

POTENSI FRAKSI AIR RIMPANG LENGKUAS PUTIH (*Alpinia galanga* W.) SEBAGAI AGEN ANTIBIOFILM

Safina Zulfa Wahana, Rio Risandiansyah, Citra Destya Rahma Putri *
Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri yang dapat menyebabkan infeksi nosokomial melalui pembentukan biofilm pada permukaan biotik dan abiotik, sehingga diperlukan agen antibiofilm baru. *Alpinia galanga* W merupakan salah satu herbal yang memiliki senyawa aktif dalam fraksi air, seperti flavonoid, tanin, dan terpenoid yang dapat berperan sebagai antibakteri. Namun, senyawa ini belum terbukti berperan sebagai agen antibiofilm. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui potensi fraksi air *Alpinia galanga* W sebagai agen antibiofilm.

Metode: Penelitian bersifat in vitro eksperimental dengan menumbuhkan biofilm *S. aureus* pada 96 wellplate yang telah diisi *Broth Heart Brain Infusion* (BHIB) + sukrosa 5% sebagai media pertumbuhan bakteri dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Kemampuan antibiofilm diukur dengan absorbansi kristal violet pada panjang gelombang 585 nm. Ekstraksi *Alpinia galanga* W menggunakan etanol 96% dilanjutkan dengan fraksinasi menggunakan pelarut air, dilarutkan kembali dalam dimetil sulfoksida (DMSO). Bakteri diberi perlakuan ekstrak setelah pertumbuhan 24 jam untuk mengukur penghancuran biofilm. Perbandingan antar kelompok ditentukan dengan ANOVA ($p < 0.05$).

Hasil: Uji destruksi menunjukkan perbedaan yang signifikan pada dosis 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm dengan kontrol negatif.

Kesimpulan: Fraksi air dari ekstrak etanol lengkuas putih dapat menghancurkan biofilm yang telah terbentuk. Penelitian lebih lanjut dapat dikembangkan dengan mengidentifikasi kualitas biofilm.

Kata kunci: *Alpinia galanga* W., fraksi air, antibiofilm, *Staphylococcus aureus*.

*Penulis Korespondensi:

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

THE POTENTIAL OF WHITE GALANGAL (*Alpinia galanga* W.) RIZHOME AQUEOUS FRACTION AS AN ANTIBIOFILM AGENT

Safina Zulfa Wahana, Rio Risandiansyah, Citra Destya Rahma Putri *
Faculty of Medicine, Islamic University of Malang

ABSTRACT

Background: *Staphylococcus aureus* can cause healthcare-associated infections via the formation of biofilms on biotic and abiotic surfaces, necessitating the need for novel antibiofilm agents. *Alpinia galanga* W is one of the herbs that has active compounds in aqueous fractions, such as flavonoids, tannins, and terpenes, which may act as antibacterial agents. However, these compounds have not yet been screened for antibiofilm activity. This study aimed to find out the potential of *Alpinia galanga* W aqueous fraction as an antibiofilm agent.

Methods: The research was an experimental in vitro study by growing biofilm of *S. aureus* on 96-well plates that had been filled with broth heart brain infusion (BHIB) + 5% sucrose as a bacterial growth medium and incubated for 24 hours at 37°C. Antibiofilm abilities were measured using crystal violet staining of biofilm and measuring its absorbance at 585 nm. Extraction of *Alpinia galanga* W using 96% ethanol, continued by fractionation with water, evaporated and reconstituted in dimethyl sulfoxide (DMSO). Bacteria were treated with extract after 24-hour growth to measure biofilm destruction. The between-group differences were determined using ANOVA ($p < 0.05$).

Results: The destruction tests showed significant result at doses 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, and 62,5 ppm with negative control.

Conclusion: The aqueous fraction of white galangal ethanolic extract can destroy preformed biofilm. Further research can be developed by identifying biofilm quality.

Keywords: *Alpinia galanga* W., water fraction, antibiofilm, *Staphylococcus aureus*.

*Correspondence:

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

PENDAHULUAN

Healthcare Associated Infections (HAIs) atau infeksi nosokomial merupakan kondisi dimana pasien yang sebelumnya tidak menunjukkan tanda-tanda infeksi, namun mengalami infeksi setelah masuk dan menerima perawatan di rumah sakit atau fasilitas kesehatan lain¹. *Healthcare Associated Infections* dapat berhubungan dengan infeksi alat medis seperti *Ventilator Associated Pneumonia* (VAP), Infeksi Aliran Darah Primer (IADP), Infeksi Saluran Kemih (ISK), dan *Catether-associated Urinary Tract Infections* (CAUTI)². Bakteri *Staphylococcus aureus* merupakan bakteri patogen yang sering berhubungan dengan alat medis, berkolonisasi dan menginfeksi pasien rawat inap di rumah sakit³.

Beberapa penelitian menyebutkan bahwa lebih dari 80% infeksi kronis disebabkan karena bakteri yang mengalami resistensi antibiotik akibat dari pembentukan biofilm. Kemampuan *Staphylococcus aureus* dalam membentuk biofilm menyebabkan bakteri ini sulit ditangani, dimana komponen *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) akan mencegah aktivitas antibakteri dengan cara menjadi penghalang fisik dan kimia terhadap antibiotik sehingga menyebabkan resistensi antibiotik. Faktor lain yang menjadi penyebab sulit ditanganinya bakteri ini adalah karena tingginya laju pertumbuhan, regulasi enzim penghancur antibiotik, *quorum sensing*, dan banyaknya protein yang berperan sebagai komponen adhesi serta pembentukan EPS⁴.

Rimpang *Alpinia galanga* W diketahui mengandung senyawa flavonoid yang memiliki kemampuan merusak layer lipid pada membran bakteri sehingga terjadi kebocoran intramembran⁵. Senyawa tanin yang terkandung dalam lengkuas putih diketahui menyebabkan dinding sel mengalami dehidrasi, menghambat bakteri untuk berkolonisasi⁶. Selain itu saponin yang terkandung dalam *Alpinia galanga* W diketahui dapat mengubah integritas membran sel bakteri sehingga kekuatan dinding sel berkurang⁷.

