

EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN MIMBA (*Azadirachta indica*) DALAM MENURUNKAN MIKROKOLONI DAN *CLUSTER* BIOFILM *Staphylococcus aureus* PADA PERMUKAAN ABIOTIK

Ahmad Akbar Syarib, Noer Aini, Rio Risandiansyah *
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri penyebab infeksi nosokomial terbesar dan mampu membentuk biofilm pada permukaan abiotik. Biofilm yang terbentuk dapat melindungi diri dari terapi antibiotik sehingga perlu penanganan khusus dalam mengeradikasinya. Daun *Azadirachta indica* salah satu herbal yang memiliki efek antibakteri, akan tetapi dalam mengeradikasi biofilm pada permukaan abiotik belum sepenuhnya diketahui sehingga perlu diteliti.

Metode: Penelitian metode *direct microscopic observation* melalui pembuatan biofilm *S. aureus* pada slide yang dimasukkan dalam cawan petri steril dan *Broth Heart Brain Infusion* (BHIB) + 5% sukrosa sebagai media pertumbuhan bakteri. Preparat diinkubasi selama 72 jam suhu 37°C. Ekstrak etanol 70% daun *A. Indica* (EEDAI) diencerkan menggunakan *Dymethyl Sulfoxide* (DMSO) dengan tiga kelompok dosis 500µg/ml, 1000µg/ml dan 2000µg/ml yang diujikan pada preparat biofilm. Kontrol positif menggunakan disinfektan enzimatik (Ozyme®) dan kontrol negatif aquades dan DMSO. Penelitian ini menggunakan tiga kali tiga ulangan dengan 10 lapang pandang pengamatan mikroskopis kemudian dikonversi dan dihitung menggunakan *software Image J*. Data setiap kelompok perlakuan dianalisa dengan Oneway ANOVA dilanjutkan uji LSD dengan nilai ($p < 0,05$).

Hasil: Penghitungan jumlah mikrokoloni EEDAI dosis 500µg/ml, 1000µg/ml dan 2000µg/ml ($p < 0,05$) secara berturut-turut adalah 30,20±11.906 unit sel, 30,54±14,701 unit sel dan 21,44±13,316 unit sel. Hasil perhitungan *cluster* EEDAI dosis 500µg/ml, 1000µg/ml dan 2000µg/ml ($p < 0,05$) secara berturut-turut 46,88±59,157 unit sel, 194,00±62,712 unit sel dan 152,06±100,360 unit sel. Hasil uji LSD ($p < 0,05$) menunjukkan EEDAI dosis 2000µg/ml setara dengan ozyme® dalam menurunkan mikrokoloni dan *cluster* biofilm *S. aureus*.

Kesimpulan: EEDAI menurunkan jumlah mikrokoloni dan *cluster* pada dosis 2000µg/ml setara dengan ozyme®. EEDAI memiliki kemampuan dalam mengeradikasi biofilm *S. aureus*

Kata Kunci: Mimba, *Azadirachta indica*, Biofilm, Antibiofilm, *Staphylococcus aureus*

*Korespondensi:

Rio Risandiansyah, S. Ked., MP., PhD (riorisandiansyah@unisma.ac.id)
Jl. MT Haryono 193, Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

EFFECT OF NEEM LEAF (*Azadirachta indica*) ETHANOL EXTRACT IN REDUCING MICROCOLONY AND CLUSTER OF *Staphylococcus aureus* BIOFILM ON ABIOTIC SURFACE

Ahmad Akbar Syarib, Noer Aini, Rio Risandiansyah *
Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: *Staphylococcus aureus* is the bacteria that causes nosocomial infections and can form a biofilm on an abiotic surface. The biofilm can protect itself from antibiotic so special treatment is needed to eradicate it. Strategies for using herbs as anti-biofilm agents are still being developed today. *Azadirachta indica* is a plant that has antibacterial properties. However, its effect on biofilm disruption is still under investigation..

Methods: This research uses the Direct Microscopic Observation method to create *S. aureus* biofilms with slide placed on sterile petriplate with BHIB+5% sucrose as a medium for bacterial growth. Slide were incubated for 72 hours at 37°C. The results of maceration of 70% ethanol extract of *A. indica* leaves (EEDAI) was diluted using *Dymethyl Sulfoxide* (DMSO) with three dose groups 500µg/ml, 1000µg/ml and 2000µg/ml. The positive control used was an enzymatic disinfectant (Ozyme®), while the negative control was aquadest and *dymethyl sulfoxide* (DMSO). This study used three repetition with 10 microscopic observation fields which were then converted and calculated using *Image J* software Data were analysed using one-way ANOVA followed by Least Significance Difference (LSD) test $p < 0.05$.

