AKTIVITAS ANTIBIOFILM EKSTRAK AIR DAUN *Syzygium polyanthum (Wight) Walp* TERHADAP PEMBENTUKAN BIOFILM *Candida albicans* ATCC.10231 IN VITRO

Parameter *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* dan *Mean Gray Value*

George Arietama[1], Agung Biworo[2], Renny Aditya[3], Lia Yulia Budiarti[4], Edyson[5]

[1]Program Studi Kedokteran Program Sarjana, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia
[2]Departemen Farmakologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia
[3]Departemen Obstetri dan Ginekologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia
[4]Departemen Mikrobiologi dan Parasitologi, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia
[5]Departemen Biokimia dan Biomolekuker, Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan, Universitas Lambung Mangkurat, Banjarmasin, Indonesia

Email Korespondensi: georgearietama28@gmail.com

***Abstract**: **Candida albicans has ability form biofilms which causes resistance antifungal.** The leaves of Syzygium polyanthum (Wight) Walp (S. polyanthum) contain antifungal compounds such as flavonoids, alkaloids, saponins, tannins which developed as anti-biofilm. This study aims to analyse the antibiofilm activity of the extract of leaf water S. polyanthum on C. albicans biofilm formation based on the Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) and Mean Gray Value (MGV) parameters. Experimental research with a posttest only control group design using the tube test method. The treatment was conducted in three repetitions, namely the extract of leaf water S. polyanthum at 6.25%, 12.5%, 25%, 50%, 75%, 100%, with control groups of fluconazole 5%, sterile distilled water, and TSB+Glucose5%. The tube test results showed that the MBIC of the extract of leaf water S. polyanthum on C. albicans biofilm was 12.5%. The analysis results of the One-way Anova and Post-hoc Duncan tests on the MGV data showed significant antibiofilm activity (p<0,05). The MGV value of the extract of leaf water S. polyanthum 75% (142.128) was equivalent to the MGV of fluconazole 5% (142.052), and the highest MGV was produced by the extract of leaf water S. polyanthum 100%. In conclusion, the extract of leaf water S. polyanthum has antibiofilm activity in inhibiting the formation of C. albicans biofilm.*

Keywords: *Biofilm, C. albicans, MBIC, MGV, S. Polyanthum*

Abstrak: *Candida albicans* memiliki kemampuan membentuk biofilm yang menimbulkan resistensi terhadap antifungi. Daun *Syzygium polyanthum (Wight) Walp (S. polyanthum)* mengandung senyawa antifungi flavonoid, alkaloid, saponin, dan tanin yang berefek sebagai antibiofilm. Penelitian ini bertujuan menganalisis aktivitas antibiofilm dari ekstrak air daun *S. polyanthum* terhadap pembentukan biofilm *C. albicans*, berdasarkan parameter *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC) dan *Mean Gray Value* (MGV). Penelitian eksperimental dengan rancangan *posttest only control group design* menggunakan metode *tube test*. Perlakuan dilakukan dalam tiga kali pengulangan, yaitu ekstrak air daun *S. polyanthum* 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 75%, 100% dengan kontrol flukonazol 5%, aquadest steril, dan TSB+*Glucose* 5%. Hasil *tube-test* didapatkan MBIC dari ekstrak air daun *S. polyanthum* pada biofilm *C. albicans* adalah 12,5%. Hasil analisis uji *One-way Anova* dan *Post-hoc Duncan* pada data MGV didapatkan aktivitas antibiofilm yang bermakna (p.005). Nilai MGV dari

ekstrak air daun *S. polyanthum* 75% (142.128) setara MGV Flukonazol 5% (142.052), dan MGV paling tinggi dihasilkan ekstrak *S. polyanthum* 100%. Kesimpulan, ekstrak air daun *S. polyanthum* memiliki aktivitas antibiofilm dalam menghambat pembentukan biofilm *C. albicans*.

Kata-Kata Kunci: *Biofilm, C. albicans, MBIC, MGV, S. Polyanthum*

PENDAHULUAN

Kandidiasis dengan penyebab utama fungi *Candida albicans (C. albicans),* sangat umum ditemukan pada daerah tropis seperti Indonesia.[1,2] Fungi ini menempati bagian vagina; ada lebih dari 200 strain fungi ini membentuk koloni dan menimbulkan kandidiasis.[3] Bentuk kandidiasis vagina (vulvovaginitis) paling banyak dikeluhkan, dengan prevalensi terbanyak pada wanita usia subur (75%) dan sekitar 40-50% akibat infeksi berulang. Vulvovaginitis pada wanita hamil cenderung tinggi karena tingginya sekresi hormon seks selama kehamilan.[4,5] Pengobatan antifungi selama kehamilan memungkinkan toksisitas janin dan teratogenisitas. Antifungi topikal dan oral juga dapat menimbulkan efek samping seperti demam, mual, muntah, pusing, diare, dan kerusakan pada kulit akibat efek toksik pada organ lain.[6] Flukonazol merupakan, antifungi yang umum digunakan pada kandidiasis.[7] Menurut Nasrollahi Z. dkk., sekitar 94% isolat *C. albicans* dari pasien vaginitis resisten terhadap flukonazol. Resistensi *C.albicans* dikaitkan dengan faktor virulensinya dalam membentuk biofilm di vagina.[4]

Biofilm merupakan komunitas sel-sel yang melekat dan terbungkus dalam ekstraseluler matriks, bersifat resisten terhadap agen antifungi dan inang sistem kekebalan tubuh, serta dapat bertindak sebagai reservoir penularan infeksi.[8] Bentukan biofilm secara *in vitro*, dapat diamati melalui metode *tube-test*.[9] Aktivitas anti-biofilm dapat dinilai melalui *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC*).[10] Intensitas biofilm yang dibentuk pada *tube-test* dapat diukur berdasarkan nilai *Mean Gray Value (*MGV).[11] Fitokimia pada produk alami dengan efek samping dan toksisitas yang rendah, dapat dimanfaatkan untuk mengatasi infeksi mikroba.[12] Fitokimia yang berperan sebagai antimikroba dan anti-biofilm, diantaranya adalah senyawa fenolik, flavonoid, tannin, dan terpenoid. [13,14]

