

ANTIBIOFILM EKSTRAK ETANOL RIMPANG LENGKUAS PUTIH (*Alpinia galanga* L.) DENGAN FRAKSI N-HEKSANA

Yunilla Aristawati, Citra Destya Rahma Putri, Rio Risandiansyah *
Fakultas Kedokteran, Universitas Islam Malang

ABSTRAK

Pendahuluan: Infeksi nosokomial atau *healthcare-associated infection* (HAIs) terus meningkat terutama negara berkembang seperti Indonesia. Peningkatan HAIs dipengaruhi oleh adanya perlekatan bakteri pada alat medis yang bersifat invasif salah satunya oleh *Staphylococcus aureus*. Perlekatan dan kolonisasi dari *Staphylococcus aureus* akan menghasilkan biofilm. Adanya biofilm akan mempersulit terapi dan menjadi titik fokal infeksi. Maka perlu dikembangkan terapi yang menargetkan biofilm, salah satunya adalah rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga*). Indonesia kaya akan tanaman obat salah satunya lengkuas putih (*Alpinia galanga*) yang memiliki berbagai senyawa bioaktif, namun potensinya sebagai antibiofilm dengan fraksi nonpolar n-heksana belum banyak diteliti.

Metode: Penelitian ini dilakukan secara in vitro sebagai eksperimen. Ekstraksi, maserasi, fraksinasi, pengujian fitokimia kualitatif, serta studi penghambatan dan penghancuran biofilm pada *Staphylococcus aureus* menggunakan pelat 96 sumur merupakan beberapa prosedur yang terlibat. Eksperimen penghambatan dilakukan sebelum pembentukan biofilm, dan ekstrak kencur diberikan pada konsentrasi 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, dan 1000 ppm setelah 48 jam pertumbuhan bakteri.

Hasil: Zat bioaktif berupa terpenoid dan alkaloid ditemukan dalam pemeriksaan fitokimia ekstrak etanol rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) dengan fraksi n-heksana nonpolar. Sementara perlakuan lain menunjukkan efek substansial, perlakuan 500 ppm menunjukkan jumlah penghambatan tertinggi, dengan hasil yang tidak signifikan secara statistik dan berbeda secara signifikan dari kontrol negatif. Dengan semua persentase perlakuan di atas 50%, semua perlakuan menunjukkan hasil substansial untuk pemberantasan, dengan pengecualian kontrol negatif, yang menghasilkan hasil yang tidak signifikan. Hasil terbaik datang dari perlakuan tertentu, seperti pada 500 ppm dan 1000 ppm. Hasil dari DMSO 3% dalam terapi penghambatan berbeda secara nyata dari yang dari kontrol negatif. Hasil dari perlakuan pemberantasan dengan DMSO 3% tidak berbeda secara signifikan dari kelompok lain, tetapi mereka berbeda secara signifikan dari kontrol negatif.

Kesimpulan: Fraksi n-heksana ekstrak *Alpinia galanga* mengandung terpenoid dan steroid. Dosis perlakuan 500 ppm pada inhibisi merupakan hambatan tertinggi yaitu 27%. Pada eradikasi dosis 1000 ppm, efektif dalam penghancuran dengan nilai 65%.

Kata Kunci: Antibiofilm, *Alpinia galanga*, *Staphylococcus aureus*.

*Koresponden: Rio Risandiansyah, S.Ked., MP., PhD (Riorisandiansyah@unisma.ac.id)

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Jl. MT Haryono 193 Malang, Jawa Timur Indonesia 65144 telp. +62-341-57892

ANTIBIOFILM OF ETHANOL EXTRACT OF WHITE GALANGAL RHIZOME (*Alpinia galanga* L.) WITH N-HEXANE FRACTION

Yunilla Aristawati, Citra Destya Rahma Putri, Rio Risandiansyah*
Faculty of Medicine, University of Islam Malang

ABSTRACT

Introduction: Nosocomial infections or healthcare-associated infections (HAIs) continue to increase, especially in developing countries such as Indonesia. The increase in HAIs is influenced by the adhesion of bacteria to invasive medical devices, one of which is *Staphylococcus aureus*. The adhesion and colonization of *Staphylococcus aureus* will produce biofilm. The presence of biofilm will complicate therapy and become a focal point of infection. Therefore, it is necessary to develop therapies targeting biofilms, one of which is white galangal rhizome (*Alpinia galanga*). Indonesia is rich in medicinal plants, including white galangal (*Alpinia galanga*), which contains various bioactive compounds. However, its potential as an antibiofilm agent using the nonpolar n-hexane fraction has not been extensively studied.

Methods: This investigation was carried out in vitro as an experiment. Extraction, maceration, fractionation, qualitative phytochemical testing, and biofilm inhibition and destruction studies on *Staphylococcus aureus* utilizing a 96-well plate are among the procedures involved. Inhibition experiments were performed prior to biofilm development, and *Alpinia galanga* extract was administered at concentrations of 62.5 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, and 1000 ppm following 48 hours of bacterial growth.

Results: Bioactive substances in the form of terpenoids and alkaloids were found in the phytochemical examination of the white galangal rhizome (*Alpinia galanga* L.) ethanol extract with the nonpolar n-hexane fraction. While other treatments demonstrated substantial effects, the 500 ppm treatment exhibited the highest amount of inhibition, with results that were not statistically significant and significantly different from the negative control. With all treatment percentages above 50%, all treatments demonstrated substantial results for eradication, with the exception of the negative control, which produced non-significant results. The best outcomes came from certain treatments, such those at 500 ppm and 1000 ppm. Results from the 3% DMSO in inhibitory therapy differed markedly from those from the negative control. Results from the eradication treatment with 3% DMSO were not significantly different from the other groups, but they were significantly different from the negative control.

Conclusion: The n-hexane fraction of *Alpinia galanga* extract contains terpenoids and steroids. The 500 ppm treatment dose in inhibition was the highest inhibitor at 27%. In eradication, the 1000 ppm dose was effective in destruction with a value of 65%.

Keywords: Antibiofilm, *Alpinia galanga*, *Staphylococcus aureus*.

**Correspondence:* Rio Risandiansyah, S.Ked., MP., PhD (Riorisandiansyah@unisma.ac.id)

Faculty of Medicine, University of Islam Malang

Jl. MT Haryono 193 Malang, East Java Indonesia 65144 telp. +62-341-57892

PENDAHULUAN

Infeksi nosokomial, juga dikenal sebagai healthcare-associated infections (HAIs), adalah infeksi yang diderita pasien saat menjalani perawatan di rumah sakit atau fasilitas pelayanan kesehatan lain yang tidak ada pada saat pasien masuk dan tidak terjadi selama masa inkubasi. Ini termasuk infeksi yang berkembang saat pasien berada di rumah sakit tetapi muncul kembali setelah pasien dipulangkan. Menurut penilaian Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) tahun 2016, HAIs bertanggung jawab atas sekitar 37.000 kematian di Eropa dan 99.000 kematian di AS. Dibandingkan dengan negara-negara industri, negara-negara berkembang memiliki tingkat prevalensi infeksi terkait layanan kesehatan (HAIs) yang lebih tinggi. Menurut data Kementerian Kesehatan, prevalensi HAIs di Indonesia tahun 2024 masih tergolong sangat tinggi yakni sebesar 15,74% dengan angka yang jauh melebihi prevalensi HAIs pada negara maju². Prevalensi *healthcare-associated infection* (HAIs) di Indonesia cukup tinggi, dengan tingkat mencapai sekitar 30,4%, yang merupakan salah satu yang tertinggi di kawasan Asia Tenggara. Secara umum, di Asia Tenggara, prevalensi HAI berkisar sekitar 21,6% hingga 30,4%, tergantung pada negara dan studi yang dilakukan. Indonesia menunjukkan prevalensi yang lebih tinggi dibandingkan beberapa negara tetangga seperti Singapura yang memiliki tingkat sekitar 8,4%. Data ini menunjukkan bahwa HAI merupakan masalah serius di Indonesia dan kawasan Asia Tenggara, yang memerlukan perhatian dan langkah pengendalian yang lebih efektif³. Sejumlah faktor berkontribusi terhadap peningkatan healthcare-associated infections (HAIs), termasuk prosedur pembedahan yang mengakibatkan infeksi pada lokasi pembedahan (SSI), pemasangan kateter urin yang menyebabkan ISK, dan prosedur perangkat medis invasif yang kurang steril seperti penggunaan intubasi dan ventilator yang dapat menyebabkan pneumonia terkait ventilator (VAP). Adapun peningkatan kasus HAIs juga merupakan salah satu akibat dari berkembangnya bakteri yang telah resisten terhadap antibiotik⁴.

