

PENGARUH EKSTRAK KLOROFORM DAN ETIL ASETAT *Salvadora persica* TERHADAP ZONA HAMBAT *Staphylococcus aureus* DAN *Streptococcus mutans*

Zulfa Laili Afdhila, Helmin Elyani, Arif Yahya*

*Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Email: arifyahya@unisma.ac.id.

ABSTRAK

Pendahuluan: Infeksi *S.aureus* dan *S.mutans* pada rongga mulut memiliki potensi terhadap kesehatan secara sistemik seperti endokarditis dan aterosklerosis. Ekstrak kloroform dan etil asetat siwak (*Salvadora persica*) mengandung tanin, triterpenoid dan fenol yang berpotensi sebagai antibakteri terhadap *S.aureus* dan *S.mutans*. Tujuan dari penelitian ini adalah membuktikan pengaruh ekstrak kloroform dan etil asetat siwak (*Salvadora persica*) terhadap zona hambat *S.aureus* dan *S.mutans*.

Metode: Eksperimental laboratorik *in vitro post test only* pada dua kelompok. Kontrol positif menggunakan Klindamisin 1 g/l. Kelompok perlakuan menggunakan ekstrak kloroform dan etil asetat *Salvadora persica* (100g/l; 50g/l; 25g/l; 12,5g/l; 6,25g/l; 3,125g/l; 1,562g/l; dan 0,781g/l) yang di paparkan pada bakteri *S.aureus* dan *S.mutans* pada media agar yang masing-masing dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali pada 3 plate. Uji Zona Inhibisi (ZOI) secara Kirby-Bauer. Hasil dianalisa menggunakan uji Mann-Whitney ($p < 0,05$) selanjutnya dilakukan penilaian kekuatan daya hambat kuat, sedang, dan lemah

Hasil: Konsentrasi 100 g/l, 50 g/l, 25g/l, dan 12,5g/l Ekstrak kloroform *Salvadora persica* (EKSP) memiliki ZOI terhadap *S.aureus* 40%, 45%, 60%, dan 90% lebih rendah dibandingkan Klindamisin ($p < 0,05$). Konsentrasi 100 g/l dan 50g/l Ekstrak etil asetat *Salvadora persica* (EEASP) memiliki ZOI terhadap *S.aureus* 50% dan 90% lebih rendah dibandingkan Klindamisin ($p < 0,05$). Konsentrasi 100g/l dan 50g/l EKSP memiliki ZOI terhadap *S.mutans* 47% dan 43% lebih rendah dibandingkan Klindamisin ($p < 0,05$). Konsentrasi 100g/l dan 50g/l EEASP memiliki ZOI terhadap *S.mutans* lebih rendah 60% dan 65% dibandingkan Klindamisin ($p < 0,05$).

Kesimpulan: Ekstrak kloroform dan etil asetat *Salvadora persica* mampu menghambat pertumbuhan *S.aureus* dan *S.mutans*

Kata Kunci: *Salvadora persica*, *S.aureus*, *S.mutans*, zona hambat

Corresponding author: arifyahya@unisma.ac.id

Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang
(0341)551932

THE EFFECT OF CHLOROFORM AND ETHYL ACETATE EXTRACT OF *Salvadora persica* TO INHIBITION ZONE OF *Staphylococcus aureus* AND *Streptococcus mutans*

Zulfa Laili Afdhila, Helmin Elyani, Arif Yahya*

*Faculty of Medicine University of Islam Malang

Email: arifyahya@unisma.ac.id.

ABSTRACT

Introduction : *S.aureus* and *S.mutans* can cause systemic infection such as endocarditis and atherosclerosis. Chloroform and ethyl acetate extract of Miswak (*Salvadora persica*) contains tanin, triterpenoid, and phenol that has antibacterial potential against *S.aureus* and *S.mutans*. This study aims to know the effect of chloroform and ethyl acetate extract to inhibition zone of *S.aureus* and *S.mutans*.

Method : Laboratory experimental *in vitro post test only* in two group. Positive control with Clindamycin 1g/l and the experimental group by using chloroform extract and ethyl acetate extract of *Salvadora persica* ((100g/l; 50g/l; 25g/l; 12,5g/l; 6,25g/l; 3,125g/l; 1,562g/l; and 0,781g/l). All extract were induced to *S.aureus* and *S.mutans* with triplicate in three different plate. Zone of inhibition calculated with Kirby-Bauer method and result were analyzed by Mann Whitney test with level of significance $p < 0.05$ and classified in high, moderate, and low inhibition.

Results : Chloroform extract of *S. persica* (CESP) in concentration 100 g/l, 50 g/l, 25g/l, and 12,5g/l has zone of inhibition against *S.aureus* 40%, 45%, 60%, and 90% lower than Clindamycin ($p < 0,05$). Ethyl acetate extract of *S. persica* (EASP) in concentration 100g/l and 50g/l has zone of inhibition against *S.aureus* 50% and 90% lower than Clindamycin ($p < 0,05$). CESP in concentration 100g/l and 50g/l has zone of inhibition against *S.mutans* 47% and 43% lower than Clindamycin ($p < 0,05$). EASP in concentration 50g/l and 25g/l has zone of inhibition against *S.mutans* 60% and 65% lower than Clindamycin ($p < 0,05$)

Conclusion : Chloroform and ethyl acetate extract of *Salvadora persica* can inhibit the growth of *S.aureus* and *S.mutans*

Keywords: Inhibition zone, *Salvadora persica*, *S.aureus*, *S.mutans*

PENDAHULUAN

Infeksi pada rongga mulut memiliki potensi terhadap kesehatan secara sistemik. *S.aureus* dan *S.mutans* merupakan bakteri patogen di rongga mulut. *S. aureus* memiliki presentase 24%-84% dari semua bakteri di rongga mulut.¹ *S.aureus* menjadi penyebab tersering terjadinya infeksi pada *stomatitis denture*², dan *mucosistis oral*³ yang masing-masing dapat menjadi faktor risiko aterosklerosis², dan *Chorn's disease oral*³. Sedangkan, *S.mutans* merupakan penyebab terbesar infeksi pada kasus periodontitis yang nantinya bisa menjadi faktor risiko endokarditis dan meningitis.⁴ Keberadaan kedua bakteri ini dalam rongga mulut akan tersebar melalui pembuluh darah dan menginfeksi organ lainnya. Pada akhirnya, rongga mulut menjadi *port de entry* beberapa infeksi sistemik¹.

Mekanisme *S.aureus* dan *S.mutans* mempengaruhi sistemik melalui mekanisme peradangan yang dapat menyebabkan sepsis.³ *S.aureus* menginvasi dan menyekresikan gen virulensi pada jaringan mukosa epitel rongga mulut sehingga jaringan mukosa mengalami injuri dan terjadi aktivasi sistem imun. *S.aureus* mengekspresikan mikrokapsul antifagositik, *clumping factor A*, protein A, dan beberapa *complement inhibitors* yang dapat menghambat destruksi dari sel neutrofil untuk menghindari imun *host*.⁴ Invasi *S. aureus* pada mukosa rongga mulut akan menyebar ke pembuluh darah dan membuat sel endotel pembuluh darah rusak. Kerusakan endotel ini diikuti dengan penumpukan sel foam pada tunika media sehingga membentuk plak dan menyebabkan aterosklerosis. Selain itu, bakteremia *S. aureus* akan menginfeksi katup jantung dan membentuk koloni yang akan mengeluarkan mediator inflamasi dan menyebabkan endokarditis. *S. mutans* merupakan bakteri kariogenik yang menyekresi glukosa untuk melekat di tepi endokardium dan merusak katup jantung sehingga menyebabkan endokarditis.^{2,5,6,7} Upaya menurunkan resiko infeksi akibat bakteri tersebut, salah satunya menjaga kebersihan rongga mulut.

