

Aktivitas antibiofilm ekstrak etanol daun saga (*Abrus precatorius*) terhadap biofilm bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada pengujian menggunakan MtPB assay: experimental laboratoris

Annisa Lontyn Adies Putri¹ 
Meylida Ichsyani^{2*} 
Christiana Cahyani Prihastuti¹ 

¹Program Studi Kedokteran Gigi,
Fakultas Kedokteran, Universitas
Jenderal Soedirman
²Departemen Biomedis, Jurusan
Kedokteran Gigi, Fakultas
Kedokteran Universitas Jenderal
Soedirman, Indonesia

*Korespondensi
Email | meylida.ichsyani@unsoed.ac.id

Submisi | 8 Agustus 2024
Revisi | 29 November 2024
Penerimaan | 3 Desember 2024
Publikasi Online | 31 Desember 2024
DOI: [10.24198/jkg.v36i3.57014](https://doi.org/10.24198/jkg.v36i3.57014)

p-ISSN [0854-6002](https://doi.org/10.24198/jkg.v36i3.57014)
e-ISSN [2549-6514](https://doi.org/10.24198/jkg.v36i3.57014)

Sitasi | Putri ALA, Ichsyani M, Prihastuti CC. Aktivitas antibiofilm ekstrak etanol daun saga (*Abrus precatorius*) terhadap biofilm bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* pada pengujian menggunakan MtPB assay: experimental laboratories. J Ked Gi Univ Padj. 2024;36(3):302-311. DOI: [10.24198/jkg.v36i3.57014](https://doi.org/10.24198/jkg.v36i3.57014)



Copyright: © 2024 oleh penulis. diserahkan ke Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran untuk open akses publikasi di bawah syarat dan ketentuan dari Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ABSTRAK

Pendahuluan: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* merupakan flora normal pembentuk biofilm di rongga mulut. Peningkatan jumlah bakteri ini secara berlebihan dapat menyebabkan terjadinya periodontitis agresif dengan prevalensi mencapai 90% sehingga berperan penting dalam peningkatan keparahan periodontitis agresif secara cepat. Daun saga (*Abrus precatorius*) memiliki aktivitas farmakologis seperti antitumor, antidiabetik, antihelminthes, dan antimikroba dengan kandungan fitokimia berupa tanin, saponin, flavonoid, steroid, dan alkaloid. Penelitian bertujuan untuk menganalisis aktivitas antibiofilm ekstrak etanol daun saga terhadap biofilm *A. actinomycetemcomitans* berfokus pada aktivitas degradasi dan penghambatan pembentukan biofilm. **Metode:** Penelitian dilakukan dengan metode MtPB menggunakan pewarna kristal violet. Ekstrak diuji pada berbagai konsentrasi bertingkat yaitu 0,39, 0,78, 1,56, 3,125, 6,25, 12,5, 25, dan 50 (mg/mL) yang dibandingkan terhadap kontrol negatif DMSO 1% serta kontrol positif amoksisilin+metronidazol 30 µg/mL. Data yang didapatkan melalui desain penelitian *posttest only control group design* kemudian dianalisis menggunakan analisis statistik *one-way ANOVA* dan analisis regresi linier. **Hasil:** Hasil uji degradasi dan penghambatan pembentukan biofilm menunjukkan aktivitas pada seluruh kelompok perlakuan dibandingkan dengan kontrol negatif ($p \leq 0,05$). Ekstrak etanol daun saga konsentrasi 25 mg/mL memiliki kemampuan degradasi sebesar 76,13% serta sudah mampu menyamai kemampuan degradasi kelompok kontrol positif ($p > 0,05$) dan mulai dari konsentrasi 1,56 mg/mL sudah menghambat biofilm mulai dari 37,52% sehingga mampu menyamai dan konsentrasi melebihi kemampuan penghambatan pembentukan biofilm *A. actinomycetemcomitans* pada kelompok kontrol positif. Nilai *Minimum Biofilm Eradication Concentration* (MBEC₅₀) terdapat pada konsentrasi 4,44 mg/mL sedangkan nilai *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC₅₀) pada konsentrasi 2,96 mg/mL. **Simpulan:** ekstrak etanol daun saga memiliki aktivitas antibiofilm terhadap bakteri *A. actinomycetemcomitans*.

Kata kunci

Abrus precatorius L., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, biofilm, periodontitis agresif, microtiter plate assay.

Antibiofilm activity of ethanol extract of saga leaf (*Abrus precatorius*) on *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Biofilm: experimental laboratoris

ABSTRACT

Introduction: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is a normal flora that forms biofilms in the oral cavity. An excessive increase in the number of these bacteria can cause inflammation of the periodontal tissue called periodontitis. *A. actinomycetemcomitans* has the main virulence of leukotoxin which can weaken the immune cell response to pathogenic bacteria with a prevalence in aggressive periodontitis reaching 90% so it plays an important role in the rapid increase in the severity of aggressive periodontitis. Saga leaves (*Abrus precatorius*) have pharmacological activities such as antitumor, antidiabetic, antihelminthic, and antimicrobial with phytochemical content in the form of tannins, saponins, flavonoids, steroids, and alkaloids. The research aims to analyze the antibiofilm activity of ethanol extract of saga leaves against *A. actinomycetemcomitans* biofilms by looking at the degradation activity and inhibition of biofilm formation. **Methods:** The research was carried out using the MtPB method using crystal violet dye. The extract was tested at various graded concentrations, namely 0.39, 0.78, 1.56, 3.125, 6.25, 12.5, 25, and 50 (mg/mL) which were compared to the negative control 1% DMSO and the positive control amoxicillin +metronidazole 30 µg/mL. Data obtained through the posttest only control group design were then analyzed using one-way ANOVA statistical analysis and linear regression. **Results:** The results of the degradation and inhibition of biofilm formation tests showed activity in all treatment groups compared to the negative control ($p \leq 0.05$). The ethanol extract of saga leaves at a concentration of 25 mg/mL was able to match the degradation ability of the positive control group ($p > 0.05$) and starting from a concentration of 1.56 mg/mL was able to match and exceed the ability to inhibit *A. actinomycetemcomitans* biofilm formation in the positive control group. The MBEC₅₀ value is found at a concentration of 4.44 mg/mL while the MBIC₅₀ value is at 2.96 mg/mL. **Conclusion:** ethanol extract of saga leaves has anti-biofilm activity against the bacteria *A. actinomycetemcomitans*.