Bakteri Gram positif paling sering menyebabkan *healthcare-associated infections* (HAIs) melalui kemampuan mekanisme bakteri dalam membentuk biofilm salah satunya Bakteri bernama *Staphylococcus aureus* memiliki kemampuan untuk menyerang setiap sistem organ. Infeksi nosokomial, yang dapat timbul akibat kontaminasi bakteri pada peralatan medis yang tidak steril, disebabkan oleh kuman seperti *Staphylococcus aureus*⁵. Kemampuan bakteri *Staphylococcus aureus* dalam menghasilkan zat polimer ekstraseluler sehingga dapat membentuk biofilm di berbagai macam media terutama peralatan medis seperti kateter, implan, ventilator, dan protesis sendi. Bakteri *Staphylococcus aureus* dapat menyebabkan infeksi saluran kemih, infeksi luka operasi,

pneumonia, endocarditis, osteomyelitis, dan bakterimia⁶.

Tahapan pembentukan biofilm terdiri dari beberapa mekanisme yaitu: adhesi/ perlekatan, proliferasi/ kolonisasi, dan detachment atau pelepasan. Kemampuan bakteri memproduksi biofilm membuat penanganan bakteri yang memiliki kemampuan dalam membentuk biofilm menjadi semakin sulit. Pembentukan biofilm dapat melindungi mikroorganisme terhadap sistem kekebalan tubuh, mendukung pertumbuhan bakteri dan menimbulkan infeksi sistemik terutama pada pasien dengan kekebalan tubuh yang lemah⁷. Infeksi bakteri *Staphylococcus aureus* sulit ditangani karena sering terjadi resistensi antibiotik melalui pembentukan biofilm. Antibiotik telah banyak digunakan untuk kasus infeksi bakteri, tetapi biofilm memiliki kemampuan lebih protektif dan tahan terhadap antibiotik⁸. Oleh karena itu diperlukan, pengembangan terapi baru untuk menghambat atau menghancurkan biofilm sehingga dapat membantu mengendalikan resistensi bakteri.

Lengkuas putih (*Alpinia galanga*), obat herbal yang sering digunakan dalam berbagai resep masakan Indonesia, merupakan salah satu dari banyak tanaman berbeda yang diketahui ada di negara ini tetapi manfaat obatnya belum diselidiki secara menyeluruh. Rimpang dari lengkuas putih (*Alpinia galanga*) mempunyai aktivitas sebagai agen antibakteri karena kandungan senyawa aktif di dalamnya berupa flavonoid, tanin, fenol, saponin, alkaloid, dan terpenoid⁹. Namun, penelitian rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga*) sebagai antibiofilm dengan fraksi n-heksana yang bersifat non-polar terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* masih belum banyak dilakukan. Oleh karena itu, potensi rimpang dari lengkuas putih (*Alpinia galanga*) untuk diteliti kandungan senyawa aktifnya sebagai agen antibiofilm menjadi pilihan yang baik¹⁰. Pada penelitian ini akan melakukan ekstraksi dan fraksinasi menggunakan pelarut dengan sifat non-polar yaitu n-heksana dari ekstrak etanol rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga*). Fraksi n-heksana dapat mengeluarkan lemak dan menarik senyawa sterol yang merupakan golongan steroid dan beberapa terpenoid karena sifatnya yang non-polar¹¹.

METODE PENELITIAN

Desain, Waktu, dan Tempat Penelitian

Penelitian yang dilakukan berupa penelitian eksperimental laboratorium in vitro yang dilakukan untuk mengetahui potensi rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga*) sebagai agen antibiofilm yang mampu untuk menghambat dan menghancurkan biofilm dari bakteri Gram positif *Staphylococcus aureus*.

Laboratorium Pusat Penelitian Kedokteran (LPRK) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang menjadi lokasi percobaan in vitro ini. Penelitian dimulai pada bulan September 2024.

Metode Pengambilan Sampel

Sampel rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga*) dari Unit Laboratorium Balai Materia Medika di Batu digunakan dalam penelitian ini. Bakteri *Staphylococcus aureus* diperoleh dari Laboratorium Pusat Penelitian Kedokteran (LPRK) Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang.

Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan alat berupa N. Heksana, Air, *Microplate well* 96, Bakteri *Staphylococcus aureus*, Ekstrak kasar *Alpinia galanga*, Oven, *Laminar air flow*, Inkubator, Spektrofotometer, *Rotary evaporator*, *Vacuum*, *büchner*, *Autoclave*, DMSO, *Waterbath shaker*, *Multichannel pippete*, *Blue tip*, *Yellow tip*, Erlenmeyer, *Baker glass*, Tabung reaksi, Cawan petri, *Whatman Filter Paper* No I, Pewarna, kristal violet 0,1%, Wadah datar, *Micropipet*, Corong pisah. Bahan penelitian ini adalah larutan asam asetat glasial 30%, tabung mikrosentrifugasi 1,5 mL, BHIB dengan sukrosa, nutrient agar, timbangan digital, *schott bottle*.

Ekstraksi Etanol *Alpinia galanga*

Ekstraksi dengan menggunakan bahan – bahan seperti simplisia rimpang lengkuas putih, aquades, etanol 96%. Sebanyak 100 gram simplisia rimpang lengkuas putih ditimbang sebanyak 4 kali, dilarutkan dengan 500 ml etanol 96% kedalam erlenmeyer dengan perbandingan (1:5). Erlenmeyer ditutup oleh aluminium foil kemudian didiamkan di *waterbath shaker* selama 24 jam. Corong Büchner digunakan untuk menyaring campuran hingga kering setelah didiamkan selama sehari penuh. *Rotary evaporator* digunakan untuk mengolah filtrat dan menghasilkan ekstrak kental. Teknik yang sama digunakan dua kali untuk remaserasi.¹²

Fraksinasi Ekstrak Rimpang Lengkuas Putih

Air dan n-heksana digunakan sebagai pelarut dalam mekanisme kerja metode fraksinasi ECC. Setelah ekstrak kental disuspensikan dalam air hangat dengan rasio 1:6, 40 mililiter n-heksana ditambahkan ke dalam corong pisah dengan perbandingan 1:1. Setelah itu, ekstrak dikocok perlahan selama lima belas menit, didiamkan selama 1 jam sehingga terjadi pemisahan pelarut yang akan menghasilkan dua lapisan endapan, pisahkan dan simpan fraksi n-heksana yang telah didapatkan. Dilakukan hal yang sama menggunakan larutan etil asetat dengan perbandingan (1:1), sehingga membentuk dua lapisan endapan. Masing-masing fraksi yang didapatkan dipisah. Sisa air di dalam corong pisah akan menjadi fraksi air.¹³

Uji Fitokimia Fraksi Rimpang Lengkuas putih

Beberapa uji digunakan untuk melakukan analisis fitokimia pada rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga*), termasuk: (a) Uji flavonoid. Uji ini melibatkan penambahan 0,5 ml fraksi n-heksana, 0,1 gram bubuk magnesium, dan lima tetes HCl kuat. Campuran tersebut kemudian dikocok dengan cepat.