Batang kayu siwak disunnahkan sebagai pembersih gigi⁸ dan dikenal memiliki efek antibakteri terhadap *Haemophilus influenzae*, *Aggregatibacter actino-mycetemcomitans*, dan *Porphyromonas gingivalis*⁸, *Streptococcus mutans*⁹. Ekstrak kloroform dan etil asetat siwak mengandung senyawa tanin, saponin triterpenoid, dan fenol.¹⁰ Ekstrak kloroform dan etil asetat siwak mampu menarik bahan antibakteri seperti benzyl isothiocyanate¹¹ (yang termasuk senyawa alkaloid), dan α -tocopherol¹² (yang termasuk senyawa triterpenoid) yang mampu mengganggu metabolisme energi bakteri¹¹ serta transpor ion.¹²

Etil asetat merupakan pelarut organik semi polar dengan toksisitas rendah yang secara selektif menarik senyawa alkaloid, terpenoid, phenol, dan anthraquinones.¹³ Kloroform merupakan pelarut non-polar sehingga diharapkan dapat menarik senyawa non-polar yang berpotensi sebagai antibakteri seperti alkaloid.¹⁴

Berdasarkan data diatas, penulis ingin membuktikan efek antibakteri ekstrak kloroform dan etil asetat siwak terhadap *S.aureus* dan *S.mutans*.

METODE PENELITIAN

Desain dan Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan eksperimental laratorik *in-vitro* dengan pendekatan kuantitatif.

Waktu dan Tempat Penelitian

Laboratorium Mikrobiologi dan Herbal Biomedik Fakultas Kedokteran UNISMA mulai Maret – Oktober 2019.

Pembuatan Ekstrak Etil Asetat dan kloroform Siwak (*Salvadora persica*)

Siwak (*Salvadora persica*) dibeli dan disimplisia di UPT Materia Medica Kota Batu. Simplisia diekstraksi di Laboratorium Herbal Medik Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. Simplisia dimaserasi menggunakan pelaut etil asetat dan kloroform.

Pada ekstraksi dengan pelarut kloroform menggunakan 160 gr simplisia siwak (*Salvadora persica*) dibagi menjadi dua sampel dan ditimbang pada neraca digital. Simplisia seberat 80gram direndam dengan 400 ml kloroform dan ditampung menggunakan erlenmeyer berukuran 500 ml. Konsentrasi awal yang didapatkan adalah 200mg/l kemudian dilarutkan menjadi berbagai konsentrasi yaitu 100g/l; 50g/l; 25g/l; 12,5g/l; 6,25g/l; 3,125g/l; 1,562g/l; dan 0,781g/l. Erlenmeyer selanjutnya ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan selama 1 hari didalam *shaker water bath*.¹³

Pada ekstraksi dengan pelarut Etil Asetat digunakan simplisia siwak (*Salvadora persica*) sebanyak 80 gr dan direndam dengan 400 ml etil asetat. Ekstrak kemudian ditampung menggunakan erlenmeyer berukuran 500 ml. Konsentrasi awal ekstrak etil asetat *Salvadora persica* didapatkan 200mg/ml. Konsentrasi awal tersebut kemudian dilarutkan 1/2x, 1/4x, 1/8x, 1/16x, 1/32x, 1/64x, 1/128x, 1/256x dan 1/512x sehingga konsentrasinya menjadi 100g/l; 50g/l; 25g/l; 12,5g/l; 6,25g/l; 3,125g/l; 1,562g/l; dan 0,781g/l. Erlenmeyer selanjutnya ditutup dengan aluminium foil dan didiamkan selama 1 hari didalam *shaker water bath*.^{14,15}

Kemudian hari berikutnya hasil ekstraksi difiltrasi dengan filter yang dibantu dengan *vacuum*,

filtrat yang dihasilkan kemudian dievaporasi dengan *Rotary vacum evaporator* sampai terpisah dengan pelarutnya. Ekstrak tersebut selanjutnya ditampung dalam gelas beker 100 ml (yang telah ditimbang) dan di masukkan ke dalam oven dengan suhu 55 – 60 °C untuk ekstrak siwak dengan kloroform hanya dioven selama 1 hari sedangkan ekstrak etil asetat selama 24-48 jam hal ini dilakukan sampai ekstrak menjadi kental atau seperti pasta, lalu ditimbang. Hasil yang didapatkan dalam bentuk pasta untuk EKSP adalah 1,7g sedangkan EEASP adalah 1,3g. Hasil ekstraksi ini selanjutnya akan digunakan untuk uji ZOI.

Uji Fitokimia Ekstrak Etil Asetat dan Kloroform

Skrining fitokimia dilakukan di UPT Materia Medica Batu. Metode skrining fitokimia yang dilakukan dengan melihat reaksi pengujian warna dengan menggunakan suatu pereaksi warna. Skrining fitokimia tersebut meliputi pemeriksaan kandungan senyawa alkaloid, flavonoida, terpenoida/steroid, tanin dan saponin.¹⁶

Pada uji Alkaloid, digunakan larutan uji sebanyak 2 ml diuapkan diatas cawan porselin hingga diperoleh residu. Residu kemudian dilarutkan dengan 5 mL HCl 2N. Setelah dingin, larutan disaring. Larutan yang didapat dibagi ke dalam 3 tabung reaksi. Tabung pertama berfungsi sebagai kontrol. Tabung ke 2 ditambahkan 3 tetes pereaksi dragendorff dan tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi mayer (melalui dinding tabung). Terbentuknya endapan jingga pada tabung kedua dan endapan kuning pada tabung ketiga menunjukan adanya alkaloid.¹⁷

Uji Flavonoid, menggunakan 3 tabung reaksi yang masing-masing berisi 1 mL larutan uji. Tabung 1 sebagai kontrol, tabung 2 ditambah dengan 1 mL larutan Pb Asetat (timbang asetat) 10%, positif flavonoid jika terdapat endapan kuning.¹⁸ Tabung 3 ditambah dengan beberapa tetes NaOH 20% terbentuk warna kuning jika mengandung flavonoid.¹⁹

Pada uji Tanin, sebanyak 2 mL larutan uji dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi, tabung 1 sebagai kontrol dan tabung 2 ditambahkan beberapa tetes larutan FeCl₃ 5% atau FeCl₃ 10%, positif Tanin jika terbentuk warna hijau gelap/biru.¹⁷

Uji Triterpenoid/Steroid, digunakan larutan uji sebanyak 2 mL yang diuapkan dalam cawan penguap. Residu dilarutkan dengan 0,5 mL kloroform, dipindahkan ke tabung reaksi,

ditambahkan 0,5 mL asam asetat anhidrat dan 2 mL asam sulfat pekat melalui dinding tabung. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila muncul cincin biru kehijauan menunjukkan adanya steroid.¹⁷

Pada uji Fenol, sebanyak 50 mg ekstrak ditambah 10 mL air kemudian dipanaskan selama 5 menit dan disaring. Sebanyak 3 mL larutan dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi, tabung 1 ditambahkan beberapa tetes larutan NaOH 1 N bila positif maka terbentuk larutan berwarna merah dan tabung 2 sebagai kontrol.¹⁷

Uji Saponin, dibutuhkan 4 mL larutan uji ditambahkan dengan 5 mL aquadest, kocok, lihat adanya busa yang stabil. Sedikit ekstrak ditambahkan 5 mL air, kocok dalam tabung reaksi, terbentuk busa stabil (busa setinggi 1 cm dan stabil selama 30 menit). 4 mL larutan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebagai kontrol.¹⁷

Metode Pembuatan Isolat Bakteri

Isolat bakteri *Staphylococcus aureus* yang didapatkan dari Laboratorium Terpadu Universitas Islam Malang dan *Streptococcus mutans* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang. Sampel bakteri yang didapat dilakukan *striking* pada media agar menggunakan oshe. Media agar yang telah dilakukan *striking* disimpan dalam inkubator untuk dibiakkan selama 18-24 jam dengan suhu 37°C.²⁰

Metode Pembuatan Suspensi Bakteri

Suspensi bakteri dibuat dengan melakukan homogenisasi pada bakteri menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600nm. Tes homogenisasi dilakukan dengan menggoreskan oshe steril sebanyak 1-2 kali pada isolat bakteri kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 10 ml NaCl 0,9% steril. Tabung reaksi diambil 3 ml dengan mikropipet dan dimasukkan kedalam kuvet. Kuvet kemudian dilakukan vorteks untuk tes homogenisasi bakteri dengan spektrofotometer. Hasil dari nilai spektrofotometer akan dilakukan pengenceran dengan rumus Jumlah pengenceran = Hasil absorbansi / 0,2. Nilai absorbansi kemudian dicatat dan dilakukan pengenceran dengan target OD600nm adalah 0,2.²⁰

perbandingan 1:50 kemudian di autoklaf. Setelah steril kemudian suhu media diukur dengan menggunakan termometer cahaya, apabila suhu <