Kandungan antimikroba juga ditemukan pada tanaman salam atau *Syzygium polyanthum (Wight) Walp.* (*S. polyanthum*). Tanaman jenis rempah dan obat jamu ini telah dimanfaatkan oleh masyarakat. Semua bagian *S. polyanthum* (buah, batang, dan daun) berkhasiat obat, tetapi bagian daun lebih banyak dimanfaatkan.[15,16] Ekstrak *S. polyanthum* memiliki bioaktivasi sebagai anti-inflamasi dan antioksidan yang tinggi.[17] Ada 4 kategori fitokimia pada daun salam yaitu golongan senyawa alkaloid, terpenoid, keton, dan terpen.[17] Menurut Uddin dkk., efek farmakologi S. polyanthum diantaranya sebagai antioksidan, antidiabetes, antihipertensi, antimikroba, antidiare, antikanker, penurun lipid, dan penghambatan plak gigi[17]; juga berefek sebagai antibakteri dan antifungi.[18,19] Daun *S. polyanthum* mengandung golongan senyawa bersifat polar dan berefek baik terhadap *C.albicans* penyebab fluor albus.[20]

Kandungan senyawa flavonoid, minyak atsiri, seskuiterpen, triterpenoid, fenol, steroid, sitral, lakton, saponin, dan sterol pada ekstrak *Syzygium sp.* memiliki efek antimikroba dan antibiofilm.[21,22] Sediaan infus daunnya merupakan pengawet bahan makanan alami dan dalam bentuk ekstrak daun salam diketahui bersifat anti-candida.[23] Hasil uji ekstrak air daun *S. polyanthum* terbukti menghambat *C.abicans*, dengan zona hambat lebih luas dibandingkan pelarut lainnya.[20] Sediaan ekstrak jenis *S. aromaticum* pada berbagai pelarut (*methanol, ethyl acetate, n-hexane*, dan *diethyl ether*) diketahui dapat menghambat isolat spesies *Candida* penyebab vulvaginitis.[4] Ekstrak *S. aromaticum* juga memperlihatkan efek antibiofilm dengan MBIC berbeda pada bakteri gram positif dan gram negatif.[21]

Kemampuan *Candida albicans* dalam membentuk biofilm merupakan tantangan untuk menemukan antibiofilm alami.[24] Berdasarkan ketersediaan daun *S. polyanthum* di masyarakat, menjadikan peluang memanfaatkan daunnya sebagai

sediaan antibiofilm yang dibuat secara sederhana. Penelitian secara *in-vitro* ini mengujikan ekstrak air daun *S. polyanthum* terhadap biofilm *Candida albicans* ATCC 10231, menggunakan parameter *MBIC* dan nilai *MGV*.

METODE PENELITIAN

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah *true experimental* menggunakan rancangan *posttest only with control group design*. Metode *in vitro* dilakukan dengan uji tube test untuk melihat 2 parameter, yaitu *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC)* dan *Mean Gray Value* (MGV). Kelompok perlakuan yang diujikan terdiri dari ekstrak air daun salam (*S. polyanthum* (Wight) Walp) konsentrasi 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 75% dan 100%, flukonazol 5% sebagai kontrol positif, TSB+*Glucose* 5%, dan aquadest steril sebagai kontrol negatif. Jumlah pengulangan untuk setiap kelompok perlakuan adalah 3 kali, yang diperoleh berdasarkan hasil perhitungan menurut rumus Federer. Penelitian bertempat di Loboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan ULM Banjarbaru pada Juli-Agustus 2024.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah inkubator aerob (Carbolite®), autoklaf (All American®), penangas air (waterbath), meja *laminary air flow* (Holten Maxisafe®), oven (Carbolite ®), neraca analitik, tabung reaksi (Pyrex Brand®), cawan petri (Pyrex Brand®), aluminium foil, gelas Erlenmeyer (IWAKI®), alat ekstraktor, rak tabung reaksi, spatula, pipet tetes, pinset, ose, korek api, kapas lidi steril, gelas beker, lampu spiritus, corong, kertas saring WH40, kain flannel, penjepit tabung, hot plate, mikropipet, stopwatch, batang pengaduk, gelas ukur, dan pisau steril

Bahan utama yang digunakan adalah daun salam (*Syzygium polyanthum* wight walp dan isolat fungi *Candida albicans* ATCC 10231. Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), media *Sabouraud Dextrose Broth (SDB)*, TSB (Trypticase Soy Broth) + *Glucose5%*, *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,3, larutan standar *Mc Farland* 0,5 (setara jumlah fungi 1.5 x 10^8 CFU/ml), *Deionized water,* Kristal violet, Medium uji *Congo red*, flukonazol 5%, dan *aquadest* steril.

Semua alat yang akan digunakan dicuci bersih dengan sabun dan membilasnya dibawah air mengalir, kemudian disterilkan dalam *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121ºC. Semua alat yang tidak dapat dimasukkan ke dalam *autoclave* dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian alat tersebut diulaskan dengan alkohol 70%.

Sebelum spesimen kultur fungi dibiakkan, terlebih dahulu dilakukan pembuatan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dan *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB). Media SDA dan SDB dibuat dengan menyiapkan gelas *Erlenmeyer* yang berisi sebanyak 6,5gram dan air suling steril lalu dipanaskan sampai larut, kemudian dibungkus dengan alumunium foil dan disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Tuangkan media SDA ke cawan petri dan dibiarkan sampai dingin dan mengeras. Sedangkan media SDB dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan dibiarkan sampai dingin.

Isolat murni Fungi *C. albicans* disiapkan dan diambil sebanyak 1 ose. Selanjutnya dimasukkan ke dalam media TSB+*Glucose* 5% untuk dibuat suspensi biakan bakteri uji. Candida diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam dan lalu di standarkan dengan larutan standar 0,5 Mc Farland (setara 1,5 X 10^8cfu/mL).