Results: It was observed EEDAI at dose of 500µg/ml, 1000µg/ml and 2000µg/ml in microcolony counts of 30,20±11.906 cells unit, 30,54±14,701 cells unit and 21,44±13,316 cells unit respectively. The cluster calculations were 46.88 ± 59,157 cell units, 194.00 ± 62,712 cell units and 152.06 ± 100,360 cell units, respectively. LSD test results ($p < 0.05$) showed that EEDAI at a dose of 2000µg/ml was equivalent to Ozyme® in reducing *S. aureus* microcolonies and biofilm clusters.

Conclusion: EEDAI at dose of 2000µg/ml reduce the number of microcolonies and clusters biofilms of *S. aureus* equivalent to ozyme® and has ability to eradicate *S. aureus* biofilm

Keywords: Neem, *Azadirachta indica*, Biofilms, Antibiofilms, *Staphylococcus aureus*

*Correspondence:

Rio Risandiansyah, S. Ked., MP., PhD (riorisandiansyah@unisma.ac.id)
Jl. MT Haryono 193, Malang, Jawa Timur, Indonesia, 65144

PENDAHULUAN

Bakteri *S. aureus* merupakan salah satu bakteri penyebab infeksi nosokomial yang dapat membentuk biofilm pada permukaan abiotik². Sekitar 50% infeksi nosokomial terjadi pada peralatan medis yang digunakan pasien¹. Peralatan tersebut menjadi tempat ideal bagi *S. aureus* untuk membentuk komponen multiseluler kompleks disatukan oleh matriks polimer ekstraseluler yang disebut biofilm¹. Pembentukan biofilm pada akhirnya akan meningkatkan infeksi dan memerlukan dosis tinggi antibiotik untuk mengeradikasinya³. Kasus ini menjadi lebih serius karena sifat resistensi yang dimiliki *S. aureus* sehingga perlu penanganan yang tepat dalam mengatasi hal ini^{1,2}.

Upaya dalam menangani biofilm meliputi penghambatan sebelum biofilm terbentuk atau pengeradikasian biofilm yang telah terbentuk². Hingga saat ini dua hal tersebut masih terus dipelajari mulai dari penggunaan obat-obatan sintetik hingga herbal sebagai salah satu *etnomedicine*¹. Daun mimba (*Azadirachta indica*) merupakan salah satu herbal yang digunakan di Indonesia sebagai obat tradisional³. Penelitian terdahulu melaporkan fraksi daun *A. indica* memiliki aktivitas antibakteri dengan kandungan senyawa metabolit sekunder paling banyak⁴⁻⁶. Penelitian sebelumnya terkait efek antibiofilm ekstrak daun *A. indica* dilaporkan dapat menghambat agregasi planktonik bakteri *S. aureus* dalam membentuk biofilm, akan tetapi efek terhadap eradikasi biofilm bakteri *S. aureus* setelah terbentuk mikrokoloni dan *cluster* masih belum diteliti⁶.

Penelitian terkait biofilm dan strategi dalam mengeliminasinya merupakan studi yang penting pada saat ini. Pengujian kemampuan ekstrak etanol daun *A. indica* (EEDAI) dalam penghancuran biofilm *S. aureus* pada penelitian ini dilakukan setelah biofilm terbentuk. Kuantifikasi yang dilakukan adalah penghitungan jumlah mikrokoloni dan *cluster* dengan menggunakan *software Image J*⁷.