Pada sebuah penelitian menunjukkan bahwa ekstrak etanolik *Alpinia galanga* W signifikan menghambat bakteri *Staphylococcus aureus* dengan menggunakan uji MIC (*minimum inhibitory concentration*) 0,325 mg/ml dan MBC (*minimum bactericidal concentration*) 1,3 mg/ml. Pada pengamatan mikroskop elektron, penelitian ini menunjukkan ekstrak rimpang lengkuas menyebabkan kerusakan pada membran luar dan dalam bakteri, sehingga terjadi koagulasi sitoplasma⁸. Penelitian yang dilakukan Zhang melaporkan terdapat empat senyawa antibakteri yang diisolasi dari lengkuas putih dan salah satunya diidentifikasi 1'-asetoksikavikol asetat (ACA) yang diteliti efektif dapat menghambat jumlah bakteri *Staphylococcus aureus* yang resisten terhadap obat⁹.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi fraksi air dari ekstrak etanol rimpang *Alpinia galanga* W dalam menghancurkan biofilm matur bakteri *Staphylococcus aureus*.

METODE PENELITIAN

Desain, Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian laboratorium secara *in vitro* menggunakan metode mikrodilusi. Penelitian dilakukan di Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada bulan Juli hingga September tahun 2024.

Alat dan Bahan

Sampel pada penelitian ini adalah simplisia rimpang *Alpinia galanga* W dan bakteri *Staphylococcus aureus* yang didapatkan dari Laboratorium Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Ekstraksi simplisia

Ekstraksi dilakukan dengan menyiapkan 400g simplisia rimpang lengkuas dan dimaserasi dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:5 (w/v) dan dikocok dengan *waterbath shaker* selama 1 hari. Cairan yang dihasilkan kemudian disaring dengan *vacuum büchner*, lalu diuapkan menggunakan *vacuum rotary evaporator* sehingga didapatkan hasil berupa ekstrak dengan konsentrasi kental. Ekstrak kental yang dihasilkan dapat ditimbang dan dihitung persentase rendemennya^{10,11,12}.

Perhitungan hasil rendemen ekstrak

Persentase rendemen dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{berat ekstrak}}{\text{berat simplisia}} \times 100\%$$

Fraksinasi

Ekstrak kental lengkuas putih diambil lalu dilarutkan dalam aquadest hangat di dalam corong pisah dengan perbandingan 1:6 (w/v) yang berarti 100 ml ekstrak dalam 600 ml aquadest. Pelarut dimasukkan ke dalam corong pisah dengan urutan dari pelarut non-polar ke polar. N-heksana ditambahkan ke dalam corong pisah dengan volume yang sama dengan air. Lalu dikocok setiap 15 menit dan didiamkan selama 1 jam sehingga akan tercampur. N-heksana dipisahkan dengan air dari corong dengan cara dibuka untuk mengeluarkan air dan fraksi n-heksana yang didapatkan dipindah ke wadah baru. Rendaman kedua pada corong pisah ditambahkan pelarut etil asetat dengan volume yang sama dengan air, lalu dikocok setiap 15 menit dan didiamkan selama 1 jam sehingga senyawa akan tercampur. Etil asetat dipisahkan dengan air dari corong dengan cara dibuka untuk mengeluarkan air dan fraksi etil asetat dipindahkan ke wadah baru. Sisa air dalam corong pisah akan menjadi fraksi ketiga¹³.

Pembuatan sampel dosis inhibisi dan destruksi

Pembuatan dosis dilakukan dengan cara menimbang hasil fraksi yang didapat. Kemudian disiapkan tabung *micro tube* 1,5 mL sebanyak 5 buah untuk dosis destruksi. Hasil fraksi disuspensi dengan *dimethyl sulfoxide* (DMSO 3%) hingga mencapai dosis 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm. Uji destruksi biofilm menggunakan konsentrasi 1000 ppm. Sampel dosis destruksi siap digunakan sebagai kontrol perlakuan pada *wellplate* yang telah dimasukkan bakteri.

Uji fitokimia

- a. Uji flavonoid
Fraksi air yang telah diuapkan dan dioven disiapkan sebanyak 1 ml dan dilarutkan dengan 1 ml ethanol 96% lalu ditambahkan 0,1 gram magnesium P serta 10 mL HCl pekat. Apabila warna berubah menjadi merah jingga hingga merah ungu maka artinya fraksi mengandung senyawa flavonoid¹⁴.
- b. Uji tanin
Uji tanin dilakukan dengan menyiapkan 1 mL fraksi air dan diteteskan 3 tetes FeCl 10%. Sampel positif mengandung tannin apabila terjadi perubahan warna fraksi menjadi warna hijau kehitaman atau biru kehitaman¹⁵.
- c. Uji saponin
Dimasukkan sampel secukupnya pada tabung reaksi. Ditambahkan HCl beberapa tetes sambil dikocok perlahan selama 10 detik. Pembentukan busa yang stabil mengindikasikan adanya saponin pada sampel¹⁶.
- d. Uji alkaloid
Sebanyak 50 mg sampel dicampur dengan kloroform serta ammonia masing – masing sebanyak 2 ml, kemudian disaring. Filtrat diberikan 3-5 tetes asam sulfat pekat. Campuran dikocok hingga terbentuk dua lapisan yang terpisah dan fase asam pada lapisan bawah diambil. Kemudian, dilakukan uji kualitatif dengan menambahkan 4-5 tetes pereaksi Mayer dan Dragendorff secara terpisah. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih dengan pereaksi Mayer dan endapan merah jingga dengan pereaksi Dragendorff, yang merupakan karakteristik senyawa alkaloid¹⁷.
- e. Uji terpenoid
Fraksi air ekstrak etanol lengkuas disiapkan sebanyak 1g serbuk lalu dicampur dengan 2 tetes Ac2O dan 1 tetes H2SO4. Perubahan warna menjadi merah kecoklatan menunjukkan adanya terpenoid¹⁸.

Persiapan bakteri

Stok bakteri *S. aureus* diinokulasikan di media *Nutrient Agar* dan diinkubasi dengan suhu 37°C selama 24 jam, kemudian disimpan di kulkas pada suhu 4-8 °C dan diremajakan setiap 2 minggu¹⁹.

Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* pada 96 *wellplate*

Bakteri diinokulasi ke dalam 3-5 ml media pertumbuhan *Nutrient Agar*, ditumbuhkan pada suhu 37°C selama semalam. Bakteri yang telah diinkubasi diambil dan dilarutkan ke dalam tabung reaksi berisi NaCl dan disetarakan kekeruhannya dengan standar McFarland 0,5²⁰. BHIB + sukrosa 5% dimasukkan ke dalam *wellplate* menggunakan *multichannel pipette* sebanyak 200 µL. Bakteri sebanyak 20 µL ditambahkan ke *wellplate*²⁰. 96 *wellplate* dapat ditutup dengan penutup dan di inkubasi pada suhu 37°C. Inkubasi dilakukan 24 jam. Untuk pengujian destruksi biofilm, sampel ditambahkan pada jam ke 48.

Pewarnaan dan pembacaan biofilm

Setelah inkubasi, *wellplate* dikeluarkan secara perlahan dan dicuci dua kali dengan larutan *Phosphate Buffered Saline* (PBS) dengan pH 7,4 sebanyak 200 µL untuk melunturkan bakteri yang tidak menempel. Sampel perlakuan destruksi dimasukkan ke dalam *wellplate* sebanyak 120 µL pada kolom 7-10, dan dimasukkan DMSO 3% sebanyak 120 µL pada kolom 11E dan 11F sebagai kontrol positif destruksi, lalu didiamkan 10 menit. Setelah itu isi *wellplate* diambil dan dimasukkan kembali larutan PBS 200 µL dan dibuang. Metanol 96% dimasukkan pada seluruh baris *wellplate* untuk memfiksasi biofilm yang terbentuk pada *wellplate*. Isi *wellplate* dibuang kembali dan bakteri yang melekat pada *wellplate* difiksasi dengan pewarna kristal violet 0,1% sebanyak 150 µL dan dibiarkan selama 3 menit. Larutan kristal violet dibuang dan *wellplate* dicuci kembali dengan larutan PBS 200 µL kemudian dibiarkan kering. Pencucian *wellplate* dengan larutan PBS pasca pemberian kristal violet dilakukan sebanyak 2x. Biofilm yang terbentuk pada pewarnaan kristal violet ditambahkan asam asetat glasial 33% (v/v) sebanyak 150 µL dan dibiarkan selama 30 menit²⁰. Biofilm yang terbentuk pada *wellplate* dapat diukur dengan menggunakan pembacaan spektrofotometri dengan panjang gelombang 585 nm. Pada pembacaan spektrofotometri akan menghasilkan nilai sisa pembentukan biofilm sehingga dapat melakukan perhitungan persentase sisa biofilm²¹.

Perhitungan Biofilm Biomass Unit (BBU) dan nilai sisa biofilm

Kuantifikasi uji eradikasi biofilm dengan menggunakan pewarna *crystal violet* terhadap pembentukan biofilm dari strain *S. aureus*

dinyatakan dalam satuan biomassa biofilm (BBU) yang dapat dihitung dengan rumus :

$$BBU = \frac{\text{Absorbansi Crystal Violet}}{0,1}$$

Nilai persentase penghancuran biofilm terbentuk dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ sisa biofilm} = \frac{KN - KP}{KN} \times 100\%$$

Keterangan :

KN (Kontrol Negatif) = media BHIB + sukrosa 5%
KP (Kelompok Perlakuan) = kelompok dengan pemberian herbal

HASIL DAN ANALISIS DATA

Hasil Pengujian Fitokimia Fraksi Air Ekstrak Etanol *Alpinia galanga* W.

Hasil pengujian fitokimia fraksi air ekstrak etanol rimpang *Alpinia galanga* W yang dilakukan secara kualitatif dengan mengidentifikasi golongan senyawa berdasarkan perubahan warna pada sampel. Hasil analisis kualitatif skrining fitokimia dapat dilihat pada **tabel 1**.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Fraksi Air Ekstrak Etanol Rimpang *Alpinia galanga* W.

Pengujian	Hasil
Flavonoid	Negatif
Tanin	Negatif
Saponin	Negatif
Terpenoid	Positif
Alkaloid	Negatif
	Negatif

Dari **tabel 1** menunjukkan hasil uji fitokimia pada fraksi air ekstrak etanol *Alpinia galanga* W dan didapatkan hasil positif mengandung terpenoid.

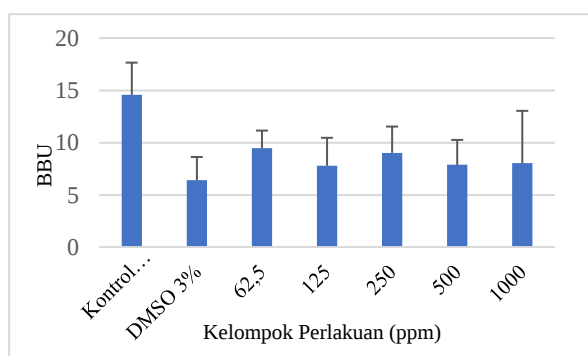
Hasil Nilai Absorbansi Biofilm Pada Pewarnaan Crystal Violet

Hasil nilai absorbansi biofilm yang telah terbentuk pada pewarnaan *crystal violet* yang diukur menggunakan spektrofotometer dikonversikan dengan nilai *Biofilm Biomass Unit* (BBU) yang ditunjukkan pada **tabel 2**. Berdasarkan uji statistik *oneway ANOVA* memiliki perbedaan yang bermakna antara kelompok perlakuan 1000 ppm, 500 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm dengan kontrol negatif dengan nilai sig 0,00 ($p < 0,05$).

Tabel 2. Hasil Biofilm Biomass Unit Uji Destruksi Biofilm *Staphylococcus aureus*

Kelompok perlakuan	Rata-rata BBU	SD	Upper Bound	Lower Bound
1000 ppm	8,01	2,21	12,73	2,52
500 ppm	7,95	1,69	12,23	3,63
250 ppm	9,83	2,90	14,12	4,68
125 ppm	8,39	3,06	13,51	1,85
62,5 ppm	9,41	2,33	17,92	0,71
DMSO 3%	12,13	3,07	25,22	0,735
Kontrol Negatif	14,57	3,99	22,57	6,69

Keterangan : Berdasarkan uji statistik *oneway ANOVA* memiliki perbedaan yang bermakna dengan nilai sig 0,00 ($p < 0,05$) pada dosis 1000 ppm, 500 ppm, 125 ppm, 62,5 ppm dengan kontrol negatif.