Larutan yang berubah menjadi merah, kuning, atau jingga menunjukkan hasil yang berhasil. (b) Uji Saponin. 0,5 ml fraksi n-Heksana dicampur dengan 0,5 ml air suling panas dalam rasio 1:1, dan campuran diaduk selama satu menit untuk menguji saponin. Jika busa terbentuk dan ekstrak tetap stabil selama +/- hingga 5 menit setelah menambahkan larutan HCl, konsentrasi saponin positif. (c) Uji tanin dengan lima tetes FeCl₃ 1% yang diaplikasikan pada 0,5 ml fraksi n-Heksana. Perkembangan warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan reaksi yang menguntungkan. (d) Uji alkaloid menggunakan 0,5 fraksi n-heksana, 0,5 HCl, dan 10 tetes larutan Dragendorff. Reagen Mayer ditambahkan setelah larutan larut. Jika terbentuk endapan atau larutan keruh, reaksi positif telah terjadi.¹⁷ (e) Uji terpenoid – steroid (*Lieberman Burchard Test*) menggunakan fraksi n-Heksana sebanyak 0,5 ml ditambahkan dengan asetat glasial pekat sebanyak 3 tetes kemudian ditambahkan dengan 1 ml H₂SO₄ pekat. Campuran dikocok perlahan, warna merah keunguan menunjukkan bahwa ekstrak mengandung terpenoid, a warna hijau kebiruan menunjukkan adanya kandungan steroid pada ekstrak.¹⁸

Standarisasi Bakteri *Staphylococcus aureus*

Standar McFarland digunakan untuk menstandarisasi mikroorganisme dalam uji biofilm awal. Untuk menstandarisasi uji mikroba, standar McFarland digunakan sebagai panduan untuk mengontrol kekeruhan suspensi bakteri dan memastikan jumlah bakteri berada dalam rentang tertentu. Dalam tabung reaksi, campurkan 0,05 ml barium klorida dihidrat 1% dan 9,95 ml asam sulfat 1% untuk membuat standar McFarland 0,5. Selanjutnya diaduk hingga memenuhi standar kekeruhan pada tingkat 0,5 McFarland Standard., bakteri dicampur dengan 10 mililiter larutan garam fisiologis untuk melakukan standarisasi bakteri. Setelah itu, kekeruhan suspensi dinaikkan hingga mencapai kadar McFarland 0,5.¹⁹

Uji Aktivitas Antibiofilm *Staphylococcus aureus* pada *Microtiter Plate Assay* 96 *Well plate*

Uji yang dilakukan yaitu uji penghambatan dan penghancuran ekstrak etanol *Alpinia galanga* Fraksi n-heksana terhadap biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*. Uji aktivitas penghambatan biofilm dilakukan menggunakan *Microtiter plate assay*. Uji hambatan biofilm dilakukan sebelum biofilm terbentuk sempurna pada media agar, untuk melihat efektivitas sampel terhadap biofilm bakteri. Sedangkan uji aktivitas penghancuran terhadap biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan setelah jam ke 48^{20, 21}.

BHIB + sukrosa dimasukkan ke dalam *well plate* menggunakan *multichannel pippete* sebanyak 200 µL. Bakteri yang telah disuspensi dimasukan kedalam masing-masing *well* sebanyak 20 ml²². Sampel fraksi untuk perlakuan hambatan ditambahkan sesuai peta pada baris 1 dan dilakukan pengenceran bertingkat pada baris 1-5. Ditambahkan

DMSO 3% ditambahkan kedalam baris kontrol bias hambatan. 96 well plate ditutup dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam²³.

Setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam, sampel pada masing-masing wellplate dibuang menggunakan pipet. Kemudian, dilakukan pencucian dengan penambahan larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) sebanyak 200 µL pada wellplate kemudian langsung dibuang²⁴. Setelah itu, ditambahkan sampel fraksi untuk uji penghancuran sesuai peta pada kolom ke 6 sampai ke 10 sebanyak 120 µl dan didiamkan selama 10 menit. Selanjutnya, sampel dibuang menggunakan pipet dan dilakukan pencucian kembali dengan menggunakan larutan PBS (*Phosphate Buffered Saline*) sebanyak 200 µl dan langsung dibuang. Fiksasi dilakukan dengan menambahkan methanol 96% sebanyak 120 µL dan didiamkan selama 10 menit setelah itu dibuang²⁵. Pewarnaan dilakukan dengan menggunakan pewarna *crystal violet* 0,1% yang ditambahkan pada tiap wellplate sebanyak 120 µl dan didiamkan selama 3 menit. Setelah dilakukan pewarnaan, kemudian dicuci menggunakan larutan PBS sebanyak 200 µL dan dilakukan pencucian sebanyak 2 kali. Asam asetat 33% kemudian ditambahkan sebanyak 200 µl untuk melarutkan *crystal violet* agar dapat dilakukan pengukuran absorbansi²⁶.

HASIL DAN ANALISA DATA

Hasil Uji Fitokimia pada Fraksi N-Heksana Ekstrak Etanol Rimpang Lengkuas Putih (*Alpinia galanga*)

Hasil uji fitokimia fraksi n-Heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga*) yang dilakukan secara kualitatif dengan identifikasi senyawa yang

Untuk menentukan nilai OD, perhitungan absorbansi dilakukan pada panjang gelombang 585 nm menggunakan spektrofotometer²⁷. Pembacaan pada spektrofotometer akan menghasilkan nilai sisa dari pembentukan biofilm sehingga dapat dilakukan penghitungan presentase sisa biofilm.

$$\begin{aligned} &\% \text{ hambatan \& penghancuran biofilm} \\ &= \frac{OD_{kn} - OD_{kp}}{OD_{kn}} \times 100\% \end{aligned}$$

Keterangan:

- OD_{kn} = Optical Density kontrol negatif (media yang diberi BHIB + sukrosa 5%)
- OD_{kp} = Optical Density uji (media yang telah diberikan sampel uji/keompok perlakuan)

Setelah dilakukan penghitungan tersebut dengan menggunakan spektrofotometer nilai yang didapatkan dikonversi ke nilai BBU. Nilai BBU diperoleh dengan rumus sebagai berikut:

$$BBU = \frac{Abs}{0.1}$$

Keterangan:

- BBU = Biofilm Biomass Unit
- Abs = Absorbansi Crystal Violet

terkandung dalam rimpang lengkuas putih berdasarkan perubahan bentuk dan warna. Adapun hasil uji fitokimia dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Hasil Uji Fitokimia Fraksi N-Heksana *Alpinia galanga*

Jenis pengujian	Hasil	Keterangan
Flavonoid	-	Terjadi perubahan larutan menjadi warna merah, kuning, atau jingga.
Alkaloid	-	Tidak terdapat endapan atau perubahan larutan menjadi keruh
Saponin	-	Tidak terdapat busa yang terbentuk dan setelah ditambahkan larutan HCl tetap stabil ± 5 menit
Tanin	-	Terjadi perubahan warna menjadi biru tua atau hitam kehijauan
Terpenoid	+	Terjadi perubahan warna larutan menjadi merah keunguan
Steroid	+	Terjadi perubahan warna larutan menjadi warna hijau kebiruan

Keterangan : Tabel di atas menjelaskan tentang ada atau tidaknya kandungan senyawa bioaktif yang diujikan pada rimpang *Alpinia galanga*, berdasarkan pengujian fitokimia fraksi n-heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) didapatkan hasil bahwa terdapat adanya kandungan terpenoid dan steroid pada fraksi n-heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.)

Pada pengujian biofilm dengan fraksi n-heksana yang mampu menarik senyawa terpenoid dan steroid, dikarenakan pada senyawa terpenoid dan steroid memiliki sifat non-polar. Senyawa terpenoid memiliki beragam efek biologis termasuk mekanisme sebagai antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba seperti jamur, bakteri, dan parasit. Terpenoid yang terdapat pada *Alpinia*

galanga memiliki mekanisme sebagai agen antibiofilm karena dapat mengganggu proses pembentukan dan keberlangsungan biofilm dengan cara menginterferensi struktur lipid dan protein yang penting untuk stabilitas biofilm bakteri. Telah dilakukan studi bahwa senyawa terpenoid mampu menghambat pertumbuhan bakteri spektrum luas, pada bakteri Gram-positif²⁸. Senyawa bioaktif steroid

yang memiliki mekanisme sebagai antibiofilm dengan cara menghambat jalur komunikasi quorum sensing bakteri, distrupsi membran sel bakteri, dan menghambat pompa efflux pada sel bakteri²⁹.