Pembuatan Media Nutrient Agar

Nutrient Agar (NA) sebanyak 3 gram dilarutkan dalam aquades steril dengan

50°C selanjutnya suspensi bakteri yang telah dibuat dimasukkan sebanyak 3% dari volume media *Nutrient Broth* (3ml dalam 300ml media). Media digoyang-goyangkan sampai suspensi bakteri tercampur rata, dan kemudian dituang ke dalam cawan petri diameter 90mm dengan ketinggian 7,5mm. Media agar didiamkan hingga dingin dan siap untuk digunakan dalam pembuatan sumuran dan uji ZOI.^{20,21}

Pembuatan Larutan Klindamisin

Pada tahapan ini digunakan antibiotik klindamisin sebanyak 10mg. Antibiotik kemudian dilarutkan dengan 10mL aquades dengan rumus konsentrasi dosis = berat antibiotik / volume pelarut. Dosis klindamisin yang didapatkan adalah 10mg/10ml atau 1g/l seperti penelitian sebelumnya.²² Larutan klindamisin disini digunakan sebagai kontrol positif.

Zone of Inhibition (ZOI)

Uji zona inhibisi diawali dengan melakukan persiapan media agar sebanyak 16 plate yang terdiri dari bakteri *S.mutans* dan *S.aureus* masing-masing 8 plate. Setiap plate dibuat 10 lubang/sumuran dengan diameter sekitar 6 mm menggunakan *cork borer*.²³ Lubang 1-8 berisi ekstrak tunggal etil asetat dan kloroform siwak. Lubang ke-9 sebagai kontrol negatif berisi aquades dan lubang ke-10 sebagai kontrol positif yang berisi larutan klindamisin (1 gram/l). Setiap lubang diberikan larutan uji menggunakan *micropipette* sebanyak 30µl. Pengulangan tiap perlakuan masing-masing dilakukan pada 3 plate.

Apabila didapatkan zona bening disekitar lubang, maka menandakan adanya daya hambat dari ekstrak Siwak terhadap pertumbuhan bakteri lalu dilakukan pengukuran diameter zona bening yang disebut sebagai ZOI. Pengukuran diameter ZOI dilakukan dengan menggunakan penggaris dengan satuan milimeter (mm). Pada analisa data pertama-tama dilakukan pemeriksaan zona inhibisi dilakukan dengan cara menghitung diameter dari *clear zone* menggunakan penggaris. Penggaris yang digunakan memiliki tingkat ketelitian 1 mm, Tingkat kekuatan

zona hambat dinilai melalui indikator:

- Diameter hambat < 5 mm : daya antibakteri lemah.
- Diameter hambat 5 – 10 mm : daya antibakteri sedang.
- Diameter hambat 10 – 20 mm : daya antibakteri kuat.
- Diameter hambat > 20mm : daya antibakteri sangat kuat.³⁰

Analisa Data

Selanjutnya diolah dengan menggunakan *Statistical Package for the Social Science (SPSS)* versi 17.²⁴ Data zona hambat hasil pengukuran ditampilkan dalam bentuk rerata dan standar deviasi. Data zona hambat kemudian dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Apabila data normal dan homogen maka dilakukan uji *One-Way ANOVA* dan dilanjutkan uji *t-test* sedangkan apabila data tidak normal dan homogen akan dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan *Mann Whitney*. Selain itu, data juga ditampilkan dalam bentuk rerata dan standar deviasi. Kekuatan zona inhibisi kemudian dikelompokkan menjadi tiga jenis yaitu lemah (<5mm), sedang (5-10mm), kuat (10-20mm), dan sangat kuat (>20mm).

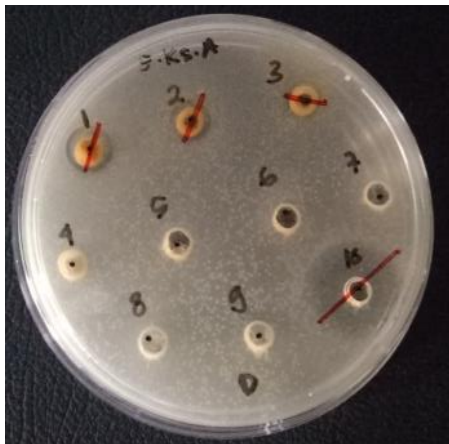
HASIL DAN ANALISA DATA

Hasil Uji Fitokimia *Salvadora persica*

Hasil analisa zoi ini didukung oleh adanya uji fitokimia pada kedua ekstrak baik etil asetat maupun kloroform didapatkannya keduanya positif mengandung tanin, triterpenoid, dan fenol.

Hasil Pengukuran Zona Inhibisi Ekstrak Kloroform *Salvadora persica* terhadap Bakteri *S. aureus*

Berdasarkan penelitian uji ZOI ekstrak kloroform *Salvadora persica* terhadap bakteri *S.aureus* yang telah dilakukan didapatkan hasil seperti pada gambar 1, gambar 2, dan Tabel 1.



Gambar 1. Hasil Pengukuran Uji ZOI ekstrak Kloroform *Salvadora persica* terhadap bakteri *S.aureus*.

Keterangan: Pengenceran 1 = 1/2x (100g/l), 2 = 1/4x (50g/l), 3 = 1/8x (25g/l), 4 = 1/16x (12,5g/l), 5 = 1/32x (6,25g/l), 6 = 1/64x (3,125g/l), 7 = 1/128x (1,562g/l), 8 = 1/256x (0,781g/l).

Tabel 1. Hasil Pengukuran Zona Inhibisi Ekstrak Kloroform Terhadap *S.aureus*

Konsentrasi (g/l)	Rata-rata $\pm$ SD (mm)	Kekuatan (N=3)
KN	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada
KP	22,67 $\pm$ 3,06 ^b	Sangat Kuat
100	13,33 $\pm$ 2,08 ^c	Kuat
50	12,33 $\pm$ 1,15 ^c	Kuat
25	9,67 $\pm$ 1,15 ^c	Sedang
12,5	2,67 $\pm$ 4,6 ^d	Lemah
6,25	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada
3,125	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada
1,562	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada
0,781	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada

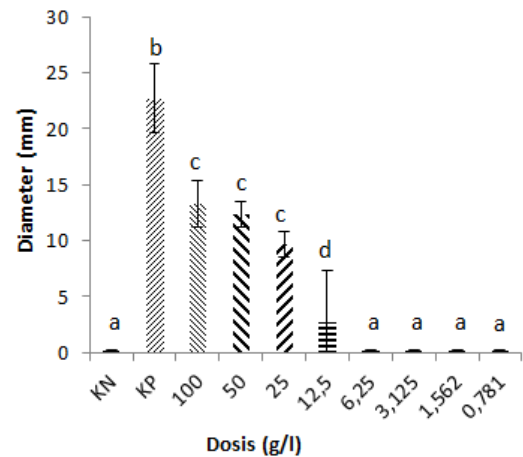
Keterangan:

Pengukuran zona inhibisi dilakukan pengulangan tiga kali. Data yang didapat tidak berdistribusi normal dan homogen sehingga dilakukan uji *Kruskal Wallis*. Pengujian *Kruskal Wallis* menunjukkan $p < 0,05$ sehingga dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

KN : Kontrol Negatif (aquades)

KP : Kontrol Positif (klindamisin 1g/l)

a,b,c,d : notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan



Gambar 2. Rata-rata Zona Inhibisi Ekstrak Kloroform *Salvadora persica* Terhadap *S.aureus*

Keterangan: KN, Kontrol Negatif (aquades); dan KP (klindamisin 1g/l), Kontrol Positif; (a,b,c,d), notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan

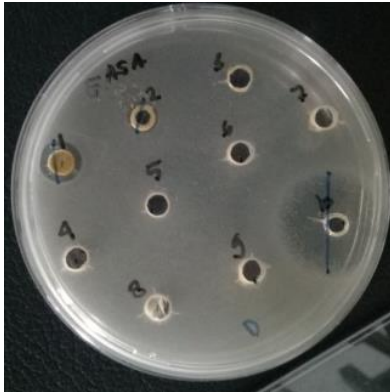
Pada Gambar 1 terlihat 10 sumuran dengan 8 sumuran diuji menggunakan 30 μ l ekstrak kloroform *Salvadora persica*. Pada sumuran 1-8 terisi dengan beberapa pengenceran yang berbeda sesuai gambar. Zona bening terdapat disekitar sumuran 1, 2 dan 3 yang mengartikan bahwa didapatkan aktivitas inhibisi pada zona tersebut. Pada sumuran lainnya tidak didapatkan zona bening pada sekitar sumuran.