Gambar 1. Histogram hasil BBU Uji Destruksi Biofilm *Staphylococcus aureus*

Keterangan : Histogram di atas menunjukkan perbedaan rata – rata BBU uji eradikasi biofilm *Staphylococcus aureus* pada berbagai dosis (a) terhadap kontrol negatif (b), tetapi tidak signifikan dibandingkan dengan kelompok c.

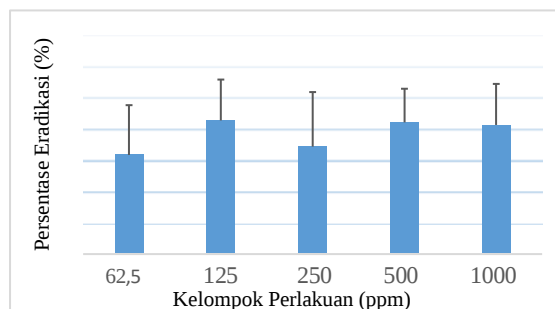
Hasil Pengujian Destruksi Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil pengujian destruksi biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* tertera pada **tabel 2**.

Tabel 2. Hasil Uji Destruksi Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus*.

Dosis	$\bar{X} \pm SD$
62,5 ppm	33,74 $\pm$ 17,16 ^a
125 ppm	45,64 $\pm$ 14,08 ^a
250 ppm	36,62 $\pm$ 18,79 ^a
500 ppm	44,98 $\pm$ 11,58 ^a
1000 ppm	44,09 $\pm$ 14,13 ^a

Keterangan : Berdasarkan pengujian statistik *oneway* ANOVA memiliki perbedaan yang tidak signifikan dengan nilai sig 0.00 ($p < 0.05$).

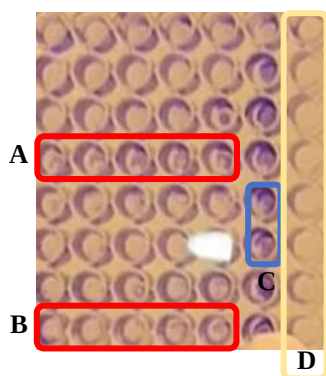


Gambar 1. Histogram perhitungan hasil destruksi biofilm pada berbagai dosis yang diuji

Keterangan : Hasil histogram diatas menunjukkan perbedaan persentase efek uji destruksi antibiofilm pada berbagai dosis. Nilai persentase tertinggi pada dosis 125 ppm sebesar 45,64 dengan hasil signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif ($p < 0,05$). Nilai destruksi yang didapat tidak mengikuti dosis atau tidak terdapat *dose response* yang berarti semakin tinggi atau rendahnya dosis yang diberikan akan mempengaruhi tinggi atau rendahnya hasil persentase destruksi.

Hasil Uji Destruksi Pada Pewarnaan *Crystal Violet* Pada 96 Wellplate

Hasil pengamatan pembentukan biofilm tersisa pada 96 wellplate dengan menggunakan pewarna *crystal violet*, dapat dilihat pada **Gambar 2**.



Gambar 2. Hasil Pengamatan Absorbansi *Crystal Violet* Pada 96 Wellplate

Keterangan : Pada wellplate kolom A dan B yang berwarna merah merupakan kolom pengujian destruksi biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Kolom C merupakan kontrol positif yang berisi bakteri dan DMSO 3%, sementara kolom D merupakan kontrol negatif yang berisi media BHIB + 5% sukrosa. Hasil pengamatan pada kolom uji destruksi biofilm (kolom A dan B) yang didapatkan setelah pembacaan spektrofotometer, tampak warna

dari *crystal violet* yang pudar pada wellplate. Warna *crystal violet* yang hilang menunjukkan berkurangnya jumlah biofilm yang menempel pada wellplate.

PEMBAHASAN

Uji Fitokimia Fraksi Air Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Putih (*Alpinia galanga* W.)

Pada penelitian ini, fraksi air dari ekstrak etanol rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* W.) mengandung senyawa terpenoid yang ditunjukkan oleh adanya perubahan warna sampel menjadi coklat kemerahan yang ditunjukkan pada **tabel 1**. Metode ekstraksi dilakukan dengan pelarut etanol 96% yang dipilih dengan alasan kemampuannya yang bagus dalam melarutkan senyawa semipolar dan memberikan nilai rendemen ekstrak yang lebih tinggi²². Pelarut etanol diketahui lebih mudah menembus membran sel untuk mengekstrak bahan intraseluler dari tanaman herbal²³.

Parameter penting dalam mendapatkan nilai rendemen ekstrak yang bagus ditentukan oleh jenis pelarut, waktu ekstraksi, kecepatan agitasi, rasio sampel dengan pelarut, dan suhu yang digunakan. Sifat pelarut yang ideal dalam ekstraksi harus memiliki toksisitas rendah, memiliki volatilitas tinggi pada suhu rendah, meningkatkan kecepatan dalam penyerapan fisiologis, dan tidak menyebabkan ekstrak menjadi kompleks atau terdisosiasi²⁴. Proses fraksinasi bertujuan untuk memisahkan senyawa organik dengan memanfaatkan dua sifat yaitu ionisasi dan polaritas. Parameter dalam keberhasilan fraksinasi yaitu pemilihan pelarut ekstraksi, urutan pengujian pelarut, laju aliran, dan jumlah tahapan yang optimal²⁵.

Hasil uji fitokimia dalam penelitian ini menunjukkan bahwa fraksi air dari ekstrak etanol rimpang lengkuas putih hanya mengandung senyawa terpenoid. Sedikitnya senyawa yang dapat ditarik oleh fraksi air dapat disebabkan karena proses ekstraksi dengan menggunakan suhu yang tinggi atau pengadukan dengan waktu yang lama. Fraksi air yang digunakan merupakan hasil sisa proses fraksinasi dari pelarut n-heksana dan etil asetat, sehingga senyawa – senyawa yang berperan sebagai antibiofilm dalam ekstrak etanol rimpang lengkuas tertarik oleh pelarut awal yang digunakan saat proses fraksinasi. Dalam beberapa penelitian menyebutkan kelemahan air sebagai pelarut, yaitu dapat menyebabkan hidrolisis dan membutuhkan panas yang tinggi untuk menghasilkan ekstrak yang baik²⁶.