Media CRA (Congo Red Agar) dibuat dengan komposisi media sebagai berikut: media LB (30 g/L), sukrosa (36 g/L), bubuk agar (18 g/L) dan pewarna merah Congo (0,8 g/L).[25] Media LB, sukrosa dan bubuk agar dilarutkan dengan aquadest dan dididihkan dengan oven hingga terlarut sempurna. Pewarna merah Congo ditempatkan pada wadah tersendiri dan diautoklaf secara terpisah dengan larutan media agar. Pewarna merah Congo akan dicampurkan dengan media agar setelah selesai diautoklaf dan suhu larutan media agar ± 80ºC. Setelah tercampur dengan

pewarna merah Congo, media agar sebanyak 15 ml media agar dituang ke dalam cawan petri steril.[26]

Bahan herbal uji yaitu daun *Syzigium Polyanthum wight walp* disiapkan kemudian dipilih, masing masing sebanyak 1 kg dengan kriteria yaitu bagian Daun yang digunakan adalah pucuk daun serta daun yang berwarna hijau segar, permukaan mengkilat dan tidak berlubang. Bahan herbal uji dicuci dan dikeringkan pada suhu ruang. Bahan herbal dipotong hingga menjadi bentukan yang lebih kecil. Daun *S. Polyanthum* diblender dan diayak hingga menjadi serbuk simplisia sebanyak 100 gram. tambahkan 100 gram simplisia daun ke dalam erlenmeyer. Simplisia direndam dalam 100 ml aquadest pada suhu 90°C selama 15 menit menggunakan plat panas. Jika volume ekstrak kurang dari 100 ml, aquadest steril yang mendidih harus ditambahkan melalui ampasnya hingga volume mencapai 100 ml.[27] Hasil pemanasan disaring sehingga bahan dan air infus terpisah. Sebelum digunakan, ekstrak air yang sudah jadi dimasukkan ke dalam botol, ditutup rapat, dan disimpan di dalam lemari pendingin pada suhu 4°C. Setelah dibuat konsentrasi awal, dilakukan pengenceran selanjutnya dalam tabung reaksi masing-masing.

Candida albicans yang sudah teridentifikasi disimpan dalam media TSB *(Trypticase Soy Broth) + glucose* 5% dan diinkubasi pada suhu 37°C selama semalam. Mikroba kultur semalam selanjutnya dimasukkan ke tabung *TSB glucose* (10 ml) dan diinkubasikan 37°C selama 48-72 jam. Selanjutnya segera amati dan catat kekeruhan pada tabung. Nilai *MBIC* adalah konsentrasi terkecil yang menunjukkan pembentukan biofilm pada kategori +2 (agak jernih). Selanjutnya tabung dicuci dengan PBS(Phospate Buffer Saline) (pH 7,3) dan dikeringkan airnya. Tabung yang sudah dikeringkan diberi kristal violet (0,1%) dan kelebihan warna dibuang dan tabung dicuci dengan *deionized water* hingga akhirnya tabung dikeringkan dan dilihat formasi biofilmnya. Formasi *biofilm* ini ditandai dengan adanya cincin berwarna ungu kebiruan yang melekat pada dinding tabung.[9,28]

Deteksi MBIC media Congo red dilakukan dengan terpisah sebagai larutan berair pekat dan diautoklaf pada 121°C untuk 15 menit dan ditambahkan secara terpisah ketika agar-agar telah dingin 55°C. Pelat diinokulasi dan diinkubasi secara aerobic 37°C selama 2-3 hari. Hasil positif ditunjukkan dengan koloni hitam dengan kering konsistensi kristal. Produsen non biofilm biasanya tetap ada merah jambu. Percobaan dilakukan dalam rangkap tiga dan diulang sebanyak tiga kali. Jika terdapat koloni fungi yang paling sedikit pada media tersebut maka konsentrasi tersebut ditentukan sebagai MBIC.

Hasil pembentukan biofilm pada tabung kemudian difoto dengan menggunakan kamera digital. Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin dan dinding tabung pada masing-masing kelompok maka digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS6* untuk mengetahui nilai *Mean Gray Value* pada biofilm yang terbentuk pada tabung dari setiap perlakuan yang diujikan. Aplikasi *Adobe photoshop CS6* mengukur *mean gray value* melalui *measurement tool*. *Mean Gray Value* dinyatakan dalam skala 0 – 255. Setelah membuka aplikasi *Adobe Photoshop CS6*, pilih *File* dan masukkan hasil fotonya. Selanjutnya pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, blok area yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool*, lalu klik *Record Measurements* maka akan didapatkan nilai *Mean Gray Value (MGV)* yang merupakan rata-rata dari intensitas warna pengecatan tabung. Semakin rendah nilai *MGV* menunjukkan intensitas warna yang semakin tebal, sementara semakin tinggi nilai *MGV* menunjukkan intensitas warna yang semakin tipis.[29]

Pada data penelitian ini, penentuan nilai *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC*) dianalisis secara deskriptif, sedangkan pada data *Mean Gray Value* dianalisis statistik menggunakan

SPSS versi 26.0 *for Windows*. Jumlah sampel penelitian ini termasuk pada skala yang diuji kecil (<50), sehingga pada data *Mean Gray Value* dilakukan uji normalitas data menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas varians menggunakan uji *Levene's test*. Hasil analisis data terdistribusi normal dan homogen, dilakukan analisis parametrik menggunakan uji *One-way Anova dan* didapatkan perbedaan bermakna, maka untuk mengetahui perbandingan atau perbedaan efek yang bermakna dari suatu perlakuan dengan perlakuan-perlakuan lainnya, dilakukan uji lanjut menggunakan uji *Post-hoc Duncan*. Tingkat kepercayaan yang digunakan adalah 95% ($\alpha = 0,05$).[30]

HASIL DAN PEMBAHASAN

Penelitian ini telah dinyatakan laik etik oleh komite etik Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Lambung Mangkurat dengan nomor No.086/KEPK-FKIK ULM/EC/VI/202. Tanaman (*Syzgium polyanthun Wight Walp* yang digunakan pada penelitian ini telah dilakukan determinasi dengan nomor 056/UN8.1.2.3.2/PG/Lab.PMIPA/Bio/2024.

Metode uji menggunakan *Tube-test* dengan kelompok perlakuan yaitu EADSP (6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 75%, dan 100% (b/v), kontrol positif Flukonazol 5%, kontrol negatif aquadest steril, dan kontrol negatif media TSB+*glucose* 5%. Pengujian dilakukan dalam 3 kali ulangan. Isolat fungi menggunakan *Candida albicans ATCC 10231* merupakan bakteri pembentuk biofilm. Pertumbuhan bakteri ini pada media *Congo Red Agar* (CRA) pada masa inkubasi selama 48 jam dan suhu 37 ℃. memperlihatkan koloni berwarna hitam, sementara koloni bakteri yang terhambat pembentukan biofilmnya tampak berwarna pink (kemerahan). Parameter yang diamati adalah *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC*) dan *Mean Gray Value (MGV)*. Hasil *tube-test* secara kualitatif dari perlakuan EADSP terhadap pertumbuhan *C. albicans* dalam media TSB+*glucose* 5% memperlihatkan tingkat kejernihan yang berbeda. Suspensi yang berisi EADSP 12,5% memperlihatkan mulai jernih atau suspensi dengan tingkat kejernihan sedang (+2). Hasil *tube-test* perlakuan EADSP terhadap *C. albicans* tercantum pada Tabel 5.1. MBIC yang dihasilkan EADSP pada biofilm *C. albicans* terjadi pada konsentrasi 12,5%. Hasil uji konfirmasi pertumbuhan suspensi EADSP 12,5% pada media CRA, memperlihatkan koloni *C. albicans* berwarna pink (kemerahan).

Tabel 5.1 Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Air Daun *Syzigium polyanthrum* (*Wight) Walp.* (EADSP) terhadap Pembentukan *Biofilm Candida albicans*

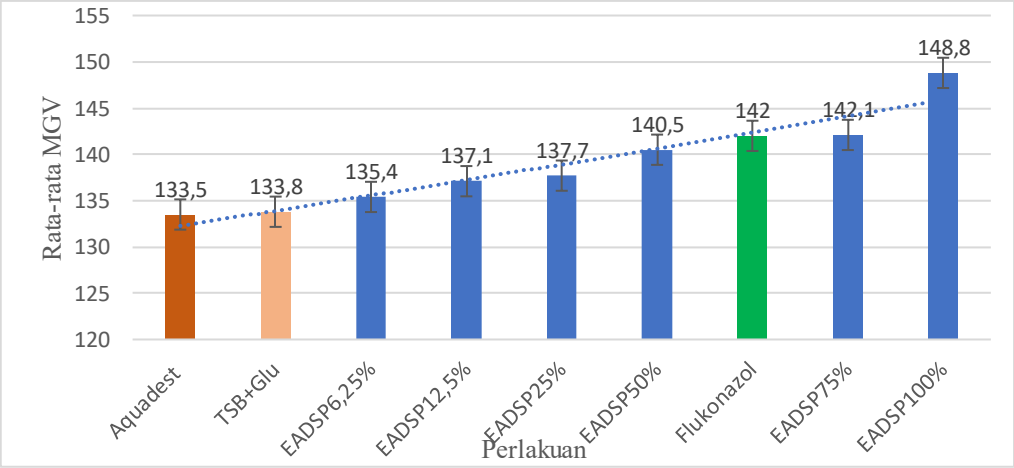
Perlakuan	Tingkat Kejernihan suspensi *tube test*		
	Ulangan-1	Ulangan-2	Ulangan-3
EADSP 6,25%	+++	+++	+++
EADSP 12,5%	++	++	++
EADSP 25%	+	+	+
EADSP 50%	+	+	+
EADSP 75%	+	+	+
EADSP 100%	+	+	+
Fluconazol	+	+	+
Aquadest steril	+++++	+++++	+++++
TSB + *Glucose*	+++++	+++++	+++++

Keterangan :
+1 : Jernih, tidak terbentuk biofilm
+2 : Agak jernih , apabila lemah sedikit terbentuk biofilm *Candida albicans*
+3: Sedikit keruh, apabila sedang terbentuk biofilm *Candida albicans*
+4 : Keruh, apabila kuat ada terbentuk biofilm *Candida albicans*
+5 : Sangat Keruh, apabila kuat banyak terbentuk biofilm *Candida albicans*

Berdasarkan Tabel 1, aktivitas EADSP pada konsentrasi di atas 12,5% tampak lebih jernih, artinya EASDP dapat berperan sebagai antibiofilm dalam menghambat pembentukan biofilm *C. albicans*. Efek antibiofilm juga ditunjukkan dari perlakuan flukonazol 5%, sedangkan media TSB+*Glucose* 5% dan aquades steril tidak menghasilkan efek antibiofilm. Berdasarkan pengamatan MBIC, maka membuktikan bahwa EADSP memiliki aktivitas antibiofilm yang menghambat bentukan biofilm *C.albicans*.

Hasil *tube test* dari semua perlakuan EADSP dan kontrol positif dalam media TSB+*glucose* 5% tampak memperlihat bentukan film berupa cincin pada suspensi dan film keunguan pada dinding tabung yang menunjukan keberadaan biofilm *C. albicans.* Hasil bilasan *tube-test* dengan *deionized water* dan pengeringan tabung dapat menilai besaran intensitas biofilm *C. albicans*. Intensitas biofilm diamati berdasarkan *Mean Gray Value* (MGV) yang diukur dengan program *Adobe Photoshop CS6*. Hasil pengamatan rata-rata MGV dari setiap kelompok perlakuan EADSP dan kontrol terhadap bentukan biofilm *C. albicans* tercantum pada Gambar 1.

Gambar 1 memperlihatkan nilai MGV dari kontrol negatif tidak berbeda jauh yaitu rerata MGV aquadest steril sebesar 133.529 dan *TSB+Glucose* 5% sebesar 133.832. Rerata MGV dari perlakuan flukonazol 5% sebesar 142.052. Rerata MGV dari perlakuan EADSP 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 75%, dan 100% secara berurutan yaitu sebesar 135.388, 137.120, 137.650, 140.479, 142.128 dan 148.754. Hasil Berdasarkan nilai MGV, menunjukkan bahwa kontrol negatif aquadest steril dan media TSB+ *Glucose* 5% tidak menghasilkan efek meghambat biofilm *C. albicans*. Flukonazol 5% dan EADSP menghasilkan efek penghambatan pada pembentukan biofilm *C. albicans.* Konsentrasi EADSP yang meningkat dapat meningktkan nilai MGV, artinya efek antibiofilm EADSP dalam menghambat bentukan biofilm *C. albicans* dipengaruhi oleh konsentrasi.



Gambar 1 Rata-rata *Mean Gray Value (MGV)* dari Ekstrak Air Daun *Syzigium polyanthum (EADSP)* dan kontrol pada Biofilm *C. albicans*

Data *MGV* pada penelitian ini sebanyak 27 perlakuan dan tergolong kecil atau ≤50 perlakuan. Hasil analisis statistik melalui *software* IBM SPSS versi 26.0, pada uji *Saphiro Wilk* di dapatkan nilai p>0.05 yaitu p=0,288, menunjukkan data penelitian ini terdistribusi normal. Hasil uji *Levene's test* didapatkan p>0.05 yaitu p=0,128 dan menunjukkan data terdistribusi homogen. Hasil uji *One Way Anova* untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan efek dari kelompok perlakuan yang diuji, didapatkan nilai p<0,05 (Lampiran 12). Hasil uji Anova menunjukkan adanya perbedaan efek yang

berbeda bermakna dari tiap perlakuan yang diujikan. Hasil uji *Post Hoc Duncan* didapatkan nilai p>0,05 (Lampiran 13). Artinya perbandingan efek yang dihasilkan dari tiap kelompok yang diujikan, ada yang berbeda bermakna. Hasil uji Duncan diringkas pada tabel 2.

Tabel 2. Perbandingan Rerata Nilai MGV Perlakuan Ekstrak Air Daun *Syzigium polyanthum.* (EADSP) dan Kontrol terhadap Biofilm *Candida albicans*

Perlakuan	Rata-rata *MGV*	Notifikasi UBD (α.005)
Aquadest steril	133.529 ± 0.348	G
TSB+ *Glucose* 5%	133.832 ± 0.088	G
EADSP 6,25 %	135.388 ± 0.248	F
EADSP 12,5 %	137.120 ± 0.201	E
EADSP 25 %	137.650 ± 0.415	D
EADSP 50 %	140.479 ± 0.369	C
Flukonazol 5 %	142.052 ± 0.260	B
EADSP 75 %	142.128 ± 0.188	B
EADSP 100 %	148.754 ± 0.050	A

Keterangan: Notasi huruf berbeda menunjukan ada perbedaan efek bermakna di antara kelompok perlakuan

Hasil analisis uji *Post Hoc Duncan* pada tingkat kepercayaan 95% (Tabel 5.2), menunjukan bahwa: 1) Perbandingan rerata nilai MGV dari kedua kontrol negatif adalah tidak berbeda bermakna, 2). Perbandingan rerata *MGV* antara EADSP 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100% dengan kontrol positif adalah berbeda bermakna, 3) Perbandingan rerata MGV EADSP 75% dengan kontrol positif adalah tidak berbeda bermakna, dan 4) Rerata MGV paling tinggi dihasilkan dengan perlakuan EADSP 100%. Berdasarkan intensitas biofilm, menunjukkan bahwa EADSP 75% menghasilkan efek antibiofilm yang optimum dan setara dengan kontrol positif (flukonazol). Hasil uji *Post Hoc Duncan* ini memperkuat hasil uji *One Way Annova*, yaitu terdapat perbedaan pengaruh dari perlakuan EADSP dalam menghambat pembentukan biofilm *C. albicans.* Berdasarkan hasil-hasil analisis statistik dapat membuktikan bahwa hipotesis (H1) pada penelitian ini diterima, yaitu ekstrak air daun *Syzygium polyanthum Wight Walp* memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm yang dibentuk *Candida albicans,* berdasarkan parameter MBIC dan MGV.

Fungi *Candida albicans* ATCC 10231 yang digunakan memiliki sel terstruktur yang kompleks dan berperan membentuk biofilm.[31] Menurut Liu dkk., bahan biofilm *C. albicans* tersusun dari struktur hifa yang bersilangan. Respons antibiofilm saat adhesi, yaitu ergosterol sebagai komponen membran sel khamir, menurun karena terhambatnya aliran karbon ke ergosterol. Akibatnya, pertumbuhan pseudohifa terhambat dan pembentukan biofilm pun terhambat.[32] Menurut Liu dkk., bahwa proses kegagalan adhesi selanjutnya menyebabkan terlepasnya biofilm dari substrat abiotik.[32]

Flukonazol sebagai kontrol positif pada penelitian ini diketahui memiliki efek antifungi. Menurut Paramita et al, flukonazol memberikan efek antifungi pada konsentrasi 512 µg/mL dan efek antibiofilm pada konsentrasi 2048 µg/mL.[33] Pada penelitian ini membuktikan bahwa flukonazol 5% dapat berefek sebagai antibiofilm pada *C. albicans*. Mekanisme kerja flukonazol sebagai antibiofilm, yaitu dengan cara menghambat aktivitas sitokrom P450 yang bergantung pada C-14 lanosterol demethylase; yaitu enzim kunci dalam biosintesis ergosterol pada membrane sel fungi. Efek flukonazol menyebabkan penurunan ergosterol, gangguan membran, peningkatan permeabilitas, kebocoran isi sitoplasma, dan kematian sel.[34]

Ekstrak daun *S. polyanthum* memiliki

efektivitas antifungi yang baik dalam menghambat *C. albicans*.[20] Pada penelitian ini dapat membuktikan ekstrak air daun *S. polyanthum* menghasilkan efek antibiofilm pada *C. albicans*. Hasil penelitian ini berbeda dengan penggunaan ekstrak etanol dari daun *Syzygium aromaticum* yang menghasilkan efek antibiofilm terhadap *C. albicans* pada MBIC 0,45%.[35] Hal ini dapat dijelaskan berdasarkan hasil uji perbandingan aktivitas ekstrak sebagai antibiofilm pada bakteri dan *C. albicans*. Perbedaan efek antibiofilm dapat dipengaruhi oleh jenis pelarut ekstrak, konsentrasi ekstrak dan mikroba uji.[36] Aktivitas antibiofilm juga dapat meningkat pada pemberian ekstrak dengan konsentrasi yang meningkat.[37]

Aktivitas antibiofilm yang dihasilkan ekstrak daun *S. polyanthum* dipengaruhi oleh peran senyawa bioakftif yang terkandung dalam ekstrak. Berdasarkan hasil skrining fitokimia ekstrak air daun *S. polyanthum*, didapatkan senyawa metabolit sekunder dari golongan flavonoid, alkaloid, tanin, fenol, saponin, steroid, dan terpenoid. (Lampiran 4) Hasil uji skrining fitokimia pada ekstrak penelitian ini relatif sama dengan yang dikemukakan penelitian sebelumnya oleh Suratiah dkk.[20]

Metabolit sekunder berperan sebagai antibiofilm, diantaranya yaitu saponin, alkaloid, flavanoid, tanin, minyak atsiri, dan polifenol.[38] Umumnya metabolit sekunder yang ditemukan dalam ekstrak tanaman bertindak sebagai anti-adhesi yang membentuk biofilm.[39] Antibiofilm metabolit sekunder dapat menghentikan adhesi yang menyebabkan pelekatan membran sel terganggu, akibatnya permeabilitas meningkat, isi sitoplasma bocor, dan kematian sel *C. albicans*.[14] Karena hambatan aliran karbon ke ergosterol, respons antibiofilm saat adhesi mengalami penurunan regulasi, sehingga menghambat pertumbuhan hifa dan menghentikan pembentukan biofilm. Setelah kegagalan adhesi, biofilm dilepaskan dari substrat abiotik.

Metabolit sekunder dari golongan fenolik dan flavonoid dapat menghentikan proses transisi ragi ke hifa dan menurunkan hidrofobisitas permukaan seluler sel biofilm, sehingga mereka menghentikan pembentukan biofilm.[32] Kandungan flavonoid juga berfungsi merusak membran plasma sel, menghambat formasi dinding sel, dan menganggu quorum sensing yang berfungsi sebagai alat komunikasi antar sel yang meregulasi patogenesis, morfogenesis, dan pembentukan filamen.[40,41] Alkaloid berfungsi sebagai antijamur dan antibiofilm melibatkan kerusakan pada dinding sel jamur dan interkalasi pada DNA jamur, yang mengakibatkan perubahan pada urutan basa.[12] Alkaloid juga menghambat biofilm dengan inhibisi dan inisiasi pembentukan biofilm. Saponin berfungsi mencegah agregasi, menghancurkan morfologi permukaan, dan menghambat transformasi miselium.[42] Tanin berfungsi menganggu mekanisme adhesi, menurunkan, dan merusak matriks biofilm.[43,44]

Pada penelitian ini terdapat keterbatasan yang dapat mempengaruhi hasil penelitian, diantaranya adalah jenis daun, dan pengamatan MGV. Daun yang digunakan juga berasal dari kebun masyarakat sehingga usia daun yang diambil beragam ada yang muda dan tua. Kandungan metabolit sekunder dapat mempengaruhi yang ada pada ekstrak.

Keterbatasan lain dari penelitian ini adalah: 1). pengukuran *Mean Gray Value* yang dipengaruhi oleh cahaya, posisi tabung, dan cincin yang terdokumentasi. 2). Penelitian hanya mengkaji aktivitas antibiofilm ekstrak air *S.* terhadap pertumbuhan biofilms *C. albicans* dengan metode *tube-test.* Metode lain secara kualitatif dan kuantitatif untuk mengetahui pembentukan biofilm yaitu dengan teknik *Scanning Electron Microscope (SEM)* atau *Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM),* serta *Microtiter Plate Assay* untuk mengamati kapasitas pembentukan biofilm. Penelitian ini hanya terbatas hanya mengamati *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC), maka perlu lagi digali untuk mengamati *Minimum Biofilm*

Eradication Concentration (MBEC).

Dengan adanya keterbatasan dari penelitian ini, maka perlu digali potensi daun *S. polyanthum* lebih lanjut dan perlu diketahui potensi bagian selain dari daun serta jenis Syzygium lainnya dapat dikembangkan sebagai bahan fitofarmaka, dengan melakukan tahapan percobaan lebih lanjut yaitu dengan metode *in vivo* serta di uji toksisitas. Hal ini untuk mengetahui dosis amannya, serta mengurangi kasus penyakit infeksi dan resistensi antifungi.[20] Penelitian lebih lanjut yaitu secara *in vivo* karena untuk mengetahui efektivitas esktrak terhadap pertumbuhan biofilm yang ada pada jaringan hidup, sehingga hasil uji *in vivo* dapat *dibandingkan* dengan *in vitro*.[45]

Penelitian ini juga hanya menggunakan satu jenis fungi uji, sehingga apabila digunakan sebagai sediaan antibiofilm alternatif, perlu mengetahui aktivitasnya terhadap fungi pembentuk biofilm seperti *Aspergillus niger*, *Candida tropicalis*, dan ragi lainnya. Melakukan kontrol sebagai antifungi atau antibiotik lainnya juga dapat digunakan untuk melakukan penelitian antibiofilm.[28,46]

PENUTUP

Kesimpulan dari hasil penelitian ini yaitu terdapat daya hambat dari ekstrak air daun *Syzygium polyanthum (wight) walp* (EADSP) terhadap pembentukan biofilm *Candida albicans,* berdasarkan *nilai Minimal biofilm inhibitory concentration* (MBIC) dan *Mean Gray Value* (MGV).

Penelitian selanjutnya dapat dilakukan penelitian deteksi antibiofilm dengan menggunakan metode uji selain *tube-test* seperti *Scanning Electron Microscope (SEM), Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM),* dan *Microtiter Plate Assay.* Penelitian lebih lanjut dapat mengamati *MBEC (Minimum Biofilm Eradication Concentration)* atau KBMB (Kadar Bunuh Minimum Biofilm), dan Mengembangkan sebagai sediaan fitofarmaka dengan menggunakan tahapan uji yang sesuai. Dapat dilakukan penelitian lanjutan dalam menghambat fungi biofilm selain *C. albicans* seperti *Aspergillus niger* dan *Candida tropicalis*, serta mengembangkan sebagai sediaan fitofarmaka dengan menggunakan tahapan uji yang sesuai.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kalista KF, Chen LK, Wahyuningsih R, Rumende CM. Karakteristik Klinis dan Prevalensi Pasien Kandidiasis Invasif di Rumah Sakit Cipto Mangunkusumo. Jurnal Penyakit Dalam Indonesia. 2017;4(2):56.
2. Puspitasari A, Kawilarang AP, Ervianti E, Rohiman A. Profil Pasien Baru Kandidiasis (Profile of New Patients of Candidiasis). Berkala Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin. 2019;31(1):24–34.
3. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. Medical Microbiology twenty-fourth edition. 2016. 832 p.
4. Yassin MT, Mostafa AAF, Al-Askar AA. In vitro anticandidal potency of *Syzygium aromaticum* (clove) extracts against vaginal candidiasis. BMC Complementary Medicine Therapies. 2020;20(1):1–9.
5. Farida S, Sahlan M, Rohmatin E, Adawiyah R. The beneficial effect of Indonesian propolis wax from *Tetragonula sp.* as a therapy in limited vaginal candidiasis patients. Saudi Journal of Biological Science [Internet]. 2020;27(1):142–6. Available from: https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2019.06.010
6. Pilmis B, Jullien V, Sobel J, Lecuit M, Lortholary O, Charlier C. Antifungal drugs during pregnancy: An updated review. Journal Antimicrobial Chemotherapy. 2015;70(1):14–22.
7. Teriyani NM, Inabuy FS, Ramona Y. Kajian Pustaka: Penanggulangan Kandidiasis Menggunakan Pendekatan Probiotik. Jurnal Veteriner. 2022;23(2):281–96.
8. Gulati M, Lohse MB, Ennis CL,

Gonzalez RE, Perry AM, Bapat P, et al. In Vitro Culturing and Screening of *Candida albicans* Biofilms. Current Protocols in Microbiology. 2018;50(1):1–45.
9. Goeres DM, Walker DK, Buckingham-Meyer K, Lorenz L, Summers J, Fritz B, et al. Development, standardization, and validation of a biofilm efficacy test: The single tube method. Journal of Microbiological Methods [Internet]. 2019;165:105694. Available from: https://doi.org/10.1016/j.mimet.2019.105694
10. Bisso BN, Makuété AL, Tsopmene JU, Dzoyem JP. Biofilm Formation and Phospholipase and Proteinase Production in *Cryptococcus neoformans* Clinical Isolates and Susceptibility towards Some Bioactive Natural Products. Scientific World Journal. 2023;2023:6080489.
11. Utami PSM, Noorhamdani, Rahayu M. The Effect of Basil Leaves Ethanol Extract (*Ocimum sanctum*) in Inhibiting The Establishment of *Staphylococcus aureus* biofilms with In Vitro Method. Journal of Agromedicine and Medical Science. 2020;6(3):168–73.
12. Fristiyanti RA. (*Syzygium aromaticum*) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* Secara In Vitro [Internet]. Tugas Akhi. Fristiyanti RA, editor. Malang: Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya; 2019. 143 p. Available from: http://repository.ub.ac.id/id/eprint/175361/7/Regina Ayu Fristiyanti.pd
13. Nadaf NH, Parulekar RS, Patil RS, Gade TK, Momin AA, Waghmare SR, et al. Biofilm inhibition mechanism from extract of *Hymenocallis littoralis* leaves. Journal of Ethnopharmacology [Internet]. 2018;222:121–32. Available from: https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.04.031
14. Mishra R, Panda AK, De Mandal S, Shakeel M, Bisht SS, Khan J. Natural Anti-biofilm Agents: Strategies to Control Biofilm-Forming Pathogens. Frontiers in Microbiology. 2020;11(October).
15. Harun N, Febrianti S E. Uji Efektivitas Antiseptik Obat Kumur Ekstrak Daun Sirih Hijau (*Piper betle L.*) Terhadap Bakteri Isolat Mulut. Jurnal Sains dan Kesehatan. 2022;4(3):268–74.
16. Rochmat A, Aditya G, Kusmayanti N, Kustiningsih I, Hariri A, Rezaldi F. Invitro Activity and Docking Approach In Silico Leaf Extract *Syzygium polyanthum (Wight) Walp*. as a *Salmonella typhi* Inhibitor. Trends in Sciences. 2022;19(16):1–8.
17. Aditya R, Santoso B, Widjiati W. Anti-inflammatory and antioxidant potential of *Syzygium polyanthum (Wight) Walp.* bioactive compounds in polycystic ovary syndrome: An in silico study. Journal of Pharmacy Pharmacognosy Research. 2022;10(4):725–36.
18. Sumi, Rusmiyanto E, Rahmawati. Aktivitas Antifungi Ekstrak Metanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum [Wight] Walp.*)Terhadap Pertumbuhan *Hortaea werneckii*(T1) Secara In Vitro. Protobiont. 2020;9(3):194–9.
19. Sulistrioningsih, Rusmiyanto E, Kurniatuhadi R. Aktivitas Antifungi Ekstrak Metanol Daun Salam (*Syzygium polyanthum [Wight] Walp.*) Terhadap Pertumbuhan *Malassezia sp.* (M1) Secara In Vitro. Journal Protobiont. 2020;9(2):180–6.
20. Suratiah, Surinati DAK, Ruspawan DM. The Effectiveness of Bay Leaf Extract (*Syzygium Polyanthum*) in Inhibiting the Growth of *Candida albicans*. Indian Journal of Public Health Research and Development. 2018;9(11):1708–13.
21. Fatima S, Saba S, Hussain A, Aslam L, Naveed A. Antibacterial and anti-biofilm profiling of *Syzygium Aromaticum* Plant Extracts against Multi-drug resistant Human Pathogens. Pakistan Journal of Biochemistry Biotechnology.

2023;4(2):71–82.
22. Nadziroh DU, Candra N, Setiawan E. Aktivitas Antifungi Air Perasan *Syzygium polyanthum* Terhadap *Candida albicans*. JC-T (Journal Cis-Trans) Jurnal Kimia dan Terapan. 2018;2(2):13–9.
23. Hamad A, Mahardika MGP, Yuliani I, Hartanti D. Chemical constituents and antimicrobial activities of essential oils of *Syzygium polyanthum* and *Syzygium aromaticum*. Rasayan Journal of Chemistry. 2017;10(2):564–9.
24. Gebreyohannes G, Nyerere A, Bii C, Sbhatu DB. Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. Heliyon [Internet]. 2019;5(8):e02192. Available from: https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02192
25. Ibrahim E, Hamzah R. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Candida glabrata* isolated from urine specimens of diabetic Iraqi women. Journal of Life Bio Sciences Research. 2021;2(02):59–63.
26. Kırmusaoğlu S. The Methods for Detection of Biofilm and Screening Antibiofilm Activity of Agents. Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods. 2019;1–17.
27. Mulyadi M, Wuryanti W, Sarjono PR. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram. Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi. 2017;20(3):130–5.
28. Janakiram B, Myneni RB, Kumar KA, Gousia S, Latha JNL. Methods of Determination of Biofilm Formation by *Candida albicans*. Research Journal of Microbiology [Internet]. 2016;12(1):90–6. Available from: http://dx.doi.org/10.3923/jm.2017.90.96
29. Anggara ED, Suhartanti D, Mursyidi A. Uji Aktivitas Antifungi Fraksi Etanol Infusa Daun Kepel (*Stelechocarpus burahot,* Hook F&Th.) Terhadap *Candida albicans*. Prosiding Seminar Nasional dan Internasional [Internet]. 2014;0:1–2. Available from: http://jurnal.unimus.ac.id/index.php/psn12012010/article/view/1179
30. Dahlan S. Hipotesis Korelatif [Internet]. Statistik Untuk Kedokteran Dan Kesehatan: Deskriptif, Bivariat, dan Multivariat Dilengkapi Aplikasi SPSS. 2017. p. 221–32. Available from: https://doku.pub/download/statistik-untuk-kedokteran-dan-kesehatan-msopiyudin-dahlan-30j8pxk4p5lw
31. Hamzah H, Rasdianah N, Nurwijayanto A, Nandini E. Aktivitas Ekstrak Etanol Daun Calincing terhadap Biofilm *Candida albicans*. Jurnal Farmasetis. 2021;10(1):21–8.
32. Liu RH, Shang ZC, Li TX, Yang MH, Kong LY. In Vitro Antibiofilm Activity of *Eucarobustol E.* against *Candida albicans*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2017;61(8):1–15.
33. Paramita NLPV, Trisnadewi IGAA, Pratiwi NPC, Dwijayanti NMP, Ardiyanti NLPP, Yustiantara PS, et al. Uji Kepekaan Antifungi Fluconazole dan Nistatin Terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 dengan Metode Difusi Disk. Jurnal Farmasi Udayana. 2016;5(1):8–11.
34. Sun L liu, Li H, Yan T hua, Fang T, Wu H, Cao Y bing, et al. Aneuploidy Mediates Rapid Adaptation to a Subinhibitory Amount of Fluconazole in *Candida albicans*. Microbiology Spectrum. 2023;11(2).
35. Nuzula F. Effectiveness of Ethanol Extract Clove Leaves (*Syzygium aromaticum*) In Inhibiting Biofilm of *Candida albicans* ATCC 14053. Biology, Medicine, and Natural Product Chemistry. 2024;13(2):407–13.
36. Budiarti LY, Khatimah H, Ridhoni MZ, Hafizhah G, Fachriyad M,

Arietama G. Anti-Biofilm Activity of Ethanol Extract of *Citrus hystrix Dc*. Against Opportunistic Pathogenic Microbes In-Vitro. Berkala Kedokteran. 2024;20(1):19.

37. Aini SN, Effendy R, Widjiastuti I. Konsentrasi Efektif Ekstrak Daun Salam (*Syzygium polyanthum Wight*) terhadap Hambatan Biofilm *Enterococcus faecalis* (Effective Concentration of Bay Leaf Extract (S*yzygium polyanthum Wight*) to Inhibit *Enterococcus faecalis* Biofilm). Conservative Dentistry Journal. 2016;6(2):87.
38. Nikmah NR, Arifin MZ, Ismunanti I. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Salam (*Syzygium poliyanthum*) terhadap Pertumbuhan Jamur *Candida albicans*. Jurnal Insan Cendekia. 2020;1–10.
39. Ayaz M, Ullah F, Sadiq A, Ullah F, Ovais M, Ahmed J, et al. Synergistic interactions of phytochemicals with antimicrobial agents: Potential strategy to counteract drug resistance. Chemico Biological Interactions [Internet]. 2019;308(May):294–303. Available from: https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.05.050
40. Pereira R, dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Morais SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. Journal of Applied Microbiology. 2021;131(1):11–22.
41. Aboody MS Al, Mickymaray S. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. Antibiotics. 2020;9(2).
42. Othman L, Sleiman A, Abdel-Massih RM. Antimicrobial activity of polyphenols and alkaloids in middle eastern plants. Frontiers in Microbiology. 2019;10(MAY).
43. Guo J, Sun W, Kim JP, Lu X, Li Q, Lin M, et al. Development of tannin-inspired antimicrobial bioadhesives. Acta Biomaterialia [Internet]. 2018;72:35–44. Available from: https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.008
44. Hamzah H, Hertiani T, Pratiwi SUT, Nuryastuti T. The Inhibition Activity of Tannin on the Formation of Mono-Species and Polymicrobial Biofilm *Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. Majalah Obat Tradisional. 2019;24(2):110–8.
45. Nordin ML, Othman AA, Kadir AA, Shaari R, Osman AY, Mohamed M. Antibacterial and cytotoxic activities of the *Syzygium polyanthum* leaf extract from Malaysia. Veterinary World. 2019;12(2):236–42.
46. Triveda L, Gomathi S. Detection of biofilm formation among the clinical isolates of Enterococci: An evaluation of three different screening methods. International Journal Current Microbiology Applied Sciences. 2016;5(3):643–50.