Keywords

Abrus precatorius L., *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, aggressive periodontitis, biofilm, microtiter plate assay

PENDAHULUAN

Periodontitis adalah peradangan pada jaringan pendukung gigi yang dipicu infeksi bakteri yang dapat menyebabkan kerusakan jaringan pendukung gigi dan kehilangan gigi.¹ Angka kejadian periodontitis di dunia cukup tinggi. Di dunia terdapat 1,1 miliar orang mengalami periodontitis dengan peningkatan sebesar 8,44% dalam kurun waktu 10 tahun.² Kemenkes RI (2018) menyebutkan bahwa prevalensi periodontitis di Indonesia pada tahun 2018 mencapai 74,1%.³ Periodontitis agresif merupakan salah satu jenis periodontitis yang terjadi pada usia muda dengan kerusakan jaringan periodontal yang terjadi secara cepat.⁴

Periodontitis agresif ditandai dengan peningkatan proporsi bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* dan *Tannerella forsythia*.⁵ Biofilm bakteri pada subgingiva dapat menyebabkan inflamasi hingga terbentuk poket periodontal.^{6,7} Bakteri *A. actinomycetemcomitans* memiliki peran penting pada kejadian periodontitis agresif dengan prevalensi mencapai 90%.⁸ Bakteri ini berperan sebagai reservoir bagi penyebaran dan reinfeksi bakteri subgingiva lainnya serta menginisiasi pembentukan biofilm pada gigi dan permukaan akar.^{7,9} Faktor virulensi utama bakteri ini berupa leukotoksin, yang dapat merusak sel leukosit dan monosit sehingga memengaruhi respon sel tersebut terhadap bakteri patogen lainnya.^{10,11}

Penggunaan antibiotik seperti metronidazol dan amoksisilin telah menjadi pilihan terapi untuk mengatasi infeksi *A. actinomycetemcomitans*.¹² Namun, penggunaan antibiotik jangka panjang dapat menyebabkan resistensi bakteri dan efek samping yang tidak diinginkan seperti diare. Oleh karena itu, diperlukan alternatif pengobatan yang lebih aman dan efektif.¹³ Kandungan fitokimia pada bahan alam memiliki potensi sebagai alternatif agen kuratif dari infeksi mulut dan jaringan periodontal.¹⁴

Salah satu bahan alam yang digunakan masyarakat Indonesia sebagai obat tradisional adalah saga (*Abrus precatorius*). Tanaman saga merupakan tanaman liar yang mudah dijumpai di daerah tropis sebagai semak-semak serta merambat pada pagar.¹⁵ Penelitian terdahulu menyatakan bahwa daun saga memiliki aktivitas farmakologis seperti antitumor, antidiabetik, antihelminthes, dan antibakteri.⁶ Aktivitas antibakteri daun saga dilaporkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *S. mutans* dan *S. aureus*.^{7,16,17} serta bakteri gram negatif *Aeromonas hydrophila*.¹⁶ Aktivitas antibiofilm ekstrak daun saga terhadap bakteri dalam bentuk biofilm terjadi pada biofilm bakteri *S. aureus*.¹⁷

Aktivitas antimikroba daun saga tersebut dikaitkan dengan kandungan senyawa metabolit sekunder seperti, tanin, saponin, flavonoid, steroid, dan alkaloid.¹⁶ Menurut penelitian sebelumnya, senyawa dengan konsentrasi tertinggi adalah tanin dengan konsentrasi pada daun, biji, dan akar berturut-turut adalah 27,71%, 21,34%, dan 12,8%.¹⁶

Penelitian-penelitian sebelumnya tentang ekstrak etanol daun saga masih belum ada yang menggunakan kontrol positif berupa kombinasi antibiotik amoksisilin dan metronidazole sehingga penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui kemampuan penghambatan dan degradasi biofilm oleh ekstrak etanol daun saga apabila dibandingkan dengan kombinasi antibiotik amoksisilin dan metronidazole sebagai *golden standard* dalam perawatan periodontitis agresif. Penelitian ini bertujuan untuk menganalisis aktivitas antibiofilm ekstrak etanol daun saga terhadap biofilm *A. actinomycetemcomitans*, dengan fokus pada degradasi dan penghambatan pembentukan biofilm yang telah terbentuk.

METODE

Penelitian berupa *true experimental laboratoris* secara *in vitro* dengan rancangan *posttest-only control group design*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi serta Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman dalam kurun waktu Desember 2023 –Februari 2024.

Daun saga (*Abrus precatorius*) diperoleh dari Desa Cikaso, Kecamatan Kramatmulya, Kabupaten Kuningan, Jawa Barat. Ekstraksi menggunakan teknik maserasi dengan merendam simplisia kering dalam larutan etanol 70% (perbandingan 1:10).¹⁸ Uji kandungan senyawa fitokimia ekstrak selanjutnya dilakukan dengan metode tabung.¹⁹ Uji alkaloid dilakukan dengan mencampur ekstrak daun saga sebanyak 3 gr dengan 1 mL ammonia dan 10 mL kloroform selanjutnya ditambah asam sulfat pekat 2N sebanyak 10 mL dan dikocok. Campuran didiamkan sampai terpisah antara asam sulfat dan kloroform. Lapisan asam sulfat dipisahkan kemudian diberikan pereaksi Dragendorff. Uji Saponin dilakukan dengan melarutkan ekstrak daun saga sebanyak 2 gr dengan menggunakan 10 mL DMSO 1% kemudian dikocok dengan kuat selama beberapa saat. Uji Flavonoid dilakukan dengan pereaksi serbuk Mg, 2 mL HCL 2N, dan amil alkohol. Uji Triterpenoid menggunakan kloroform, asam asetat anhidrat, dan H₂SO₄, sedangkan untuk uji Tanin dilakukan menggunakan pereaksi FeCl₃ 1%.¹⁹ Ekstrak etanol daun saga kemudian diencerkan secara bertingkat menggunakan DMSO 1% sehingga diperoleh variasi konsentrasi 0,39 mg/mL, 0,78 mg/mL, 1,56 mg/mL, 3,125 mg/mL, 6,25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 25 mg/mL, dan 50 mg/mL.