Pada rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* W.) terdapat beberapa senyawa turunan terpenoid, diantaranya 1,8 cineole, alpha-

bergamotene, alpha-copaene, alpha-humulene, alpha-pinene, alpha-terpineol, carveol-I, carveol-II, eugenol, limonene, linalool, terpinolene, geraniol, dan camphor yang beberapa diantaranya memiliki aktivitas sebagai antibiofilm²⁶.

Uji Destruksi Fraksi Air Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Putih (*Alpinia galanga* W.) terhadap Jumlah Mikrokoloni *Staphylococcus aureus*

Hasil uji destruksi berdasarkan jumlah mikrokoloni *S. aureus* menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang bermakna ($p > 0.05$) antara fraksi air dosis 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm dibandingkan dengan kelompok tanpa perlakuan dan DMSO 3%. Hasil pengamatan langsung pada 96 wellplate menunjukkan pewarna *crystal violet* luntur, yang berarti berkurangnya jumlah biofilm yang menempel. Walaupun hasil uji destruksi menunjukkan fraksi air dari ekstrak etanolik *Alpinia galanga* W dapat mendestruksi biofilm *S. aureus* sebesar 45,64 %, namun hasil yang didapat tidak signifikan dibandingkan dengan DMSO 3%. Dimethyl sulfoxide (DMSO) merupakan molekul yang ideal untuk melarutkan molekul polar dan non-polar yang sulit larut. Penggunaan DMSO 2% dapat meningkatkan kelarutan yang tinggi yang merupakan parameter terpenting dalam bioavailabilitas seluler²⁷. Menurut beberapa penelitian, DMSO dapat berperan sebagai penghambat biofilm. Namun, dalam beberapa kasus dengan penggunaan dosis tertentu dapat mendorong pembentukan biofilm pada konsentrasi yang rendah ($< 2\%$)^{28,29,30}.

Uji antibiofilm dengan menggunakan 96 wellplate dianggap sebagai metode standar untuk kuantifikasi pembentukan biofilm *S. aureus* secara in vitro³¹. Pengujian ini menunjukkan kemampuan strain klinis *S. aureus* untuk membentuk biofilm dengan 96 wellplate^{32,33,34}.

Media pertumbuhan bakteri yang digunakan yaitu *Brain-heart Infusion Broth* (BHIB), merupakan media cair yang mengandung karbohidrat dan protein yang dapat digunakan sebagai media kultur pertumbuhan biofilm *S. aureus* dengan penambahan glukosa dengan jumlah tertentu^{35,36}. Pada sebuah penelitian antibiofilm oleh Freeman menggunakan media BHIB + 5% sukrosa sebagai metode alternatif untuk menumbuhkan biofilm bakteri^{37,38}. Metode pewarnaan *crystal violet* merupakan metode pengujian biofilm yang paling umum dan sering digunakan karena dapat melakukan pengukuran seluruh biomassa dan matriks biofilm³⁹. Pewarna *crystal violet* memiliki kemampuan untuk mengikat berbagai komponen sel bakteri, seperti DNA, protein, dan polisakarida EPS dengan cara yang tidak spesifik. Pada metode ini,

nilai OD (*optical density*) digunakan sebagai indikator jumlah bakteri yang menempel pada permukaan dan membentuk biofilm, lalu dilanjutkan dengan pengukuran spektrofotometer⁴⁰.

Terpenoid yang ditarik dari fraksi air ekstrak etanol rimpang lengkuas putih bertindak sebagai antibiofilm dengan menghambat pembentukan biofilm melalui penghambatan sintesis EPS melalui gangguan pada ekspresi selulosa⁴¹. Selain itu terpenoid menyebabkan kerusakan membran sel bakteri⁴².

Beberapa penelitian menunjukkan senyawa murni terpenoid polar carvacrol, thymol, dan eugenol diketahui memiliki efek antibiofilm terhadap berbagai bakteri, termasuk *Staphylococcus*⁴³⁻⁴⁶. Senyawa tersebut dikenal dengan kemampuannya sebagai antimikroba yang luas, terutama dalam merusak membran sitoplasma⁴⁷. Pada penelitian yang dilakukan Dimitria menguji senyawa murni terpenoid carvacrol, thymol, dan eugenol ditemukan memiliki hasil yang sama yaitu memiliki potensi antibiofilm yang meningkat terhadap bakteri *Staphylococcus*. Ketiga senyawa ini merupakan senyawa fenolik dengan sifat hidrofilik, diketahui mampu berinteraksi dengan lapisan lipid membran sitoplasma, yang menyebabkan kerusakan integritas, gangguan homeostasis pH intraseluler, dan kebocoran komponen intraseluler termasuk ATP⁴⁸.

Beberapa senyawa turunan dari terpenoid yaitu 1,8-Cineole, alpha-copaene, alpha-humulene, alpha-pinene, camphor, limonene, dan linalool yang terkandung dalam rimpang *Alpinia galanga* W. Senyawa – senyawa tersebut telah diteliti kemampuannya dalam merusak struktur serta menghancurkan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* dengan cara yang berbeda – beda. 1,8-Cineole yang termasuk dalam monoterpenoid telah diteliti memiliki efek penghambatan yang kuat terhadap *S. aureus*⁴⁹. Alpha-copaene termasuk golongan sesquiterpen, pada studi in-silico menunjukkan mekanisme *anti-quorum sensing* dengan cara menekan produksi AHL (*acyl-homoserine lactone*) yang merupakan salah satu sinyal bakteri dalam berkomunikasi dan berkoordinasi dalam membentuk biofilm, serta memblokir sekresi protein biofilm⁵⁰. Golongan sesquiterpen lain yang diketahui memiliki efek antibiofilm yaitu alpha-humulene. α -humulene dapat menurunkan koloni bakteri *S. aureus* (CFU/ml) pada uji kontak langsung yang dilakukan pada jam ke 1 dan 24. Pada bakteri gram positif *Bacteroides fragilis*, α -humulene dapat menghambat biofilm dengan MIC 2 μ g/ml dan MBC 8-32 μ g/ml yang juga dideteksi melalui *confocal laser scanning microscopy* (CLSM)⁵¹. Senyawa camphor yang

merupakan turunan terpenoid yaitu monoterpen dilaporkan memiliki efek dalam menghambat pertumbuhan biofilm bakteri, terutama pada gram positif termasuk *S. aureus*⁵².