Hasil Uji Penghambatan dan Penghancuran Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus*

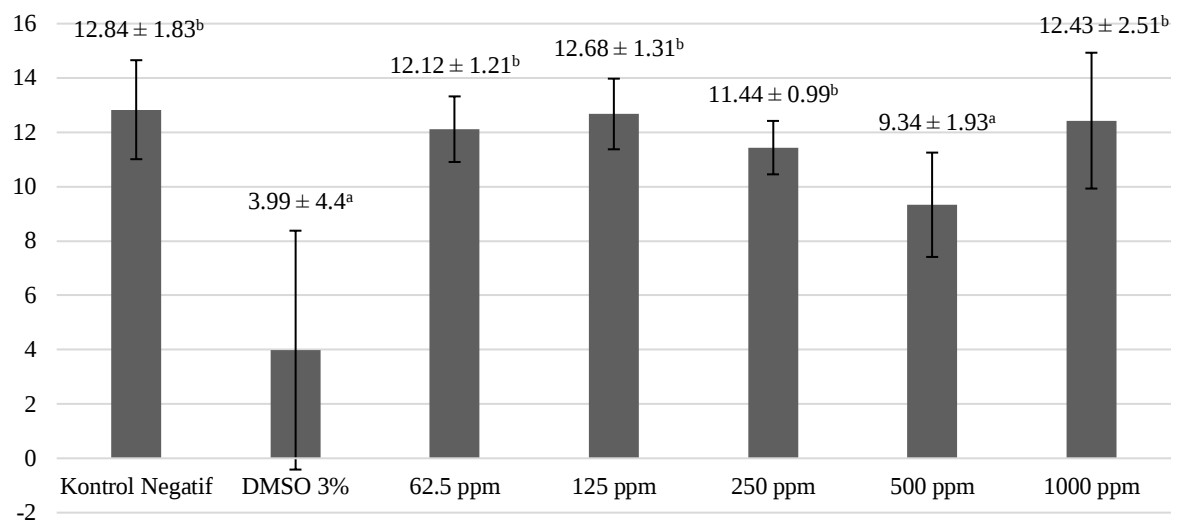
Hasil pengujian hambatan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan *Kruskal Wallis-Pairwise Comparison* dapat dilihat pada Tabel 2, pengujian hambatan biofilm dengan perhitungan BBU dapat dilihat pada Gambar 1 dan perhitungan %hambatan biofilm dengan perbedaan dosis pengujian dapat dilihat pada Gambar 2.

Tabel 2. Hasil Uji Penghambatan Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus* (n = 12)

DOSIS	$\bar{X} \pm SD$
Kontrol -	12.83 $\pm$ 1.82 ^b
Kontrol + DMSO 3%	3.98 $\pm$ 4.39 ^a
62,5 ppm	12.11 $\pm$ 1.20 ^b
125 ppm	12.67 $\pm$ 1.30 ^b
250 ppm	11.43 $\pm$ 0.98 ^b
500 ppm	9.33 $\pm$ 1.92 ^a
1000 ppm	12.42 $\pm$ 2.50 ^b

Keterangan: "Pada pengujian penghancuran fraksi n-heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) dengan dosis 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm berdasarkan dari uji one way ANOVA menggunakan kruskal wallis memiliki perbedaan yang bermakna dengan nilai sig 0.003. Sampel dengan perbedaan yang signifikan memiliki nilai sig ($p < 0.05$) atau kurang dari 0.05 dapat dikatakan memiliki hasil signifikan. Huruf (b) menerangkan bahwa nilai dikatakan signifikan dengan nilai pada huruf (b) yang lain dan tidak signifikan dengan nilai huruf (a)."

BBU Penghambatan

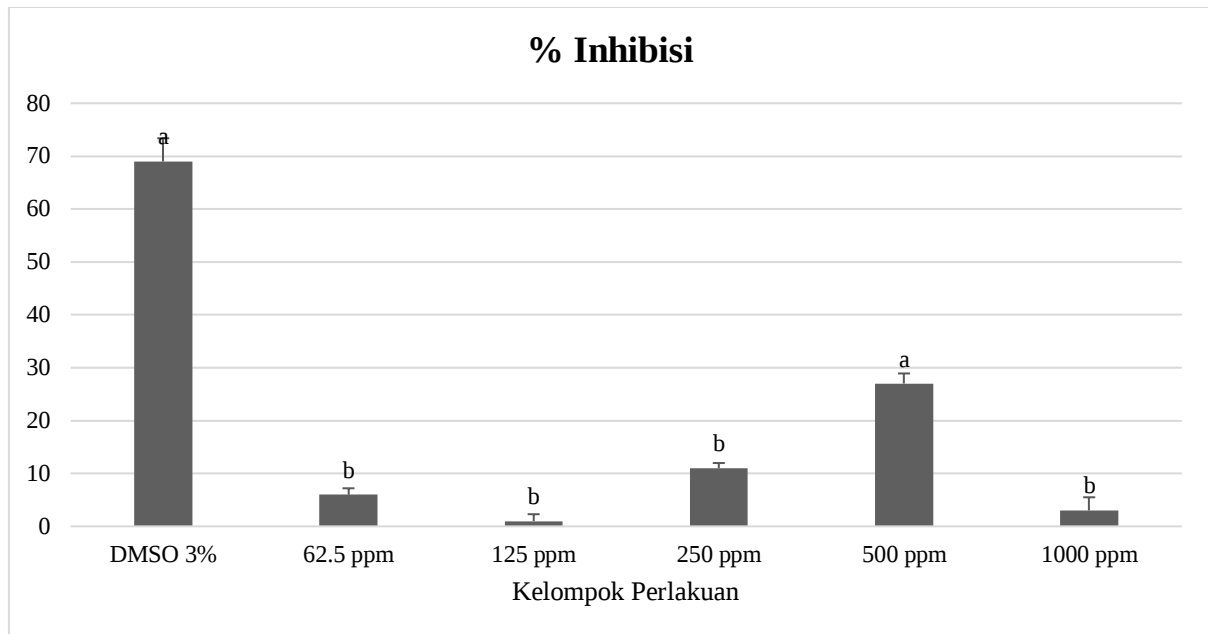


Gambar 1. Histogram Perhitungan Hasil Hambatan Biofilm dengan Perbedaan Dosis Pengujian

Keterangan: Berdasarkan histogram parameter BBU diatas menunjukkan pada dosis 500 ppm memiliki nilai rata – rata inhibisi yang paling rendah dibandingkan dengan dosis pengujian yang lainnya. Tetapi dari enam jenis perlakuan yang diberikan (selain kontrol negatif), kelompok yang diberikan DMSO 3% adalah kelompok yang memiliki rata – rata paling rendah, dan kelompok yang diberikan 125 ppm menghasilkan rata – rata inhibisi yang paling tinggi. Huruf (a) menerangkan bahwa nilai dikatakan signifikan dengan nilai pada huruf (a) yang lain dan tidak signifikan dengan nilai huruf (b).

Penghitungan biofilm menggunakan parameter BBU (*Biomassa Biofilm Unit*). Parameter yang digunakan untuk mengukur kapasitas biofilm pada suatu media adalah parameter BBU. Biomassa biofilm unit yang memiliki nilai rendah atau sedikit menunjukkan bahwa jumlah mikroorganisme dalam

biofilm berarti berkurang, dan sebaliknya jika biomassa biofilm unit memiliki hasil nilai yang tinggi atau besar maka menunjukkan bahwa jumlah mikroorganisme yang ada di dalam biofilm meningkat atau masih banyak³⁰.



Gambar 2. Histogram Perhitungan % Hambatan Biofilm dengan Perbedaan Dosis Pengujian

Keterangan: Hasil histogram diatas menunjukkan perbedaan persentase efek uji penghambatan biofilm pada berbagai dosis. Kelompok perlakuan fraksi n-heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) tidak ada yang mencapai nilai persentase penghambatan sebesar 50%, namun pada dosis 500 ppm merupakan kelompok perlakuan dengan hambatan tertinggi yaitu sebesar 27%. Kontrol positif DMSO 3% mencapai persentase penghambatan lebih dari 50% yaitu sebesar 69%.