Uji antibiofilm dilakukan menggunakan *Microtiter Plat Biofilm (MtPB) Assay* dengan *well plate 96 flat bottom* (Iwaki, Japan).⁸ Uji antibiofilm ini terdiri dari dua uji utama yaitu uji degradasi biofilm dan uji penghambatan pembentukan biofilm, yang dilakukan pada 2 *microplate* secara berurutan. Sebelumnya, kultur murni bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 29522 yang didapatkan dari Indilab Samarinda disubkultur 2x24 jam pada medium *Mueller-Hinton Agar* (MHA) (Himedia, India) dalam inkubator CO₂. Koloni segar kemudian di suspensi pada media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) (Himedia, India) dan disetarakan kekeruhannya dengan larutan standar 0,5 *Mcfarland* (1,5 x 10⁸ CFU/mL).

Kedua *microplate* dipersiapkan dengan menambahkan 100 µL suspensi bakteri *A. actinomycetemcomitans* dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Setelah inkubasi, suspensi dibuang perlahan dan *microplate* dibilas 3 kali dengan PBS (Hyeobne, USA) untuk membuang bakteri *non-adherent*. Selanjutnya, 100 µL BHIB dan 100 µL ekstrak daun saga dengan berbagai konsentrasi, kontrol negatif (DMSO 1%), dan kontrol positif (amoksisilin (AMX) 30 µg/mL + metronidazole (MET) 20 µg/mL) ditambahkan ke dalam *microplate* sesuai dengan kelompok perlakuan. Pengulangan dilakukan sebanyak 6 kali untuk setiap konsentrasi ekstrak yang diujikan. *Microplate* kemudian diinkubasi selama 60 menit pada suhu 37°C, selanjutnya cairan dibuang dan *microplate* dibilas kembali dengan PBS.

Pengujian degradasi biofilm, biofilm yang telah dipaparkan ekstrak langsung diberi kristal violet 1% sebanyak 200 µL dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. *Microplate* kemudian dibilas PBS dan kristal violet 1% dilarutkan dengan etanol 96%. Pembacaan *optical density* (OD) dilakukan menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 620 nm, dan persentase degradasi biofilm dihitung dengan membandingkan OD perlakuan dengan kontrol pertumbuhan bakteri. Sementara itu, pada uji penghambatan pembentukan biofilm, pada *microplate* dilakukan menambahkan 200 µL medium BHIB setelah paparan ekstrak. *Microplate* diinkubasi selama 24 jam, kemudian dilanjutkan dengan pewarnaan kristal violet 1% dan pengukuran OD. Persentase penghambatan pembentukan biofilm *A. actinomycetemcomitans* dihitung berdasarkan nilai OD yang diperoleh dan dibandingkan dengan kontrol pertumbuhan.

Data berupa persentase degradasi dan penghambatan biofilm dianalisis

menggunakan uji statistik *One-way ANOVA* dengan *post hoc* LSD pada tingkat kepercayaan 95% untuk mengetahui perbedaan aktivitas antar kelompok dan kelompok kontrol. Penentuan nilai *Minimum Biofilm Eradication Concentration* 50% (MBEC₅₀) dan nilai *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* 50% (MBIC₅₀) dianalisis dengan regresi linier. Pengukuran nilai *Minimum Biofilm Eradication Concentration* (MBEC₅₀) digunakan untuk mengetahui konsentrasi terkecil dari agen antibiofilm baru yang dapat mengeradikasi sejumlah biofilm, dan pengukuran nilai *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration* (MBIC₅₀) digunakan untuk mengetahui konsentrasi terkecil dari agen antibiofilm baru yang dapat menghambat pembentukan biofilm.

HASIL

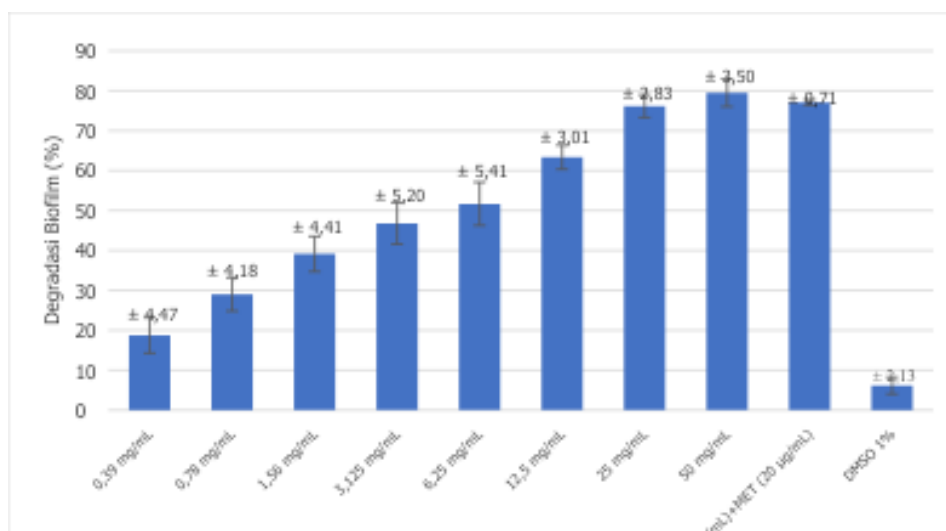
Berdasarkan uji fitokimia, ekstrak etanol daun saga mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, steroid/triterpenoid, tanin, dan saponin (Tabel 1)

Tabel 1. Kandungan fitokimia ekstrak etanol daun saga

No.	Senyawa fitokimia	Hasil uji	Keterangan
1.	Alkaloid	+	Terdapat endapan berwarna kemerahan
2.	Flavonoid	+	Terdapat lapisan berwarna merah kecoklatan
3.	Tanin	+	Terdapat perubahan warna menjadi hijau kehitaman
4.	Saponin	+	Terdapat busa yang stabil selama 10 menit, ketinggian 1-3 cm dan apabila ditambahkan 1 tetes HCL 2N busa tidak hilang
5.	Triterpenoid	+	Terdapat cincin hijau kebiruan