Camphor dapat mengurangi pembentukan planktonik bakteri *S. aureus* hingga 50%. Pada konsentrasi perlakuan yang berbeda, camphor dapat meningkatkan kerusakan biofilm oleh bakteri *S. aureus* hingga 63%⁵³. Limonene merupakan senyawa yang sangat kontras dengan biofilm yang dibentuk oleh bakteri *S. aureus* dan *P. aeruginosa* karena dapat merusak struktur biofilm secara signifikan dan irreversibel⁵⁴. Senyawa monoterpen lain, yaitu linalool (LIN) diketahui menghambat motilitas sel serta menurunkan produksi EPS pada biofilm bakteri gram positif *B. amyloliquefaciens*⁵⁵. Linalool juga aktif dalam menurunkan viabilitas sel sessile bakteri *P. aeruginosa*, menurunkan kandungan protein dan karbohidrat dari eksopolisakarida biofilm. Kombinasi senyawa EUG dan LIN dapat mempengaruhi *quorum sensing* signaling, LasA dan LasB serta faktor virulensi piosianin dan rhamnolipid sebagai penghambat biofilm⁵⁶. Terpinen-4-ol merupakan senyawa monoterpen yang juga diketahui memiliki kemampuan kuat dalam menghambat pembentukan biofilm dan biofilm yang telah terbentuk pada bakteri *S. aureus*, meskipun pada konsentrasi yang kurang maksimal⁵⁷. Serta senyawa terpinolene diteliti mampu menghambat beta lactam dan regulasi pompa efluks yang merupakan mekanisme resistensi bakteri *S. aureus*⁵⁸.

Hasil uji destruksi biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* dengan fraksi air dari ekstrak etanol rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga W.*) dapat menghancurkan beberapa biofilm yang terbentuk pada 96 wellplate dengan hasil yang signifikan dibandingkan dengan kontrol negatif. Namun, hasil yang didapat tidak mengikuti *dose response*. Hal ini disebabkan karena proses pengerjaan yang kurang maksimal seperti pencucian PBS yang terlalu banyak, atau metode pembuatan sampel yang kurang memberikan hasil yang baik terhadap uji destruksi yang dilakukan. Selain itu metode ekstraksi dan fraksinasi yang digunakan kurang memenuhi parameter standar yang baik, seperti penggunaan suhu yang tinggi, dan proporsi rasio sampel yang digunakan kurang sesuai, sehingga hasil dari penarikan senyawa pada fraksi air tidak maksimal.

KESIMPULAN

1. Fraksi air dari ekstrak etanol rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga W.*) mengandung senyawa terpenoid melalui uji fitokimia.

2. Fraksi air dari ekstrak etanol rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga W.*) dapat menghancurkan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* yang terbentuk pada dosis 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm dan 62,5 ppm.

SARAN

1. Perlu dilakukan uji fitokimia menggunakan ekstrak kasar yang dihasilkan dari proses ekstraksi untuk membandingkan hasil penarikan senyawa, dan mengetahui apakah hasil uji fitokimia yang kurang maksimal disebabkan karena proses ekstraksi atau fraksinasi.
2. Perlu dilakukan observasi menggunakan *scanning electron microscopy* untuk mengetahui kualitas biofilm, seperti struktur atau kematian sel planktonik.
3. Perlu dilakukan isolasi senyawa terpenoid dari rimpang *Alpinia galanga W* untuk uji antibiofilm.

UCAPAN TERIMAKASIH

Terimakasih penulis sampaikan kepada Ikatan Orang Tua Mahasiswa (IOM) FK UNISMA untuk pendanaan riset.

REFERENSI

1. Sundoro, T., Sari, D. W., Alvionita, I., Nuhyanan, W. R., & Bafadhal, A. (2021). Pencegahan healthcare associated infections sebagai upaya peningkatan pengetahuan cara mencuci tangan bagi pasien rumah sakit di Yogyakarta. *JMM (Jurnal Masyarakat Mandiri)*, 5(4), 2020-2030.
2. Al-Tawfiq, J. A., & Tambyah, P. A. (2014). Healthcare associated infections (HAI) perspectives. *Journal of infection and public health*, 7(4), 339-344.
3. Chessa, D., Ganau, G., Spiga, L., Bulla, A., Mazzaello, V., Campus, G. V., & Rubino, S. (2016). *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* virulence strains as causative agents of persistent infections in breast implants. *PLoS One*, 11(1), e0146668.
4. Piras, C., Di Ciccio, P. A., Soggiu, A., Greco, V., Tilocca, B., Costanzo, N., ... & Roncada, P. (2021). *S. aureus* biofilm protein expression linked to antimicrobial resistance: A proteomic study. *Animals*, 11(4), 966.
5. Ningrum, D. U. W. (2015). Efek Daya Hambat Flavonoid Ekstrak Kulit Manggis (*Garcinia Mangostana Linn.*) Terhadap