Berdasarkan hasil dari Tabel 1 dan Gambar 2 menunjukkan bahwa zona inhibisi terbesar didapatkan pada kontrol positif yang terdiri dari larutan antibiotik klindamisin 1g/l. Zona inhibisi terbesar dari ekstrak kloroform didapatkan pada pengenceran 1/2x. Zona inhibisi menjadi kecil seiring dengan penurunan konsentrasi dari ekstrak.

Berdasarkan hasil dari Tabel 1 dan Gambar 2 didapatkan bahwa dosis 100g/l dan 50g/l memiliki daya hambat kuat meskipun dibawah klindamisin. Dosis ekstrak tersebut memiliki zona inhibisi 40% dan 50% lebih rendah dibandingkan klindamisin. Dosis 25g/l memiliki daya hambat sedang dan memiliki zona inhibisi 60% lebih rendah dari klindamisin.

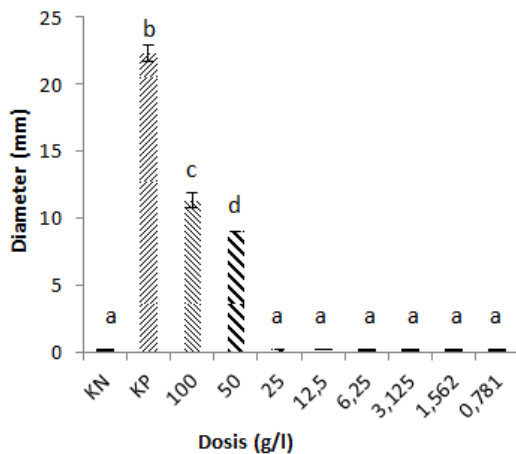
Hasil Pengukuran Zona Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Salvadora persica* terhadap *S.aureus*

Uji Zona Inhibisi merupakan pengujian kemampuan suatu senyawa terhadap daya hambat suatu kolonisasi bakteri. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan didapatkan hasil pada Gambar 3, Gambar 4, dan Tabel 2



Gambar 3. Hasil Zona Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Salvadora persica* Terhadap *S.aureus*.

Keterangan: Gambar 3 menunjukkan hasil uji ZOI ekstrak etil asetat *Salvadora persica* terhadap bakteri *S.aureus*. Adapun dengan pengenceran, 1= 1/2x (100g/l), 2 =1/4x (50g/l), 3 = 1/8x (25g/l), 4 = 1/16x (12,5g/l), 5 = 1/32x (6,25g/l), 6 = 1/64x (3,125g/l), 7 = 1/128x (1,562g/l) , 8 = 1/256x (0,781g/l).



Gambar 4 Rata-rata Zona Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Salvadora persica* Terhadap *S. aureus*
Keterangan: KN, Kontrol Negatif (aquades); dan KP, Kontrol Positif (klindamisin 1g/l); (a,b,c,d), notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan

Tabel 2 Zona Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Salvadora persica* Terhadap *S. aureus*

Konsentrasi (g/l)	Rata-rata $\pm$ SD (mm)	Kekuatan (N=3)
KN	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada
KP	22,33 $\pm$ 0,57 ^b	Sangat Kuat
100	11,33 $\pm$ 0,57 ^c	Kuat
50	9,00 $\pm$ 0,00 ^d	Sedang
25	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada
12,5	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada
6,25	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada
3,125	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada
1,562	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada
0,781	0,00 $\pm$ 0,00 ^a	Tidak ada

Keterangan:

Pengukuran zona inhibisi dilakukan pengulangan tiga kali. Data yang didapat tidak berdistribusi normal dan homogen sehingga dilakukan uji Kruskal Wallis. Pengujian Kruskal Wallis menunjukkan $p < 0,05$ sehingga dilanjutkan dengan uji Mann Whitney dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

KN : Kontrol Negatif (aquades)

KP : Kontrol Positif (klindamisin 1g/l)

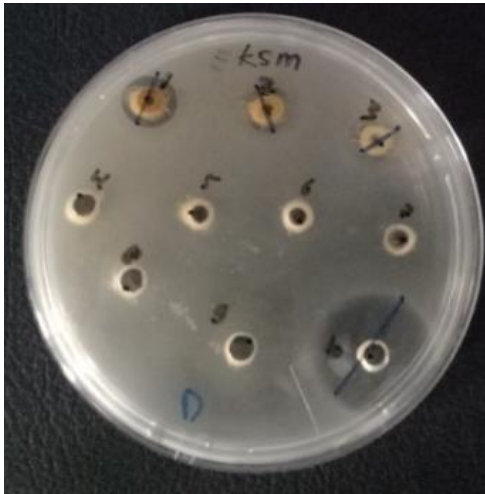
a,b,c,d : notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan

Pada Gambar 3 terlihat 10 sumuran dengan 8 sumuran diuji menggunakan 30 μ l ekstrak etil asetat *Salvadora persica*. Pada sumuran 1-8 terisi dengan beberapa pengenceran yang berbeda sesuai gambar. Zona bening terdapat disekitar sumuran 1 dan 2 yang mengartikan bahwa didapatkan aktivitas inhibisi pada zona tersebut. Pada sumuran lainnya tidak didapatkan zona bening pada sekitar sumuran.

Berdasarkan hasil dari Tabel 2 dan Gambar 4 didapatkan bahwa dosis 100g/l memiliki daya hambat kuat meskipun dibawah klindamisin. Dosis ekstrak tersebut memiliki zona inhibisi 50% lebih rendah dibandingkan klindamisin. Dosis 50g/l memiliki daya hambat sedang dan memiliki zona inhibisi 60% lebih rendah dari klindamisin.

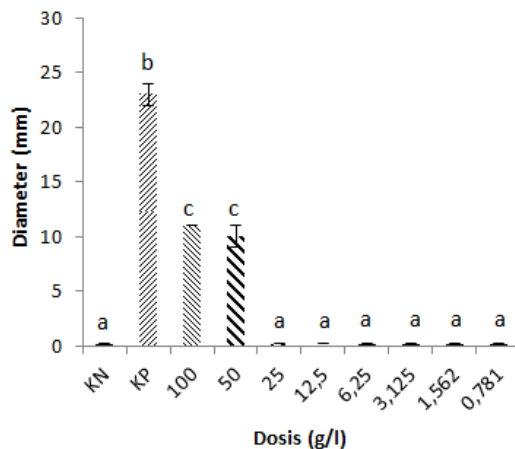
Hasil Pengukuran Zona Inhibisi Ekstrak Kloroform *Salvadora persica* Terhadap *S.mutans*

Berdasarkan penelitian uji ZOI ekstrak kloroform *Salvadora persica* terhadap bakteri *S.mutans* yang telah dilakukan didapatkan pada Gambar 5, Gambar 6 dan Tabel 3



Gambar 5. Hasil Pengukuran Uji ZOI ekstrak kloroform *Salvadora persica* terhadap bakteri *S.mutans*.

Keterangan: Pengenceran 1 = 1/2x (100g/l), 2 = 1/4x (50g/l), 3 = 1/8x (25g/l), 4 = 1/16x (12,5g/l), 5 = 1/32x (6,25g/l), 6 = 1/64x (3,125g/l), 7 = 1/128x (1,562g/l), 8 = 1/256x (0,781g/l).