Keterangan: (+) = Positif (terdapat kandungan senyawa dalam sampel)

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanol daun saga memiliki aktivitas degradasi dan penghambatan pembentukan biofilm *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* yang signifikan. Gambar 1. merupakan persentase degradasi biofilm bakteri *A. actinomycetemcomitans* oleh ekstrak etanol daun saga. Hasil degradasi biofilm menunjukkan peningkatan persentase degradasi seiring peningkatan konsentrasi ekstrak. Analisis statistik *One Way ANOVA* menunjukkan perbedaan yang signifikan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$) (Tabel 2). Persentase degradasi tertinggi sebesar $79,52 \pm 3,50\%$ dicapai pada konsentrasi 50 mg/mL. Konsentrasi 25 mg/mL dan 50 mg/mL menunjukkan aktivitas degradasi yang setara dengan kontrol positif. Nilai MBEC₅₀ (*Minimum Biofilm Eradication Concentration*) ekstrak ditemukan pada konsentrasi 4,44 mg/mL.



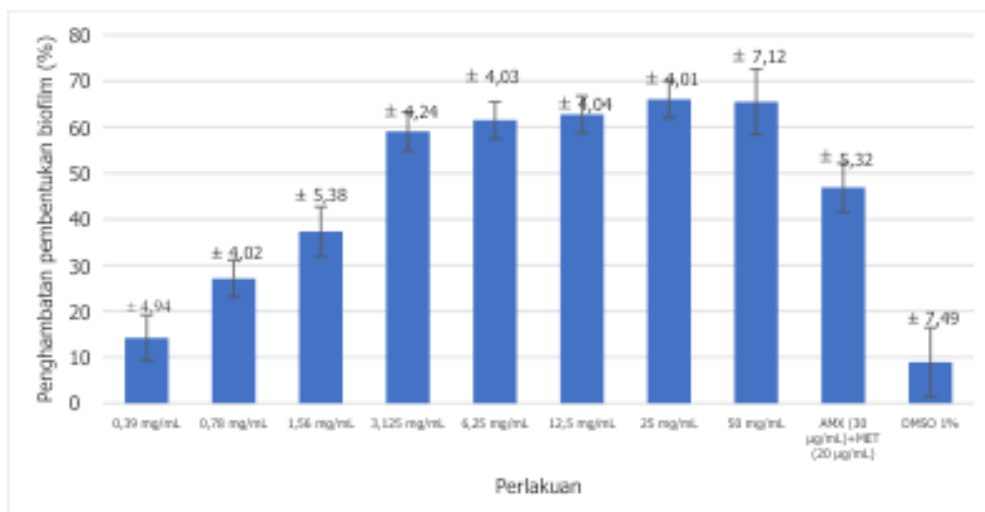
Gambar 1. Degradasi biofilm bakteri *A. actinomycetemcomitans* oleh ekstrak etanol daun saga

Tabel 2. Hasil *post-hoc* LSD aktivitas degradasi biofilm *A. actinomycetemcomitans* oleh ekstrak etanol daun saga

Kelompok	0,39 mg/mL	0,78 mg/mL	1,56 mg/mL	3,125 mg/mL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	AMX (30 µg/mL)+ME T (20µg/mL)	DMSO 1%
0,39 mg/mL										
0,78 mg/mL	0,000*									
1,56 mg/mL	0,000*	0,000*								
3,125 mg/mL	0,000*	0,000*	0,001*							
6,25 mg/mL	0,000*	0,000*	0,000*	0,035*						
12,5 mg/mL	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*					
25 mg/mL	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*				
50 mg/mL	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,142			
AMX (30µg/mL)+ MET (20µg/mL)	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,761	0,456		
DMSO 1%	0,003*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	

Keterangan: *=Terdapat perbedaan yang bermakna dengan tingkat kepercayaan 95%

Uji penghambatan pembentukan biofilm juga menunjukkan hasil yang serupa, dengan persentase penghambatan meningkat seiring konsentrasi ekstrak. Penghambatan tertinggi sebesar $66,03 \pm 4,01\%$ dicapai pada konsentrasi 25 mg/mL. Analisis statistik *One Way Anova* menunjukkan perbedaan signifikan ditemukan antar kelompok perlakuan ($p < 0,05$) (Tabel 3). Ekstrak konsentrasi 1,56 mg/mL menunjukkan aktivitas penghambatan setara dengan kontrol positif, sedangkan konsentrasi 3,125-50 mg/mL menunjukkan aktivitas yang melampaui kontrol positif. Nilai MBIC₅₀ (*Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*) ekstrak ditemukan pada konsentrasi 2,96 mg/mL (Gambar 2).



Gambar 2. Penghambatan pembentukan biofilm bakteri *A. actinomycetemcomitans* oleh ekstrak etanol daun saga

Tabel 3. Hasil uji *post-hoc* LSD uji penghambatan pembentukan biofilm *Actinomycescomitans* oleh ekstrak etanol daun saga

Kelompok	0,39 mg/mL	0,78 mg/mL	1,56 mg/mL	3,125 mg/mL	6,25 mg/mL	12,5 mg/mL	25 mg/mL	50 mg/mL	AMX (30 µg/mL)+ME T (20µg/mL)	DMSO 1%
0,39 mg/mL										
0,78 mg/mL	0,056*									
1,56 mg/mL	0,000*	0,079*								
3,125 mg/mL	0,000*	0,000*	0,000*							
6,25 mg/mL	0,000*	0,000*	0,003*	0,371						
12,5 mg/mL	0,000*	0,000*	0,000*	0,169	0,624					
25 mg/mL	0,000*	0,000*	0,000*	0,002*	0,023*	0,070				
50 mg/mL	0,000*	0,000*	0,000*	0,001*	0,012*	0,040*	0,801			
AMX (30 µg/mL)+MET (20µg/mL)	0,000*	0,011*	0,177	0,024*	0,005*	0,002*	0,000*	0,000*		
DMSO 1%	0,473	0,010*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	0,000*	