METODE PENELITIAN

Desain dan Sampel Penelitian

Penelitian eksperimental laboratorium menggunakan desain penelitian *in vitro* dalam mengeradikasi biofilm *S. aureus* menggunakan senyawa aktif EEDAI yang di dapatkan dari Widiyana⁴. Sampel Bakteri *S. aureus* didapatkan dari Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Tempat dan Waktu Penelitian

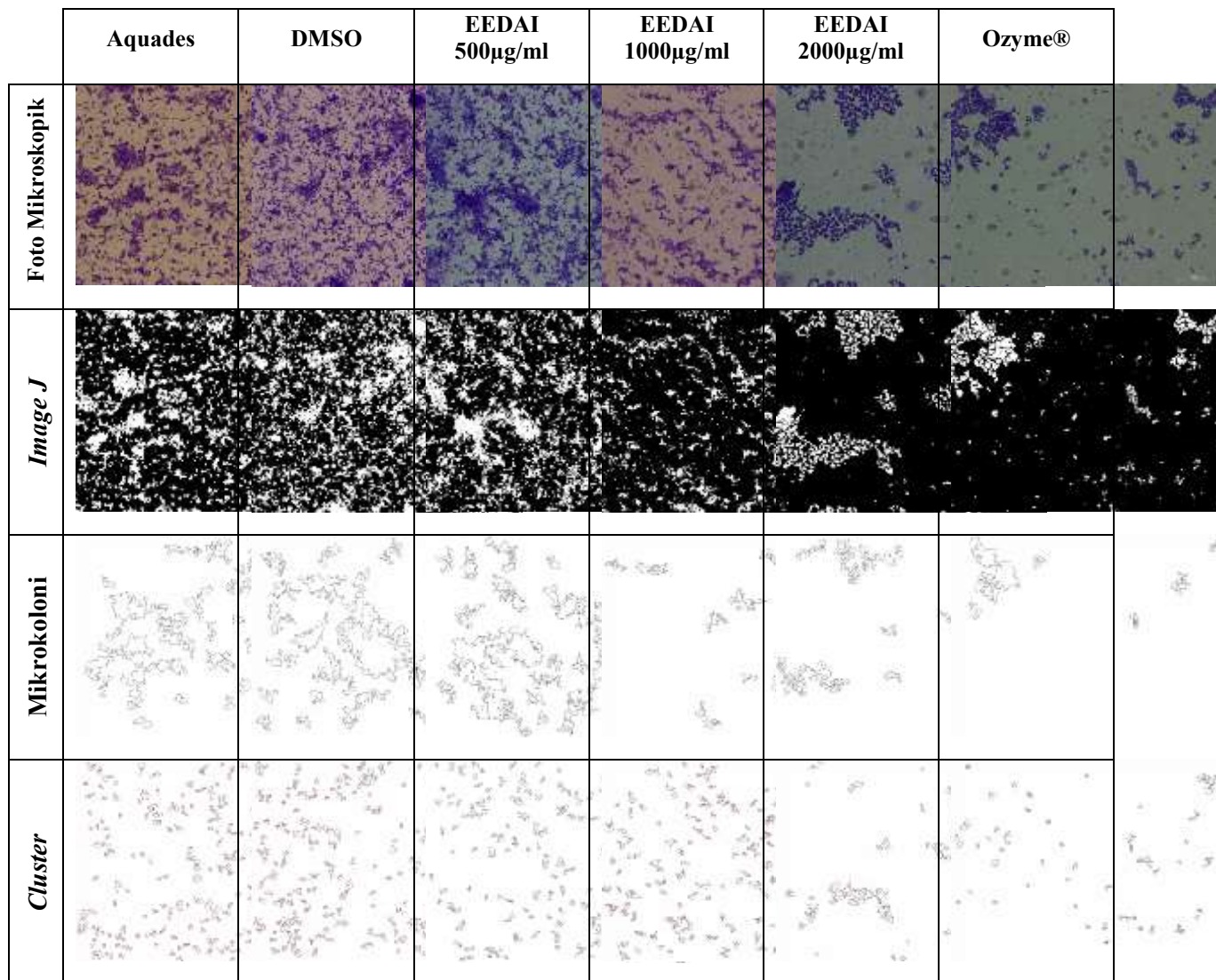
Penelitian ini telah dilaksanakan pada bulan September-Oktober 2023 bertempat di Laboratorium Pusat Riset Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Pembuatan Biofilm Metode *Direct Microscopic Observation*