- Biofilm Bakteri *Lactobacillus Acidophilus* (Penelitian Eksperimental Laboratoris) (Doctoral Dissertation, Universitas Airlangga).
6. Wu, X., Wang, H., Xiong, J., Yang, G. X., Hu, J. F., Zhu, Q., & Chen, Z. (2024). Staphylococcus aureus biofilm: Formulation, regulatory, and emerging natural products-derived therapeutics. *Biofilm*, 100175.
 7. Besan, E. J., Rahmawati, I., & Saptarini, O. (2023). Aktivitas Antibiofilm Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap Staphylococcus aureus. *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, 20(1), 1-11.
 8. Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., & Eumkeb, G. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* Linn.) on Staphylococcus aureus. *LWT-Food Science and Technology*, 39(10), 1214-1220.
 9. Shen, G., Yang, L., Lv, X., Zhang, Y., Hou, X., Li, M., ... & Zhang, Z. (2023). Antibiofilm activity and mechanism of linalool against food spoilage *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10980.
 10. Khusnul, *, Hidana, R., Program, W. K., Diii, S., Kesehatan, A., Tinggi, S., Kesehatan, I., Tunas, B., & Tasikmalaya, H. (2017). Uji Efektivitas Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga* W.) Terhadap Pertumbuhan *Trichophyton Rubrum* Secara In Vitro. In *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada* (Vol. 17).
 11. Puspita, I. T., & Mufliah, C. H. (2023). Aktivitas antibakteri ekstrak dan fraksi rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan *Bacillus subtilis* serta bioautografinya. *Usadha Journal of Pharmacy*, 144-162.
 12. Winarsih, S., Khasanah, U., & Alfatah, A. H. (2019). Aktivitas antibiofilm fraksi etil asetat ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) pada bakteri methicilin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) secara in vitro. *Majalah Kesehatan*, 6(2), 76-85.
 13. Winarsih, S., Khasanah, U., & Alfatah, A. H. (2019). Aktivitas antibiofilm fraksi etil asetat ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) pada bakteri methicilin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) secara in vitro. *Majalah Kesehatan*, 6(2), 76-85.
 14. Asra, R., Azni, N. R., Rusdi, R., & Nessa, N. (2019). Uji Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Fraksi Heksan, Fraksi Etil Asetat dan Fraksi Air Daun Kapulaga (*Elettaria cardamomum* (L.) Maton). *Journal of Pharmaceutical and Sciences*, 2(1), 30-37..
 15. Harborne, J. B., & Harborne, J. B. (1984). Phenolic compounds. *Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis*, 37-99.
 16. Indah, D. N. (2006). Isolasi dan Uji Aktivitas Pestisida Senyawa Metabolit Sekunder Fraksi Diklorometan Daun Tumbuhan Toona Sinensis Roem. *Skripsi. Universitas Pendidikan Indonesia. Bandung*.
 17. Harborne, J. B. (1987). Metode fitokimia: Penuntun cara modern menganalisis tumbuhan. *Bandung: Penerbit ITB*, 78.
 18. Julianto, T. S. (2019). Fitokimia tinjauan metabolit sekunder dan skrining fitokimia. *Yogyakarta: Universitas Islam Indonesia*.
 19. Coffey, B. M., & Anderson, G. G. (2014). Biofilm formation in the 96-well microtiter plate. *Pseudomonas methods and protocols*, 631-641.
 20. Lade, H., Park, J. H., Chung, S. H., Kim, I. H., Kim, J. M., Joo, H. S., & Kim, J. S. (2019). Biofilm formation by Staphylococcus aureus clinical isolates is differentially affected by glucose and sodium chloride supplemented culture media. *Journal of clinical medicine*, 8(11), 1853.
 21. Maryulia Dewi, D., Nurliana, T., T Zahrial Helmi, F., Erina, M. A., AK, M. D., & Admi, M. (2020). Aktivitas Antibiotik terhadap Biofilm Staphylococcus aureus Isolat Preputium Sapi Aceh Antibiotic Activities to Staphylococcus aureus Biofilms of Aceh Cattle Preputium Isolate. *Jurnal Sain Veteriner*, 38(1).
 22. Winarsih, S., Khasanah, U., & Alfatah, A. H. (2019). Aktivitas antibiofilm fraksi etil asetat ekstrak daun putri malu (*Mimosa pudica*) pada bakteri methicilin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) secara in vitro. *Majalah Kesehatan*, 6(2), 76-85.
 23. Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1(1), 98-106.

24. Azwanida, N. N. (2015). A review on the extraction methods use in medicinal plants, principle, strength and limitation. *Med aromat plants*, 4(196), 2167-0412.
25. Bauer, A. E., Frank, R. A., Headley, J. V., Milestone, C. B., Batchelor, S., Peru, K. M., ... & Hewitt, L. M. (2019). A preparative method for the isolation and fractionation of dissolved organic acids from bitumen-influenced waters. *Science of the Total Environment*, 671, 587-597.
26. Ravindran, P. N. (2017). *The encyclopedia of herbs and spices*. CABI.
27. Verheijen M, Lienhard M, Schrooders Y, Clayton O, Nudischer R, Boerno S, Timmermann B, Selevsek N, Schlapbach R, Gmuender H, Gotta S, Geraedts J, Herwig R, Kleinjans J, Caiment F. DMSO induces drastic changes in human cellular processes and epigenetic landscape in vitro. *Scientific reports*, 9(1), 4641.
28. Modrzyński, J. J., Christensen, J. H., & Brandt, K. K. (2019). Evaluation of dimethyl sulfoxide (DMSO) as a co-solvent for toxicity testing of hydrophobic organic compounds. *Ecotoxicology*, 28(9), 1136-1141.
29. Guo, Q., Wu, Q., Bai, D., Liu, Y., Chen, L., Jin, S., ... & Duan, K. (2016). Potential use of dimethyl sulfoxide in treatment of infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(12), 7159-7169.
30. Banerjee, S. K., & Farber, J. M. (2018). Trend and pattern of antimicrobial resistance in molluscan *Vibrio* species sourced to Canadian estuaries. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 62(10), 10-1128.
31. Smith, K., Perez, A., Ramage, G., Lappin, D., Gemmell, C. G., & Lang, S. (2008). Biofilm formation by Scottish clinical isolates of *Staphylococcus aureus*. *Journal of medical microbiology*, 57(8), 1018-1023.
32. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., & Beachey, E. H. (1985). Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of clinical microbiology*, 22(6), 996-1006.
33. Croes, S., Deurenberg, R. H., Boumans, M. L. L., Beisser, P. S., Neef, C., & Stobberingh, E. E. (2009). *Staphylococcus aureus* biofilm formation at the physiologic glucose concentration depends on the *S. aureus* lineage. *BMC microbiology*, 9, 1-9.
34. Sugimoto, S., Sato, F., Miyakawa, R., Chiba, A., Onodera, S., Hori, S., & Mizunoe, Y. (2018). Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and-sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Scientific reports*, 8(1), 2254.
35. Hsu, C. Y., Shu, J. C., Lin, M.-H., Chong, K. Y., Chen, C. C., Wen, S. M., Hsieh, Y. T., Liao, W. T. (2015). High glucose concentration promotes vancomycin-enhanced biofilm formation of vancomycin-non-susceptible *Staphylococcus aureus* in diabetic mice. *PLoS One*, 10(8), e0134852.
36. Yoshii, Y.; Okuda, K.; Yamada, S.; Nagakura, M.; Sugimoto, S.; Nagano, T.; Okabe, T.; Kojima, H.; Iwamoto, T.; Kuwano, K.; et al. Norgestimate inhibits staphylococcal biofilm formation and resensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactam antibiotics. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2017, 3, 18. [CrossRef]
37. Freeman, D. J., Falkiner, F. R., & Keane, C. T. (1989). New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. *Journal of clinical pathology*, 42(8), 872-874.
38. Prakoso, Y. D., Hakim, R., & Risandiansyah, R. (2023). Pembentukan Biofilm pada *Staphylococcus aureus* pada Penambahan Glukosa dan Sukrosa. *Jurnal Kedokteran Komunitas (Journal of Community Medicine)*, 11(2).
39. Silva, N. B. S., Marques, L. A., & Röder, D. D. B. (2021). Diagnosis of biofilm infections: Current methods used, challenges and perspectives for the future. *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), 2148-2160.
40. Nuryastuti, T. (2014). Current in vitro assay to determine bacterial biofilm formation of clinical isolates. *Journal of the Medical Sciences (Berkala Ilmu Kedokteran)*, 46(03).
41. Palomares-Navarro, J. J., Bernal-Mercado, A. T., González-Aguilar, G. A., Ortega-Ramirez, L. A., Martínez-Téllez, M. A., & Ayala-Zavala, J. F. (2022). Antibiofilm action of plant terpenes in *Salmonella* strains: Potential inhibitors of the synthesis