Keterangan: * =Terdapat perbedaan yang bermakna dengan tingkat kepercayaan 95%

Hasil ini mengindikasikan bahwa ekstrak etanol daun saga memiliki potensi yang menjanjikan sebagai agen anti-biofilm terhadap *A. actinomycetemcomitans*, dengan aktivitas yang sebanding dengan antibiotik konvensional pada konsentrasi tertentu.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol daun saga memiliki potensi yang signifikan sebagai agen antibiofilm terhadap bakteri *A. actinomycetemcomitans*. Aktivitas antibiofilm ini dapat dikaitkan dengan kandungan senyawa bioaktif yang teridentifikasi dalam ekstrak, terutama flavonoid, tanin, dan saponin (Tabel 1). Hal tersebut sesuai dengan penelitian sebelumnya yang menunjukkan hasil positif ekstrak etanol daun saga terhadap flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, dan triterpenoid.¹⁷

Senyawa tanin dan flavonoid bekerja dengan menghambat proses *quorum sensing* pada pembentukan biofilm bakteri dengan mengganggu pensinyalan oleh *acyl-homoserine lactones* (AHLs) melalui penghambatan AHLs *synthase* sehingga komunikasi antar sel bakteri dalam pembentukan biofilm terganggu.¹⁴ Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa tanin 1% memiliki kemampuan mendegradasi matriks EPS biofilm sebesar 50%.²⁰ Senyawa flavonoid juga dapat menonaktifkan enzim glikosiltransferase yang berperan dalam mentransfer karbohidrat untuk membentuk polisakarida yang dibutuhkan dalam pembentukan lipopolisakarida bakteri.^{21,22}

Aktivitas antibiofilm juga dimiliki oleh senyawa saponin. Saponin mampu menurunkan tegangan permukaan sehingga meningkatkan permeabilitas sel dan mengganggu integritas membran sel yang menyebabkan kebocoran sel.²³ Saponin juga dapat berikatan dengan enzim *mannitol dehydrogenase* (MDH) yang berperan dalam sintesis alginat pada EPS.²⁴ Interaksi tersebut menghambat fungsi MDH dalam membentuk EPS dan mengganggu fungsi DNA ekstraseluler dalam mempertahankan integritas struktur biofilm.²⁵

Senyawa triterpenoid dapat mengganggu proses adhesi sel bakteri karena mampu mengubah struktur protein adhesin pada membran sel bakteri.²⁶ Triterpenoid juga mengganggu aktivitas metabolisme biofilm dengan menekan penyerapan gula di sitoplasma bakteri.^{27,28} Senyawa alkaloid dapat merusak fimbria bakteri sehingga proses adhesi terhambat. Alkaloid bekerja dengan memblokir reseptor yang peka terhadap molekul pensinyal AI-2, yaitu gen *luxS* sehingga menekan fungsi AI-2 dalam pensinyalan antara bakteri pada pembentukan dan pematangan biofilm.^{29,30,31}

Aktivitas degradasi biofilm bakteri *A. actinomycetemcomitans* oleh ekstrak etanol daun saga mulai dari konsentrasi 0,39 mg/mL hingga 50 mg/mL terus meningkat (Gambar 1), begitu juga aktivitas penghambatan pembentukan biofilm bakteri *A.*

actinomycetecomitans oleh ekstrak etanol daun saga mulai dari konsentrasi 0,39 mg/mL hingga 50 mg/mL yang terus meningkat (Gambar 2). Peningkatan aktivitas antibiofilm seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak menunjukkan adanya efek *dose-dependent*. Hal ini penting untuk dipertimbangkan dalam pengembangan formulasi terapeutik berbasis ekstrak daun saga di masa depan. Penelitian sebelumnya juga menunjukkan peningkatan persentase penghambatan biofilm *S. aureus* seiring peningkatan konsentrasi ekstrak etanol daun saga dari konsentrasi 25 mg/mL hingga 800 mg/mL.⁸ Hal tersebut terjadi karena kandungan fitokimia ekstrak yang terkandung jumlahnya semakin banyak pada konsentrasi ekstrak yang lebih tinggi.²⁰

Dibandingkan dengan antibiotik metronidazol dan amoksisilin, ekstrak etanol daun saga menawarkan pendekatan yang lebih holistik dalam mengatasi infeksi biofilm *A. actinomycetecomitans*. Kompleksitas senyawa bioaktif dalam ekstrak dapat memberikan efek sinergis dan diharapkan dapat mengurangi risiko resistensi bakteri. Aktivitas degradasi biofilm ditujukan untuk mengetahui eradikasi/pengurangan massa biofilm yang telah terbentuk selama 48 jam. Lain hal dengan aktivitas penghambatan pembentukan biofilm, dilakukan dengan tujuan melihat apakah terdapat penambahan biomassa biofilm setelah dipaparkan ekstrak selama 1 jam dan diinkubasi ulang selama 24 jam. Persentase degradasi biofilm kelompok konsentrasi 25 mg/mL dan 50 mg/mL tidak berbeda secara bermakna dengan kelompok kontrol positif (Tabel 2), sedangkan rerata persentase penghambatan pembentukan biofilm antara kelompok perlakuan kelompok kontrol positif dan ekstrak etanol daun saga konsentrasi 1,56 mg/mL tidak menunjukkan perbedaan yang signifikan ($p>0,05$), namun kembali menunjukkan perbedaan dengan persentase yang lebih tinggi dan bermakna pada konsentrasi 3,125 mg/mL hingga 50 mg/mL (Tabel 3). Hal tersebut menunjukkan aktivitas degradasi biofilm oleh ekstrak etanol daun saga baru mampu menyamai aktivitas degradasi biofilm pada konsentrasi 50 mg/mL, sedangkan pada aktivitas penghambatan pembentukan biofilm ekstrak etanol daun saga konsentrasi 1,56 mg/mL sudah mampu menyamai aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dari kombinasi antibiotik amoksisilin+metronidazol sebagai kontrol positif dan konsentrasi 3,125 mg/mL hingga 50 mg/mL sudah mampu melampaui aktivitas penghambatan pembentukan biofilm dari kombinasi antibiotik amoksisilin+metronidazol sebagai kontrol positif.