Pembuatan kultur strain *S. aureus* menggunakan media *Brain Heart Infusion Broth* (BHIB) + sukrosa 5% yang dibuat sebanyak 25 mL. Media tersebut dimasukkan kedalam cawan petri yang sudah diisi *object glass (slide)* steril sebanyak 6 buah. Setiap cawan petri yang sudah diisi BHIB + 5% sukrosa dan *slide* didalamnya ditambahkan 250µl bakteri *S. aureus* dengan standar *McFarland* 0,5% ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) kemudian di inkubasi 72 jam dengan suhu 37°C tanpa pengocokan. Setelah di inkubasi selama 72 jam *slide* dikeluarkan dari inkubator secara aseptik. Masing-masing *slide* dikelompokkan menjadi kontrol negatif direndam dengan aquades selama 5 menit, kelompok direndam dengan *dymethyl sulfoxide* (DMSO) selama 5 menit, kontrol positif direndam dengan ozyme® selama 5 menit, dan konsentrasi kelompok perlakuan EEDAI dengan konsentrasi dosis 500µg/ml, 1000µg/ml dan 2000µg/ml yang dilarutkan dengan DMSO kemudian direndam selama 5 menit. Selanjutnya *slide* direndam kembali dengan *Phosphate Buffer Saline* (PBS) dan difiksasi dengan 2% sodium asetat masing-masing selama 1 menit. Pewarnaan dilakukan dengan perendaman Kristal violet 0.1% selama 1 menit. *Slide* kemudian direndam dengan aquades dan dikeringkan pada suhu ruangan selama 5-10 menit⁸.

Pengambilan Foto Lapang Pandang Dan Penghitungan Jumlah Mikrokoloni-Cluster dengan *Image J*

Pengambilan foto lapang pandang (**Gambar 1**) menggunakan mikroskopik trinokuler dengan perbesaran 1000 kali minyak emersi sebanyak 10 lapang pandang setiap kelompok perlakuan. Masing-masing foto hasil mikroskop trinokuler dikonversi menjadi 8 bit dengan *software image J* yang selanjutnya mengatur *Threshold* dan membuat *Binary*. Kemudian mengubah skala ukuran menjadi 226 dalam pixel dan 200µm untuk ukuran yang diketahui. Kemudian melakukan analisis dengan memasukkan ukuran mikrokoloni ($1500\text{-infinity}\mu\text{m}^2$) dan *cluster* ($200\text{-}1499\mu\text{m}^2$).



Gambar 1. Hasil Dokumentasi Biofilm *S. aureus* dari Mikroskop Trinokuler dan *Image J* Setiap Kelompok Perlakuan

Keterangan: Pengambilan foto mikroskopik masing-masing kelompok perlakuan dilakukan sebanyak 10 LP. Penggunaan konversi foto mikroskopik menjadi format 8 bit menggunakan *software image j* dapat dilihat pada gambar diatas. Gambaran yang berbeda terlihat setelah memasukkan format ukuran kedalam *software image j* dengan ukuran mikrokoloni 1500-infinity μm^2 dan *cluster* 200-1499 μm^2

Analisa Data

Hasil data jumlah mikrokoloni dan *cluster* biofilm *S. aureus* telah diuji normalitas dan homogenitasnya menggunakan SPSS versi 26 dilanjutkan dengan uji *Oneway ANOVA* ($p < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji *Pos Hoc Test LSD*.

HASIL PENELITIAN

Hasil Perhitungan Jumlah Mikrokoloni EEDAI

Hasil perhitungan jumlah mikrokoloni biofilm *S. aureus* dapat dilihat pada **Tabel 1**. Kelompok kontrol negatif (perendaman aquades) didapatkan hasil $38,38 \pm 13,275$ unit sel. Kelompok perendaman dengan DMSO didapatkan $44 \pm 8,047$ unit sel. Kelompok perendaman kontrol positif ozyme® didapatkan $17,81 \pm 10,309$ unit sel.

Kelompok perendaman dengan EEDAI 500µg/ml, 1000µg/ml, dan 2000µg/ml berturut-turut didapatkan $30,20 \pm 11,906$ unit sel, $30,54 \pm 14,701$ unit sel dan $21,44 \pm 13,316$ unit sel. Dosis EEDAI 2000µg/ml menunjukkan hasil yang setara dengan kontrol positif ozyme® dalam penurunan jumlah mikrokoloni. Dosis 500µg/ml dan 1000µg/ml dapat menurunkan jumlah mikrokoloni dibandingkan kelompok kontrol negatif akan tetapi tidak seefektif dosis 2000µg/ml. Hasil dari uji lanjut *Post-hoc LSD* menunjukkan bahwa nilai signifikansi perbedaan rerata antar kelompok dengan nilai 0,000 ($p < 0,05$) sehingga dapat dijelaskan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna rerata jumlah mikrokoloni antar kelompok perlakuan.

