



Efektivitas Anti Biofilm Ekstrak Etanol Daun Bidara Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*

Yolanda Agtari^{1*}, Yuziani², Vera Novalia³

^{1,2,3}Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran, Universitas Malikussaleh, Uteun Kot, Muara Dua, Kota Lhokseumawe, Aceh

*Penulis korespondensi: yolanda.200610056@mhs.unimal.ac.id

Abstract. This research aims to determine the effect of ethanol extract of bidara leaves on the degradation of *S. aureus* biofilms. This research is an experimental study with 7 treatment groups. KN (negative control given distilled water), KP (positive control, given Erythromycin), ethanol extract concentration treatment groups namely P1 60%, P2 70%, P3 80%, P4 90%, P5 100%. The research design used was 28 samples calculated using the Federer formula. The biofilm degradation test was carried out using the crystal violet binding assay technique. Data were analyzed using the Kruskal Wallis test with a p value of 0,005 (<0,05) which was significantly different and continued with the Mann-Whitney Post Hoc test. Biofilm degradation test results of bidara leaf ethanol extract at concentrations of 60%, 70%, 80%, 90% and 100% were able to degrade *S. aureus* bacterial biofilms up to 19,32%, 5,42%, 10,72%, 24,16% and 38,80%, in the positive control groups (erythromycin) it was 94,84% and in the negative control (distilled water) 0,00%. It can be concluded that the ethanol extract of bidara leaves (*Z. mauritiana* Lamm) is able to degrade *S. aureus* bacterial biofilms up to 38,80%.

Keywords: Biofilm degradation; Phytochemical screening; *Ziziphus mauritiana* Lamm; *Staphylococcus aureus* biofilm; Antibiofilm activity.

Abstrak. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol daun bidara terhadap degradasi biofilm *S. aureus*. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan 7 kelompok perlakuan. KN (kontrol negatif diberikan aquadest), KP (kontrol positif, diberikan Eritromisin), kelompok perlakuan konsentrasi ekstrak etanol yaitu P1 60%, P2 70%, P3 80%, P4 90%, P5 100%. Rancangan penelitian yang digunakan dengan jumlah 28 sampel yang dihitung menggunakan rumus Federer. Uji degradasi biofilm dilakukan dengan teknik *crystal violet binding assay*. Data dianalisis menggunakan uji *Kruskal Wallis* nilai p sebesar 0,005 (< 0,05) berbeda secara nyata dan dilanjutkan uji *Post Hoc Mann-Whitney*. Hasil uji degradasi biofilm ekstrak etanol daun bidara pada konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% mampu mendegradasi biofilm bakteri *S. aureus* hingga 19,32%, 5,42%, 10,72%, 24,16% dan 38,80%, pada kelompok kontrol positif (eritromisin) sebesar 94,84% dan pada kontrol negatif (aquadest) 0,00%. Dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) mampu mendegradasi biofilm bakteri *S. aureus* hingga 38,80%.

Kata Kunci: Kata Kunci: Degradasi biofilm; Skrining fitokimia; *Ziziphus mauritiana* Lamm.; Biofilm *Staphylococcus aureus*; Aktivitas antibiofilm.

1. LATAR BELAKANG

Infeksi bakteri masih menjadi salah satu permasalahan kesehatan utama di dunia, terutama infeksi yang disebabkan oleh bakteri patogen oportunistik yang mampu menginvasi berbagai jaringan tubuh manusia. Salah satu bakteri yang paling sering ditemukan sebagai penyebab infeksi pada manusia adalah *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), yaitu bakteri Gram positif yang dapat menyebabkan berbagai jenis penyakit dengan tingkat keparahan yang beragam, mulai dari infeksi ringan hingga infeksi sistemik yang mengancam jiwa (Becker et al., 2014; Todar, 2020). Bakteri ini diketahui menjadi penyebab berbagai penyakit seperti bisul, impetigo, jerawat, mastitis, osteomielitis, pneumonia, meningitis, infeksi saluran kemih, hingga endokarditis (Carroll et al., 2019). Selain itu, *S. aureus* juga merupakan salah satu penyebab

utama infeksi nosokomial, keracunan makanan, dan sindrom syok toksik yang sering ditemukan pada fasilitas pelayanan kesehatan (Becker et al., 2014).

Kemampuan *S. aureus* dalam menyebabkan penyakit berkaitan erat dengan berbagai faktor virulensi yang dimilikinya. Bakteri ini mampu menghasilkan berbagai jenis toksin, enzim, adhesin, dan protein permukaan yang berperan penting dalam proses kolonisasi, invasi jaringan, serta penghindaran terhadap sistem imun inang (Kong et al., 2016; Tam & Torres, 2019). Beberapa faktor virulensi utama yang dimiliki *S. aureus* meliputi α -toksin, β -toksin, δ -toksin, Panton-Valentine leukocidin, staphylococcal enterotoxins, exfoliative toxin, serta toxic shock syndrome toxin (Ahmad-Mansour et al., 2021; Oliveira et al., 2018). Faktor-faktor tersebut memungkinkan bakteri bertahan hidup pada lingkungan yang tidak menguntungkan dan menyebabkan kerusakan jaringan yang luas pada inang.

Keberhasilan *S. aureus* dalam menginfeksi jaringan juga dipengaruhi oleh kemampuannya untuk melakukan adhesi dan kolonisasi pada permukaan sel inang. Berbagai protein adhesin seperti clumping factor A (ClfA), clumping factor B (ClfB), hemagglutinin, dan protein pengikat fibrinogen berperan penting dalam proses perlekatan awal bakteri pada jaringan target (Ganesh et al., 2011; Foster et al., 2014). Abrar et al. (2013) menjelaskan bahwa hemagglutinin memiliki peran penting dalam proses adhesi *S. aureus* pada sel epitel, sedangkan Khusnan et al. (2016) melaporkan bahwa keberadaan hemagglutinin berkorelasi dengan peningkatan kemampuan kolonisasi bakteri pada jaringan inang. Oleh karena itu, faktor adhesi menjadi salah satu target potensial dalam upaya pengendalian infeksi bakteri.

Selain faktor adhesi, β -toksin juga diketahui memiliki peranan penting dalam patogenesis infeksi *S. aureus*. Toksin ini berkontribusi terhadap terjadinya berbagai penyakit seperti furunkulosis, osteomielitis kronis, pneumonia, keratitis, dan konjungtivitis (Herrera et al., 2016; Afzal et al., 2022). Penelitian menunjukkan bahwa β -toksin juga berperan dalam pembentukan biofilm melalui aktivitas sphingomyelinase dan DNA biofilm ligase yang dimilikinya (Herrera et al., 2016). Biofilm yang terbentuk dapat meningkatkan kemampuan bakteri untuk bertahan hidup dan menghindari mekanisme pertahanan tubuh maupun terapi antibiotik (Oliveira et al., 2018).

Saat ini, terapi utama terhadap infeksi bakteri umumnya menggunakan antibiotik. Namun, penggunaan antibiotik yang tidak rasional dan berlebihan telah menyebabkan munculnya resistensi antimikroba yang menjadi tantangan serius dalam dunia kesehatan (National Centre for Disease Control, 2016). *Staphylococcus aureus* termasuk salah satu bakteri yang menunjukkan peningkatan resistensi terhadap berbagai jenis antibiotik, sehingga menyebabkan pengobatan menjadi lebih sulit dan meningkatkan angka morbiditas maupun

mortalitas pasien (Mardiah, 2017). Kondisi tersebut mendorong perlunya pengembangan agen antibakteri alternatif yang berasal dari bahan alam dan memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri maupun pembentukan biofilm.

Salah satu tanaman yang berpotensi dikembangkan sebagai agen antibakteri alami adalah bidara (*Ziziphus mauritiana* Lamm.). Tanaman ini telah lama digunakan dalam pengobatan tradisional karena memiliki berbagai aktivitas farmakologis seperti antioksidan, antiinflamasi, antimikroba, antijamur, dan antitumor (Hastiana et al., 2022; Dhuha et al., 2019). Berbagai penelitian menunjukkan bahwa ekstrak daun bidara mengandung senyawa metabolit sekunder yang berpotensi sebagai antibakteri, antara lain flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, fenolik, steroid, dan terpenoid (Muharrami et al., 2019; Ma'ruf et al., 2021; Khoirunnisak et al., 2020).