Kombinasi antibiotik metronidazole dan amoksisilin 30 µg/mL bertujuan untuk mencegah resistensi bakteri *A. actinomycetecomitans* terhadap metronidazol. Metronidazol dapat merusak DNA bakteri melalui reduksi dari gugus nitro 2-methyl-5-nitroimidazole-1-ethanol. Aktivitas reduksi tersebut terjadi melalui transpor elektron dari bakteri anaerob ke gugus nitro pada metronidazole sehingga menyebabkan terbentuknya radikal bebas.³² Kerusakan pada DNA ekstraseluler yang terkandung di dalam matriks EPS memengaruhi biofilm yang telah terbentuk.³³ Amoksisilin sebagai antibiotik dari golongan beta-laktam memiliki mekanisme kerja dengan berikatan pada *penicillin-binding proteins* bakteri yang akan menghambat proses transpeptidasi pada pembentukan dinding sel bakteri sehingga terjadi lisis dinding sel dan destruksi sel bakteri. Mekanisme aksi amoksisilin dan metronidazol tersebut serupa dengan mekanisme senyawa aktif flavonoid, tanin, saponin, alkaloid, dan triterpenoid, yaitu dengan mengganggu *quorum sensing* dan merusak matriks EPS dari biofilm bakteri.^{34,35,36}

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan bahwa nilai MBEC₅₀ ekstrak etanol daun saga dalam mendegradasi biofilm bakteri *A. actinomycetecomitans* terdapat pada konsentrasi 4,44 mg/mL, sedangkan nilai MBIC₅₀ dalam menghambat biofilm bakteri *A. actinomycetecomitans* terdapat pada konsentrasi 2,96 mg/mL. Hasil tersebut menunjukkan kemampuan penghambatan (inhibisi) biofilm dari ekstrak ini lebih efektif dibandingkan kemampuan degradasinya. Perbedaan ini mengindikasikan bahwa ekstrak daun saga lebih optimal ketika digunakan sebagai agen pencegahan pembentukan biofilm dibandingkan untuk menghancurkan biofilm yang sudah terbentuk. Aktivitas penghambatan yang lebih baik kemungkinan disebabkan oleh dua senyawa utama dalam

ekstrak etanol daun saga, yaitu tanin dan etanol memiliki mekanisme utama dengan menghambat proses *quorum sensing* pada pembentukan matriks EPS bakteri. Kemampuan degradasi yang lebih rendah dapat juga disebabkan karena pada inkubasi 48 jam biofilm telah memasuki fase maturasi. Proteksi biofilm berupa matriks EPS yang terbentuk pada fase ini sudah tebal dan kuat sehingga agen antibakteri/antibiofilm sulit untuk menjangkau lapisan biofilm yang lebih dalam.^{36,37}

Ketika dibandingkan dengan kontrol positif ekstrak daun saga menunjukkan aktivitas yang lebih baik. Ekstrak etanol daun saga mampu menyamai efektivitas kontrol positif pada konsentrasi yang relatif rendah untuk penghambatan biofilm (1,56 mg/mL) meskipun membutuhkan konsentrasi yang lebih tinggi (25 mg/mL) untuk aktivitas degradasi. Hal ini semakin memperkuat potensi ekstrak daun saga sebagai agen preventif pembentukan biofilm. Rendahnya aktivitas antibiofilm pada kelompok kontrol positif kemungkinan disebabkan karena waktu paparan amoksisilin+metronidazol yang singkat sehingga tidak sepenuhnya mempengaruhi *A. actinomycetemcomitans* yang pertumbuhannya lebih lambat, selain itu kerentanan bakteri *A. actinomycetemcomitans* terhadap antibiotik juga menurun seiring dengan matangnya biofilm.³⁷

Hasil penelitian ini dapat menjadi acuan bagi pengembangan penelitian selanjutnya terutama dalam hal mengatasi biofilm rongga mulut secara komprehensif dari pencegahan pembentukannya hingga mendegradasi biofilm yang telah terbentuk. Keterbatasan pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun saga yang belum di fraksinasi sehingga belum dapat diketahui senyawa fitokimia yang memiliki aktivitas degradasi biofilm bakteri *A. actinomycetemcomitans* paling tinggi. Penelitian lanjutan dengan konsentrasi yang lebih tinggi dari 50 mg/mL juga diperlukan karena persentase degradasi biofilm masih terus meningkat hingga konsentrasi tertinggi yang diujikan sehingga belum dapat diketahui konsentrasi optimal dari ekstrak etanol daun saga dalam mendegradasi degradasi biofilm bakteri *A. actinomycetemcomitans*.

Aktivitas degradasi dan penghambatan pembentukan biofilm oleh ekstrak etanol menunjukkan potensi yang baik untuk dikembangkan sebagai salah satu alternatif bagi perawatan periodontitis agresif dengan mengurangi jumlah bakteri *A. actinomycetemcomitans* yang mendominasi. Berkurangnya jumlah bakteri dapat menurunkan faktor virulensi oleh bakteri *A. actinomycetemcomitans* yang dapat menyebabkan keparahan kerusakan jaringan periodontal. Keterbatasan penelitian lebih lanjut diperlukan untuk mengetahui senyawa utama yang memiliki aktivitas antibiofilm dengan fraksinasi dan uji aktivitas kandungan senyawa. Selain itu, diperlukan analisis *in silico* untuk melihat interaksi senyawa dan protein bakteri, serta uji *in vivo* untuk menguji toksisitas dan kemampuan ekstrak pada hewan coba.

SIMPULAN

Ekstrak etanol daun saga (*Abrus precatorius*) memiliki aktivitas antibiofilm terhadap biofilm bakteri *A. actinomycetemcomitans*, baik dalam mendegradasi maupun menghambat pembentukan biofilm. Aktivitas ini berkorelasi dengan kandungan senyawa bioaktif sehingga memiliki prospek yang baik untuk dikembangkan sebagai alternatif atau pendamping terapi dalam penanganan infeksi yang melibatkan biofilm bakteri *A. actinomycetemcomitans*. Implikasi penelitian ini adalah diharapkan mampu menjadi langkah awal dalam pengurangan ketergantungan terhadap antibiotik melalui penggunaan bahan alam yang minim efek samping.