Gambar 6. Rata-rata Zona Inhibisi Ekstrak Kloroform *Salvadora persica* Terhadap *S. mutans*

Keterangan: KN, Kontrol Negatif (aquades); dan KP (klindamisin 1g/l), Kontrol Positif, (a,b,c,d), notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan

Tabel 3. Zona Inhibisi Ekstrak Kloroform *Salvadora persica* Terhadap *S. mutans*

Konsentrasi (g/l)	Rata-rata ± SD (mm)	Kekuatan (N=3)
KN	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
KP	23,00 ± 1,00 ^b	Sangat Kuat
100	11,00 ± 0,00 ^c	Kuat
50	10,00 ± 1,00 ^c	Sedang
25	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
12,5	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
6,25	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
3,125	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
1,562	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
0,781	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada

Keterangan:

Pengukuran zona inhibisi dilakukan pengulangan tiga kali. Data yang didapat tidak berdistribusi normal dan homogen sehingga dilakukan uji Kruskal Wallis. Pengujian Kruskal Wallis menunjukkan $p < 0,05$ sehingga dilanjutkan dengan uji Mann Whitney dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

KN : Kontrol Negatif (aquades)

KP : Kontrol Positif (klindamisin 1g/l)

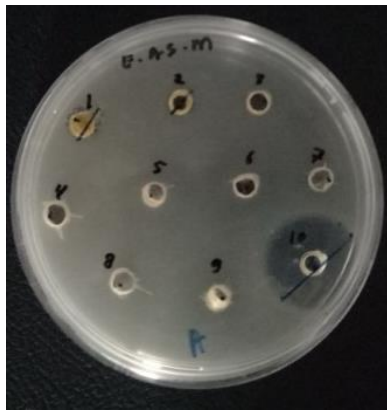
a,b,c : notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan

Pada Gambar 5 terlihat 10 sumuran dengan 8 sumuran diuji menggunakan 30µl ekstrak kloroform *Salvadora persica*. Pada sumuran 1-8 terisi dengan beberapa pengenceran yang berbeda sesuai gambar. Didapatkan zona bening disekitar sumuran 1, 2 dan 3 yang membuktikan bahwa didapatkan aktivitas inhibisi pada zona tersebut. Sedangkan pada sumuran lainnya tidak didapatkan zona bening pada sekitar sumuran.

Berdasarkan hasil dari Tabel 3 dan Gambar 6 didapatkan bahwa dosis 100g/l memiliki daya hambat kuat meskipun dibawah klindamisin. Dosis ekstrak tersebut memiliki zona inhibisi 43% lebih rendah dibandingkan klindamisin. Dosis 50g/l memiliki daya hambat sedang dan memiliki zona inhibisi 47% lebih rendah dari klindamisin.

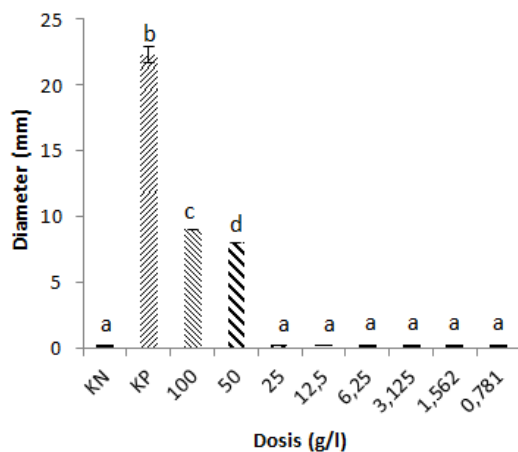
Hasil Pengukuran Zona Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Salvadora persica* terhadap bakteri *S. mutans*

Berdasarkan penelitian uji ZOI ekstrak etil asetat *Salvadora persica* terhadap bakteri *S.mutans* terdapat Gambar 7, Gambar 8, dan Tabel 4



Gambar 7. Hasil Pengukuran Uji ZOI ekstrak etil asetat *Salvadora persica* terhadap bakteri *S.mutans*.

Keterangan: 1 = $1/2 \times$ (100g/l), 2 = $1/4 \times$ (50g/l), 3 = $1/8 \times$ (25g/l), 4 = $1/16 \times$ (12,5g/l), 5 = $1/32 \times$ (6,25g/l), 6 = $1/64 \times$ (3,125g/l), 7 = $1/128 \times$ (1,562g/l), 8 = $1/256 \times$ (0,781g/l).



Gambar 8. Rata-rata Zona Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Salvadora persica* Terhadap *S. mutans*

Keterangan: KN, Kontrol Negatif (aquades); dan KP (klindamisin 100mg/l), Kontrol Positif, (a,b,c,d), notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan

Tabel 4. Zona Inhibisi Ekstrak Etil Asetat *Salvadora persica* Terhadap *S. mutans*

Konsentrasi (g/l)	Rata-rata ± SD (mm)	Kekuatan (N=3)
KN	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
KP	22,33 ± 0,57 ^b	Sangat Kuat
100	9,00 ± 0,00 ^c	Sedang
50	8,00 ± 0,00 ^d	Sedang
25	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
12,5	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
6,25	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
3,125	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
1,562	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada
0,781	0,00 ± 0,00 ^a	Tidak ada

Keterangan:

Pengukuran zona inhibisi dilakukan pengulangan tiga kali. Data yang didapat tidak berdistribusi normal dan homogen sehingga dilakukan uji Kruskal Wallis. Pengujian Kruskal Wallis menunjukkan $p < 0,05$ sehingga dilanjutkan dengan uji Mann Whitney dengan tingkat signifikansi $p < 0,05$.

KN : Kontrol Negatif (aquades)

KP : Kontrol Positif (klindamisin 1g/l)

a,b,c,d : notasi yang berbeda menunjukkan perbedaan signifikan

Pada gambar 7 terlihat 10 sumuran dengan 8 sumuran diuji menggunakan 30µl ekstrak etil asetat *Salvadora persica*. Pada lubang 1-8 terisi dengan beberapa pengenceran yang berbeda sesuai gambar. Didapatkan zona bening disekitar sumuran 1 dan 2 yang mengartikan bahwa didapatkan aktivitas inhibisi pada zona tersebut. Sedangkan pada sumuran lainnya tidak didapatkan zona bening pada sekitar sumuran.

. Berdasarkan hasil dari Tabel 4 dan Gambar 8 didapatkan bahwa dosis 100g/l memiliki daya hambat kuat meskipun dibawah klindamisin. Dosis ekstrak tersebut memiliki zona inhibisi 60% lebih rendah dibandingkan klindamisin. Dosis 50g/l memiliki daya hambat sedang dan memiliki zona inhibisi 65% lebih rendah dari klindamisin.

PEMBAHASAN

Efek Ekstrak Kloroform *Salvadora persica* terhadap Zona Inhibisi bakteri *S. aureus*

Pada penelitian ini menggunakan ekstraksi pelarut kloroform untuk menarik senyawa non polar sedangkan pelarut etil asetat untuk menarik senyawa semi polar. Ekstrak Kloroform *Salvadora persica* memiliki efek antibakteri terhadap *S. aureus* (Tabel 1). Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya zona inhibisi pada bakteri *S. aureus* (Gambar 1). Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya bahwa ekstrak kloroform memiliki efek antibakteri terhadap *S. aureus*.¹⁴ Efek antibakteri ekstrak kloroform lebih rendah dibandingkan dengan kontrol positif yaitu klindamisin. Peneliti menduga, hal ini disebabkan karena ekstrak herbal memiliki banyak senyawa aktif sedangkan antibiotik hanya senyawa tunggal.¹⁴ Banyaknya senyawa aktif pada ekstrak herbal menyebabkan adanya berbagai interaksi yang berpotensi bersifat antagonis sehingga menjadi tidak efektif dalam membunuh bakteri. Berbeda dengan klindamisin, klindamisin memiliki satu jenis senyawa aktif yang memiliki mekanisme menghambat sintesis protein ribosom 50s.²² Pada penelitian ini ekstrak kloroform *Salvadora persica* memiliki zona inhibisi lebih rendah dibandingkan klindamisin. Zona inhibisi ekstrak kloroform belum mencapai zona inhibisi klindamisin. Peneliti menduga, penurunan aktivitas bakteri disebabkan karena adanya penurunan senyawa antibakteri yang terkandung dalam ekstrak tersebut. Berdasarkan penelitian oleh Omer *et al* (2010) menunjukkan bahwa ekstrak aquades dari *Salvadora persica* memiliki zona inhibisi lebih tinggi dibandingkan dengan kloroform dan etil asetat dalam membunuh *S. aureus* dan *S. mutans*.²⁰ Oleh sebab itu, perlu dilakukan ekstraksi menggunakan pelarut aquades.