Gambar 3 menunjukkan hasil uji penghancuran biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan uji statistik ANOVA satu arah dengan Kruskal Wallis-Pairwise Comparison; Gambar 4 menunjukkan persentase penghancuran

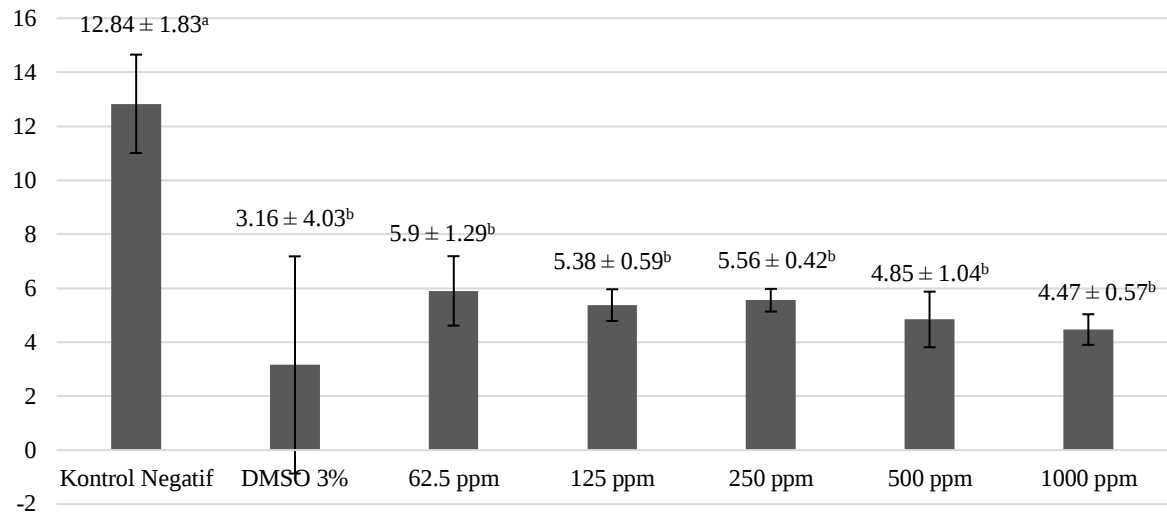
biofilm dengan berbagai dosis uji; dan Tabel 3 menunjukkan hasil uji penghancuran biofilm pada bakteri *Staphylococcus aureus* menggunakan perhitungan BBU.

Tabel 3. Hasil Uji Penghancuran Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus* (n = 12)

DOSIS	$\bar{X} \pm SD$
Kontrol -	12.83 $\pm$ 1.82 ^a
Kontrol + DMSO 3%	3.15 $\pm$ 4.02 ^b
62,5 ppm	5.89 $\pm$ 1.28 ^b
125 ppm	5.37 $\pm$ 0.58 ^b
250 ppm	5.55 $\pm$ 0.41 ^b
500 ppm	4.84 $\pm$ 1.03 ^b
1000 ppm	4.46 $\pm$ 0.56 ^b

Keterangan: "Pada pengujian penghancuran biofilm menggunakan fraksi n-heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) dengan dosis 1000 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 125 ppm, dan 62,5 ppm berdasarkan dari uji kruskal wallis memiliki perbedaan yang bermakna dengan nilai 0.003. Sampel dengan perbedaan yang bermakna memiliki nilai sig ($p < 0.05$) atau kurang dari 0.05. Huruf (b) menerangkan bahwa nilai dikatakan signifikan dengan nilai pada huruf (b) yang lain dan tidak signifikan dengan nilai huruf (a)."

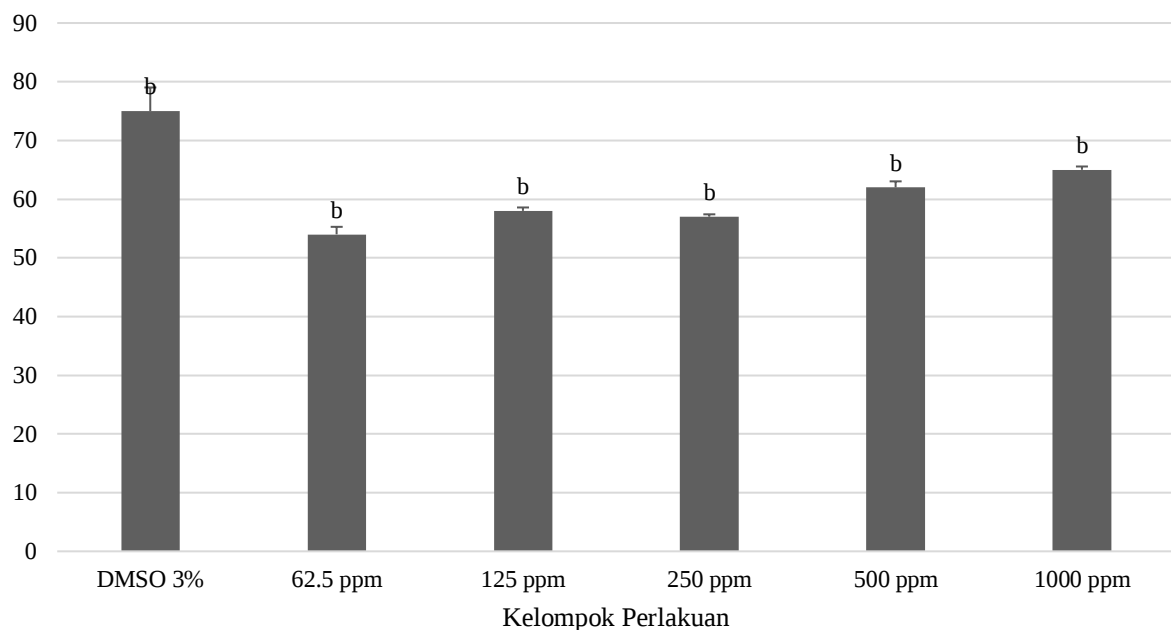
BBU Penghancuran



Gambar 3. Histogram Perhitungan Hasil Penghancuran Biofilm dengan Perbedaan Dosis Pengujian

Keterangan: Berdasarkan histogram parameter BBU diatas menunjukkan pada dosis 1000 ppm memiliki nilai yang rendah dibandingkan dengan dosis pengujian yang lainnya. Sementara kelompok yang diberikan dosis 62.5 ppm menghasilkan rata – rata eradikasi yang paling tinggi. Tetapi pada enam jenis perlakuan yang diberikan (selain kontrol negatif), kelompok yang diberikan kontrol + (DMSO 3%) menunjukkan nilai rata – rata eradikasi yang paling rendah dibanding sampel lain yang digunakan, sehingga pada pengujian penghancuran biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat kemungkinan bahwa yang memiliki efektivitas sebagai penghancur biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* adalah kontrol + (DMSO 3%). Huruf (b) menerangkan bahwa nilai dikatakan signifikan karena memiliki nilai sig ($p < 0.05$) dengan nilai pada huruf (b) yang lain dan tidak signifikan dengan nilai huruf (a) karena memiliki nilai sig ($p > 0.05$).

% Eradikasi



Gambar 4. Histogram Perhitungan % Penghancuran Biofilm dengan Perbedaan Dosis Pengujian

Keterangan: Hasil histogram diatas menunjukkan perbedaan persentase efek uji penghancuran biofilm pada berbagai dosis. Semua kelompok perlakuan fraksi n-heksana rimfang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) mencapai nilai persentase penghambatan lebih dari 50%. Kelompok perlakuan yang memiliki nilai persentase penghambatan paling tinggi dan mendekati nilai persentase penghambat kelompok kontrol positif yaitu dosis 1000 ppm dengan nilai 65%. Semakin tinggi persentase penghambatan biofilm, maka semakin efektif agen dalam menghambat pembentukan biofilm. Tetapi pada enam jenis perlakuan yang diberikan, pada kontrol + (DMSO 3%) menunjukkan nilai yang tinggi sebesar 75% dibanding sampel lain, sehingga pada pengujian penghancuran biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat kemungkinan yang memiliki efektivitas sebagai penghancur biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* adalah kontrol + (DMSO 3%).