Senyawa flavonoid diketahui memiliki aktivitas antibakteri melalui mekanisme penghambatan sintesis protein, gangguan permeabilitas membran sel, penghambatan sintesis peptidoglikan, serta penghambatan pembentukan biofilm bakteri (Górniak et al., 2019; Lopes et al., 2017). Selain flavonoid, senyawa terpenoid juga dilaporkan mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan mengganggu stabilitas membran sel mikroorganisme (Guimarães et al., 2019; Farha et al., 2020). Tanin diketahui bekerja dengan cara mengendapkan protein dan menghambat aktivitas enzim mikroba sehingga dapat mengurangi kemampuan bakteri untuk berkembang biak dan membentuk biofilm (Ekambaram et al., 2016; Farha et al., 2020). Adapun saponin memiliki kemampuan merusak integritas membran sel bakteri melalui interaksi dengan komponen lipid membran sehingga menyebabkan kematian sel mikroba (Putri et al., 2023; Zhao et al., 2020).

Berbagai penelitian telah membuktikan aktivitas antibakteri ekstrak daun bidara terhadap bakteri patogen. Aisyah et al. (2021) melaporkan bahwa ekstrak daun bidara mampu menghambat pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. Temuan serupa juga dilaporkan oleh Asy'syifa et al. (2020) dan Saraswati et al. (2023), yang menunjukkan bahwa ekstrak daun bidara memiliki aktivitas antibakteri yang signifikan terhadap *S. aureus*. Selain itu, Kurnia et al. (2021) menemukan bahwa ekstrak etanol daun bidara dapat menurunkan sifat hidrofobik dan aktivitas fosfolipase pada *Streptococcus pyogenes*, sehingga menghambat pembentukan biofilm dan proses quorum sensing bakteri.

Quorum sensing merupakan mekanisme komunikasi antar sel bakteri yang berfungsi mengatur ekspresi gen tertentu berdasarkan kepadatan populasi bakteri (Akhdiya, 2018). Sistem ini memiliki peranan penting dalam regulasi faktor virulensi dan pembentukan biofilm. Penghambatan quorum sensing diketahui dapat mengurangi kemampuan patogen dalam

menyebabkan infeksi tanpa harus membunuh bakteri secara langsung sehingga risiko resistensi dapat ditekan (Deryabin & Inchagova, 2018; Mahdally et al., 2021).

Biofilm merupakan komunitas mikroorganisme yang terorganisasi dan terbungkus dalam matriks ekstraseluler yang diproduksi sendiri oleh bakteri (Donlan & Costerton, 2002). Struktur biofilm memungkinkan bakteri melekat pada berbagai permukaan, baik biotik maupun abiotik, serta meningkatkan ketahanan terhadap antibiotik dan respons imun inang (Donlan, 2002). Diperkirakan sekitar 80% infeksi kronis pada manusia berkaitan dengan pembentukan biofilm mikroba (Ghafourian et al., 2012). Pada *S. aureus*, biofilm berkontribusi terhadap persistensi infeksi kronis dan meningkatkan kemampuan transfer gen resistensi antibiotik antar bakteri (Moghadam et al., 2014).

Proses pembentukan biofilm berlangsung melalui beberapa tahap, yaitu adhesi awal, pembentukan mikrokoloni, maturasi biofilm, dan dispersi sel bakteri ke lingkungan sekitar (Purbowati et al., 2017). Karena peran biofilm yang sangat penting dalam patogenesis infeksi bakteri, pengembangan agen antibiofilm dari bahan alam menjadi salah satu strategi yang menjanjikan dalam mengatasi masalah resistensi antimikroba (Lahiri et al., 2019; Hadjicharalambous et al., 2022).

Meskipun berbagai penelitian telah melaporkan aktivitas antibakteri daun bidara terhadap beberapa bakteri patogen, penelitian yang secara khusus mengevaluasi kemampuan ekstrak etanol daun bidara dalam menghambat atau mendegradasi biofilm *Staphylococcus aureus* masih relatif terbatas. Oleh karena itu, penelitian mengenai efektivitas antibiofilm ekstrak etanol daun bidara (*Ziziphus mauritiana* Lamm.) terhadap *Staphylococcus aureus* perlu dilakukan untuk memperoleh informasi ilmiah yang lebih komprehensif mengenai potensi tanaman ini sebagai alternatif agen antibakteri dan antibiofilm alami.

2. KAJIAN TEORITIS

Biofilm dan Karakteristik Bakteri *Staphylococcus aureus*

Biofilm merupakan komunitas mikroorganisme yang melekat pada suatu permukaan dan terbungkus dalam matriks ekstraseluler yang dihasilkan sendiri, sehingga memberikan perlindungan terhadap lingkungan eksternal, termasuk terhadap antibiotik dan sistem imun inang. Pembentukan biofilm berlangsung melalui beberapa tahap, yaitu adhesi awal, pembentukan mikrokoloni, maturasi, dan dispersi. Dalam kondisi biofilm, bakteri menunjukkan tingkat resistensi yang jauh lebih tinggi dibandingkan dengan bentuk planktonik, sehingga menjadi salah satu penyebab utama kegagalan terapi infeksi kronis. Oleh karena itu, studi mengenai agen anti-biofilm menjadi sangat penting dalam pengembangan terapi alternatif.

Staphylococcus aureus merupakan bakteri Gram-positif yang bersifat patogen dan sering ditemukan sebagai penyebab infeksi pada manusia, seperti infeksi kulit, luka, hingga infeksi sistemik. Bakteri ini memiliki kemampuan kuat dalam membentuk biofilm pada berbagai permukaan, termasuk jaringan tubuh dan alat medis. Kemampuan tersebut didukung oleh faktor virulensi seperti adhesin dan produksi polisakarida interseluler, yang memperkuat struktur biofilm. Akibatnya, infeksi yang disebabkan oleh bakteri ini cenderung sulit diobati dan memerlukan pendekatan terapi yang lebih inovatif, termasuk penggunaan bahan alami sebagai agen antibakteri dan anti-biofilm.

Potensi Ekstrak Etanol Daun Bidara sebagai Agen Anti-Biofilm

Daun Bidara dikenal sebagai tanaman herbal yang memiliki berbagai kandungan senyawa bioaktif, seperti flavonoid, saponin, tannin, dan alkaloid, yang berperan dalam aktivitas antibakteri. Ekstraksi menggunakan etanol dinilai efektif dalam menarik senyawa-senyawa polar hingga semi-polar yang berpotensi sebagai agen terapeutik. Senyawa-senyawa tersebut bekerja dengan cara merusak dinding sel bakteri, mengganggu permeabilitas membran, serta menghambat aktivitas enzim yang penting bagi kelangsungan hidup bakteri. Selain itu, beberapa komponen bioaktif juga diketahui mampu menghambat pembentukan matriks biofilm.

Dalam anti-biofilm, ekstrak etanol daun Bidara berpotensi mengganggu proses pembentukan dan stabilitas biofilm bakteri, termasuk *Staphylococcus aureus*. Mekanisme yang terjadi meliputi penghambatan adhesi awal bakteri, degradasi matriks ekstraseluler, serta gangguan komunikasi sel bakteri (quorum sensing). Dengan demikian, penggunaan ekstrak daun bidara sebagai agen anti-biofilm dapat menjadi alternatif yang menjanjikan dalam mengatasi resistensi antibiotik. Kajian ini mendukung pengembangan terapi berbasis bahan alami yang lebih aman, efektif, dan berkelanjutan dalam menangani infeksi bakteri berbasis biofilm.

3. METODE PENELITIAN

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental menggunakan ekstrak etanol daun bidara, dengan jumlah perlakuan sebanyak 7 kelompok yaitu (1) kontrol negatif ; (aquadest) (2) kontrol positif (eritromisin); (3) P1 (60%); (4) P2 (70%); (5)P3 (80%); (6) P3 (90%); (7) P4 (100%). Setiap percobaan memiliki 4 ulangan per perlakuan. Jumlah sampel penelitian sebanyak 28 sampel. Teknik pengambilan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah *simple random sampling* yaitu pengambilan sampel daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) dilakukan secara acak. Penelitian ini dilakukan atas izin komite etik Fakultas Kedokteran Universitas Malikussaleh dengan nomor 121/KEPK/FKUNIMAL-RSUCM/2023.

Prosedur Penelitian

Pengambilan Daun Bidara (*Z. mauritiana* Lamm)

Sampel daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) diperoleh dari kawasan Indrapuri Kabupaten Aceh Besar Provinsi Aceh. Daun bidara diambil pada pagi hari pukul 08.00-11.00 WIB dan bagian yang diambil adalah seluruh daun yang ada pada batang pohon kecuali daun yang masih dalam kuncup.