Berdasarkan uji fitokimia ekstrak kloroform *Salvadora persica* mengandung senyawa tanin, triterpenoid, dan fenol. Senyawa ekstrak kloroform yang paling dominan dari *Salvadora persica* adalah *benzyl isothiocyanate* yang tergolong dalam senyawa alkaloid.²⁵ *Benzyl isothiocyanate* membunuh bakteri dengan cara meningkatkan regulasi *heat shock response genes*. Ekspresi gen ini akan mengganggu metabolisme energi bakteri sehingga menurunkan sintesis ATP dan membunuh bakteri.²⁶ Senyawa triterpenoid memiliki mekanisme menghambat *efflux pump* sehingga bakteri mengalami gangguan transport ion.²⁷ Senyawa tanin memiliki mekanisme merusak dinding sel bakteri sehingga menyebabkan bakteri edem dan lisis.²⁸ Senyawa fenol memiliki mekanisme mengikat enzim vital bakteri menggunakan ikatan hidrogen.²⁹

Temuan ini berbeda dengan penelitian oleh beberapa peneliti sebelumnya yang menyatakan

bahwa senyawa ekstrak kloroform *Salvadora persica* mengandung senyawa alkaloid.^{30,31,32,33} Pada penelitian lain *Salvadora persica* memiliki senyawa Stigmast-5-en-3 β -ol.³⁴ Perbedaan kandungan senyawa aktif pada penelitian ini diduga disebabkan karena perbedaan herbal yang diekstraksi. Hal ini disebabkan karena kondisi geografis dapat mempengaruhi tumbuhan untuk menyintesis senyawa tertentu.

Efek Ekstrak Etil Asetat *Salvadora persica* terhadap Zona Inhibisi bakteri *S. aureus*

Ekstrak etil asetat *Salvadora persica* memiliki efek antibakteri terhadap *S. aureus* (Tabel 2). Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya zona inhibisi pada bakteri *S. aureus* (Gambar 3). Ekstrak etil asetat mengandung senyawa tanin, triterpenoid, dan fenol. Pada penelitian lain ekstrak etil asetat mengandung fenol yang terdiri dari beberapa senyawa antara lain *Pyrogallol*, *Salycilic*, *e-vanillic*, *Ceumarin*, *Benzoic*, *Ellagic*, *Protocatechuic*, *Ferulic*, *Caffeine*, *Chlorogenic*, *Catechin*, *P-OH-benzoic* dan *Gallic*.³⁵ Penelitian lain menyebutkan bahwa ekstrak etil asetat juga memiliki senyawa *Benzyl isothiocyanate*, *Benzyl cyanide*, dan *Benzyl nitrile*.^{25,36,37,38,39} Hasil yang berbeda didapatkan pada penelitian lain yang membuktikan bahwa terdapat senyawa alkaloid yang ada di ekstrak etil asetat.^{40,41} Perbedaan hasil ini dapat disebabkan karena perbedaan letak geografis yang mempengaruhi jenis senyawa aktif herbal.

S. aureus merupakan bakteri gram positif yang memiliki dinding peptidoglikan. *S. aureus* menginfeksi dengan cara menempel pada sel *host* dan menghindari respon pertahanan sel *host*. *S. aureus* menyekresikan toksin, *leukocidine*, kapsul polisakarida, protein A, dan enzim koagulase serta *staphylokinase*. Beberapa protein tersebut yang akan menghambat leukosit untuk melakukan fagositosis dan opsonisasi.⁴²

Pada dosis 100g/l memiliki zona inhibisi kuat meskipun lebih rendah dibandingkan klindamisin. Penurunan konsentrasi menurunkan efek antibakteri bakteri. Peneliti menduga, penurunan aktivitas bakteri disebabkan karena penurunan senyawa antibakteri pada ekstrak etil asetat. Pada penelitian ini, hasil ekstrak kloroform lebih efektif dalam membunuh *S. aureus* dibandingkan dengan ekstrak etil asetat. Hal ini diduga disebabkan oleh perbedaan senyawa yang terdapat dalam kedua pelarut tersebut. Ekstrak kloroform mengandung jumlah senyawa *benzylisothiocyanate* lebih besar dibandingkan dengan ekstrak etil asetat.²⁵

Pada penelitian ini, zona hambat yang terbentuk oleh kedua ekstraksi lebih kecil dibandingkan dengan kontrol positif (Tabel 1 dan Tabel 2). Hal ini diduga disebabkan karena adanya

berbagai senyawa yang bersifat antagonis. Oleh sebab itu, perlu penelitian lebih lanjut menggunakan fraksinasi dari tiap ekstraksi untuk meningkatkan efektivitas dari herbal ini.

Efek Ekstrak Kloroform *Salvadora persica* terhadap Zona Inhibisi bakteri *S. mutans*

Ekstrak kloroform *Salvadora persica* memiliki efek antibakteri terhadap *S. mutans* (Tabel 3). Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya zona inhibisi pada bakteri *S. mutans* (Gambar 5). Pada dosis 100g/l memiliki zona inhibisi kuat meskipun lebih renah dibandingkan klindamisin. Terjadi penurunan zona inhibisi seiring dengan penurunan dosis disebabkan karena penurunan konsentrasi senyawa antibakteri dalam ekstrak tersebut. Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya bahwa ekstrak kloroform memiliki efek antibakteri terhadap *S. mutans*.¹⁴ Selain itu, ekstrak kloroform juga diketahui memiliki efek antibakteri terhadap *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus sanguis*, dan *Streptococcus salivarius*.^{15, 38}

S. mutans dapat tumbuh dalam rongga mulut menggunakan berbagai mekanisme. *S. mutans* menyekresikan *fructosyl transferase* yang berfungsi untuk menyintesis glukans. Glukans ini berfungsi untuk menurunkan proteksi dan efek antimikroba saliva. *S. mutans* juga menyintesis *glucosyl transferase* yang digunakan untuk sintesis dekstran dan glukans. Dekstran dan glukans ini berfungsi untuk adhesi pada gigi dan membentuk plak. Selain itu, *S. mutans* juga dapat memetabolisme glikolisis sehingga menghasilkan asam laktat yang dapat menurunkan pH oral. Penurunan pH ini akan menyebabkan bakteri tetap hidup sehingga tetap mengalami pertumbuhan.⁴³

Ekstrak kloroform memiliki senyawa *benzyl isothiocyanate* yang dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans*. *Benzyl isothiocyanate* membunuh *S. mutans* dengan cara mengganggu metabolisme bakteri sehingga mengalami kematian.²⁶ Pada penelitian lain, ekstrak kloroform juga diketahui memiliki senyawa alkaloid. Senyawa alkaloid membunuh bakteri dengan cara menghambat pembelahan sel dan menghambat enzim pada bakteri.⁴⁴

Efek Ekstrak Etil Asetat *Salvadora persica* terhadap Zona Inhibisi bakteri *S. mutans*

Ekstrak etil asetat *Salvadora persica* memiliki efek antibakteri terhadap *S. mutans* (Tabel 4). Hal ini dibuktikan dengan terbentuknya zona inhibisi pada

bakteri *S. mutans* (Gambar 7). Pada dosis 100g/l kuat meskipun diameternya lebih kecil dibandingkan kontrol positif. Pada penelitian ini, penurunan dosis menyebabkan penurunan zona inhibisi diduga disebabkan oleh penurunan jumlah senyawa aktif dalam ekstrak tersebut.