PEMBAHASAN

Alpinia galanga L. merupakan tumbuhan herba teresterial yang banyak dijumpai pada kawasan hutan tropis memiliki batang tegak dengan tinggi mencapai 1 m³². Batang semu berwarna hijau tua yang tersusun dari pelepah-pelepah daun yang bersatu³³. Dengan tangkai daun pendek dan pelepah serta anak daun berwarna hijau, daun tunggal tersusun berselang-seling. Daunnya panjang dan lanset, berukuran sekitar 25 hingga 35 cm dan lebar 9,5 hingga 13,0 cm. Daunnya memiliki pangkal tumpul, tepi halus, urat menyirip, dan ujung runcing. Tanaman lengkuas putih memiliki bunga yang harum, berbentuk lonceng, kompleks, berwarna putih kehijauan atau putih kekuningan. Rimpangnya besar, tebal, berdaging, silindris, dan berwarna kuning kecokelatan, memiliki sisik putih dan benang putih. Tanaman ini menghasilkan buah beri kecil, keras, dan bulat sebagai buahnya.

Bahan aktif tanaman lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.), termasuk steroid, alkaloid, tanin, terpenoid, saponin, dan flavonoid, memiliki sifat antibakteri yang kuat terhadap berbagai infeksi, termasuk *Staphylococcus aureus*. Zat-zat ini membantu memecah dinding sel bakteri atau menghentikan penyebaran mikroba berbahaya. Lengkuas putih digunakan secara luas dalam pengobatan tradisional dan sebagai obat herbal.

Lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) mengandung metabolit sekunder yang mungkin memiliki sifat antibiofilm, termasuk alkaloid, flavonoid, tanin, steroid, saponin, dan terpenoid. Hal ini dibuktikan oleh penelitian terdahulu bahwa pada lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) mampu mengganggu sistem quorum sensing yang mengatur produksi biofilm dan eksoprotease, sehingga mengurangi kemampuan bakteri dalam membentuk biofilm tanpa harus membunuh bakteri secara langsung. Kandungan terpenoid dan steroid pada tanaman lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) merupakan komponen yang berpotensi sebagai antibiofilm. Mekanisme kerja senyawa bioaktif terpenoid sebagai antibiofilm dengan cara mengganggu pembentukan dan stabilitas biofilm pada bakteri. Senyawa ini dapat merusak membran sel bakteri, menghambat adhesi sel, serta mengintervensi sinyal quorum sensing. Senyawa bioaktif steroid yang memiliki mekanisme sebagai antibiofilm dengan cara menghambat jalur komunikasi quorum sensing bakteri, distrupsi membran sel bakteri, dan menghambat pompa efflux sel bakteri²⁹.

Uji Fitokimia

Berdasarkan Tabel 1, fraksi n-heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) yang digunakan dalam penelitian ini mengandung senyawa steroid, yang ditandai dengan perubahan warna hijau kebiruan dalam larutan, dan senyawa terpenoid, yang ditandai dengan perubahan warna merah keunguan dalam larutan. Konsentrasi metabolit sekunder dalam

fraksi n-heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) ditentukan melalui skrining fitokimia.

Berbagai senyawa metabolit sekunder, yang diklasifikasikan sebagai senyawa polar, semi-polar, dan nonpolar berdasarkan polaritasnya, terdapat dalam ekstrak rimpang lengkuas putih. Oleh karena itu, untuk memisahkan senyawa-senyawa ini berdasarkan polaritasnya, diperlukan proses fraksinasi. N-heksana merupakan pelarut yang digunakan dalam proses fraksinasi. Senyawa nonpolar seperti terpenoid dan steroid yang ada pada ekstrak etanol rimpang lengkuas putih akan tertarik kedalam pelarut n-heksana.

Uji Biofilm pada Microtiter Plate Assay 96 Well plate

Menggunakan kristal violet dan metode pelat mikrotiter, pembentukan biofilm dan penilaian inhibisi dilakukan. Suspensi bakteri yang setara dengan standar McFarland 0,5 (1,5 x 10⁸ CFU/mL) diaplikasikan pada setiap pelat sumur dan dikultur selama 24 jam untuk menilai produksi biofilm oleh bakteri *Staphylococcus aureus*. Ekstrak diaplikasikan pada sumur dan diwarnai dengan kristal violet 0,1% setelah masa inkubasi 24 jam.

Teknik pewarnaan Gram secara keseluruhan umumnya diikuti oleh produksi dan stabilitas pewarna kristal violet dalam biofilm yang terhubung ke sumur. *Staphylococcus aureus* adalah bakteri gram positif dengan dinding sel yang terbuat dari lapisan asam teikoat dan peptidoglikan (murein) yang menghambat lisis osmotik protoplas dan pelepasan warna kristal violet setelah pembilasan.

Uji Hambatan Terhadap Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil yang didapatkan pada perhitungan mikrokoloni bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai sig. 0.003 atau kurang dari 0.005 atau sig (p<0.05) antar dosis pengujian ditunjukkan pada Tabel 2. Dalam penelitian ini, pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus* kurang efektif dihambat oleh fraksi n-heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.). Gambar 1 menunjukkan persentase penghambatan sebesar 27% pada dosis 500 ppm. Tujuan uji penghambatan biofilm adalah untuk mengetahui seberapa efektif rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) menghambat pembentukan biofilm *Staphylococcus aureus*. Dalam penelitian ini, perkembangan biofilm diukur dengan uji kristal violet.

Produksi biofilm pada permukaan padat terdiri dari dua fase. Proliferasi sel dan produksi Zat Polimer Ekstraseluler (EPS) menyebabkan penumpukan sel biofilm pada tahap pertama. Pelepasan dan penempelan kembali merupakan bagian dari tahap kedua. Menghambat atau bahkan membunuh sel untuk menghentikan proliferasi dan sintesis EPS dapat menghentikan pertumbuhan biofilm. Tanpa adanya penghambatan, biofilm akan berproliferasi dan berkembang menjadi struktur tiga

dimensi dengan beberapa gugus sel tertutup yang saling terhubung. Medium BHIB yang ditambahkan sukrosa 5% digunakan sebagai medium kultur untuk pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* dalam penelitian ini.

Uji Penghancuran Terhadap Biofilm Bakteri *Staphylococcus aureus*

Hasil yang didapatkan pada perhitungan mikrokoloni bakteri *Staphylococcus aureus* menunjukkan terdapat perbedaan yang bermakna dengan nilai sig. 0.003 atau kurang dari 0.05 atau sig ($p < 0.05$) antar dosis pengujian yang ditunjukkan pada Tabel 3. Pada penghitungan persentase penghancuran fraksi n-Heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) nilai persentase tertinggi pada dosis 1000 ppm sebesar 65% dan pada dosis 500 ppm sebesar 62%. Semakin tinggi persentase penghancuran biofilm, maka semakin efektif agen dalam menghancurkan biofilm yang telah terbentuk. Tetapi pada kontrol + (DMSO 3%) menunjukkan nilai yang tinggi sebesar 75% dibanding sampel lain, sehingga pada pengujian penghancuran biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* terdapat kemungkinan yang memiliki efektivitas sebagai penghancur biofilm bakteri *Staphylococcus aureus* adalah kontrol + (DMSO 3%) seperti yang ditunjukkan pada Gambar 2.

KESIMPULAN

1. Fraksi n-Heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) melalui uji fitokimia memiliki kandungan senyawa steroid dan terpenoid.
2. Fraksi n-Heksana rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* L.) dengan berbagai dosis tidak menunjukkan perbedaan kemampuan untuk menghambat pertumbuhan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*
3. Uji penghancuran dengan fraksi n-Heksana rimpang lengkuas putih (*Alpinia galanga* L.) pada dosis 500 ppm dan dosis 1000 ppm memiliki kemampuan sebagai eradikator untuk menghancurkan biofilm bakteri *Staphylococcus aureus*

UCAPAN TERIMA KASIH

Ucapan terima kasih saya sampaikan kepada pihak-pihak berikut dari Universitas Islam Malang, Laboratorium Pusat Penelitian Kedokteran Universitas Islam Malang, khususnya Ibu Arni, Ibu Nofie, dan Ibu Erlin, serta Ikatan Orang Tua Mahasiswa Fakultas Kedokteran UNISMA yang telah memberikan kesempatan kepada saya untuk menyelesaikan jurnal penelitian ini dan melakukan penelitian.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] A. M. Sandu, M. C. Chifiriuc, and Corneliu, "Healthcare-Associated Infections: The Role of Microbial and Environmental Factors in Infection Control—A Narrative Review," *Infectious Diseases and Therapy* 2025 14:5,

vol. 14, no. 5, pp. 933–971, Apr. 2025, doi: 10.1007/S40121-025-01143-0.