Ucapan terimakasih: Terima kasih kami sampaikan pada Universitas Jenderal Soedirman yang telah membantu penelitian ini melalui hibah penelitian dosen Skema Riset Peningkatan Kompetensi tahun anggaran 2024 serta segenap pihak Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman atas izin, kesediaan, dan bantuan yang telah mendukung keberlangsungan penelitian.

Kontribusi Penulis: Konseptualisasi, PALA, IM, dan PCC; metodologi, IM; perangkat lunak, PALA; validasi, IM

dan PCC; analisis formal, IM dan PCC; investigasi, IM dan PCC; sumber daya, PALA; kurasi data, IM dan PCC; penulisan penyusunan draft awal, PALA; penulisan tinjauan dan penyuntingan, PALA, MI, dan PCC; visualisasi, PALA; supervisi, IM dan PCC; administrasi proyek, PALA; perolehan pendanaan, PALA. Semua penulis telah membaca dan menyetujui versi naskah yang diterbitkan.

Pendanaan: Hibah Riset Peningkatan Kompetensi Universitas Jenderal Soedirman Tahun Anggaran 2024

Persetujuan Etik: Penelitian ini telah disetujui oleh Komite Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Jenderal Soedirman dengan nomor etik 010/KEPK/PE/1/2024.

Pernyataan Ketersediaan Data: Ketersediaan data penelitian akan diberikan seizin semua peneliti melalui email korespondensi dengan memperlihatkan etika dalam penelitian.

Konflik Kepentingan: Penulis menyatakan tidak ada konflik kepentingan.

DAFTAR PUSTAKA

1. European Federation of Periodontology. Gum Disease and Periodontitis . 2021. Available from: <https://www.efp.org/>
2. Zhang X, Wang X, Wu J, Wang M, Hu B, Qu H, et al. The global burden of periodontal diseases in 204 countries and territories from 1990 to 2019. *Oral diseases* 2022; 30(2): 754-768. <https://doi.org/10.1111/odi.14436>
3. Kemenkes RI. Hasil Utama Riskesdas 2018. Lembaga Penerbit. Jakarta: Balitbangkes. 2018. p. 204
4. Boehm, Chui. Guide to Periodontal Treatment Solution for General Dentistry. 1st Ed. Thieme. 2020. p. 67-145. <https://doi.org/10.1055/b-006-161174>
5. Badanian A, Bueno L, Papone V. Comparative bacterial analysis of chronic and aggressive periodontitis in a sample population from Uruguay. *Odontostomatología* 2019;21(33):5-13. <https://doi.org/10.22592/ode2019n33a2>
6. Kriswandini IL, Tantiana, Berniyati T, Tyas PNB. Detection of biofilm proteins from *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* induced by glucose, lactose, soy protein, and iron along with protein density analysis. *Malaysian J of Medicine and Health Sciences* 2020; 16(SUPP4):2636-9346.
7. Nisak SK, Pambudi DB, Waznah U, Slamet S. Uji antibakteri ekstrak etanol daun saga (*Abrus precatorius* L.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 31987 dan *Staphylococcus aureus* ATCC 25923PK/5. Prosiding Seminar Nasional Kesehatan Lembaga Penelitian Dan Pengabdian Masyarakat Universitas Muhammadiyah Pekajangan 2021. p. 2031-2037. <https://doi.org/10.48144/prosiding.v1i.967>
8. Mutmainnah B, Ni'matuzahroh. Penurunan aktivitas biofilm strain MRSA 22156 oleh tanaman saga (*Abrus precatorius* L.). *Bioscientist: J Ilm Biol* 2023;11(2):1442-1449. <https://doi.org/10.33394/bioscientist.v11i2.9297>
9. Belibasakis GN, Maula T, Bao K, Lindholm M, Bostanci N, Oscarsson J, et al. Virulence and pathogenicity properties of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *Pathogens* 2019;8(4):222. <https://doi.org/10.3390/pathogens8040222>
10. Bao K, Bostanci N, Thurnheer T, Grossmann J, Wolski WE, Thay B, et al. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* H-NS promotes biofilm formation and alters protein dynamics of other species within a polymicrobial oral biofilm. *Npj Biofilms and Microbiomes* 2018;4(1):4. <https://doi.org/10.1038/s41522-018-0055-4>
11. Missoum A. Aggressive periodontitis etiology, pathophysiology, and treatment: a recent review. *Int J of Exp Dent Science* 2019; 8(1):11-22. <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10029-1189>
12. Abdelmagdy HA, Shetty DS, Al-Ahmari DM. Herbal medicine as adjunct in periodontal therapies- A review of clinical trials in past decade. *J Oral Biology and Craniofacial Research* 2019;9(3):212-7. <https://doi.org/10.1016/j.jobcr.2019.05.001>
13. Isola G. Current evidence of natural agents in oral and periodontal health. *Nutrients* 2020;12(2):585. <https://doi.org/10.3390/nu12020585>
14. Bora N, Jha NA. Tannic acid: an efficient quorum sensing inhibitor. *Proceedings of Int. Conf. on Systems and Processes in Physics, Chemistry and Biology* 2018. p. 124-126.
15. Nayak SP, Lone RA, Fakhrah S, Chauhan A, Sarvendra K, Mohanty CS. Future Foods: Global Trends, Opportunities, and Sustainability Challenges. Academic Press. 2022. p. 151-163. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91001-9.00023-2>
16. Ulansari, Putri M. Penggunaan Ekstrak Daun Saga (*Abrus precatorius*) Sebagai Antibakteri *Aeromonas hydrophila* Secara In Vitro. Jurusan. Skripsi. Manajemen Sumberdaya Perairan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang 2021. p. 31-40. (Tidak Dipublikasikan).
17. Sunday OJ, Babatunde SK, Ajiboye AE, Adedayo RM, Ajao MA, Ajuwon BI. Evaluation of phytochemical properties and in-vitro antibacterial activity of the aqueous extracts of leaf, seed and root of *Abrus precatorius* Linn. against *Salmonella* and *Shigella*. *Asian Pacific J Tropical Biomedicine*. 2016;6(9):755-759. <https://doi.org/10.1016/j.apitb.2016.07.002>
18. Pargaputri AF, Munadzirah E, Indrawati R. Antibacterial effects of *Pluchea indica* less leaf extract on *E. faecalis* and *Fusobacterium nucleatum* (in vitro). *Maj Kedok Gi*. 2017;19(2):264-79. <https://doi.org/10.20473/j.djmg.v49.i2.p93-98>
19. Untung J, Mapiliandari I, Djanis RL, Hindarto C, Amalia A, Rachmy S. Uji aktivitas antifungi ekstrak etanol dan etil asetat daun saga (*A. precatorius*) terhadap *Candida albicans*. *Warta Akab* 2022; 46(2): 1-4. <https://doi.org/10.55075/wa.v46i2.149>
20. Triana H, Pratiwi S, Hamzah H. The inhibition activity of tannin on the formation of mono-species and polymicrobial biofilm *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Candida albicans*. *Maj Obat Tradisional* 2019;24(2): 110-118. <https://doi.org/10.22146/mot.44532>
21. Federika AS, Rukmo M, Setyabudi. Antibiofilm activity of flavonoid mangosteen pericarp extract against *Porphyromonas gingivalis* bacteria. *Cons Dent J* 2020;10(1):27-30. <https://doi.org/10.20473/cdj.v10i1.2020.27-30>
22. Yakovlieva L, Walvoort MTC. Processivity in bacterial glycosyltransferases. *ACS Chemical Biology* 2019;15(1):3-16. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.9b00619>
23. Adnan M, Siddiqui AJ, Ashraf SA, Ashraf MS, Alomrani SO, Alreshidi M, et al. Saponin-derived silver nanoparticles from *Phoenix dactylifera* (Ajwa dates) exhibit broad-spectrum bioactivities combating bacterial infections. *Antibiotics (Basel)* 2023;12(9):1415. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091415>