Tabel 1. Rerata Perhitungan Mikrokoloni dan Cluster EEDAI

Kelompok Perlakuan	Mikrokoloni	<i>p</i>	Cluster	<i>p</i>
Aquades ^{c,d,e,f}	38,38±13,275	0,000	199,28±69,249	0,000
DMSO ^{c,d,e,f}	44,00±8,047		188,03±60,923	
Ozyme® ^{a,b,d,e}	17,81±10,309		157,60±99,905	
EEDAI 500µg/ml ^{a,b,c,f}	30,20±11,906		246,88±59,157	
EEDAI 1000µg/ml ^{a,b,c,f}	30,54±14,701		194,00±62,712	
EEDAI 2000µg/ml ^{a,b,d,e}	21,44±13,316		152,06±100,360	

Keterangan notasi menunjukkan perbedaan nilai dalam rerata ± standar deviasi dengan signifikansi ($p < 0,05$ uji LSD) a: aquades, b: DMSO, c: ozyme®, d: EEDAI 500µg/ml, e: EEDAI 1000µg/ml dan f: EEDAI 2000µg/ml.

Hasil Perhitungan Jumlah Cluster EEDAI

Hasil perhitungan jumlah *cluster* biofilm *S. aureus* dapat dilihat pada **Tabel 1**. Kelompok kontrol negatif (perendaman aquades) 199,28±69,249 unit sel. Perendaman dengan DMSO berjumlah 188,03±60,923 unit sel. Kelompok kontrol positif (ozyme®) berjumlah 157,60±99,905 unit sel. Perendaman dengan EEDAI 500µg/ml, 1000µg/ml, dan 2000µg/ml berturut-turut sebesar 46,88±59,157 unit sel, 194,00±62,712 unit sel dan 152,06±100,360 unit sel. Dosis EEDAI 2000µg/ml menunjukkan hasil setara dengan ozyme® dalam menurunkan jumlah *cluster* biofilm *S. aureus*. Hasil dari uji lanjut *Post-hoc* LSD menunjukkan bahwa nilai signifikansi perbedaan rerata antar kelompok dengan nilai 0,000 ($p < 0,05$) sehingga dapat dijelaskan bahwa terdapat perbedaan yang bermakna rerata jumlah *cluster* antar kelompok perlakuan.

PEMBAHASAN

Efek EEDAI terhadap Mikrokoloni Biofilm *Staphylococcus aureus*

Hasil penelitian efek EEDAI terhadap jumlah mikrokoloni biofilm *S. aureus* didapatkan perbedaan signifikan antara kelompok kontrol positif dengan EEDAI 500µg/ml dan 1000µg/ml sedangkan pada EEDAI 2000µg/ml tidak didapatkan perbedaan bermakna. Seperti diketahui ozyme® sebagai salah satu disinfektan antibiofilm enzimatis dapat menghancurkan biofilm. Hal ini dimungkinkan kandungan multi enzim yang ada dalam ozyme® yaitu protease, lipase, amilase, selulosa dan agen antikorosif yang berperan mempengaruhi biofilm *S. aureus*. Penelitian sebelumnya mengatakan disinfektan enzimatis dapat mendispersi biofilm bakteri *S. aureus*¹¹. Efek dari enzim melisis sel bakteri dan mendispersi penempelan *S. aureus* pada permukaan inang¹².

EEDAI 2000µg/ml menunjukkan efek paling baik terhadap penurunan jumlah mikrokoloni biofilm *S. aureus* dibandingkan 500µg/ml dan 1000µg/ml, dan setara dengan ozyme®. Hal ini diduga kandungan senyawa aktif *A. indica* pada 2000µg/ml lebih optimal dan mempunyai efek sinergis sehingga dapat menghambat bakteri *S. aureus*^{4,7,13}. Mekanisme penghambatan EEDAI pada biofilm *S. aureus*

diduga menghambat produksi interseluler adesi polisakarida atau bisa berefek pada dinding sel *S. aureus* dengan hidrofobitasnya⁷, sehingga dapat menghancurkan susunan mikrokoloni. Efek mekanisme secara detail dari masing-masing senyawa aktif EEDAI hingga saat ini belum diketahui.