- [2] A. A. Waleleng, O. A. Waworuntu, and F. E. S. Rares, "Identifikasi Pola Bakteri dan Uji Sensitivitas Antibiotik di Kamar Bedah RSU GMIM Pancaran Kasih Manado," *Medical Scope Journal*, vol. 6, no. 2, pp. 296–302, Apr. 2024, doi: 10.35790/MSJ.V6I2.53545.
- [3] L. P. Wah Goh, H. Marbawi, S. M. Goh, A. K. bin Abdul Asis, and J. A. Gansau, "The prevalence of hospital-acquired infections in Southeast Asia (1990-2022)," *J Infect Dev Ctries*, vol. 17, no. 2, pp. 139–146, Feb. 2023, doi: 10.3855/JIDC.17135.
- [4] R. Asnawati, S. B. Syukur, H. Yunus, F. F. Abas, S. Tabrani, and M. Yahya, "PENGENDALIAN INFEKSI DI RUANGAN INTERNA RSUD ALOEI SABOE KOTA GORONTALO," *J-ABDI: Jurnal Pengabdian kepada Masyarakat*, vol. 1, no. 11, pp. 3211–3216, Apr. 2022, doi: 10.53625/JABDI.V1I11.1927.
- [5] I. G. Shafira, N. Aini, and R. Risandiansyah, "AKTIVITAS ANTIBIOFILM EKSTRAK ETANOL BUAH PARE (*Momordica charantia*) TERHADAP *Staphylococcus aureus*," *Jurnal Kedokteran Komunitas (Journal of Community Medicine)*, vol. 11, no. 2, Nov. 2023, Accessed: Jul. 06, 2025. [Online]. Available: <https://jim.unisma.ac.id/index.php/jkkfk/article/view/23062>
- [6] M. N. Maulani, R. Hakim, and R. Risandiansyah, "EFEKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAUN KELOR (*Moringa oleifera*) SEBAGAI ANTIBIOFILM *Staphylococcus aureus*," *Jurnal Kedokteran Komunitas (Journal of Community Medicine)*, vol. 11, no. 2, Nov. 2023, Accessed: Jul. 06, 2025. [Online]. Available: <https://jim.unisma.ac.id/index.php/jkkfk/article/view/23063>
- [7] A. Zhao, J. Sun, and Y. Liu, "Understanding bacterial biofilms: From definition to treatment strategies," *Front Cell Infect Microbiol*, vol. 13, p. 1137947, 2023, doi: 10.3389/FCIMB.2023.1137947/FULL.
- [8] A. Martínez, M. Manrique-Moreno, M. C. Klaiss-Luna, E. Stashenko, G. Zafra, and C. Ortiz, "Effect of essential oils on growth inhibition, biofilm formation and membrane integrity of *escherichia coli* and *staphylococcus aureus*," *Antibiotics*, vol. 10, no. 12, Dec. 2021, doi: 10.3390/ANTIBIOTICS10121474.
- [9] A. B. S. N. Jannah, K. Ramadhanti, and K. Uyun, "Identifikasi Ciri Morfologi pada Lengkuas (*Alpinia galanga*) dan Bangle (*Zingiber purpureum*) di Desa Mesjid Priyayi, Kecamatan Kasemen, Kota Serang,

- Banten,” *Tropical Bioscience: Journal Of Biological Science*, vol. 2, no. 1, pp. 27–34, Jun. 2022, doi: 10.32678/TROPICALBIOSCI.V2I1.6240.
- [10] Y. A. Prasetya, K. Nisyak, and E. R. Amanda, “Aktivitas Antibakteri Nanoemulsi Minyak Lengkuas (*Alpinia galanga* L. Willd) dalam menghambat pertumbuhan *Helicobacter pylori*,” *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, vol. 7, no. 3, pp. 136–142, Dec. 2019, doi: 10.21776/UB.BIOTROPIKA.2019.007.03.7.
- [11] E. Kumalasari, A. Septia, and D. Rizki Febrianti, “PENETAPAN KADAR FLAVONOID TOTAL EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI ETANOL, FRAKSI KLOROFORM, FRAKSI N-HEKSANA, FRAKSI AIR, FRAKSI ETIL ASETAT DARI DAUN BAWANG DAYAK (*Eleutherine palmifolia* (L.) Merr.),” *Jurnal Ilmiah Manuntung: Sains Farmasi Dan Kesehatan*, vol. 9, no. 2, pp. 167–173, Dec. 2023, doi: 10.51352/JIM.V9I2.678.
- [12] X. Wang, M. Liu, C. Yu, J. Li, and X. Zhou, “Biofilm formation: mechanistic insights and therapeutic targets,” *Molecular Biomedicine*, vol. 4, no. 1, Dec. 2023, doi: 10.1186/S43556-023-00164-W.
- [13] A. I. Aribowo, C. F. Lubis, L. M. Urbaningrum, and N. D. Rahmawati, “Isolasi dan Identifikasi Senyawa Flavonoid pada Tanaman,” *Jurnal Health Sains*, vol. 2, no. 6, pp. 751–757, Jun. 2021, doi: 10.46799/JHS.V2I6.188.
- [14] Hamida fathin, “Lestarian Alam Raya dalam Berkarya Melalui Indonesia SDGs Menuju Human Welfare 380 Prosiding SEMNAS BIO 2022 UIN Syarif Hidayatullah Jakarta”.
- [15] I. Aliwu, J. A. Rorong, and E. Suryanto, “SKRINING FITOKIMIA DAN UJI EFEK SEDATIF PELARUT DARI DAUN TAKOKAK (*Solanum Turvum* Swartz) PADA TIKUS PUTIH GALUR WISTAR,” *CHEMISTRY PROGRESS*, vol. 13, no. 1, Jun. 2020, doi: 10.35799/CP.13.1.2020.28795.
- [16] E. S. Dewi, “POTENSI EKSTRAK ETANOL BUAH TOMAT (*Lycopersicum Esculentum*) SEBAGAI PENGHAMBAT BAKTERI PENYEBAB PNEUMONIA,” *Jurnal Agrotek Ummat*, vol. 7, no. 1, pp. 26–29, Mar. 2020, doi: 10.31764/AGROTEK.V7I1.1902.
- [17] G. L. Kapondo, Fatimawali, and M. Jayanti, “Isolasi, Identifikasi Senyawa Alkaloid Dan Uji Efektivitas Penghambatan Dari Ekstrak Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*,” *eBiomedik*, vol. 8, no. 2, pp. 180–186, Aug. 2020, doi: 10.35790/EBM.V8I2.28999.
- [18] A. S. Hasibuan, V. Edrianto, and N. Purba, “SKRINING FITOKIMIA EKSTRAK ETANOL UMBI BAWANG MERAH (*Allium cepa* L.),” *JURNAL FARMASIMED (JFM)*, vol. 2, no. 2, pp. 45–49, Apr. 2020, doi: 10.35451/JFM.V2I2.357.
- [19] N. W. P. W. Suryantarini, N. Hasbi, and R. D. Ayunda, “Antibiotics Susceptibility Testing Against *Staphylococcus Aureus* from Nasal Isolates in Food Handlers in Canteen of Mataram University,” *Jurnal Biologi Tropis*, vol. 24, no. 1b, pp. 51–63, Dec. 2024, doi: 10.29303/JBT.V24I1B.7891.
- [20] T. Mao *et al.*, “In Vitro Inhibition of Growth, Biofilm Formation, and Persistence of *Staphylococcus aureus* by Pinaverium Bromide,” *ACS Omega*, vol. 8, no. 10, pp. 9652–9661, Mar. 2023, doi: 10.1021/ACSOMEGA.3C00340/ASSET/IMAGES/LARGE/AO3C00340_0009.JPEG.
- [21] S. Mastoor *et al.*, “Analysis of the Antimicrobial and Anti-Biofilm Activity of Natural Compounds and Their Analogues against *Staphylococcus aureus* Isolates,” *Molecules*, vol. 27, no. 20, p. 6874, Oct. 2022, doi: 10.3390/MOLECULES27206874/S1.
- [22] L. Rudin, M. M. Bornstein, and V. Shyp, “Inhibition of biofilm formation and virulence factors of cariogenic oral pathogen *Streptococcus mutans* by natural flavonoid phloretin,” *J Oral Microbiol*, vol. 15, no. 1, 2023, doi: 10.1080/20002297.2023.2230711.
- [23] Y. Liu *et al.*, “Inhibition of Biofilm Formation and Related Gene Expression of *Listeria monocytogenes* in Response to Four Natural Antimicrobial Compounds and Sodium Hypochlorite,” *Front Microbiol*, vol. 11, p. 617473, Jan. 2021, doi: 10.3389/FMICB.2020.617473/BIBTEX.
- [24] H. Lade *et al.*, “Biofilm formation by *staphylococcus aureus* clinical isolates is differentially affected by glucose and sodium chloride supplemented culture media,” *J Clin Med*, vol. 8, no. 11, Nov. 2019, doi: 10.3390/JCM8111853.
- [25] Z. X. Luo, Y. Li, M. F. Liu, and R. Zhao, “Ciprofloxacin enhances the biofilm formation of *Staphylococcus aureus* via an agrC-dependent mechanism,” *Front Microbiol*, vol. 14, p. 1328947, Dec. 2023, doi: 10.3389/FMICB.2023.1328947/BIBTEX.
- [26] I. Park, A. Jailani, J. H. Lee, B. Ahmed, and J. Lee, “The Antibiofilm Effects of Antimony Tin Oxide Nanoparticles against Polymicrobial Biofilms of Uropathogenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*,” *Pharmaceutics*, vol. 15, no. 6, Jun. 2023, doi: 10.3390/PHARMACEUTICS15061679.