24. Panlilio H, Rice CV. The role of extracellular DNA in the formation, architecture, stability, and treatment of bacterial biofilms. *Biotechnology and bioengineering* 2021;118(6):2129-2141. <https://doi.org/10.1002/bit.27760>.
25. Lu L, Zhao Y, Li M, Wang X, Zhu J, Liao L, et al. Contemporary strategies and approaches for characterizing composition and enhancing biofilm penetration targeting bacterial extracellular polymeric substances. *J Pharmac Analys* 2023;14(4). <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2023.11.013>.
26. Sycz Z, Tichaczek-Goska D, Wojnicz D. Anti-Planktonic and Anti-Biofilm Properties of Pentacyclic Triterpenes—Asiatic Acid and Ursolic Acid as Promising Antibacterial Future Pharmaceuticals. *Biomolecules* 2022; 12(1):98. <https://doi.org/10.3390/biom12010098>.
27. Bhattacharya SP, Bhattacharya A, Sen A. A comprehensive and comparative study on the action of pentacyclic triterpenoids on *Vibrio cholerae* biofilms. *Microbial Pathogenesis* 2020;149:104493. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104493>.
28. Yamashita H, Matsuzaki M, Kurokawa Y, Nakane T, Goto M, Lee K, et al. Four new triterpenoids from the bark of *Euonymus alatus* forma *ciliato-dentatus*. *Phytochemistry Letters* 2019;31:140–146. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.03.015>.
29. Lahiri D, Dash S, Dutta R, Nag M. Elucidating the effect of anti-biofilm activity of bioactive compounds extracted from plants. *J Biosciences* 2019;44(52). <https://doi.org/10.1007/s12038-019-9868-4>.
30. Lu L, Hu W, Tian Z, Yuan D, Yi G, Zhou Y, et al. Developing natural products as potential anti-biofilm agents. *Chinese Medicine* 2019;14(11). <https://doi.org/10.1186/s13020-019-0232-2>.
31. Clontz, L. Biofilm inhibition: the use of a marine alkaloid derivative in the prevention of clinically-relevant biofilms. *J Micro Exp* 2018;6(5):206-14. <https://doi.org/10.15406/jmen.2018.06.00216>.
32. Anggita D, Nuraisyah S, Wiriansya P. Mekanisme kerja antibiotik. *UMI Med J* 2022;7(1):46-58. <https://doi.org/10.33096/umj.v7i1.149>.
33. Gottschick C, Szafranski SP, Kunze B, Sztajer H, Masur C, Abels C, et al. Screening of compounds against *Gardnerella vaginalis* biofilms. *PLOS ONE* 2016;11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154086>.
34. Ghosh C, Bhowmik J, Ghosh R, Das MC, Sandhu P, Kumari M, et al. The anti-biofilm potential of triterpenoids isolated from *Sarcochlamys pulcherrima* (Roxb.). *Microbial Pathogenesis* 2020;139:103901. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103901>.
35. Kining E, Falah S, Nurhidayat N. The in vitro antibiofilm activity of water leaf extract of papaya (*Carica papaya* L.) against *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Biochemistry* 2016;2(3):150-163. <https://doi.org/10.29244/cb.2.3.150-163>.
36. Hamzah H, Hertiani T, Pratiwi SUT, Nuryastuti T. Efek saponin terhadap penghambatan planktonik dan mono-spesies biofilm *Candida albicans* ATCC 10231 pada fase pertengahan, pematangan, dan degradasi. *Majalah Farmaseutik* 2020;17(2):198–205. <https://doi.org/10.22146/farmaseutik.v17i2.54444>.
37. Dabija-Wolter G, Al-Zubaydi SS, Mohammed MMA, Bakken V, Bolstad AI. The effect of Metronidazole plus amoxicillin or metronidazol plus penicillin V on periodontal pathogens in an in vitro biofilm model. *Clinical and Experimental Dental Research* 2018;4(1):6-12. <https://doi.org/10.1002/cre2.96>