Efek EEDAI terhadap Cluster Biofilm *Staphylococcus aureus*

Hasil perhitungan *cluster* kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif menunjukkan perbedaan signifikan. Efek dari disinfektan enzimatis ozyme® dalam menurunkan jumlah *cluster* belum diketahui secara pasti, akan tetapi kemungkinan melalui mekanisme yang sama seperti penghancuran mikrokoloni melalui pelisisan dan hidrofobitas⁹. EEDAI dosis 2000µg/ml menunjukan hasil yang sama dengan ozyme® ($p < 0,05$), sedangkan dosis 500µg/ml dan 1000µg/ml tidak menunjukkan hasil signifikan dalam menurunkan *cluster* biofilm *S. aureus*. Hal ini menunjukkan kandungan senyawa aktif dari EEDAI efektif dalam menurunkan jumlah *cluster*. Mekanisme secara detail perlu dipelajari lebih lanjut bagaimana efek dari senyawa aktif dapat mengeradikasi susunan *cluster* biofilm *S. aureus*.

Penghitungan *cluster* menjadi penting dikarenakan *S. aureus* diketahui berkoloni dalam komunitas kecil (sel dengan sel atau sel dengan matriks) dengan ukuran 5 hingga 20 sel¹⁰. *S. aureus* yang telah membentuk *cluster* ini akan membentuk susunan mikrokoloni melalui formasi adesi interseluler polisakarida, sehingga penting dalam mengeradikasinya untuk mencegah pembentukan biofilm baru⁶.

Peranan EEDAI dalam Mengeradikasi Biofilm *Staphylococcus aureus*

Pembentukan biofilm *S. aureus* memiliki peranan faktor virulensi yang dapat memberikan efek terhadap masalah kesehatan terutama pada peralatan medis seperti ventilator, kateter dan alat pacu jantung¹¹. Hal ini memerlukan tindakan khusus seperti penggantian alat medis yang telah digunakan, memberikan antibiotik dengan dosis tinggi atau menggunakan alternatif lain¹². Kasus ini bisa menjadi lebih serius ketika bakteri resisten terhadap antibiotik seperti *Methicilin Resistance*

Staphylococcus aureus (MRSA)¹, oleh karena itu perlu penemuan agen antibiofilm baru yang dapat menghancurkan formasi biofilm yang telah terbentuk. Struktur dari biofilm terdiri dari komunitas besar (mikrokoloni) dan komunitas kecil (sel dengan sel atau sel dengan matrix) seperti *cluster*¹⁰. Dalam hal ini, penghitungan jumlah mikrokoloni dan *cluster* menjadi ukuran keberhasilan senyawa uji menghancurkan biofilm bakteri *S. aureus*. Pembentukan mikrokoloni dan *cluster* bergantung pada eksopolisakarida dan kondisi lingkungan media tumbuh serta dipengaruhi oleh bakteri itu sendiri¹⁰.

Hasil uji pengukuran jumlah mikrokoloni dan *cluster* EEDAI dosis 2000µg/ml efektif dalam menurunkan keduanya serupa dengan ozyme®. Beberapa penelitian sebelumnya terkait efek antibiofilm daun *A. indica* terhadap biofilm *Pseudomonas aeruginosa* yaitu kandungan senyawa aktif daun *A. indica* dapat mempengaruhi proses pembentukan dan mengganggu hidrofobisitas bakteri tersebut¹³. Efek daun mimba terhadap biofilm *Enterococcus faecialis* yaitu kandungan senyawa aktif terpenoid dapat merusak sel planktonik dan mengganggu integritas membran sel bakteri, kandungan *fatty acid* dapat menghambat proses *quorum sensing*, dan alkaloid dapat mengeliminasi atau menghambat proses pembentukan biofilm⁵. Pada penelitian ini EEDAI dapat mengeradikasi biofilm *S. aureus* pada permukaan abiotik yang telah terbentuk. Pengeradikasan ditunjukkan dari hasil pengukuran mikrokoloni dan *cluster* yang mengalami penurunan dibandingkan dengan kelompok kontrol negatif. Penurunan jumlah tersebut diduga karena mengganggu hidrofobisitas biofilm *S. aureus*, akan tetapi perlu penelitian lebih lanjut dalam memastikan hal tersebut.

KETERBATASAN PENELITIAN

Dalam penelitian ini penggunaan *software Image J* sebagai alat untuk mengukur mikrokoloni dan *cluster* memiliki keterbatasan sehingga perlu dipelajari lebih lanjut atau mengganti dengan *software* yang lain.