S. mutans merupakan bakteri yang menginfeksi rongga mulut yang berpotensi menyebabkan infeksi sistemik. *S. mutans* menyintesa glukans dan mengekspresikan *collagen binding protein* (CBP). Glukans membantu *S. mutans* untuk melakukan perlekatan pada endokardium sehingga bakteri ini dapat menginfeksi dan merusak katup jantung. Kerusakan katup jantung ini dapat menyebabkan regurditasi dan inflamasi pada endokardium. Ekspresi CBP menginduksi *matrix metallo-protease-9* (MMP-9) sehingga menyebabkan kerusakan endotel. Kerusakan endotel ini dapat menyebabkan aterosklerosis dan infark miokardium.⁴⁵

Di Indonesia *S. persica* sering digunakan sebagai sikat gigi. Pada saat digunakan sebagai sikat gigi senyawa siwak yang berperan adalah *benzyl isothiocyanate*, *benzyl cyanide*, dan *benzaldehyde*.⁸ Penggunaan siwak sebagai sikat gigi dapat menurunkan tingkat patogen periodontal yang cukup rendah.³⁷ Selain gapat digunakan sebagai sikat gigi siwak juga dapat digunakan sebagai larutan kumur. Penggunaan *S. persica* sebagai larutan kumur dapat menurunkan infeksi *S. mutans*.⁴⁶

Hasil penelitian ini didukung oleh penelitian sebelumnya bahwa ekstrak etil asetat *S. persica* dapat membunuh *S. mutans*.¹³ Pada penelitian ini efektivitas ekstrak kloroform lebih tinggi dibandingkan dengan ekstrak etil asetat. Hal ini disebabkan karena perbedaan senyawa yang terekstraksi. Selain itu, pada penelitian lain ekstraksi menggunakan aquades memiliki zona inhibisi lebih tinggi dibandingkan dengan kedua pelarut diatas. Oleh sebab itu, perlu penelitian lanjutan untuk mengidentifikasi senyawa ekstrak kloroform yang paling efektif dalam membunuh *S. mutans* dan *S. aureus*. Selain itu, pada penelitian yang akan datang perlu menggunakan ekstraksi dengan pelarut aquades.

KESIMPULAN

Berdasarkan penelitian ini dapat disimpulkan bahwa

1. Ekstrak kloroform (*Salvadora persica*) memiliki daya hambat pada dosis 100g/l sampai 12,5 g/l terhadap *S. aureus*

2. Ekstrak kloroform (*Salvadora persica*) memiliki daya hambat pada dosis 100g/l sampai 50g/l terhadap *S.mutans*
3. Ekstrak etil asetat (*Salvadora persica*) memiliki daya hambat pada dosis 100g/l sampai 50g/l terhadap *S.aureus*
4. Ekstrak etil asetat (*Salvadora persica*) memiliki daya hambat pada dosis 100g/l sampai 50g/l terhadap *S.mutans*

SARAN

Peneliti menyarankan hal – hal berikut untuk menunjang penelitian selanjutnya guna pengembangan dan kemajuan ilmu pengetahuan.

1. Diperlukan penelitian tentang identifikasi senyawa kimia pada ekstrak kloroform dan etil asetat *Salvadora persica*
2. Diperlukan penelitian tentang uji antibakteri menggunakan fraksi ekstrak kloroform untuk mencari fraksi paling efektif dalam membunuh bakteri *S.aureus* dan *S.mutans*
3. Diperlukan penelitian menggunakan ekstraksi menggunakan pelarut aquades

UCAPAN TERIMAKASIH

Peneliti mengucapkan terimakasih kepada ikatan orangtua mahasiswa (IOM) yang telah mendanai penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. McCormack MG, Smith AJ, Akram AN, Jackson M, Robertson D, & Edwards G. Staphylococcus aureus and the oral cavity: an overlooked source of carriage and infection?. American journal of infection control, 2015; 43(1): 35–37. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2014.09.015>
2. Lisa MS, et al. Systemic Staphylococcus aureus infection mediated by Candida albicans hyphal invasion of mucosal tissue. Microbiology (Reading). 2015 Jan; 161(Pt 1): 168–181. <https://doi.org/10.1099/mic.0.083485-0>
3. Smith JA, Jacson SM, Bagg J. The Ecology of Staphylococcus Species in the oral cavity. Med. Microbiol, 2001; 50:940-946
4. Metwalli KH, Khan SA, Krom BP, & Jabra-Rizk MA. Streptococcus mutans, Candida albicans, and the human mouth: a sticky situation. PLoS pathogens, 2013; 9(10): e1003616. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003616>
5. Thomer L, Schneewind O, & Missiakas D. Pathogenesis of Staphylococcus aureus Bloodstream Infections. Annual review of pathology, 2016; 11: 343–364. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-012615-044351>
6. Liu GY. 2009. Molecular pathogenesis of Staphylococcus aureus infection. Pediatric research, 65 (5Pt2):71R–77R. <https://doi.org/10.1203/PDR.0b013e31819dc44d>
7. Fernandes CP, Oliveira FA, Silva PG, Alves, AP, Mota MR, Montenegro RC, Burbano RM, Seabra AD, Lobo, Filho JG, Lima D. L, Soares Filho, A. W, & Sousa, F. B. Molecular analysis of oral bacteria in dental biofilm and atherosclerotic plaques of patients with vascular disease. International journal of cardiology, 2014; 174(3): 710–712. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2014.04.201>
8. Jasmi, Kamarul Azmi. Siwak dan Puasa. In Kamarul Azmi Jasmi (Ed.), Ensiklopedia Pendidikan Islam (Edisi Pertama ed., pp. 146-148). Skudai Johor: Fakulti Tamadun Islam, Universiti Teknologi Malaysia & Persatuan. (2016).
9. Nobbs A. Getting to the heart of the matter: Role of Streptococcus mutans adhesin Cnm in systemic disease. Virulence, 2017; 8(1): 1–4. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1212157>
10. Fuad Fatkhurrohman, Ana Medawati. Efektifitas Ekstrak Etanol Kayu Siwak (Salvadora Persica L.) Dengan Metode Perkolasi Terhadap Pertumbuhan Staphylococcus Aureus Isolat 248 Yang Resisten Multiantibiotik. IDJ, Vol. 2 No. 2. 2013.
11. Abdel-Kader MS, Alam P, Kamal YT, et al. Optimization of the extraction condition for benzyl isothiocyanate contents in Salvadora persica roots "Siwak". Saudi Pharmaceutical Journal : SPJ : the Official Publication of the Saudi Pharmaceutical Society. 2019 Sep;27(6) hal:753-755. DOI: 10.1016/j.jsps.2019.04.011.
12. Akhtar J, Siddique KM, Bi S, Mujeeb M. A review on phytochemical and pharmacological investigations of miswak (Salvadora persica Linn). Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences. 2011 Jan;3(1):113-117. DOI: 10.4103/0975-7406.76488.
13. Maina, ENM, Njau VG, dan Gavamukulya Y. Phytochemical Analysis and Antileishmanial Activity of Clerodendrum myricoides and Salvadora persica Plant Extracts against Leishmania major. Journal