Uji Determinasi Tanaman Bidara (*Z. mauritiana* Lamm)

Determinasi dilakukan untuk mengidentifikasi variasi morfologi yang menjadi karakteristik khas pada tumbuhan, untuk determinasi tumbuhan dan sebagai media untuk penelitian (36). Pengujian determinasi direncanakan dilaksanakan di laboratorium Anatomi Tumbuhan Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Universitas Syiah Kuala.

Penyiapan Simplisia Daun Bidara (*Z. mauritiana* Lamm)

Disiapkan sampel yang akan digunakan yaitu daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) sebanyak 5 kg. Sampel dibersihkan dengan cara dicuci menggunakan air bersih yang mengalir. Kemudian dikeringkan dengan cara dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 60 °C selama 1 x 24 jam. Proses pengeringan ini dilakukan sampai daun bidara mudah dihancurkan. Daun kering yang dihasilkan kemudian dihancurkan menggunakan blender sehingga menghasilkan serbuk daun bidara (20).

Ekstraksi daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) secara Maserasi dengan Pelarut Etanol 96%

Serbuk daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) dimasukkan ke dalam wadah maserasi, kemudian ditambahkan etanol 96% sebanyak 6000 mL. Selanjutnya disimpan pada tempat yang tidak terkena sinar matahari langsung dan dibiarkan selama 5 hari sambil sekali-sekali diaduk, setelah 5 hari kemudian disaring, ampasnya dimaserasi kembali dengan pelarut etanol 96%. Hal ini dilakukan sebanyak 2 kali dengan jumlah pelarut yang sama, namun pada perlakuan ke dua dilakukan selama 3 hari. Tiap filtrat dipisahkan dari pelarutnya dengan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental (25). Hasil ekstrak murni yang telah didapatkan kemudian dilarutkan dalam 100 ml akuades dengan konsentrasi masing-masing yaitu konsentrasi 100%; konsentrasi 90%; konsentrasi 80%; konsentrasi 70%; dan konsentrasi 60% disesuaikan dengan penelitian Qudsiyyah (37).

Uji Fitokimia

Uji fitokimia bertujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak daun bidara. Uji fitokimia yang dilakukan pada penelitian ini meliputi uji senyawa alkaloid, saponin, flavonoid, polifenol, dan tanin.

Uji Alkaloid

Ekstrak daun bidara sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquadest serta HCl 2N lalu dididihkan dan disaring. Filtrat dibasakan dengan ammonia 10% lalu ditambahkan klorofom dan dikocok kuat. Lapisan klorofom dipipet kemudian ditambahkan ke dalam larutan HCl 2N, lalu dikocok kuat hingga terbentuk dua lapisan. Lapisan asam pada tabung reaksi dipipet dan dibagi menjadi 3 tabung. Pada tabung I ditambahkan pereaksi Mayer dan terjadi perubahan dengan adanya endapan putih atau kekeruhan menandakan sampel positif mengandung alkaloid. Pada tabung II ditambahkan pereaksi Dragendorff, apabila terbentuk suatu endapan berwarna jingga-kuning menandakan sampel positif mengandung alkaloid. Tabung III digunakan sebagai blanko (38, 39).

Uji Saponin

Ekstrak daun bidara sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 10 mL air panas selama 10 menit. Kemudian campuran disaring dan filtrat ditampung. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu dikocok secara vertikal selama 10 detik dengan kecepatan konstan dan dibiarkan selama 10 menit. Terbentuknya busa dengan tinggi 1 cm pada tabung reaksi menandakan adanya senyawa golongan saponin. Busa ditambahkan HCl 2N beberapa tetes. Jika busa hilang maka hasil saponin negatif. Jika busa masih bertahan, maka hasil saponin positif (38, 39).

Uji Flavonoid

Ekstrak dimasukkan daun bidara sebanyak 0,5 g ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquadest secukupnya. Kemudian tabung reaksi dipanaskan selama 1 menit, lalu disaring. Filtrat diambil sebanyak, dicampurkan dengan serbuk magnesium (Mg) dan asam klorida (HCL 2N pekat) serta amil alkohol ke dalam campuran. Tabung reaksi tersebut dikocok dengan kuat dan perubahan diamati. Adanya perubahan dengan terbentuknya warna merah, kuning, dan jingga pada campuran menunjukkan keberadaan senyawa flavonoid (38, 39).

Uji Polifenol

Ekstrak sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dengan aquadest. Tabung berisi sampel dan aquadest dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Filtrat ditampung dan ditambahkan larutan FeCl₃. Warna hijau, biru kehijauan, merah-ungu, biru hitam hingga hitam pekat menandakan positif fenolat. Jika timbul endapan berwarna coklat menandakan adanya polifenolat (38, 39).

Uji Tannin

Ekstrak daun bidara sebanyak 0,5 g dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dilarutkan dengan aquades, dan dididihkan selama 15 menit. Setelah itu campuran dibiarkan dingin

dan disaring. Filtrat ditambahkan larutan gelatin 1% lalu dikocok hingga terbentuk endapan putih yang menunjukkan adanya senyawa tannin (38, 39).

Preparasi Media Pertumbuhan Bakteri

Disiapkan media media *nutrient broth* (NB) sebanyak 5,7 g dan akuades 150 mL. Media NB dipanaskan di atas *hot plate* yang didalamnya sudah terdapat *magnetic stirrer* hingga mendidih. Kemudian disterilkan menggunakan sterilisasi panas uap di autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit. Kemudian dituang ke dalam cawan petri yang steril, dan didiamkan hingga dingin dan memadat (25).

Penyiapan Bakteri Uji

Bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu *S. aureus* yang berasal dari Laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Syiah Kuala Banda Aceh diremajakan dalam media NB dan diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C.

Pembuatan Kelompok Kontrol

Kelompok kontrol pada penelitian ini menggunakan eritromisin (dosis 250 mg) sebagai kontrol positif dan aquadest sebagai kontrol negatif. Sampel bakteri diperoleh dari isolat murni bakteri *S. aureus* yang telah tersedia di Laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Syiah Kuala Banda Aceh.

Preparasi Biofilm Bakteri *S. aureus*

Diambil satu koloni bakteri *S. aureus*, kemudian diinokulasikan pada 5 ml media TSB (*Trypticase Soy Broth*) yang dicampur 2,5% glukosa dan diinkubasi pada *incubator* dengan suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya suspensi bakteri *S. aureus* disesuaikan dengan standar Mc Farland 0,5 ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL). Selanjutnya diambil suspensi bakteri sebanyak 100 μ l dan dimasukkan ke dalam mikroplate 96 lubang-U Bottom dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam untuk persiapan pengujian aktivitas ekstrak daun bidara terhadap degradasi biofilm bakteri *S. aureus*.

Uji Aktivitas Ekstrak Daun Bidara (*Z. mauritiana* Lamm) terhadap Degradasi Biofilm *S. aureus*

Uji Degradasi biofilm dilakukan dengan teknik *crystal violet binding assay* untuk menilai kemampuan pembentukan biofilm oleh *S. aureus*. Pengujian dilakukan terhadap ekstrak daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) dengan konsentrasi masing-masing yaitu konsentrasi 100%; konsentrasi 90%; konsentrasi 80%; konsentrasi 70%; dan konsentrasi 60% dalam media NB dan suspensi bakteri dengan volume total 200 μ L tiap well, dan suspensi bakteri saja sebagai kontrol negatif. Suspensi uji dan suspensi bakteri dimasukkan ke dalam mikroplat, selanjutnya mikroplat ditutup dan diinkubasi pada 37°C selama 42 jam. Setelah diinkubasi, isi mikroplat dikeluarkan

dan dicuci dengan *Phosphat Buffer Saline* (PBS). Mikroplat diberikan pewarna dengan cara dimasukkan 200 µL larutan kristal violet 1% dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Setelah mikroplat kering, sebanyak 200 µL etanol 96% dimasukkan ke dalam mikroplat dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Mikroplat diukur menggunakan *microplate reader* pada densitas optik 595_{nm} (150). Pengujian dilakukan secara *duplo* sebanyak dua kali ulangan. Persentase degradasi biofilm dihitung dengan menggunakan rumus *Radical-scavenging activity* (40):

$$\% \text{ Degradasi Biofilm} = \left(\frac{AC - AT}{AC} \right) \times 100$$

Keterangan :(i)

AC : Rata-rata nilai absorbansi biofilm tanpa perlakuan.

AT : Rata-rata nilai absorbansi biofilm setelah perlakuan dengan ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm).