KESIMPULAN

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa:

1. EEDAI mampu menurunkan jumlah mikrokoloni biofilm *S. aureus* pada dosis 2000µg/ml setara dengan ozyme®
2. EEDAI mampu menurunkan jumlah *cluster* pada dosis 2000µg/ml setara dengan ozyme®
3. EEDAI memiliki kemampuan dalam mengeradikasi biofilm *S. aureus* ditandai

dengan penurunan mikrokoloni dan *cluster* yang disebabkan kandungan senyawa aktif ekstrak dalam merusak susunan biofilm.

SARAN

1. Melakukan peningkatan dosis dan waktu yang lebih beragam penggunaan ekstrak etanol daun *A. indica* terhadap biofilm *S. aureus*.
2. Menggunakan media selain kaca sebagai tempat pertumbuhan biofilm *S. aureus*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada Ikatan orang tua mahasiswa (IOM) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang yang telah mendanai penelitian ini, Ibu Anita Widiyana, S. Farm., M. Farm., Apt yang memberikan sampel ekstrak etanol 70% daun *A. Indica* dan dr. Rahma Triliana, M.Kes., PhD sebagai *peer reviewer*.

DAFTAR PUSTAKA

1. Idrees M, Sawant S, Karodia N, Rahman A. *Staphylococcus aureus* biofilm: Morphology, genetics, pathogenesis and treatment strategies. **Int J Environ Res Public Health**. 2021;18(14).
2. Ford CA, Hurford IM, Cassat JE. Antivirulence Strategies for the Treatment of *Staphylococcus aureus* Infections: A Mini Review. **Front Microbiol**. 2021;11(January):1–10.
3. Andhiarto Y, Andayani R, Ilmiyah NH. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 96% Daun Mimba (*Azadirachta indica* A. Juss.) Dengan Metode Ekstraksi Perkolasi Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. **J Pharm Sci Technol**. 2021;2(1):102–11.
4. Widiyana AP, Illian DN. Phytochemical Analysis and Total Flavonoid Content on Ethanol and Ethyl Acetate Extract From Neem (*Azadirachta Indica* Juss.) Leaves Utilizing Uv–Vis Spectrophotometric. **J Farm Sains dan Prakt**. 2022;8(1):71–7.
5. Suhartono S, Soraya C, Shabira P. Antibiofilm activity of neem leaf (*Azadirachta indica* A. Juss) ethanolic extracts against *Enterococcus faecalis* in vitro. **Dent J (Majalah Kedokt Gigi)**. 2023;56(2):98–103.
6. Quelemes P V., Perfeito MLG, Guimarães MA, Dos Santos RC, Lima DF, Nascimento C, et al. Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on

- resistant *Staphylococcus aureus* biofilm formation and *Schistosoma mansoni* worms. **J Ethnopharmacol** [Internet]. 2015;175:287–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2015.09.026>
7. Hartig SM. Basic image analysis and manipulation in imageJ. **Curr Protoc Mol Biol**. 2013;(SUPPL.102):1–12.
 8. Magesh H, Kumar A, Alam A, Priyam, Sekar U, Sumantran VN, et al. Identification of natural compounds which inhibit biofilm formation in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Indian J Exp Biol**. 2013;51(9):764–72.
 9. Hogan S, Zapotoczna M, Stevens NT, Humphreys H, O’Gara JP, O’Neill E. Potential use of targeted enzymatic agents in the treatment of *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections. **J Hosp Infect** [Internet]. 2017;96(2):177–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2017.02.008>
 10. Koo H. Dynamics of bacterial population growth in biofilms resemble spatial and structural aspects of urbanization. **Nat Commun** [Internet]. 2020;1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-15165-4>
 11. Roy R, Tiwari M, Donelli G, Tiwari V. Strategies for combating bacterial biofilms: A focus on anti-biofilm agents and their mechanisms of action. **Virulence**. 2018;9(1):522–54.
 12. Tuon FF, Suss PH, Telles JP, Dantas LR, Borges NH, Ribeiro VST. Antimicrobial Treatment of *Staphylococcus aureus* Biofilms. **Antibiotics**. 2023;12(1):1–24.
 13. Harjai K, Bala A, Gupta RK, Sharma R. Leaf extract of *Azadirachta indica* (neem): A potential antibiofilm agent for *Pseudomonas aeruginosa*. **Pathog Dis**. 2013;69(1):62–5.