Slobodnikova L, Fialova S, Rendeckova K, Kovac J, Mucaji P. Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*. 2016;21(1717):2-15. DOI: [10.3390/molecules21121717](https://doi.org/10.3390/molecules21121717).
40. Bouchelaghem S, Das S, Naorem RS, Czuni L, Papp G, Kocsis M. Evaluation of total phenolic and flavonoid contents, antibacterial and antibiofilm activities of hungarian propolis ethanolic extract against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2022;27(574):1-18. DOI: [10.3390/molecules27020574](https://doi.org/10.3390/molecules27020574).
41. Cankaya TII, Somuncuoglu EI. Potential and prophylactic use of plants containing saponin-type compounds as antibiofilm agents against respiratory tract infections. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2021;6814215:1-14. DOI: [10.1155/2021/6814215](https://doi.org/10.1155/2021/6814215).
42. Ye Y, Yang Q, Fang F, Li Y. The camelliagenin from defatted seeds of *Camellia oleifera* as antibiotic substitute to treat chicken against infection of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *BMC Veterinary Research*. 2015;11(214):1-10. DOI: [10.1186/s12917-015-0529-z](https://doi.org/10.1186/s12917-015-0529-z).
43. Jain A, Parihar DK. Antibacterial, biofilm dispersal, and antibiofilm potential of alkaloids and flavonoids of *Curcuma*. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2018;16(2018):677-682. DOI: [10.1016/j.bcab.2018.09.023](https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.09.023).
44. Febriana N, Prasetya F, Ibrahim A. Aktivitas antimikrobaekstrak daun bungur (*Langerstoremia speciosa* (L.) Pers). *Jurnal Sains dan Kesehatan*. 2015; 1(2):45-50. DOI: [10.25026/jsk.v1i2.15](https://doi.org/10.25026/jsk.v1i2.15).
45. Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-An overview. *Frontiers in Microbiology*. 2015; 6(1174): 1-8. DOI: [10.3389/fmicb.2015.01174](https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01174).
46. Mahdally NH, George RF, Kashef MT, Al-Ghobashy M, Murad FE, Attia AS. Starquorsin: A novel *Staphylococcus aureus* Agr-mediated quorum sensing inhibitor impairing virulence in vivo without notable resistance development. *Front Microbiol*. 2021;12(700494):1-12. DOI: [10.3389/fmicb.2021.700494](https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.700494).
47. Katzung BG. *Trevor AJ. Basic and clinical pharmacology*. McGraw-Hill Medical. 2012. h. 46-50.