- of Complementary and Alternative Medical Research, 2020; 9(1): 29-44.
14. Gupta A, Verma S, Kushwaha P, Srivastava S, Rawat ASK. Phytochemical and Antioxidant Studies of *Salvadora persica* L. Stem & Twig. Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 2015; 49(1):1-8.
 15. Zaenab, Mardiasuti HW, Anny V P, Logawa B. Uji Antibakteri *Siwak* (*Salvadora persica* Linn.) Terhadap *Streptococcus mutans* (ATC31987) dan *Bacteroides melaninogenicus*. Makara Kesehatan, 2004; 8 (2): 37-40.
 16. Prabhakaran K, Britto J, Preethi J. Identification Of Ethnomedicinal Compounds And Antimicrobial Studies of *Salvadora persica* L. (salvadoraceae). Asian J Pharm Clin Res, 2019; 12(4): 183-188.
 17. Abu F, Mat Taib CN, Mohd MMA, & Mohd AS. Antioxidant Properties of Crude Extract, Partition Extract, and Fermented Medium of *Dendrobium sabin* Flower. Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM, 2017, 2907219.
<https://doi.org/10.1155/2017/2907219>.
 18. Mamadaliyeva N, Vinciguerra V, Ovidi E, & Tiezzi A. Identification and isolation of non-polar compounds from the chloroform extract of *Scutellaria ramosissima*. Natural product research, 2013; 27(21): 2059–2062.
<https://doi.org/10.1080/14786419.2013.819508>.
 19. Abdel-Rahman HF, Skaug N, Whyatt AM, dan Francis GW. Volatile Compounds in Crude *Salvadora persica* Extracts. Pharmaceutical Biology, 2003; 41:(6):399–404.
 20. Omer A, Qarani S, & Khalil A. 2018. In vitro antimicrobial activity of Miswak extracts against some oral pathogenic isolates. Zanco Journal of Medical Sciences (Zanco J Med Sci), 2018; 14(1), 71-8.
 21. Balto H, Al-Howiriny T, Al-Somaily A, Siddiqui Y, Al-Sowygh Z. Screening for the antimicrobial activity of *Salvadora persica* extracts against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. Int. J. Phytomed. 2013;5(4):486–492
 22. Kristianti AN, Aminah NS, Tanjung M, dan Kurniadi B, Buku ajar fitokimia. Surabaya: Jurusan Kimia Laboratorium Kimia Organik FMIPA Universitas Airlangga. 2008.
 23. Putri WS, Warditiani NK, Larasanty LPF. Skrining Fitokimia Ekstrak Etil Asetat Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.I), Fakultas Matematika dan IPA, Universitas Udayana, Jimbaran. 2015.
 24. Raphael E. Phytochemical constituents of some leaves extract of *Aloe vera* and *Azadirachta indica* plant species. Global Advanced Research Journal of Environmental Science and Toxicology, 2012;1(2):014-017
 25. Hossain MA, AL-Raqmi KA, AL-Mijizy ZH, Weli AM, & Al-Riyami Q. Study of total phenol, flavonoids contents and phytochemical screening of various leaves crude extracts of locally grown *Thymus vulgaris*. Asian Pacific journal of tropical biomedicine, 2013; (9): 705–710.
 26. Sanders, E. R. 2012. Aseptic Laboratory Techniques: Plating Methods. J. Vis. Exp. (63), e3064 [10.3791/3064](https://doi.org/10.3791/3064),
 27. Risadiansyah, R. Induction Of Secondary Metabolism Across Actinobacterial Genera (Thesis). South Australia: Flinders University. 2016.
 28. Leyden JJ. In vivo antibacterial effects of tretinoin-clindamycin and clindamycin alone on *Propionibacterium acnes* with varying clindamycin minimum inhibitory. Journal of Drugs in Dermatology : JDD. 2012 Dec;11(12):1434-1438.
 29. Balouri, M, Sadiki M, Ibnsounda S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. J Pharm Anal Elsevier 2016; 6:71-9.
 30. Sudirman, T.A.. Uji Efektivitas Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* secara invitro [Skripsi]. Makassar : Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Hasanudin. 2014.
 31. Abdel-Kader, M. S, Alam, P, Kamal, Y. T, Alkharfy, K. M, Foudah, A. I, & Alqasoumi, S. I. Optimization of the extraction condition for benzyl isothiocyanate contents in *Salvadora persica* roots "Siwak". Saudi pharmaceutical journal, 2019; 27(6), 753–5.
 32. Dufour V, Stahl M, Rosenfeld E, Stintzi A, & Baysse C. Insights into the mode of action of benzyl isothiocyanate on *Campylobacter jejuni*. Applied and environmental microbiology, 2013; 79(22), 6958–68.
 33. Jesus JA, Lago JH, Laurenti MD, Yamamoto ES, Passero LF. Antimicrobial activity of oleanolic and ursolic acids: an update. Evid Based Complement Alternat

- Med. 2015;2015:620472. doi:10.1155/2015/620472.
34. Tomiyama K, Mukai Y, Saito M. Antibacterial Action of a Condensed Tannin Extracted from Astringent Persimmon as a Component of Food Additive Pancil PS-M on Oral Polymicrobial Biofilms. *Biomed Res Int*, 2016;5730748. doi:10.1155/2016/5730748
 35. Nzogong RT, Ndjateu FST, Ekom SE, et al. Antimicrobial and antioxidant activities of triterpenoid and phenolic derivatives from two Cameroonian Melastomataceae plants: *Dissotis senegambiensis* and *Amphiblemma monticola*. *BMC Complement Altern Med*. 2018;18(1):159. Published 2018 May 16. doi:10.1186/s12906-018-2229-2
 36. Gupta A, Verma S, Kushwaha P, Srivastava S, Rawat ASK. Phytochemical and Antioxidant Studies of *Salvadora persica* L. Stem & Twig. *Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2015; 49(1)1-8.
 37. Ibrahim MM, Al Sahli AAA, Alaraidh IA, Al-Homaidan AA, Mostafa EM, EL-Gaaly GA. Assessment of antioxidant activities in roots of Miswak (*Salvadora persica*) plants grown at two different locations in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 2015; 22: 168–175
 38. Niazi, F, Naseem, M., Khurshid, Z, Zafar, M.S, Almas. K. Role of *Salvadora persica* chewing stick (miswak): A natural toothbrush for holistic oral health. *Eur J Dent*, 2016; 10:301-8.
 39. Farag, M, Abdel-Mageed, WM, Basudan O, El-Gamal A. Persicaline, A New Antioxidant Sulphur-Containing Imidazoline Alkaloid from *Salvadora persica* Roots. *Molecules*, 2018; 23: 483-486; doi: 10.3390/molecules 23020483
 40. Iyer D, dan Patil UK. Efficacy of Stigmast-5-en-3 β -ol Isolated from *Salvadora persica* L. as Antihyperlipidemic and Anti-tumor agent: Evidence from animal studies. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 2012; S849-S855
 41. Alotaibi AB, Kattouah ASA, Alqassass BS, Aljomai, I.A. Uses of *Salvadora Persica* L. (Chewing Sticks) As A Therapeutic to Inflammation Periodontal. *International Journal of Pharmaceutical Research&Allied Sciences*, 2018; 7(1):156-164
 42. Noumi E, Snoussi M, Trabelsi N, Hajlaoui H, Ksouri R, Valentin E, dan Bakhrouf A. Antibacterial, anticandidal and antioxidant activities of *Salvadora persica* and *Juglans regia* L. extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 2011; 5(17): 4138-4146.
 43. Halawany, HS. A review on miswak (*Salvadora persica*) and its effect on various aspects of oral health. *The Saudi Dental Journal*. King Saud University, 2012; 24(2), pp. 63–69. doi: 10.1016/j.sdentj.2011.12.004.
 44. Mahdi LH, Aziz R, Murtatha A, Shafiq SA. Effect of Plant Extracted *Salvadora persica* L. On Some Isolated Pathogens From Mouth And Teeth. *World Journal of Pharmaceutical Research*, 2015; 4,(1): 1571- 1576
 45. Bader A, Guido F, Pier LC, Ivano M. The composition of the root oil of *Salvadora persica* L. *J Essent Oil Res*, 2002; 14:128-9.
 46. Rajesh V, Suresh P, Anil B, Purohit P. Analgesic and Anti-Inflammatory Activities of Ethyl Acetate Extract of Leaves of *Salvadora persica* L. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*, 2010; 1(1): 51 -55
 47. Maina ENM, Njau VG, and Gavamukulya Y. Phytochemical Analysis and Antileishmanial Activity of *Clerodendrum myricoides* and *Salvadora persica* Plant Extracts against *Leishmania major*. *Journal of Complementary and Alternative Medical Research*, 2020; 9(1): 29-44.
 48. Moormeier DE, Bayles KW. *Staphylococcus aureus* biofilm: a complex developmental organism. *Mol Microbiol*, 2017; 104(3):365-376. doi:10.1111/mmi.13634
 49. Conrads G, & About I. Pathophysiology of Dental Caries. *Monographs in oral science*, 2018; 27, 1–10.
 50. Othman L, Sleiman A, Abdel-Massih RM. Antimicrobial Activity of Polyphenols and Alkaloids in Middle Eastern Plants. *Front Microbiol*. 2019;10:911. Published 2019 May 15. doi:10.3389/fmicb.2019.00911.
 51. Yumoto H. The Pathogenic Factors from Oral Streptococci for Systemic Diseases', *International Journal of Molecular Sciences Review*, 2019; 20(4571): 3–18. Available at: www.mdpi.com/journal/ijms.
 52. Santoso O, Wardani AP, Kusumasari N. Pengaruh Larutan Ekstrak Siwak (*Salvadora persica*) Terhadap *Streptococcus Mutans*: Studi In Vitro Dan In Vivo. *Media Medika Indonesia*, 2012; 46(3), 1-8.