Analisis data

Analisis data yang diperoleh dalam penelitian ini dilakukan dengan *One Way Anova* menggunakan SPSS 24.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil uji determinasi menunjukkan daun yang digunakan pada penelitian adalah daun bidara dengan jenis *Ziziphus Mauritiana* Lamm, termasuk dalam kingdom Plantae, sub kingdom Tracheobioma, divisi Magnoliophyta, kelas Magnoliopsida, sub kelas Rosidae, ordo Rhamnales, famili Rhamnaceae, genus *Zizipus*, spesies *Ziziphus Mauritiana* Lamm. Hasil uji skrining fitokimia daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) positif mengandung senyawa flavonoid, terpenoid, tanin, fenolik dan saponin. Hasil analisis uji skrining fitokimia dapat dilihat pada Tabel. 1.

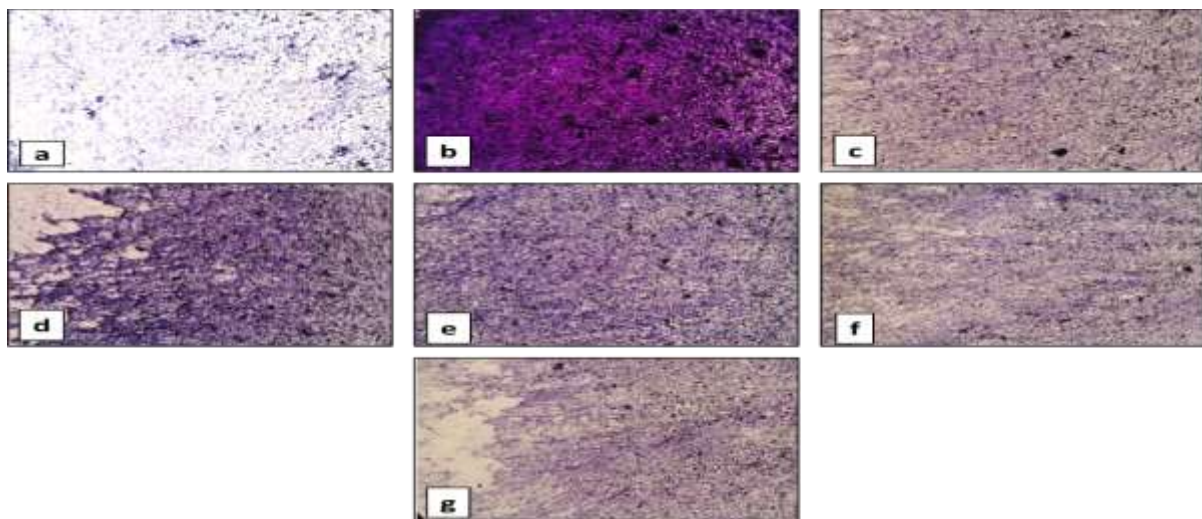
Tabel.1 Hasil uji skrining fitokimia ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm).

No	Uji Fitokimia	Hasil
1	Flavonoid	+
2	Steroid	-
3	Terpenoid	+
4	Tanin	+
5	Fenolik	+
6	Saponin	+
7	Alkaloid;	
	Dragendroff (DD)	-
	Mayer	-
	Wagner	-

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, didapatkan hasil uji ekstrak etanol daun bidara pada konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% masing-masing membentuk zona hambat rata-rata sebesar 9,24 mm, 8,79 mm, 9,30 mm, 10,15 mm, dan 10,99 mm. Rata-rata zona hambat pada kelompok kontrol positif (eritromisin) yaitu sebesar 19,34 mm, sedangkan pada kontrol negatif tidak terbentuk zona hambat.

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun bidara dalam mendegradasi biofilm *S. aureus* pada konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% masing-masing 19,32%, 5,42%, 10,72%, 24,16% dan 38,80%, pada kelompok kontrol positif 94,84% dan pada kontrol negatif 0,00%. Hasil analisis uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun bidara dalam mendegradasi biofilm *S. aureus* dapat dilihat pada Tabel. 2 dan Gambar 1.

Sampel	Nilai Absorbansi				Rata-rata	% degradasi biofilm
	1	2	3	4		
Kontrol Negatif	2,80	0,76	0,72	0,74	1,25	0,00
Kontrol Positif	0,06	0,06	0,07	0,07	0,06	94,84
Ekstrak Bidara 60%	0,93	0,98	1,19	0,95	1,01	19,32
Ekstrak Bidara 70%	1,25	1,13	1,19	1,16	1,18	5,42
Ekstrak Bidara 80%	0,90	1,46	0,93	1,18	1,12	10,72
Ekstrak Bidara 90%	0,89	0,86	1,17	0,88	0,95	24,16
Ekstrak Bidara 100%	0,87	0,70	0,72	0,78	0,77	38,80



Gambar 1.

Gambaran mikroskopis degradasi biofilm bakteri *S. aureus* setelah pemberian ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) pada berbagai konsentrasi. (a) kontrol positif, (b) kontrol negatif, (c) ekstrak bidara 60%, (d) ekstrak bidara 70%, (e) ekstrak bidara 80%, (f) ekstrak bidara 90%, (g) ekstrak bidara 100%. (pembesaran 4 x 10).

Gambar.1 di atas memperlihatkan pengaruh pemberian ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) pada berbagai konsentrasi terhadap degradasi biofilm bakteri *S. aureus*. Kelompok kontrol positif yang diberikan antibiotik eritromisin (dosis 250 mg), menunjukkan mampu mendegradasi biofilm bakteri *S. aureus* (Gambar a), sedangkan kelompok kontrol negatif yang diberikan aquadest steril, tidak mampu mendegradasi biofilm bakteri *S. aureus*, hal ini terlihat adanya pertumbuhan biofilm bakteri *S. aureus* yang masih sangat pekat (Gambar b). Kelompok yang diberikan ekstrak bidara (*Z. mauritiana* Lamm) konsentrasi 60% (P1), menunjukkan mampu mendegradasi biofilm bakteri *S. aureus* hingga 19,32%, terlihat adanya pertumbuhan biofilm bakteri *S. aureus* yang tergolong rendah (Gambar c), sementara pada P2 (konsentrasi 70%), menunjukkan adanya degradasi biofilm bakteri *S. aureus* sebesar 5,42%, dan terlihat pertumbuhan biofilm bakteri *S. aureus* yang tergolong masih pekat dibandingkan dengan P1 (Gambar d). Kelompok ekstrak bidara (*Z. mauritiana* Lamm) konsentrasi 80% (P3), menunjukkan mampu mendegradasi biofilm bakteri *S. aureus* hingga 10,72%, terlihat adanya pertumbuhan biofilm bakteri *S. aureus* yang tergolong agak pekat (Gambar e), pada konsentrasi 90% (P4), menunjukkan mampu mendegradasi biofilm bakteri *S. aureus* hingga 24,16%, terlihat adanya pertumbuhan biofilm bakteri *S. aureus* yang tergolong rendah (Gambar f), dan pada konsentrasi 100% (P5), menunjukkan mampu mendegradasi biofilm bakteri *S. aureus* hingga 38,80%, meskipun masih terlihat adanya pertumbuhan biofilm bakteri *S. aureus* namun tergolong rendah (Gambar g). Berdasarkan gambaran di atas menunjukkan bahwa ekstrak bidara (*Z. mauritiana* Lamm) mampu mendegradasi biofilm bakteri *S. aureus*.

Uji Normalitas

Uji normalitas dilakukan untuk menguji kenormalan data sebagai syarat dilakukan uji ANOVA. Data yang berdistribusi normal memiliki nilai $p \geq 0,05$, sedangkan data yang tidak berdistribusi normal memiliki nilai $p \leq 0,05$. Hasil uji normalitas pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel.3.

Tabel. 3 Hasil Uji Normalitas Shapiro-Wilk Data Degradasi Biofilm.

Pengukuran	Kelompok Perlakuan	Nilai p	keterangan
Degradasi Biofilm	Kontrol Negatif	0,002	Tidak Normal
	Kontrol Positif	0,024	Tidak Normal
	Ekstrak Bidara 60%	0,070	Normal
	Ekstrak Bidara 70%	0,850	Normal
	Ekstrak Bidara 80%	0,397	Normal
	Ekstrak Bidara 90%	0,015	Tidak Normal
	Ekstrak Bidara 100%	0,539	Normal

Berdasarkan Tabel uji normalitas Shapiro-Wilk di atas didapatkan bahwa data degradasi biofilm kelompok kontrol negatif, kontrol positif, ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 90%

berdistribusi tidak normal karena nilai signifikansinya $< 0,05$. Hal ini menunjukkan bahwa data degradasi biofilm ekstrak daun bidara tidak memenuhi asumsi untuk dilakukan uji ANOVA, sehingga harus dilakukan uji nonparametrik Kruskal Wallis.

Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan untuk mengetahui apakah data varian yang diuji homogen atau tidak yang merupakan sebagai syarat dilakukan uji ANOVA. Varian data dikatakan homogen apabila memiliki nilai $p \geq 0,05$, sedangkan data yang tidak homogen memiliki nilai $p \leq 0,05$. Hasil uji homogenitas pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel.4.

Tabel. 4 Hasil Uji Homogenitas Levene Data Degradasi Biofilm.

Pengukuran	Nilai p	keterangan
Degradasi Biofilm	0,000	Tidak Homogen

Berdasarkan Tabel uji homogenitas Levene di atas didapatkan data tidak homogen karena menunjukkan nilai signifikansi sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa data varian data degradasi biofilm ekstrak daun bidara tidak memenuhi asumsi untuk dilakukan uji ANOVA, sehingga harus dilakukan uji nonparametrik *Kruskal Wallis*.

Uji Nonparametrik Kruskal Wallis

Uji *Kruskal Wallis* dilakukan karena varian bebas lebih dari dua atau tidak berpasangan dengan syarat data tidak berdistribusi normal dan varian data tidak homogen. Berdasarkan output uji *Kruskal Wallis*, didapatkan nilai p sebesar 0,005 ($< 0,05$), sehingga dapat disimpulkan bahwa rata-rata ke tujuh kelompok perlakuan tersebut berbeda secara nyata.

Uji Post Hoc Mann-Whitney

Hasil uji *Mann-Whitney* menunjukkan bahwa data kelompok kontrol negatif berbeda nyata dengan kontrol positif ($p < 0,05$), namun tidak berbeda nyata dengan kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 60%, 70%, 80%, 90% dan 100% ($p > 0,05$). Data kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 60% berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kontrol positif, namun tidak berbeda nyata dengan kelompok kontrol negatif dan kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 100% ($p < 0,05$), sedangkan kelompok kontrol negatif, kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 70%, 80%, dan 90% menunjukkan tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Data kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 70% berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kontrol positif, dan ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 100% ($p < 0,05$), sedangkan kelompok kontrol negatif dan kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 60%, 80%, dan 90% tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Data kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 80%

berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kontrol positif, dan ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 100% ($p < 0,05$), sedangkan kelompok kontrol negatif dan kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 60%, 70%, dan 90% tidak berbeda nyata ($p > 0,05$).

Data kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 90% berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kontrol positif, dan ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 100% ($p < 0,05$), sedangkan kelompok kontrol negatif dan kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 60%, 70%, dan 80% tidak berbeda nyata ($p > 0,05$). Data kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 100% berbeda nyata dengan kelompok perlakuan kontrol positif, ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 60%, 70%, 80%, dan 90% ($p < 0,05$), sedangkan kelompok negatif menunjukkan perbedaan yang tidak nyata ($p > 0,05$). Hasil uji homogenitas pada penelitian ini dapat dilihat pada Tabel.5.

Tabel. 5 Hasil Uji *Post Hoc Mann-Whitney* Data Degradasi Biofilm.

Kelompok perlakuan	KN	KP	P1	P2	P3	P4	P5
KN	-	0,019*	0,248	0,248	0,248	0,248	0,663
KP	0,019*	-	0,019*	0,019*	0,019*	0,019*	0,019*
P1	0,248	0,019*	-	0,110	0,885	0,149	0,021*
P2	0,248	0,019*	0,110	-	0,564	0,083	0,021*
P3	0,248	0,019*	0,885	0,564	-	0,083	0,021*
P4	0,248	0,019*	0,149	0,083	0,083	-	0,043*
P5	0,663	0,019*	0,021*	0,021*	0,021*	0,043*	-

Skrining fitokimia ekstrak etanol daun bidara (Z. mauritiana Lamm)

Hasil skrining fitokimia pada penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) mengandung senyawa flavonoid, terpenoid, tanin, fenolik dan saponin. Dimana senyawa metabolit sekunder tersebut memiliki aktivitas yang berbeda-beda.

Flavonoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang banyak ditemukan dalam tumbuhan dan telah dikenal memiliki aktivitas antioksidan (41). Flavonoid dilaporkan memiliki potensi antimikroba dan dapat memberikan perlindungan terhadap penyakit degeneratif (42). Flavonoid merupakan senyawa yang cenderung bersifat polar yang mengakibatkan senyawa tersebut lebih mudah menembus dinding sel bakteri dengan cara mendenaturasi protein bakteri yang dapat menyebabkan berhentinya aktivitas metabolisme protein bakteri (25). Flavonoid juga mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak membran sel bakteri, menghambat berbagai sintase yang melibatkan sintase asam nukleat bakteri, atau sintesis selubung sel (43).

Senyawa terpenoid ditemukan dalam daun bidara dan telah diketahui memiliki sifat antimikroba (44). Senyawa terpenoid juga berpotensi sebagai agen antibakteri (45), antibiofilm dan bersifat sitotoksik (46). Aktivitas antimikroba terpenoid terkait dengan gugus fungsi lainnya seperti terpenoid fenolik, gugus hidroksil, serta adanya elektron yang terdelokalisasi. Gugus hidroksil carvacrol yang disubstitusi oleh gugus metil eter dapat mempengaruhi hidrofobisitas sel bakteri. Terpenoid diketahui mampu mempengaruhi membran sel bakteri, menghambat laju pembelahan bakteri. Selain itu juga berperan dalam penghambatan enzim esensial bakteri tertentu, seperti protein FtsZ (*Filamenting Temperature Sensitive Strain Z*), yang merupakan target utama dalam pembelahan sel bakteri (47).

Daun bidara dilaporkan mengandung senyawa tanin dan alkaloid yang bersifat antibakteri dan menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mendenaturasi protein dan menghambat asam nukleat bakteri. Gugus basa dari senyawa aktif yang mengandung nitrogen akan bereaksi dengan DNA bakteri yang merupakan komponen utama dari nukleus, sehingga sintesis protein dan asam nukleat di dalam sel akan terganggu dan metabolisme sel bakteri juga akan terganggu serta pertumbuhan bakteri akan terhambat. Selain itu, tanin juga akan mengganggu dinding sel bakteri dengan cara membentuk kompleks polisakarida yang menyebabkan permeabilitas sel bakteri terganggu. Terganggunya permeabilitas sel bakteri menyebabkan sel tidak dapat beraktivitas, sehingga pertumbuhan bakteri akan terhambat (48). Sifat struktural tanin juga memainkan peran signifikan dalam aktivitas antibakterinya. Sebagai senyawa polifenol makromolekul, tanin mengandung sejumlah besar hidroksi fenolik, yang menjadi salah satu faktor utama penyebab kekuatan aktivitas antibakterinya (49).

Senyawa fenolik juga dikenal memiliki aktivitas antioksidan dan antibakteri. Senyawa fenol dan turunannya dapat merusak membran sel bakteri karena kandungan ion H⁺ yang dapat merusak gugus fosfat, membuat molekul fosfolipid terurai, sehingga terjadi penghambatan pertumbuhan sel atau kematian sel karena fosfolipid tidak mampu mempertahankan bentuk membran sel. Senyawa fenol dan turunannya juga berperan sebagai penghambat enzim, merusak membran sitoplasma dan mengendapkan protein sel secara total setelah berikatan dengan protein non-spesifik (50).

Hasil skrining senyawa metabolit sekunder terakhir yang ditemukan pada ekstrak daun bidara pada penelitian ini yaitu saponin. Saponin adalah senyawa metabolit sekunder yang hampir ditemukan pada semua tanaman, karena memiliki fungsi melindungi tanaman dari serangan hama dan mikroba patogen (51). Menurut Ravi et al., (52), saponin merupakan senyawa metabolit sekunder yang tersebar luas di seluruh kingdom tumbuhan, dan keberadaannya dapat terdeteksi pada jaringan tanaman yang secara umum rentan terhadap

serangan jamur atau bakteri. Sifat tersebut ditandai oleh kehadiran saponin pada jaringan tanaman yang sering kali menjadi target serangan patogen. Zhao et al., (53) juga melaporkan bahwa saponin memiliki efek bakteriostatik yang efektif, yang dapat mengubah permeabilitas membran, merusak struktur membran sel, dan menghambat pertumbuhan bakteri.

Aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) berdasarkan uji zona hambat

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) memiliki daya aktivitas antibakteri yang lemah. Kriteria daya aktivitas antibakteri yang lemah dalam penelitian ini menyesuaikan dengan penelitian Greenwood (54).

Berdasarkan kriteria aktivitas zona daya hambat menurut Greenwood, didapatkan hasil bahwa ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) pada konsentrasi 100% dengan rata-rata zona hambat 10,99 mm dan konsentrasi 90% dengan rata-rata zona hambat 10,15 mm, dinyatakan bahwa daya hambat lemah terhadap bakteri *S. aureus*.

Zona hambat yang terbentuk pada semua kelompok perlakuan lebih rendah dibandingkan kelompok kontrol Positif, hal ini menunjukkan bahwa antibiotik eritromisin yang digunakan memiliki daya hambat yang lebih kuat terhadap bakteri *S. aureus* dibandingkan ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) dengan kategori sedang. Daya hambat kelompok ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 60% lebih tinggi dibandingkan konsentrasi 70%, namun lebih rendah dibandingkan konsentrasi 80%, 90% dan 100%.

Hasil penelitian yang dilakukan oleh Dewi yang menyatakan bahwa diameter zona hambat tidak selalu naik sebanding dengan naiknya konsentrasi antibakteri, kemungkinan ini terjadi karena perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar serta jenis dan konsentrasi senyawa antibakteri yang berbeda juga memberikan diameter zona hambat yang berbeda pada lama waktu tertentu (26).

Eritromisin sebagai kontrol positif memiliki aktivitas antibakteri yang lebih kuat dibandingkan dengan ekstrak etanol daun bidara, yang dibuktikan dengan diameter zona bening di sekitar cakram (19,34 mm) yang lebih besar dari ekstrak etanol daun bidara, serta aquades sebagai kontrol negatif tidak terdapatnya zona bening di sekitar cakram. Eritromisin merupakan salah satu golongan antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *S. aureus* (55). Eritromisin juga memiliki aktivitas penghambatan terhadap *quorum sensing* saat proses pembentukan biofilm (56). Aktivitas penghambatan bakteri dari ekstrak etanol daun bidara pada penelitian ini diduga karena senyawa kimia yang terkandung di dalam ekstrak (50).

Aktivitas ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) terhadap degradasi biofilm *S. aureus*

Hasil penelitian ini menunjukkan pada konsentrasi tertinggi dari ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) yang mampu mendegradasi biofilm *S. aureus* yaitu pada konsentrasi 100%. Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) konsentrasi 100% merupakan konsentrasi yang paling efektif menyebabkan degradasi biofilm *S. aureus* meskipun persentase degradasinya masih lebih rendah dibandingkan antibiotik eritromisin sebagai kontrol positif. Hasil penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) maka semakin tinggi persen degradasi biofilm kecuali pada ekstrak etanol daun bidara konsentrasi 60%.

Menurut Threenesia and Ramadhian (175) aktivitas antibakteri atau daya hambat bakteri tidak selalu meningkat sebanding dengan meningkatnya konsentrasi antibakteri, hal ini terjadi karena perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media inkubasi dan jenis serta konsentrasi senyawa antibakteri yang berbeda juga dapat memberikan aktivitas antibakteri yang berbeda. Faktor lain yang dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri antara lain adalah konsentrasi mikroba pada media yang digunakan, nilai pH pada media (57). Selain itu, faktor eksternal yang kemungkinan dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri adalah suhu. Ketidakstabilan suhu ruangan dan suhu inkubator karena kondisi laboratorium aktif dan sering terbuka dapat mempengaruhi aktivitas antibakteri (58). Halla et al., (59) mengemukakan bahwa suhu dengan kondisi yang optimum sangat dibutuhkan untuk kecepatan pertumbuhan sel bakteri.

Beberapa mekanisme dari senyawa kimia yang terkandung dalam ekstrak memperlihatkan aktivitas penghambatan dan penghancuran biofilm melalui mekanisme yang dapat mengakibatkan degradasi matriks biofilm, kematian sel, dan kebocoran sel (60). Beberapa senyawa dapat memfasilitasi penetrasi agen antimikroba ke dalam sel bakteri atau biofilm, sehingga meningkatkan efektivitasnya. Hal ini dapat menghasilkan aktivitas antimikroba yang lebih komprehensif dan efisien (61). Interaksi sinergis antara senyawa kimia dalam ekstrak dapat meningkatkan daya bioavailabilitas senyawa, hingga senyawa tersebut mampu mencapai lokasi targetnya di dalam sel bakteri pada konsentrasi yang efektif. Hal ini dapat mengatasi masalah yang berkaitan dengan kelarutan yang buruk atau metabolisme yang cepat dari masing-masing senyawa. Pengaruh interaksi antar senyawa ini dapat mengarah pada hasil terapi yang lebih baik dan strategi pengobatan yang lebih baik (62).

Mekanisme saponin dalam merusak biofilm dengan cara mempengaruhi matriks polimer ekstraseluler yang ada dalam matriks biofilm bakteri sehingga zat polimer berkurang dan

mengubah integritas membran sel bakteri yang menyebabkan terjadi ketidakstabilan pada dinding sel bakteri. Senyawa terpenoid dalam mendegradasi biofilm dapat mengurangi biofilm yang sudah terbentuk dan membunuh bakteri dalam biofilm (63). Senyawa tanin yang terdapat dalam tanaman herbal termasuk daun bidara memiliki efek kematian sel dan kebocoran sel pada biofilm, selain itu tanin juga mempunyai efek bakteriosid. Sebagai suatu makromolekul polifenol, tanin mengandung sejumlah besar hidroksil fenolik, yang menjadi salah satu faktor penyebab aktivitas antibakteri yang kuat pada tanin. Pengaruh dalam menghambat pertumbuhan bakteri dari ekstrak yang kaya tanin bergantung pada sifat kimia yang dimiliki oleh tanin tersebut (64).

Senyawa flavonoid mempunyai efek menghambat molekul adhesin yang sangat dibutuhkan dalam pembentukan biofilm. Senyawa tanin dan flavonoid bekerja dengan mengikat salah satu protein adhesin bakteri yang dikenal sebagai reseptor permukaan bakteri, sehingga terjadi penurunan daya perlekatan bakteri serta penghambatan sintesis protein untuk pembentukan dinding sel (65). Senyawa flavonoid, terpenoid, tanin, fenolik dan saponin yang terdapat dalam ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lam.) pada penelitian ini belum mampu mendegradasi biofilm bakteri *S. aureus*. Hal ini sesuai dengan hasil penelitian Lopes et al., (66) yang melaporkan efek flavonoid dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *S. aureus* SA1199B dengan konsentrasi kurang dari 1024 $\mu\text{g/mL}$. Nilai IC₅₀ flavonoid bervariasi antara 1 hingga 256 $\mu\text{g/mL}$. Secara umum, nilai IC₅₀ terendah (1 $\mu\text{g/mL}$) tercatat pada *S. aureus* RN4220, kecuali myricitrin yang menunjukkan IC₅₀ sebesar 128 $\mu\text{g/mL}$. Temuan ini menunjukkan bahwa meskipun flavonoid yang diuji pada konsentrasi tertentu tidak mampu memberikan efek penghambatan terhadap pertumbuhan *S. aureus*, namun senyawa flavonoid masih mampu mengurangi kemampuan bakteri *S. aureus* untuk membentuk biofilm.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun bidara juga mengandung saponin. Menurut Sobolewska et al., (67) saponin dapat diklasifikasikan ke dalam dua kelompok yaitu steroid saponin dan triterpenoid saponin. Aktivitas antibiofilm dari saponin steroid yaitu dengan cara mengganggu stabilitas matriks ekstraseluler polisakarida dan menghambat pembentukan biofilm *S. aureus* melalui ikatan dengan sisi aktif enzim manitol dehidrogenase dan eDNA yang berperan dalam sintesis alginat. Alginat merupakan komponen utama penyusun matriks ekstraseluler polisakarida. Sedangkan Efek alkaloid yaitu mereduksi gen-gen inisiator pembentuk biofilm, menghambat quorum-sensing, dan menurunkan faktor-faktor regulator pembentuk biofilm.

Variasi konsentrasi ekstrak memiliki peran pada proses penghambatan pembentukan biofilm *S. aureus*. Konsentrasi ekstrak berpengaruh pada aktivitas senyawa fitokimia untuk berpenetrasi ke reseptor-reseptor di dinding sel bakteri (68). *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*. 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 (68-69).

