

ARTIKEL PENELITIAN

**KEMAMPUAN EKSTRAK ETANOL DAUN BINAHONG
(*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) DALAM MENGHAMBAT
PEMBENTUKAN BIOFILM *STREPTOCOCCUS MUTANS***

**THE ABILITY OF BINAHONG (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) LEAVES
ETHANOLIC EXTRACT IN INHIBITING *STREPTOCOCCUS MUTANS*
BIOFILM FORMATION**

Suryani Hutomo¹, Ceny Gloria Larope²

¹ Bagian Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana, Jl. Wahidin Sudirohusodo No. 5-25, Yogyakarta, 55224

² Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana, Jl. Wahidin Sudirohusodo No. 5-25, Yogyakarta, 55224

* **Korespondensi:** suryani_hutomo@staff.ukdw.ac.id

ABSTRACT

Introduction: *Streptococcus mutans* is the predominant bacteria in dental caries. These bacteria can form biofilms. The existence of antibiotic resistance and biofilms that inhibit their penetration makes it necessary to carry out research to control the formation of biofilms. Binahong (*Anredera cordifolia*) has antibacterial activity and is easy to find in the environment. The aim of this study was to analyse the antibiofilm effect of binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) leaf extract against *S. mutans* as the main cause of dental caries.

Methods: The extract preparation was using the maceration method. The susceptibility of *S. mutans* ATCC 25175 to *a. cordifolia* extract was examined by minimum inhibitory concentration (MIC) test using broth microdilution method. For bacterial adherence assay, the method was similar with it was MIC methods. The biofilm then was stained with 0,1% crystal violet and measured at 595 nm using a microplate reader.

Results: The results of the antibacterial test showed that the minimum inhibitory value (MIC) was at a concentration of 3750 µg/ml, while the concentration of the extract as an antibiofilm was obtained from a concentration of 187,5 µg/ml to 3000 µg/ml. Statistical analysis using One-way ANOVA showed significant differences between each treatment group ($p=0,000$).

Conclusion: The binahong leaves ethanolic extract can inhibit the growth of *S. mutans* with a minimum inhibitory concentration of 3750 µg/ml and inhibit the formation of *S. mutans* biofilm formation at an effective concentration of 750 µg/ml.

Key Words: *Anredera cordifolia*, antibiofilm, biofilm, *S. mutans*, MIC

ABSTRAK

Pendahuluan: *Streptococcus mutans* merupakan bakteri dominan pada karies gigi. Bakteri ini mampu membentuk biofilm. Adanya resistensi antibiotik dan biofilm yang menghambat penetrasinya menyebabkan perlunya dilakukan penelitian untuk mengendalikan terbentuknya biofilm. Binahong (*Anredera cordifolia*) memiliki aktivitas antibakteri dan mudah ditemukan di lingkungan. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji efek antibiofilm ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *S. mutans* sebagai penyebab utama karies gigi.

Metode: Ekstrak dipersiapkan menggunakan metode macerasi. Uji antibakteri *S. mutans* ATCC 25175 menggunakan metode *broth microdilution*. Pengujian antibiofilm menggunakan metode yang serupa. Biofilm yang terbentuk diwarnai dengan 0,1% crystal violet dan dibaca pada 595 nm menggunakan *microplate reader*.

Hasil: Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa nilai hambat minimum (MIC) ada pada konsentrasi 3750 µg/ml, sedangkan konsentrasi ekstrak sebagai antibiofilm didapatkan mulai dari konsentrasi 187,5 µg/ml sampai dengan 3000 µg/ml. Analisis statistik menggunakan *One-way ANOVA* menunjukkan perbedaan yang bermakna dari masing-masing kelompok perlakuan ($p=0,000$).

Simpulan: Ekstrak etanol daun binahong dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans* dengan konsentrasi hambat minimum 3750 µg/ml serta menghambat pembentukan biofilm *S. mutans* pada konsentrasi efektif 750 µg/ml.

Kata Kunci: *Anredera cordifolia*, antibiofilm, biofilm, *S. mutans*, MIC

PENDAHULUAN

Karies gigi merupakan permasalahan global yang masih dianggap remeh oleh masyarakat secara umum. Prevalensi karies gigi bervariasi mulai dari anak-anak sampai dewasa. Data Survei Kesehatan Indonesia (SKI) tahun 2023 menunjukkan bahwa 82,8% populasi orang Indonesia memiliki masalah karies gigi. Prevalensi tertinggi pada sebaran populasi tersebut berada pada kelompok usia 3-5 tahun dan 45-65 tahun.¹ Penyebab karies gigi meliputi faktor yang berhubungan langsung dengan mulut seperti pejamu, mikroorganisme, dan substrat, sedangkan faktor eksternal yang memengaruhi meliputi usia, gender, edukasi, lingkungan, kebiasaan, dan status ekonomi.² Hal ini menyebabkan karies gigi menjadi masalah yang serius terkait dengan dampak kesehatan, ekonomi, dan sosial karena semakin tingginya prevalensi dan biaya pengobatan.³

Karies gigi dihubungkan dengan keterlibatan bakteri *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, dan *Scardovia*. *S. mutans* merupakan bakteri dominan di antara bakteri-bakteri tersebut.³ Proses terbentuknya karies gigi melibatkan terbentuknya biofilm.⁴ Berkembangnya *S. mutans* dalam biofilm yang terbentuk menyebabkan ketidakseimbangan komposisi mikrobial biofilm tersebut dan menjadi kariogenik, sehingga membuat *S. mutans* menjadi etiologi utama penyebab karies gigi.^{4,5} Virulensi *S. mutans* berhubungan dengan kemampuannya mensintesis polimer ekstraseluler glukon dari sukrosa yang membantu dalam kolonisasi pada permukaan

gigi, serta dapat berkembang dan berkolonisasi pada keadaan asam.⁶ Biofilm yang terbentuk oleh *S. mutans* memproduksi asam organik sebagai hasil dari metabolisme karbohidrat terfermentasi, yang menyebabkan pH lokal turun dan mengakibatkan demineralisasi email gigi.⁷

Upaya pencegahan karies gigi dengan mengeliminasi *S. mutans* menggunakan antibiotik dapat menyebabkan gangguan keseimbangan ekologi rongga mulut. