PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia
(*Pharmaceutical Journal of Indonesia*)
VOL 20 (01) 2023: 1-11

Received 01-08-2022 Accepted 01-04-2023 Available online 30-05-2023

Aktivitas Antibiofilm Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap *Staphylococcus aureus*

Antibiofilm Activity of Butterfly Pea Flower (*Clitoria ternatea* L.) Extract and Fractions against *Staphylococcus aureus*

Emma Jayanti Besan*, Ismi Rahmawati, Opstaria Saptarini

Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi Surakarta
Jln. Letjend Sutoyo, Mojosongo, Surakarta 57127, Indonesia
*Corresponding author email: emmafarmasi@gmail.com

ABSTRAK

Biofilm diketahui terlibat dalam berbagai macam infeksi mikroba dan merupakan salah satu faktor penyebab resistensi. Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan infeksi biofilm adalah *Staphylococcus aureus*. Penelitian ini memiliki tujuan untuk memahami aktivitas antibiofilm dari fraksi dan ekstrak bunga telang (*Clitoria ternatea* L.). Bunga telang dimaserasi menggunakan etanol 96% selanjutnya dilaksanakan fraksinasi menggunakan pelarut etil asetat, n-heksana, maupun air. Identifikasi kandungan senyawa kimia dilakukan menggunakan metode pereaksi warna untuk melihat secara kualitatif adanya flavonoid, alkaloid, terpenoid, saponin dan tanin. Metode pengujian aktivitas antibiofilm ditentukan dengan metode uji penghambatan pembentukan biofilm dan uji degradasi biofilm menggunakan ekstrak dan fraksi-fraksi bunga telang pada variasi konsentrasi 20, 40 dan 80 mg/ml. Fraksi air merupakan fraksi teraktif yang memiliki aktivitas yang paling besar dengan nilai IC_{50} dan EC_{50} masing-masing sebesar 5,46±1,36 dan 3,42±0,44 ppm.

Kata kunci: Antibiofilm, bunga telang, *Clitoria ternatea, Staphylococcus aureus*

ABSTRACT

Biofilms are known to be involved in various kinds of microbial infections and are one of the factors causing resistance. One of the bacteria that can cause biofilm infection is Staphylococcus aureus. Butterfly pea flower (Clitoria ternatea L.*) has been studied to have antibacterial and antibiofilm activity. This purpose of this research was to determine the antibiofilm activity of the extract, n-hexane, ethyl acetate and water of butterfly pea flower extract and the antibacterial activity of the active fraction of butterfly pea flower against Staphylococcus aureus ATCC 25923. Butterfly pea flower was macerated using 96% ethanol and then fractionated using n-hexane, ethyl acetate and water solvent. Phytochemical screening of the extract and fraction of butterfly pea was carried out using color reagents and TLC to see qualitatively the presence of flavonoids, alkaloids, terpenoids, saponins and tannins. The method of testing the antibiofilm activity was determined by the method of inhibition of biofilm formation and biofilm degradation test using extracts and fractions of Butterfly pea flower at 20, 40 and 80 mg/ml. Water fraction is the most active fraction which has the greatest activity with IC_{50} and EC_{50} values were 5.46±1.36 and 3.42±0.44 ppm, respectively.*

Keywords*: Antibiofilm, butterfly pea, Clitoria ternatea, Staphylococcus aureus*

Pendahuluan

Peningkatan resistensi terhadap antimikroba merupakan suatu tantangan karena tingginya angka mortalitas dan morbiditas dalam pengobatan infeksi. Pembentukan biofilm adalah faktor utama yang bertanggung jawab atas resistensi obat pada banyak patogen terutama bakteri Gram-positif. Biofilm bakteri dapat menimbulkan resiko kesehatan di lingkungan klinis, industri makanan dan sistem air minum (Bazargani & Rohloff, 2016).

Pembentukan biofilm dan pembungkus sel dalam matriks berbasis polimer dapat menurunkan kerentanan terhadap antimikroba dan pertahanan kekebalan sehingga masalah infeksi menjadi sulit diatasi. Penyebaran sel dari biofilm dapat menyebar ke tempat sekunder sehingga dapat memperburuk infeksi (Lister & Horswill, 2014).

Salah satu bakteri umum yang menyebabkan infeksi biofilm adalah bakteri *Staphylococcus aureus* (Patsilinakos *et al.*, 2019; Setiawati, 2015). *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan berbagai penyakit inflamasi, dan pembentukan biofilmnya berhubungan erat dengan infeksi kronis dan resistensi antibiotik (Ahn *et al.*, 2018). *Staphylococcus aureus* mampu menempel dan membentuk bioflm (Cuenca *et al.,* 2020) yang sebagian besar dapat

diatur oleh produksi *polysaccharide intercellular adhesin* (PIA). PIA memainkan peran kunci dalam interaksi sel atau *quorum sensing* (QS) (Gowrishankar *et al.,* 2012).

Pengembangan obat untuk melihat aktivitas antibiofilm dianggap penting sebagai suatu strategi untuk menghindari munculnya resistensi obat (Fair & Tor, 2014). Roy *et al.,* (2018) mengatakan bahwa pertumbuhan biofilm dapat dihambat dengan menggunakan antimikroba yang memiliki kemampuan untuk melewati matriks biofilm.

Bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) mengandung alkaloid, tanin, saponin, antosianin, dan glikosida yang memberikan potensi manfaat bagi kesehatan (Al-snafi, 2016). Komponen bioaktif yang terdapat dalam bunga telang adalah flavonol glikosida, flavon, flavonol, asam fenolat, senyawa-senyawa terpenoid dan senyawa-senyawa peptida siklik atau siklotida.

Penelitian terdahulu telah dilakukan uji antibakteri dan *antiquorum sensing* dari ekstrak bunga telang terhadap bakteri *Streptococcus mutans* dan menunjukkan bahwa ekstrak bunga telang memiliki potensi terapi dalam pencegahan infeksi, hal ini dibuktikan dengan KHM pada dosis 1 mg/ml terhadap *S. mutans* dan penghambatan terhadap *quorum sensing* pada dosis 0,25 mg/ml dapat mengurangi produksi violacein hingga 68% secara signifikan dan aktivitas penghambatannya lebih besar dari antibiotik tetrasiklin (2 mg/ml) (Yanti *et al.*, 2021). *Quorum sensing* merupakan bagian dari proses pembentukan biofilm, sehingga jika dihambat maka diharapkan pembentukan biofilm juga terganggu. *S. mutans* merupakan bakteri Gram-positif, yang merupakan golongan yang sama dengan bakteri *S. aureus* dan diharapkan memiliki aktivitas antibiofilm yang sama.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibiofilm ekstrak dan fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air bunga telang terhadap *Staphylococcus aureus* dan mengetahui fraksi paling aktif antara fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air bunga telang yang menunjukkan aktivitas antibiofilm terhadap *Staphylococcus aureus*.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah seperangkat alat gelas, *blender*, *mesh* nomor 60, *rotary evaporator*, *waterbath*, kertas saring, *autoclave* (Allamerican), pipet volume, siringe, ose platina, cawan petri, pinset, mikroskop, tabung reaksi, bunsen, *microplate* (Iwaki), *Microplate Reader* (Biorad iMark), inkubator (Memmert), mikropipet (Socorex), *yellow tip*, *blue tip* dan ose bulat.

Bahan tumbuhan yang dipakai pada penelitian merupakan bunga telang yang diambil dari Blora, Jateng dan telah dilakukan proses determinasi di Laboratorium Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta. bahan yang dipergunakan dalam ekstraksi merupakan etanol teknis 96% (Brataco). Pelarut yang dipakai guna fraksinasi merupakan etil asetat, n-heksana, air, aqua destilata steril. Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 didapatkan melalui Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi USB, *brain heart infusion broth* (Merck®), *nutrient broth* (Merck®), *nutrient agar* (Merck®), *Vogel Johnson agar*, kristal violet (Merck®). Kontrol positif yang digunakan adalah Tetrasiklin.

Jalannya Penelitian

1. Ekstraksi dan fraksinasi

Serbuk simplisia bunga telang sebanyak 1000 g dimasukkan dalam wadah yang berwarna gelap lalu ditambahkan etanol 96% dengan perbandingan 1:10, selanjutnya direndam selama 6 jam pertama sambil sesekali diaduk perlahan, kemudian didiamkan selama 18 jam. Maserat atau hasil maserasi dapat dipisahkan dengan cara disaring, dekantasi atau filtrasi. Ulangi proses penyarian sekurang-kurangnya satu kali dengan jenis pelarut yang sama dan jumlah volume pelarut sebanyak setengah kali jumlah volume pelarut pada penyarian pertama. Ekstrak maserat yang telah diperoleh kemudian dipekatkan dengan menggunakan *vacum rotary evaporator* (suhu dijaga pada 50^{o}C) sampai diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 2000).

Fraksinasi mengunakan metode ekstraksi cair-cair terhadap ekstrak etanol 96 % bunga telang menggunakan beberapa pelarut yaitu *n*-heksana, etil asetat, dan air. Ekstrak etanol 96% bunga telang diambil sebanyak 10 g kemudian dilarutkan sedikit dengan air panas, dipartisi dengan air 50 ml dan pelarut *n*-heksana 50 ml ke dalam corong pisah dan diulang sebanyak 3 kali. Fraksi *n*-heksana merupakan filtrat yang terletak diatas dan fraksi air merupakan filtrat yang terletak dibawah. Fraksi *n*-heksana dipisahkan dari fraksi air ditampung dan dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu penangas 50^{0}C.Fraksi air sisa dari fraksi *n*-heksana kemudian

difraksinasi kembali dengan pelarut etil asetat 50 ml menggunakan corong pisah. Proses ini diulang sebanyak 3 kali. Fraksi etil asetat merupakan filtrat yang terletak diatas dan fraksi air terletak dibawah. Fraksi etil asetat dipisahkan dari fraksi air kemudian dipekatkan dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu penangas 50^{0}C. Filtrat sisa fraksinasi dengan etil asetat adalah fraksi air, yang kemudian dikentalkan dengan penangas air sampai kental.

2. Identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi bunga telang

Identifikasi kandungan senyawa kimia pada ekstrak dan fraksi-fraksi bunga telang mengacu pada pedoman yang ada dalam Fransworth, 1966.

3. Persiapan sampel uji dan identifikasi bakteri

Kontrol uji yang digunakan berupa ekstrak, fraksi n-heksana, etil asetat dan air dengan variasi konsentrasi 20, 40 dan 80 mg/ml. Pembuatan larutan uji diawali dengan menimbang tiap-tiap sampel kemudian dilarutkan masing-masing dalam DMSO 10% hingga 10 ml dan diambil sesuai dengan volume yang dibutuhkan untuk pengujian. Pembuatan larutan kontrol positif dilakukan dengan menimbang tetrasiklin sebanyak 0,03 mg/ml dan dilarutkan dengan aquadest steril.

Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan identifikasi makroskopis, identifikasi mikroskopis dan identifikasi biokimia untuk memastikan kebenaran bakteri yang digunakan dalam penelitian ini.

4. Optimasi waktu pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*

Optimasi ini bertujuan untuk mendapatkan waktu inkubasi optimal dalam membentuk biofilm. Variasi waktu inkubasi yang digunakan adalah 1, 2 dan 3 hari. Setelah masa inkubasi, *microplate* dicuci menggunakan air mengalir sebanyak 3 kali, kemudian ditambahkan 200 µL larutan kristal violet 1% ke tiap *well* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. *Microplate* dicuci kembali dengan menggunakan air mengalir sebanyak 3 kali. Larutan etanol 96% sebanyak 200 µL dimasukkan ketiap *well* dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Selanjutnya dilakukan pembacaan pertumbuhan biofilm (Absorbansi OD 595) menggunakan alat *iMark- Biorad Microplate Reader*. Hasil nilai absorbansi terbesar dinyatakan sebagai pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* yang optimal.

5. Uji aktivitas penghambatan pembentukan biofilm.

Uji aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dilakukan menggunakan *microplate round bottom polystyrene 96 wells* dengan media BHI. Sebanyak 70 µL sampel dalam media ditambahkan dalam tiap-tiap sumuran kemudian 70 µL suspensi bakteri dalam media setara dengan 1,5x10^8 CFU/mL ditambahkan dalam sumuran berisi sampel, inkubasi dilakukan pada suhu ± 37^0 C selama 72 jam. Setelah inkubasi isi sumuran dibuang dan plate di cuci dengan air mengalir kemudian dikeringkan selama 15 menit dengan membalikkan *microplate* pada suhu ruang. Sebanyak 200 µL larutan kristal violet 1% ditambahkan pada tiap-tiap sumuran dengan lama pewarnaan15 menit. Isi sumuran di buang dan sumuran kembali dibilas air mengalir. *Microplate* dikeringkan dengan cara dibalik pada suhu ruangan selama satu jam. Kemudian diberi larutan etanol 96% sebanyak 200 µL tiap-tiap sumuran pada plate dan *optical density* dibaca pada λ 595 nm. Masing-masing uji dibuat replikasi 3 kali (Kırmusaoğlu, 2019). Kontrol positif menggunakan Tetrasiklin dengan konsentrasi 0,03 mg/ml.

Nilai IC$_{50}$ *Staphylococcus aureus* ditentukan dari persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel dengan persentase penghambatan biofilm.

$$\%\ \text{Penghambatan Biofilm} = \frac{\text{DO Kontrol negatif-DO Sampel}}{\text{DO Kontrol negatif}} \times 100\ \%$$

Dengan DO = densitas optik

6. Uji aktivitas degradasi biofilm

Uji aktivitas degradasi biofilm dilakukan menggunakan *microplate roundbottom polystyrene 96 wells* dengan media BHI. Biofilm dibentuk dengan menambahkan 70 µL media pada tiap-tiap sumuran dan kemudian ditambahkan 70 µL suspensi bakteri dalam BHI yang setara dengan 1,5x10^8 CFU/mL. *Microplate* kemudian diinkubasi pada suhu ± 37^{0}C selama 72 jam. Isi sumuran kemudian dibuang dan sumuran dicuci menggunakan air mengalir. Tiap-tiap sumuran diisikan sampel dalam media sebanyak 200 µL kemudian *microplate* kembali di inkubasi pada suhu ± 37^{0}C selama 24 jam. Untuk penentuan biofilm, cara yang sama pada uji aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dapat diaplikasikan (Kırmusaoğlu, 2019). Kontrol positif menggunakan Tetrasiklin dengan konsentrasi 0,03 mg/ml.

$$\% \text{ Penghancuran Biofilm} = \frac{\text{DO Kontrol negatif-DO Sampel}}{\text{DO Kontrol negatif}} \text{ X } 100\ \%$$

Dengan DO = densitas optik. Uji aktivitas penghancuran biofilm *Staphylococcus aureus* dinyatakan dengan parameter EC_{50} (*Efective Concentration*) yaitu konsentrasi senyawa uji yang menghancurkan biofilm sebesar 50%. Nilai EC_{50} ditentukan dari persamaan regresi linier antara konsentrasi sampel dengan persentase penghancuran biofilm.

Hasil dan Pembahasan

Hasil Ekstrak dan Fraksi Bunga Telang

Penelitian ini menggunakan serbuk bunga telang 800 g menghasilkan ekstrak bunga telang sebesar 165 g sehingga persen rendemen yang diperoleh adalah 20,63. Penelitian Pertiwi *et al.,* (2022) menghasilkan rendemen ekstrak bunga telang sebesar 9,45% menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 70%. Penelitian yang dilakukan oleh Wicaksono *et al*., 2021 menggunakan etanol 96% menghasilkan rendemen ekstrak bunga telang sebesar 27,45%. Suhesti *et* al (2021) menggunakan pelarut etanol 96% dan dimaserasi selama 24 jam mendapatkan rendemen ekstrak bunga telang sebesar 14%. Hasil tersebut berbeda dengan penelitian ini yang menggunakan pelarut etanol 96% menghasilkan rendemen ekstrak sebesar 20,63%.

Berdasarkan beberapa penelitian tersebut, konsentrasi pelarut dan lamanya waktu proses maserasi mempengaruhi jumlah ekstrak yang dihasilkan, semakin tinggi konsentrasi pelarut yang digunakan maka semakin banyak juga ekstrak yang dihasilkan. Besar atau kecilnya hasil rendemen yang diperoleh dipengaruhi oleh keefektifan dalam proses ekstraksi. Menurut Febrina *et al.* (2015) faktor-faktor yang mempengaruhi hasil ekstraksi adalah waktu, suhu, pengadukan, pelarut dan ukuran sampel juga mempengaruhi jumlah rendemen. Semakin kecil luas permukaan sampel akan semakin memperluas kontak dan meningkatkan interaksi dengan pelarut (Sineke *et al.,* 2016).

Penelitian ini menggunakan ekstrak bunga telang sebanyak 40 g, menghasilkan fraksi n-heksana sebesar 10 g, fraksi etil asetat sebesar 1 g dan fraksi air sebesar 28,5 g. Hasil persentase rendemen yang dihasilkan tidak genap 100% dikarenakan ada beberapa persen yang hilang selama proses penampungan hasil fraksi. Fraksi air yang didapatkan lebih banyak dibandingkan fraksi yang lain karena sebagian besar senyawa yang terkandung dalam bunga telang bersifat polar.

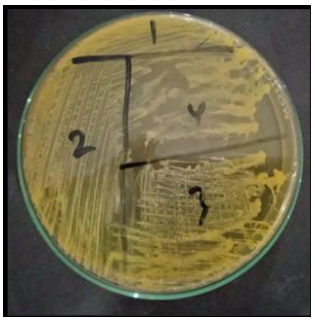
Rendemen dari hasil setiap pelarut berbeda karena kemampuan dari masing-masing pelarut dalam menyari senyawa yang terkandung dalam ekstrak bunga telang berbeda. Penelitian yang dilakukan oleh Wicaksono *et al*., 2021 menggunakan metode maserasi dengan pelarut etanol 96% dan dilanjutkan dengan proses fraksinasi menggunakan pelarut etil asetat menghasilkan rendemen ekstrak bunga telang sebesar 2,16%.

Hasil Identifikasi Senyawa Kimia Ekstrak dan Fraksi Bunga Telang

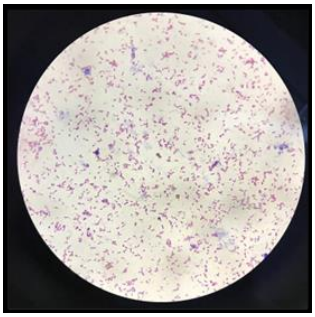
Hasil identifikasi kandungan senyawa kimia menunjukkan bahwa ekstrak bunga telang dan fraksi etil asetat mengandung senyawa flavonoid, saponin, tanin, alkaloid dan terpenoid. Fraksi n-heksana mengandung saponin, alkaloid dan terpenoid. Fraksi air mengandung flavonoid, saponin dan tannin.

Hasil Identifikasi Bakteri

Hasil identifikasi makroskopis pada Gambar 1. menunjukkan bahwa bakteri *Staphylococcus aureus* yang ditanam pada media MSA membentuk koloni berwarna kuning dan adanya perubahan warna kuning pada media, yang disebabkan karena fermentasi *mannitol*, yaitu mengakibatkan perubahan *phenol red* pada media agar dari warna merah berubah menjadi warna kuning (Dewi, 2013). Bakteri *Staphylococcus* mampu menguraikan gula yang terdapat di dalam larutan mannitol akibatnya kadar asam meningkat dan berubah warna media menjadi kuning (Hayati *et al.,* 2019).



Gambar 1. Hasil identifikasi makroskopis *Staphylococcus aureus* pada Media MSA.



Gambar 2. Hasil identifikasi mikroskopis *Staphylococcus aureus.*

Pengamatan *Staphylococcus aureus* secara mikroskopis pada Gambar 2 menggunakan pewarnaan Gram perbesaran kuat (100x) menunjukkan bakteri berwarna ungu, berbentuk bulat, dan bergerombol seperti buah anggur. Warna ungu yang terlihat merupakan hasil pewarnaan dari kristal violet dan larutan lugol. Pewarna kristal violet dan larutan lugol akan terjadi kristal kompleks yang terjerat pada lapisan peptidoglikan. Penambahan etanol untuk mendegradasi lapisan peptidoglikan dan mengakibatkan pori peptidoglikan mengkerut.

Tabel 1. Hasil identifikasi kandungan kimia ekstrak dan fraksi bunga telang

Metabolit sekunder	Ekstrak	Fraksi *n*-heksana	Fraksi etil asetat	Fraksi air
Flavonoid	+	-	+	+
Saponin	+	+	+	+
Tanin	+	-	+	+
Alkaloid	+	+	+	-
Terpenoid	+	+	+	-

Keterangan: (+) = Mengandung senyawa uji, (-) = Tidak mengandung senyawa uji

Gambar 3. Hasil uji katalase

Dengan demikian, kompleks kristal violet dan lugol tidak terlepas. Penambahan safranin tidak mempengaruhi warna bakteri karena dinding sel tetap berwarna ungu (Rachma *et al.,* 2009).

Hasil uji katalase bakteri *Staphylococcus aureus* pada Gambar 3 menunjukkan hasil positif, yang dibuktikan dengan adanya gelembung gas pada kaca objek. Bakteri Staphylococcus membentuk enzim katalase yang menghidrolisis hidrogen peroksida (H_2O_2) menjadi air (H_2O) dan gas oksigen.

Berdasarkan Gambar 4. uji koagulase menunjukkan reaksi positif, yaitu terjadi penggumpalan pada plasma darah kelinci yang terdenaturasi oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Berdasarkan hasil identifikasi tersebut dapat disimpulkan bahwa bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah benar-benar bakteri *Staphylococcus aureus*.

Fungsi uji katalase pada bakteri berbentuk kokus adalah untuk membedakan antara staphylococcus dan streptococcus, dimana kelompok staphylococcus bersifat katalase positif. Katalase merupakan enzim yang mengkatalisa penguraian hidrogen peroksida menjadi H_2O_2 dan O_2. Hidrogen peroksida bersifat toksik terhadap sel karena dapat menginaktifkan enzim dalam sel. Hidrogen peroksida terbentuk saat terjadi metabolisme aerob, sehingga mikroorganisme yang tumbuh dalam lingkungan aerob dapat menguraikan bahan tersebut (Lay, 1994).

Gambar 4. Hasil uji koagulase

Uji koagulase bertujuan untuk mengetahui kemampuan bakteri menghasilkan enzim koagulase. Produksi koagulase adalah kriteria yang paling umum digunakan untuk identifikasi sementara *Staphylococcus aureus* (Abrar, 2001). Reaksi koagulase positif sangat penting untuk membedakan *Staphylococcus aureus* dengan spesies staphylococcus yang lain (Brückler *et al.,* 1994). Koagulase merupakan protein ekstraseluler yang dihasilkan oleh *Staphylococcus aureus* yang dapat menggumpalkan plasma dengan bantuan faktor yang terdapat dalam serum (Brückler *et al.,* 1994).

Optimasi Waktu Pembentukan Biofilm

Optimasi waktu pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* dilakukan selama 72 jam atau 3 hari dengan menggunakan alat Elisa *Reader* dengan panjang gelombang 595 nm.

Tabel 2. Hasil optimasi waktu pembentukan biofilm

No	Absorbansi		
	24 Jam	**48 Jam**	**72 Jam**
1	0,330	0,445	0,545
2	0,363	0,420	0,540
3	0,341	0,493	0,573
4	0,403	0,403	0,550
5	0,323	0,423	0,539
6	0,354	0,408	0,567
7	0,307	0,452	0,540
8	0,293	0,418	0,542
9	0,398	0,428	0,544
10	0,347	0,424	0,512
11	0,376	0,416	0,506
12	0,376	0,432	0,521
	0,351±0,03	0,430±0,02	0,540±0,02

Berdasarkan hasil pada Tabel tersebut, terlihat bahwa *Staphylococcus aureus* dapat membentuk biofilm yang baik dan paling optimal pada waktu inkubasi selama 3 hari atau 72 jam. Menurut Pambayun *et al.* (2008) mengamati kurva pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* yang terdiri dari beberapa fase pertumbuhan, yaitu fase lag, fase log, fase stasioner dan fase kematian. Fase stasioner dicapai pada saat pertumbuhan mencapai 1220 jam, dan fase kematian dicapai setelah 20 jam.

Hasil optimasi waktu pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* mempunyai nilai rata-rata absorbansi pada inkubasi 24 jam yaitu 0,351; pada inkubasi 48 jam yaitu 0,430 dan pada masa inkubasi 72 jam yaitu 0,540. Hasil optimasi waktu pembentukan biofilm digunakan sebagai acuan masa inkubasi pada uji penghambatan dan degradasi biofilm bakteri *Staphylococcus aureus.*

Panjang gelombang maksimum yang digunakan dalam penelitian ini adalah 595 nm, mengacu pada jurnal Tobi *et al*., 2022 yang melakukan optimasi panjang gelombang menggunakan tiga variasi yaitu 490 nm, 595 nm dan 655 nm dan panjang gelombang yang paling optimal dalam membaca biofilm adalah 595 nm yang ditunjukkan dengan nilai absorbansi atau OD terbesar pada setiap pembacaan. Berdasarkan penelitian tersebut maka penelitian ini menggunakan panjang gelombang 595 nm dalam pembacaan biofilm bakteri uji pada *microplate reader.*

Pertumbuhan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* yang paling optimal pada hari ke-3 dengan rata-rata nilai absorbansi atau OD sebesar 0,540. Waktu tersebut menjadi waktu optimal pertumbuhan biofilm yang kemudian digunakan sebagai masa inkubasi dalam pengujian aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dan degradasi biofilm pada masing-masing bakteri tersebut.

Pembentukan biofilm dimulai ketika bakteri melekat pada kondisi permukaan melalui molekul organik. Tingkat perlekatan sel mikroba diatur oleh faktor seperti sifat permukaan, kondisi lapisan permukaan, karakteristik dan hidrodinamika dari media cair, berbagai karakteristik permukaan sel mikroba, regulasi gen dan kuorum sensing (Mahami & Gyamfi, 2011). Pembentukan biofilm dapat terjadi diberbagai jenis permukaan dan berbagai kondisi lingkungan dimana bakteri berada. Bakteri, molekul organik dan anorganik yang berada di permukaan kemudian membentuk kondisi film. Substrat organik dan anorganik ini bersama-sama dengan mikroorganisme berpindah ke permukaan melalui difusi atau mengikuti aliran cairan. Transfer nutrisi lebih tinggi dalam biofilm daripada fase cair (Riemann & Cliver, 2006). Kondisi film penting dalam proses perlekatan. Polimer organik dari media yang permukaannya terendam sehingga mempengaruhi tingkat dan kekuatan perlekatan mikroba, film terbentuk dalam beberapa menit pemaparan, dan terus berkembang selama beberapa jam. Karakteristik media cair, seperti pH, tingkat nutrisi, kekuatan ion, dan temperatur, juga mungkin memainkan peran dalam tingkat perlekatan mikroba pada permukaan.

Aktivitas Penghambatan Pembentukan Biofilm

Uji penghambatan pembentukan biofilm bertujuan untuk mendapatkan aktivitas dari bunga telang dalam menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Pembentukan biofilm pada penelitian ini diukur secara kuantitatif dengan metode kristal violet *assay.*

Data yang terlihat pada Tabel tersebut merupakan data yang dihasilkan dari perhitungan persentase penghambatan biofilm berdasarkan hasil absorbansi atau *optical density* (OD). Nilai OD yang didapatkan mengGambarkan ketebalan dari biofilm yang terbentuk, semakin tinggi nilai OD menggambarkan bahwa biofilm yang terbentuk semakin tebal. Nilai rata-rata persen penghambatan pembentukan biofilm yang terlihat pada Tabel semakin meningkat seiring dengan peningkatan dosis antibiofilm yang digunakan, hal tersebut berbeda dengan nilai absorbansi/OD dimana semakin meningkat dosis antibiofilm maka semakin menurun nilai absorbansinya.

Tabel 3. Hasil persentase rata-rata penghambatan pembentukan biofilm

Konsentrasi (mg/ml)	Ekstrak (%)	Fraksi n-heksan (%)	Fraksi etil asetat (%)	Fraksi air (%)
20	60,27±0,92	51,62±1,37	56,85±1,61	63,95±0,61
40	67,25±0,54	56,64±0,89	59,71±0,47	69,86±2,75
80	71,61±0,40	60,90±1,47	68,80±1,83	78,27±0,58
K +	79,83±1,15			

Ket: K + = Kontrol positif

Penelitian ini menggunakan variasi tiga konsentrasi yaitu 20, 40 dan 80 mg/ml, dimana konsentrasi tertinggi dalam menghambat pembentukan biofilm adalah 80 mg/ml. Menurut Satria *et al* (2022), dalam penelitiannya yang menguji aktivitas antibakteri dan antibiofilm ekstrak bunga telang terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 dan *Streptococcus mutans* ATCC 25175 menyimpulkan bahwa konsentrasi ekstrak bunga telang yang terbaik dalam menghambat pembentukan biofilm adalah sebesar 100 mg/ml. Penelitian tentang antibiofilm menggunakan ekstrak jus bunga telang terhadap bakteri *Porphyromonas gingivalis* telah dilakukan oleh Widyarman *et al* (2018) dan menunjukkan konsentrasi yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *Porphyromonas gingivalis* adalah konsentrasi 50% dengan nilai absorbansi biofilm sebesar 0,47±0,15. Hasil yang berbeda dari beberapa penelitian dapat disebabkan oleh variasi dosis berbeda dan waktu pembentukan biofilm yang berbeda. Hasil perhitungan persentase penghambatan pembentukan biofilm menunjukkan bahwa peningkatan konsentrasi ekstrak dan fraksi bunga telang mampu meningkatkan penghambatan pembentukan biofilm.

Proses pembentukan biofilm pada permukaan padat terjadi berdasarkan dua tahap. Tahap pertama yaitu pertumbuhan sel dan pembentukan *Extracellular Polymeric Substances* (EPS), sehingga sel biofilm terakumulasi. Tahap kedua adalah bisa terjadi pelepasan atau penempelan kembali. Pencegahan pertumbuhan biofilm dapat dilakukan dengan menghambat atau bahkan mematikan sel agar tidak bertambah, dan mencegah pembentukan EPS, ketika tahap perkembangan biofilm tidak dihambat, maka biofilm yang terbentuk semakin banyak dan membentuk struktur tiga dimensi yang mengandung sel-sel terselubung dalam beberapa kelompok yang saling terhubung satu sama lainnya (Renner & Weibel, 2011).

Kontrol positif yang digunakan pada penelitian ini adalah antibiotik tetrasiklin. Tetrasiklin merupakan golongan antibiotik yang dapat menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* (Dewi *et al.,* 2020). Tetrasiklin memiliki aktivitas penghambatan terhadap *quorum sensing* saat proses pembentukan biofilm (Deryabin & Inchagova, 2018). Prinsip *quorum sensing* adalah ketika sel tunggal bakteri melepaskan autoinducer ke lingkungan, maka konsentrasi mereka terlalu rendah untuk dideteksi karena terencerkan di lingkungannya. Konsentrasi autoinducer akan meningkat ketika populasi bakteri cukup banyak dan dapat mencapai konsentrasi ambang saat sel-sel bakteri dapat mendeteksinya kembali dan selanjutnya mengaktifkan ekspresi gen-gen target secara bersamaan (De Kievit & Iglewski, 2000). Proses-proses selular yang regulasinya dikontrol melalui mekanisme *quorum sensing* pada bakteri Gram positif antara lain adalah: kompetensi pada *Bacillus subtilis* dan *Streptococcus pnemoniae*, sporulasi

pada *Bacillus*, konjugasi pada *E. faecalis*, serta virulensi pada *Staphylococcus aureus* (de Kievit & Iglewski, 2000; Miller & Bassler, 2001).

Hasil persentase penghambatan pembentukan biofilm menunjukkan bahwa tetrasiklin memiliki rata-rata penghambatan pembentukan biofilm sebesar 789,83%, yang mendekati dengan rata-rata penghambatan pembentukan biofilm pada fraksi air dosis terbesar 80 mg/ml yaitu sebesar 78,27%. Berdasarkan hasil persentase tersebut maka tetrasiklin memiliki efektivitas yang hampir sama dengan fraksi air bunga telang. Dosis tetrasiklin yang digunakan sebagai kontrol positif adalah 0,03 mg/ml, artinya tetrasiklin berpotensi dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Hal tersebut juga sesuai dengan penelitian Dewi *et al* (2020) yang mengatakan bahwa tetrasiklin dapat menghambat pertumbuhan biofilm dan tetrasiklin memiliki daya hambat tertinggi dibandingkan dengan antibiotik fosfomisin dan oksitetrasiklin. Hasil data persen penghambatan pembentukan biofilm yang didapatkan kemudian dilanjutkan menghitung nilai IC_{50} dengan menggunakan persamaan garis linier antara persen penghambatan pembentukan biofilm dengan konsentrasi fraksi.

Tabel 4. Nilai IC_{50} penghambatan biofilm

Sampel	IC_{50} penghambatan pembentukan biofilm (mg/ml)
Ekstrak	5,73 ± 1,13
Fraksi n-heksana	15,06 ± 4,90
Fraksi etil asetat	10,28 ± 1,17
Fraksi air	5,45 ± 1,36

Hasil persen (%) penghambatan biofilm *Staphylococcus aureus* memberikan nilai IC_{50} terkecil sebesar 5,45 mg/ml pada fraksi air. IC_{50} merupakan konsentrasi dimana fraksi air bunga telang dapat menghambat 50% pembentukan biofilm. Nilai IC_{50} sering digunakan untuk uji penghambatan pembentukan biofilm, semakin kecil nilai IC_{50} maka semakin efektif pula sampel tersebut dalam menghambat pembentukan biofilm. Berdasarkan data tersebut, fraksi air bunga telang merupakan fraksi teraktif dan yang paling besar memiliki potensi dalam penghambatan biofilm dibandingkan dengan fraksi *n*-heksana dan fraksi etil asetat.

Fraksi air bunga telang mengandung beberapa kandungan senyawa kimia, diantaranya adalah senyawa tanin dan flavonoid yang berpotensi dapat menghambat *intercellular adhesion genes* icaA dan icaD yang menjadi salah satu faktor pembentukan biofilm (Lee *et al.,* 2013). Penghambatan ekspresi gen ica ini menyebabkan tanin dan flavonoid juga dapat menghambat adhesi sel bakteri, baik perlekatan bakteri dengan permukaan substrat maupun perlekatan antar bakteri, dimana adhesi merupakan faktor utama dalam pembentukan biofilm (Nuryastuti, 2010). Kemampuan penghambatan biofilm dari suatu senyawa terkait dengan kemampuan penetrasi senyawa tersebut ke dalam biofilm yang terbentuk, yakni mampu berpenetrasi pada lapisan *Extracelluler Polymeric Substance* (EPS) atau lapisan lendir yang menyelubungi bakteri.

Aktivitas Degradasi Biofilm

Uji degradasi biofilm dilakukan dengan cara memasukkan suspensi bakteri dan media ke dalam *microplate* hingga terbentuk biofilm, kemudian larutan dalam plate dibuang dan dicuci selanjutnya diberikan perlakuan ekstrak dan fraksi-fraksi bunga telang dengan berbagai konsentrasi.

Berdasarkan Tabel 5, dapat terlihat bahwa persentase degradasi biofilm tertinggi terdapat pada fraksi air dengan dosis 80 mg/ml yaitu sebesar 77,23%, kemudian diikuti oleh ekstrak dengan nilai 74,75%, fraksi etil asetat dengan nilai 64,19% dan fraksi *n*-heksana dengan nilai 60,50%. Kontrol positif pada penelitian ini adalah antibiotik tetrasiklin dengan dosis 0,03 mg/ml. Kontrol positif pada degradasi biofilm menunjukkan persen rata-rata 78,31%. Hasil data persentase degradasi biofilm digunakan untuk menentukan nilai EC_{50} degradasi biofilm dari ekstrak, fraksi air, fraksi etil asetat dan fraksi *n*-heksana bunga telang. Perhitungan persen degradasi biofilm dengan menggunakan persamaan garis linier antara persen konsentrasi ekstrak atau fraksi dengan nilai persentase degradasi biofilm.

Berdasarkan hasil uji degradasi biofilm menggunakan ekstrak dan fraksi-fraksi bunga telang terlihat memiliki aktivitas dalam menghancurkan atau degradasi biofilm pada *Staphylococcus aureus*, namun fraksi air lebih besar dibanding fraksi etil asetat maupun fraksi *n*-heksana. Fraksi air memiliki potensi degradasi biofilm sebesar 3,41 mg/ml, fraksi etil asetat 7,85 mg/ml dan fraksi *n*-heksana 13,43 mg/ml. Hasil menunjukan semakin tinggi konsentrasi fraksi-fraksi bunga telang maka semakin tinggi persen degradasi biofilm. Nilai EC_{50} berbanding terbalik dengan persen degradasi biofilm, semakin besar harga EC_{50} aktivitas degradasi biofilm semakin

kecil, artinya konsentrasi yang dibutuhkan untuk menghasilkan aktivitas degradasi biofilm sebesar 50% semakin besar.

Beberapa mekanisme dalam menghancurkan biofilm diantaranya adalah degradasi matriks biofilm, kematian sel dan kebocoran sel. Kandungan senyawa kimia dalam fraksi air bunga telang adalah saponin, tanin dan flavonoid.

Tabel 5. Hasil rata-rata persentase degradasi biofilm

Konsentrasi (mg/ml)	Ekstrak (%)	Fraksi *n*-heksan (%)	Fraksi etil asetat (%)	Fraksi air (%)
20	63,23 ± 1,01	51,84 ± 0,55	55,28 ± 0,78	65,08 ± 0,56
40	71,25 ± 0,24	57,89 ± 0,59	61,83 ± 0,41	72,33 ± 0,62
80	74,75 ± 0,65	60,50 ± 0,82	64,19 ± 1,60	77,23 ± 1,40
K+	78,31 ± 0,65			

Tabel 6. Nilai EC_{50} degradasi biofilm

Sampel	EC_{50} degradasi biofilm (mg/ml)
Ekstrak	3,76 ± 1,27
Fraksi n-heksana	13,43 ± 2,35
Fraksi etil asetat	7,85 ± 0,73
Fraksi air	3,41 ± 0,44

Senyawa-senyawa tersebut menghambat dan menghancurkan biofilm karena mempunyai mekanisme yang dapat menyebabkan terjadinya degradasi matriks biofilm, kematian sel dan kebocoran sel. Kemampuan degradasi biofilm dari suatu senyawa terkait dengan kemampuan penetrasi senyawa tersebut ke dalam biofilm yang terbentuk, yakni mampu berpenetrasi pada lapisan *Extracelluler Polymeric Substance* (EPS) atau lapisan lendir yang menyelubungi bakteri. Selain itu, kemampuan senyawa dalam mendegradasi biofim adalah menghilangkan EPS pada biofilm yang sudah terbentuk (Ardani *et al.,* 2010).

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 (Andrade *et al.,* 2019).

Senyawa tanin memiliki efek kematian sel dan kebocoran sel pada biofilm, selain itu tanin juga mempunyai efek bakteriosidik. Senyawa flavonoid mempunyai efek menghambat molekul adhesin yang sangat dibutuhkan dalam pembentukan biofilm (Karatan & Watnick, 2009). Tanin dan flavonoid bekerja dengan mengikat salah satu protein adhesin bakteri yang dipakai sebagai reseptor permukaan bakteri, sehingga terjadi penurunan daya perlekatan bakteri serta penghambatan sintesis protein untuk pembentukan dinding sel (Agnol *et al.,* 2003; Jagani *et al.,* 2008).

Kesimpulan

Ekstrak, Fraksi air, etil asetat dan n-heksana bunga telang dapat menghambat pembentukan dan degradasi biofilm bakteri *Staphylococcus aureus.* Fraksi teraktif bunga telang yang memiliki aktivitas antibiofilm terbesar adalah fraksi air dengan nilai IC_{50} penghambatan biofilm sebesar 3,41±0,44 ppm dan nilai EC_{50} degradasi biofilm sebesar 5,46±1,36 ppm.

Daftar Pustaka

Abrar M. 2001. *Isolasi, Karakterisasi dan Aktivitas Biologi Hemaglutinin Staphylococcus aureus dalam Proses Adhesi pada Permukaan Sel Ephitel Ambing Sapi Perah*. Disertasi. Program Pasca Sarjana. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Ahn, K. B., Baik, J. E., Yun, C. H., & Han, S. H. 2018. Lipoteichoic acid inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation. *Frontier in Microbiology*. 9: 327. doi: 10.3389/fmicb.2018.00327.

Al-Snafi, A. E. 2016. Pharmacological importance of *Clitoria ternatea* – A review. *IOSR Journal of Pharmacy*. 6(3):68–83.

Andrade, J. C., da Silva, A. R. P., Freitas, M. A., Ramos, B. A., Freitas T. S., 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.

Ardani, M., Pratiwi, S. U. T., & Hertiani, T. 2010, Efek campuran minyak atsiri daun cengkeh dan kulit batang kayu manis sebagai antiplak gigi. *Majalah Farmasi Indonesia.* (21)3: 191-201.

Bazargani, M. M., Rohloff, J. 2016. Antibiofilm activity of essential oils and plant extracts against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* biofilms. *Food Control* 61:156-164.

Brückler J., Schwarz, S., & Untermann, F. 1994. *Staphylokokken-Infektionen und Enterotoxine*, Band. II/1, In Blobel, H. und Schlier (Eds.), Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, 2. Auflage. Gustav Fischer Verl ag Jena, Stuttgart.

Dall'Agnol, R., Ferraz, A., Bernardi, A. P., Albring, D., Nör, C., Sarmento, L., Lamb, L., Hass, M., von Poser, G., & Schapoval, E. E. S. 2003. Antimicrobial activity of some Hypericum species. *Phytomedicine*. 10(6-7): 511-516.

de Kievit, T. R., Iglewski, B.H., 2000. Bacterial quorum sensing in pathogenic relationships. *Infection and Immunity*. 69: 4839-4849. doi: 10.1128/IAI.68.9.4839–4849.2000.

Departemen Kesehatan RI. 2000. *Parameter Standar Umum Ekstrak Tumbuhan Obat*. Cetakan pertama: 17-19, Dikjen POM, Direktorat Pengawasan Obat Tradisional.

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, A. K. 2013. Isolasi, identifikasi dan uji sensitivitas *Staphylococcus aureus* terhadap amoxicillin dari sampel susu kambing peranakan ettawa (PE) penderita mastitis di wilayah Girimulyo, Kulonprogo, Yogyakarta. *Jurnal Sain Veteriner* 31(2):138–150.

Dewi, M., Darmawi, Nurliana, Karmil, T. F., Helmi, T. Z., et al. 2020. Aktivitas antibiotik terhadap biofilm Staphylococcus aureus isolat preputium sapi Aceh. *Jurnal Sain Veteriner*. 38(1): 1-6.

Fair, R. J., & Tor Y. 2014. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspectives in Medicinal Chemistry*. *6*: 25–64. doi.org/10.4137/PMC.S14459

Febrina, L., Rusli, L., & Muflihah, F. 2015. Optimalisasi ekstraksi dan uji metabolit sekunder tumbuhan libo (*Ficus variegate* Blume). *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*. 3: 74-81.

Fransworth, N. R. 1966. Biological and phytochemical screening of plants. *Journal of Pharmaceutical Science*. 55(3): 225-76. doi: 10.1002/jps.2600550302.

Gowrishankar, S., Mosioma, N. D., & Pandian, S. K. 2012. Coral-associated bacteria as a promising antibiofilm agent against methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* biofilms. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. 2012: 862374. doi:10.1155/2012/862374.

Hayati, L. N., Tyasningsih, W., Praja, R. N., Chusniati, S., Yunita, M. N., & Wibawati, P. A. 2019. Isolasi dan identifikasi *Staphylococcus aureus* pada susu kambing peranakan etawah penderita mastitis subklinis di Kelurahan Kalipuro, Banyuwangi. *Jurnal Medik Veteriner*. 2(2): 76-82.

Karatan, E., & Watnick, P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 73: 310-347.

Kırmusaoğlu S. 2019. The methods for detection of biofilm and screening antibiofilm activity of agents. In Kırmusaoğlu, S. (editor). *Antimicrobials, Antibiotic Resistance, Antibiofilm Strategies and Activity Methods*. pp 1-17.

Lay, B. W. 1994. *Analisis Mikroba di Laboratorium*. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta.

Lee, L. H., Park, J. H., Cho, H. S., Joo, S. W., Cho, M. H., & Lee, J. 2013. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against Staphylococcus aureus. *Biofouling*. 29(5): 491-499.

Lister, J. L., & Horswill AR. 2014. Staphylococcus aureus biofilms: Recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 4: 178. doi: 10.3389/fcimb.2014.00178.

Mahami, T., & Gyamfi, A. 2011. Biofilm-associated infections: Public health implications. *International Research Journal of Microbiology* (IRJM). 2(10): 375-381.

Matilla-Cuenca, L., Gil, C., Cuesta, S., Rapún-Araiz, B., Žiemytė, M., Mira, A., Lasa, I., & Valle, J. 2020. Antibioflm activity of favonoids on staphylococcal bioflms through targeting BAP amyloids. *Scientifc Reports* 10: 18968. doi.org/10.1038/s41598-020-75929-2.

Miller, M.B., & Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*. 55: 165-199. doi: 10.1146/ annurev. micro.55.1.165.

Nuryastuti, T. 2010. *Environmental Signals Affecting ica-expression in Staphylococcus epidermidis Biofilm* [Thesis]. University Medical Center Groningen, University of Groningen, Netherlands.

Pambayun, R., Gardjito, M., Sudarmadji, S., & Rahayu, K.K. 2008. Sensitivitas bakteri Gram positif terhadap katekin yang diekstraksi dari gambir (*Uncaria gambir*). *Agritech*. 28(4).

Patsilinakos, A., Artini, M., Papa, R., Sabatino, M., & Božović, M. 2019. Machine learning analyses on data including essential oil chemical composition and in vitro experimental antibiofilm activities against *Staphylococcus species*. *Molecules*. 24(5): 890. doi. 10.3390/molecules24050890.

Pertiwi, F. D., Rezaldi, F., & Puspitasari, R. 2022. Uji aktivitas dan formulasi sediaan *liquid body wash* dari ekstrak etanol bunga telang (*Clitoria ternatea* L) sebagai antibakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Klinik Jurnal Ilmiah Kedokteran dan Kesehatan* 1(1): 53-66.

Rachma, A., Sarjono, P. R., & Aminin, A. L. N. 2009. Isolasi bakteri termofilik sumber air panas Gedongsongo dengan media pengaya minimal YT (*Yeast tripton*) serta identifikasi genotipik dan fenotipik. Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi 12: 66–71.

Renner, L.D., & Weibel, D.B. 2011. Physicochemical regulation of biofilm formation. *MRS Bulletin*. 36(5): 347–355. doi: 10.1557/mrs.2011.65.

Riemann, H.P., & Cliver, D. O. 2006. *Foodborne Infections and Intoxications*, Third edition. Elsevier. USA.

Roy, R., Tiwari, M., Donelli, G., & Tiwari, V. 2018. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. *Virulence*. 9(1): 522-554.

Satria, D., Sofyanti, E., Wulandari, P., Fajarini, Pakpahan, S. D., & Limbong, S. A. 2022. Antibacterial activity of Medan butterfly pea (*Clitoria ternatea* L.) corolla extract against *Streptococcus mutans* ATCC®25175™ and *Staphylococcus aureus* ATCC®6538™. *Pharmacia*. 69(1): 195–202. doi: 10.3897/pharmacia.69.e77076.

Setiawati A. 2015. Peningkatan resistensi kultur bakteri *Staphylococcus aureus* terhadap amoxicillin menggunakan metode adaptif gradual. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 7(3): 190–194.

Sineke, F.U., Suryanto, E., & Sudewi, S. 2016. Penentuan kandungan fenolik dan sun protecting factor (SPF) dari ekstrak etanol dari beberapa tongkol jagung (*Zea mays* L.). *Pharmacon*. 5(1):.

Suhesti, T. S., Warsinah, Pratiwi, H., Pudjastuti, B., & Hendra, T. 2021. Formulasi sediaan effervescen ektrak etanol kembang telang (*Clitoria ternatea* L) sebagai antioksidan. Prosiding Seminar Nasional '*Pengembangan Sumber Daya Perdesaan dan Kearifan Lokal Berkelanjutan XI*'

Tobi, C. H. B., Saptarini, o., & Rahmawati, I. 2022. Aktivitas antibiofilm ekstrak dan fraksi-fraksi biji pinang (*Areca*

catechu L.) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 1: 56-70.

Wicaksono, B., Pratimasari, D., & Lindawati, N. Y. 2021. Uji aktivitas antioksidan ekstrak etanol, fraksi polar, semi polar dan nonpolar bunga telang (*Clitoria ternatea* L.) dengan metode ABTS. *Jurnal Kesehatan Kartika* 6(3).

Widyarman, A.S., & Sumadi, S., Agustin, T. P. 2018. Antibiofilm effect of *Clitoria ternatea* flower juice on *Porphyromonas gingivalis* in vitro. *Journal of Indonesian Dental Association*. 1(1).