Penelitian-penelitian sebelumnya telah membuktikan bahwa senyawa fitokimia yang terdapat dalam tanaman herbal berpotensi menjadi agen antibiofilm alami terhadap bakteri *S. aureus*. Penelitian ini juga menunjukkan keberadaan senyawa fitokimia serupa dalam ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) yang berpotensi sebagai agen antibiofilm dalam mendegradasi biofilm *S. aureus*.

5. KESIMPULAN

Hasil skrining fitokimia ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) mengandung flavonoid, terpenoid, tanin, fenolik, dan saponin. Konsentrasi ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) yang paling efektif dalam menghambat bakteri *S. aureus* yaitu 90% dan 100% rata-rata 10,15 mm dan 10,99 mm. Konsentrasi ekstrak etanol daun bidara (*Z. mauritiana* Lamm) pada konsentrasi 100% mampu mendegradasi biofilm bakteri *S. aureus* hingga 38,80%.

DAFTAR PUSTAKA

- Abrar, M., Wibawan, I. W. T., Priosoeryanto, B. P., Soedarwanto, M., & Pasaribu, F. H. (2013). Peranan hemaglutinin *Staphylococcus aureus* dalam proses adhesi pada sel epitel ambing sapi perah. *Jurnal Kedokteran Hewan*, 7(1).
- Acosta, A. C., Oliveira, P. R. F., Albuquerque, L., et al. (2018). Frequency of *Staphylococcus aureus* virulence genes in milk of cows and goats with mastitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 38, 2029–2036.

- Afzal, M., Vijay, A. K., Stapleton, F., & Willcox, M. (2022). Virulence genes of *Staphylococcus aureus* associated with keratitis, conjunctivitis, and contact lens-associated inflammation. *Translational Vision Science & Technology*, 11(7), 5. <https://doi.org/10.1167/tvst.11.7.5>
- Ahmad-Mansour, N., Loubet, P., Pouget, C., et al. (2021). *Staphylococcus aureus* toxins: An update on their pathogenic properties and potential treatments. *Toxins*, 13(10), 677. <https://doi.org/10.3390/toxins13100677>
- Aisyah, N., Harahap, M. R., & Arfi, F. (2021). Analisis fitokimia dan uji aktivitas antibakteri ekstrak daun bidara (*Ziziphus mauritiana* L.) terhadap *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *AMINA*, 2(3), 106–113.
- Akhdiya, A. (2018). *Quorum sensing bakteri: Manipulasi dan potensi aplikasinya dalam bioteknologi pertanian*.
- Andrade, J. C., da Silva, A. R. P., Freitas, M. A., et al. (2019). Control of bacterial and fungal biofilms by natural products of *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 65, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.06.006>
- Andrade, J. C., da Silva, A. R. P., Freitas, M. A., et al. (2019). Control of bacterial and fungal biofilms by natural products of *Ziziphus joazeiro* Mart. (Rhamnaceae). *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 65, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2019.06.004>
- Asy'syifa, N. S., Darusman, F., & Dewi, M. L. (2020). Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun bidara Arab (*Ziziphus spina-christi* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Prosiding Farmasi*, 6(2), 616–620.
- Becker, K., Heilmann, C., & Peters, G. (2014). Coagulase-negative staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), 870–926. <https://doi.org/10.1128/CMR.00109-13>
- Bhalani, D. V., Nutan, B., Kumar, A., & Singh Chandel, A. K. (2022). Bioavailability enhancement techniques for poorly aqueous soluble drugs and therapeutics. *Biomedicines*, 10(9), 2055. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092055>
- Bhalani, D. V., Nutan, B., Kumar, A., & Singh Chandel, A. K. (2022). Bioavailability enhancement techniques for poorly aqueous soluble drugs and therapeutics. *Biomedicines*, 10(9), 2055. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10092055>
- Carroll, K. C., Hobden, J. A., Miller, S., et al. (2019). The staphylococci. In K. C. Carroll et al. (Eds.), *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology* (27th ed.). McGraw-Hill Education.
- Deryabin, D. G., & Inchagova, K. S. (2018). Inhibitory effect of aminoglycosides and tetracyclines on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *Microbiology*, 87(1), 1–8.
- Deryabin, D. G., & Inchagova, K. S. (2018). Inhibitory effect of aminoglycosides and tetracyclines on quorum sensing in *Chromobacterium violaceum*. *Microbiology*, 87(1), 1–8.
- Dewi, M., Darmawi, D., Nurliana, N., et al. (2020). Aktivitas antibiotik terhadap biofilm *Staphylococcus aureus* isolat preputium sapi Aceh. *Jurnal Sain Veteriner*, 38(1), 1–6.
- Dewi, M., Darmawi, D., Nurliana, N., et al. (2020). Aktivitas antibiotik terhadap biofilm *Staphylococcus aureus* isolat preputium sapi Aceh. *Jurnal Sain Veteriner*, 38(1), 1–6.

- Dhuha, N. S., Haeria, H., & Putri, H. E. (2019). Toksisitas akut ekstrak etanol daun bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) berdasarkan gambaran morfologi dan histologi hati mencit. *ad-Dawaa' Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(1).
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881. <https://doi.org/10.3201/eid0809.020063>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- Ekambaram, S. P., Perumal, S. S., & Balakrishnan, A. (2016). Scope of hydrolysable tannins as possible antimicrobial agents. *Phytotherapy Research*, 30(7), 1035–1045. <https://doi.org/10.1002/ptr.5619>
- Ekambaram, S. P., Perumal, S. S., & Balakrishnan, A. (2016). Scope of hydrolysable tannins as possible antimicrobial agents. *Phytotherapy Research*, 30(7), 1035–1045. <https://doi.org/10.1002/ptr.5619>
- Farha, A. K., Yang, Q. Q., Kim, G., et al. (2020). Inhibition of multidrug-resistant foodborne *Staphylococcus aureus* biofilms by a natural terpenoid (+)-nootkatone and related molecular mechanism. *Food Control*, 112, 107154. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107154>
- Farha, A. K., Yang, Q. Q., Kim, G., et al. (2020). Inhibition of multidrug-resistant foodborne *Staphylococcus aureus* biofilms by a natural terpenoid (+)-nootkatone and related molecular mechanism. *Food Control*, 112, 107154. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107154>
- Farha, A. K., Yang, Q. Q., Kim, G., et al. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, 38, 100751. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100751>
- Farha, A. K., Yang, Q. Q., Kim, G., et al. (2020). Tannins as an alternative to antibiotics. *Food Bioscience*, 38, 100751. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100751>
- Farnsworth, N. R. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(3), 225–276.
- Farnsworth, N. R. (1966). Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55(3), 225–276. <https://doi.org/10.1002/jps.2600550302>
- Foster, T. J., Geoghegan, J. A., Ganesh, V. K., & Höök, M. (2014). Adhesion, invasion and evasion: The many functions of the surface proteins of *Staphylococcus aureus*. *Nature Reviews Microbiology*, 12(1), 49–62. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3161>
- Ganesh, V. K., Barbu, E. M., Deivanayagam, C. C., et al. (2011). Structural and biochemical characterization of *Staphylococcus aureus* clumping factor B/ligand interactions. *Journal of Biological Chemistry*, 286(29), 25963–25972.
- Ghafourian, S., Mohebi, R., Rezaei, M., et al. (2012). Comparative analysis of biofilm development among MRSA and MSSA strains. *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*, 71(4), 175–182.
- Ghafourian, S., Mohebi, R., Rezaei, M., et al. (2012). Comparative analysis of biofilm development among MRSA and MSSA strains. *Romanian Archives of Microbiology and Immunology*, 71(4), 175–182.

- Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18, 241–272. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>
- Górniak, I., Bartoszewski, R., & Króliczewski, J. (2019). Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. *Phytochemistry Reviews*, 18, 241–272. <https://doi.org/10.1007/s11101-018-9591-z>
- Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., et al. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24(13), 2471. <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>
- Guimarães, A. C., Meireles, L. M., Lemos, M. F., et al. (2019). Antibacterial activity of terpenes and terpenoids present in essential oils. *Molecules*, 24(13), 2471. <https://doi.org/10.3390/molecules24132471>
- Gutiérrez-del-Río, I., López-Ibáñez, S., Magadán-Corpas, P., et al. (2021). Terpenoids and polyphenols as natural antioxidant agents in food preservation. *Antioxidants*, 10(8), 1264. <https://doi.org/10.3390/antiox10081264>
- Hadjicharalambous, A., Bournakas, N., Newman, H., Skynner, M. J., & Beswick, P. (2022). Antimicrobial and cell-penetrating peptides: Understanding penetration for the design of novel conjugate antibiotics. *Antibiotics*, 11(11), 1523. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111523>
- Hadjicharalambous, A., Bournakas, N., Newman, H., Skynner, M. J., & Beswick, P. (2022). Antimicrobial and cell-penetrating peptides: Understanding penetration for the design of novel conjugate antibiotics. *Antibiotics*, 11(11), 1520. <https://doi.org/10.3390/antibiotics11111520>
- Halla, S., Rohmi, R., & Agrijanti, A. (2019). Efektivitas inkubator portable sebagai alat inovasi penunjang laboratorium mikrobiologi. *Jurnal Analis Medika Biosains*, 6(1), 66–72.
- Hanin, N. N. F., & Pratiwi, R. (2017). Kandungan fenolik, flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak daun paku laut (*Acrostichum aureum* L.) fertil dan steril di kawasan mangrove Kulon Progo, Yogyakarta. *Journal of Tropical Biodiversity and Biotechnology*, 2(2), 51–56.
- Hastiana, Y., Handaiyani, S., & Agustin, I. (2022). Test of phytochemical levels of bidara (*Ziziphus spina-christi* L.) potential as medicinal plants. *Jurnal Mangifera Edu*, 6(2), 182–196.
- Herrera, A., Vu, B. G., Stach, C. S., et al. (2016). *Staphylococcus aureus* β -toxin mutants are defective in biofilm ligase and sphingomyelinase activity, and causation of infective endocarditis and sepsis. *Biochemistry*, 55(17), 2510–2517.
- Khoirunnisak, K., Ningrum, W. A., Wirasti, W., & Rahmatullah, S. (2020). Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun bidara (*Ziziphus mauritiana* Lamm.) dalam formulasi sediaan sabun cair sebagai antiseptik terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Medical Sains: Jurnal Ilmiah Kefarmasian*, 5(1), 89–98.
- Kong, C., Neoh, H. M., & Nathan, S. (2016). Targeting *Staphylococcus aureus* toxins: A potential form of anti-virulence therapy. *Toxins*, 8(3), 72. <https://doi.org/10.3390/toxins8030072>
- Lahiri, D., Dash, S., Dutta, R., & Nag, M. (2019). Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *Journal of Biosciences*, 44(2), 52.

- Lahiri, D., Dash, S., Dutta, R., & Nag, M. (2019). Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *Journal of Biosciences*, 44(2), 52. <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9868-4>
- Lopes, L. A. A., dos Santos Rodrigues, J. B., Magnani, M., de Souza, E. L., & de Siqueira-Júnior, J. P. (2017). Inhibitory effects of flavonoids on biofilm formation by *Staphylococcus aureus* that overexpresses efflux protein genes. *Microbial Pathogenesis*, 107, 193–197. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.024>
- Mahdally, N. H., George, R. F., Kashef, M. T., Al-Ghobashy, M., Murad, F. E., & Attia, A. S. (2021). Staquorsin: A novel *Staphylococcus aureus* Agr-mediated quorum sensing inhibitor impairing virulence in vivo without notable resistance development. *Frontiers in Microbiology*, 12, 700494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.700494>
- Mahdally, N. H., George, R. F., Kashef, M. T., Al-Ghobashy, M., Murad, F. E., & Attia, A. S. (2021). Staquorsin: A novel *Staphylococcus aureus* Agr-mediated quorum sensing inhibitor impairing virulence in vivo without notable resistance development. *Frontiers in Microbiology*, 12, Article 700494. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.700494>
- Mardiah, M. (2017). Uji resistensi *Staphylococcus aureus* terhadap antibiotik amoksisilin, tetrasiklin dan propolis. *Jurnal Ilmu Alam dan Lingkungan*, 8(2), 1–6.
- Mauludiyah, E. N., Darusman, F., & Darma, G. C. E. (2020). Skrining fitokimia senyawa metabolit sekunder dari simplisia dan ekstrak air daun bidara Arab (*Ziziphus spinachristi* L.). *Prosiding Farmasi*, 6(2), 1084–1089.
- Mbaveng, A. T., Hamm, R., & Kuete, V. (2014). Harmful and protective effects of terpenoids from African medicinal plants. In V. Kuete (Ed.), *Toxicological survey of African medicinal plants* (pp. 557–576). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800018-2.00019-8>
- Mirzaei, B., Babaei, R., Asiabar, A. P. D., & Bameri, Z. (2015). Detection of both vanA and vanB genes in vanA phenotypes of *Enterococci* by TaqMan RT-PCR. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 161–165. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246120131240>
- Moghadam, S. O., Pourmand, M. R., & Aminharati, F. (2014). Biofilm formation and antimicrobial resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from burn patients, Iran. *Journal of Infection in Developing Countries*, 8(12), 1511–1517. <https://doi.org/10.3855/jidc.4664>
- Muharrami, L. K., Munawaroh, F., Ersam, T., et al. (2019). Antibacterial activity of leaves extract of Bukkol (*Ziziphus mauritania* Lam.) against *E. coli* and *S. aureus*. *KnE Engineering*, 180–189.
- Mukhlisoh, F., Verdianti, P., & Krihariyani, D. (2018). The resistance profile of bacteria *Salmonella* sp. towards antibacterial ethanol extract of bidara leaves (*Ziziphus mauritiana*). *Proceedings*, 381–385.
- Oktavia, F. D., & Sutoyo, S. (2021). Skrining fitokimia, kandungan flavonoid total, dan aktivitas antioksidan ekstrak etanol tumbuhan *Selaginella doederleinii*. *Jurnal Kimia Riset*, 6(2), 141–149.
- Parnomo, T. (2021). Effect of Arabica coffee bean extract (*Coffea arabica*) as a growth inhibitor of *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*, 11(3), 89–96.

- Purbowati, R., Rianti, E. D. D., & Ama, F. (2017). Kemampuan pembentukan slime pada *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, MRSA dan *Escherichia coli*. *Jurnal Florea*, 4(2), 1–10.
- Putri, P. A., Chatri, M., & Advinda, L. (2023). Karakteristik saponin senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan. *Jurnal Serambi Biologi*, 8(2), 252–256.
- Qudsiyyah, F. (2021). Uji efektivitas ekstrak etanol daun bidara (*Ziziphus mauritiana*) sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Skripsi). Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim.
- Ravi, L., Manasvi, V., & Lakshmi, B. P. (2016). Antibacterial and antioxidant activity of saponin from *Abutilon indicum* leaves. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 9(Suppl. 3), 344–347.
- Rizki, R., & Des, M. (2019). Teknik pengumpulan data sampel tumbuhan untuk pembuatan spesimen herbarium. Center for Open Science.
- Rosyada, A. G., Prihastuti, C. C., Sari, D. N. I., et al. (2023). Aktivitas antibiofilm ekstrak etanol kulit bawang merah (*Allium cepa* L.) dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*, 35(1), 34–42.
- Saraswati, A. T., Sugihartuti, R., Puspitasari, Y., et al. (2023). Antibacterial activity of bidara leaf extract (*Ziziphus mauritiana*) against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitis case in vitro. *Journal of Basic Medical Veterinary*, 12(2), 85–91.
- Sobolewska, D., Galanty, A., Grabowska, K., Makowska-Wąs, J., Wróbel-Biedrawa, D., & Podolak, I. (2020). Saponins as cytotoxic agents: An update (2010–2018). Part I—Steroidal saponins. *Phytochemistry Reviews*, 19(1), 139–189. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09632-x>
- Threonesia, A., & Ramadhian, M. R. (2019). Perbandingan efek pemberian ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum* L.) terhadap daya hambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella typhi* secara in vitro. *Jurnal Agromedicine*, 6(1), 120–124.
- Trianes, J., Bastian, B., & Hartati, D. (2022). Differences in diameter of the growth inhibition zone of *Klebsiella pneumoniae* bacteria after incubation at 37°C and 25°C. *Indonesian Journal of Medical Laboratory Science and Technology*, 4(2), 120–127.
- Wen, Q. H., Wang, R., Zhao, S. Q., Chen, B. R., & Zeng, X. A. (2021). Inhibition of biofilm formation of foodborne *Staphylococcus aureus* by the citrus flavonoid naringenin. *Foods*, 10(11), 2614. <https://doi.org/10.3390/foods10112614>
- Zhao, Y., Su, R., Zhang, W., Yao, G. L., & Chen, J. (2020). Antibacterial activity of tea saponin from *Camellia oleifera* shell by novel extraction method. *Industrial Crops and Products*, 153, 112604. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112604>