- [27] T. George, V. Sivam, M. Vaiyapuri, R. Anandan, G. K. Sivaraman, and T. C. Joseph, "Standardizing biofilm quantification: harmonizing crystal violet absorbance measurements through extinction coefficient ratio adjustment," *Arch Microbiol*, vol. 207, no. 3, pp. 1–7, Mar. 2025, doi: 10.1007/S00203-025-04251-0/METRICS.
- [28] P. I. G. Flores, R. B. Valenzuela, L. Delgadillo Ruiz, C. Meza López, and F. Echavarría Cháirez, "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CINCO COMPUESTOS TERPENOIDES: CARVACROL, LIMONENO, LINALOOL, α -TERPINENO Y TIMOL," *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, vol. 22, no. 2, Jul. 2019, doi: 10.56369/TSAES.2838.
- [29] Y. A. Prasetya, K. Nisyak, and E. R. Amanda, "Aktivitas Antibakteri Nanoemulsi Minyak Lengkuas (*Alpinia galanga* L. Willd) dalam menghambat pertumbuhan *Helicobacter pylori*," *Biotropika: Journal of Tropical Biology*, vol. 7, no. 3, pp. 136–142, Dec. 2019, doi: 10.21776/UB.BIOTROPIKA.2019.007.03.7.
- [30] J. L. Baronetti, P. L. Páez, and M. G. Paraje, "Oxidative Imbalance in *Candida tropicalis* Biofilms and Its Relation With Persister Cells," *Front Microbiol*, vol. 11, p. 598834, Feb. 2021, doi: 10.3389/FMICB.2020.598834/BIBTEX.
- [31] K. Reddersen *et al.*, "Critical parameters in cultivation of experimental biofilms using the example of *Pseudomonas fluorescens*," *J Mater Sci Mater Med*, vol. 32, no. 9, p. 96, Sep. 2021, doi: 10.1007/S10856-021-06568-W.
- [32] P. L. Andayani, K. Santoso, N. Kusumorini, A. S. Satyaningtijas, and A. Supiyani, "Determination of High Sucrose Intake to SGPT and SGOT Concentration in Wistar Rats As Indicator of Liver Function," *Bioma*, vol. 12, no. 1, pp. 60–68, Jun. 2016, doi: 10.21009/BIOA12(1).8.
- [33] H. Hamidi *et al.*, "IDENTIFIKASI JENIS TUMBUHAN FAMILY ZINGIBERACEAE DI KEBUN RAYA SRIWIJAYA KABUPATEN OGAN ILIR PROVINSI SUMATERA SELATAN," *STIGMA: Jurnal Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Unipa*, vol. 15, no. 02, pp. 60–66, Sep. 2022, doi: 10.36456/STIGMA.15.02.6273.60-66.
- [34] Setiawan, "Pengembangan Sumberdaya Hayati Lokal untuk Mendukung Pemanfaatan Megabiodiversitas," *Prosiding Seminar Nasional Biologi 2018*, pp. 159–162, 2018, Accessed: Jul. 06, 2025. [Online]. Available: https://www.researchgate.net/publication/333172580_Morphology_Structure_Study_of_Medicine_Plant_Family_Zingiberaceae_at_Sumbersari_Village_Semarang_City_Indonesia
- [35] D. K. Wahyuni, W. Ekasari, and J. R. Witono, *Toga Indonesia*. Surabaya: Airlangga University Press. Accessed: Jul. 06, 2025. [Online]. Available: https://books.google.co.id/books?hl=id&lr=&id=guZwDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR5&dq=BUKU+KUSUMA+ET+AL+2016+TUMBUHAN&ots=_wraGgWdAp&sig=nBrnbMMj9r35iYi87VQPdnAlBVQ&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false
- [36] A. K. Azzahra, C. Destya, R. Putri, and R. Risandiansyah, "Potensi Fraksi Etil Asetat Rimpang Lengkuas Putih (*Alpinia galanga* W) Sebagai Penghambat dan Penghancur Biofilm *Staphylococcus aureus*," *Jurnal Kedokteran Komunitas (Journal of Community Medicine)*, vol. 13, no. 1, 2025, Accessed: Jul. 06, 2025. [Online]. Available: <https://jim.unisma.ac.id/index.php/jkkfk/article/view/27524>
- [37] R. Al-Fariz, E. Kurniawan, J. Ustyawati, B. I. Hijriani, and P. Studi, "Uji Efektivitas Ekstrak Batang Lengkuas (*Alpinia Galanga*) Terhadap Bakteri *Streptococcus Pyogenes* Secara In Vitro," *JSN : Jurnal Sains Natural*, vol. 2, no. 4, pp. 129–133, Nov. 2024, doi: 10.35746/JSN.V2I4.632.
- [38] S. Z. Wahana, R. Risandiansyah, and C. D. R. Putri, "POTENSI FRAKSI AIR RIMPANG LENGKUAS PUTIH (*Alpinia galanga* W.) SEBAGAI AGEN ANTIBIOFILM," *Jurnal Kedokteran Komunitas (Journal of Community Medicine)*, vol. 13, no. 1, 2025, Accessed: Jul. 06, 2025. [Online]. Available: <https://jim.unisma.ac.id/index.php/jkkfk/article/view/27532>
- [39] X. Wu *et al.*, "Staphylococcus aureus biofilm: Formulation, regulatory, and emerging natural products-derived therapeutics," *Biofilm*, vol. 7, p. 100175, Jun. 2024, doi: 10.1016/J.BIOFLM.2023.100175.
- [40] E. J. Besan, I. Rahmawati, and O. Saptarini, "Aktivitas Antibiofilm Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L.) terhadap *Staphylococcus aureus*," *PHARMACY: Jurnal Farmasi Indonesia (Pharmaceutical Journal of Indonesia)*, vol. 20, no. 1, pp. 1–11, Aug. 2023, doi: 10.30595/PHARMACY.V0I0.14437.