- of extracellular polymeric substances. *Pathogens*, 12(1), 35.
42. Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. (2011). Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica scientia*, 1(1), 98-106.
 43. Miladi, H., Zmantar, T., Kouidhi, B., Al Qurashi, Y. M. A., Bakhrouf, A., Chaabouni, Y., Mahdouani, K., & Chaieb, K. (2017). Synergistic effect of eugenol, carvacrol, thymol, p-cymene and γ -terpinene on inhibition of drug resistance and biofilm formation of oral bacteria. *Microbial pathogenesis*, 112, 156-163.
 44. Morán, A., Gutiérrez, S., Martínez-Blanco, H., Ferrero, M. A., Monteagudo-Mera, A., & Rodríguez-Aparicio, L. B. (2014). Non-toxic plant metabolites regulate *Staphylococcus* viability and biofilm formation: a natural therapeutic strategy useful in the treatment and prevention of skin infections. *Biofouling*, 30(10), 1175-1182.
 45. Walsh, D. J., Livinghouse, T., Durling, G. M., Chase-Bayless, Y., Arnold, A. D., & Stewart, P. S. (2020). Sulfenyl esters of simple phenols exhibit enhanced activity against biofilms. *ACS omega*, 5(11), 6010-6020.
 46. Walsh, D. J., Livinghouse, T., Goeres, D. M., Mettler, M., & Stewart, P. S. (2019). Antimicrobial activity of naturally occurring phenols and derivatives against biofilm and planktonic bacteria. *Frontiers in chemistry*, 7, 653.
 47. Vergis, J., Gokulakrishnan, P., Agarwal, R. K., & Kumar, A. (2015). Essential oils as natural food antimicrobial agents: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 55(10), 1320-1323.
 48. Ben Arfa, A., Combes, S., Preziosi-Belloy, L., Gontard, N., & Chalier, P. (2006). Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Letters in applied microbiology*, 43(2), 149-154.
 49. Oonmetta-aree, J., Suzuki, T., Gasaluck, P., & Eumkeb, G. (2006). Antimicrobial properties and action of galangal (*Alpinia galanga* W. Linn.) on *Staphylococcus aureus*. *LWT-Food Science and Technology*, 39(10), 1214-1220.
 50. Kostoglou, D., Protopappas, I., & Giaouris, E. (2020). Common plant-derived terpenoids present increased anti-biofilm potential against *Staphylococcus* bacteria compared to a quaternary ammonium biocide. *Foods*, 9(6), 697.
 51. ROSSATO, T. C. D. A., Alves, T., Cuevas-Suárez, C. E., ROSA, W. L. D. O. D., SILVA, A. F. D., Piva, E., ... & Lund, R. G. (2022). Effect of alpha-humulene incorporation on the properties of experimental light-cured periodontal dressings. *Brazilian Oral Research*, 36, e091.
 52. Sancineto, L., Piccioni, M., De Marco, S., Pagiotti, R., Nascimento, V., Braga, A. L., ... & Pietrella, D. (2016). Diphenyl diselenide derivatives inhibit microbial biofilm formation involved in wound infection. *BMC microbiology*, 16, 1-10.
 53. Duda-Madej, A., Viscardi, S., Pacyga, K., Kupeczyński, R., Mączka, W., Grabarczyk, M., ... & Wińska, K. (2024). Antibiofilm and Antimicrobial Potentials of Novel Synthesized Sulfur Camphor Derivatives. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(20), 10895.
 54. Gambino, E., Maione, A., Guida, M., Albarano, L., Carraturo, F., Galdiero, E., & Di Onofrio, V. (2022). Evaluation of the pathogenic-mixed biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*/*Staphylococcus aureus* and treatment with limonene on three different materials by a dynamic model. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(6), 3741.
 55. Shen, G., Yang, L., Lv, X., Zhang, Y., Hou, X., Li, M., ... & Zhang, Z. (2023). Antibiofilm activity and mechanism of linalool against food spoilage *Bacillus amyloliquefaciens*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(13), 10980.
 56. Lahiri, D., Nag, M., Dutta, B., Dey, S., Mukherjee, D., Joshi, S. J., & Ray, R. R. (2021). Antibiofilm and anti-quorum sensing activities of eugenol and linalool from *Ocimum tenuiflorum* against *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Journal of Applied Microbiology*, 131(6), 2821-2837.
 57. Cordeiro, L., Figueiredo, P., Souza, H., Sousa, A., Andrade-Júnior, F., Medeiros, D., ... & Lima, E. (2020). Terpinen-4-ol as an Antibacterial and Antibiofilm Agent against *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 4531.

58. Scherf, J. R., Dos Santos, C. R. B., de Freitas, T. S., Rocha, J. E., Macêdo, N. S., Lima, J. N. M., ... & da Cunha, F. A. B. (2020). Effect of terpinolene against the resistant *Staphylococcus aureus* strain, carrier of the efflux pump QacC and β -lactamase gene, and its toxicity in the *Drosophila melanogaster* model. *Microbial Pathogenesis*, 149, 104528.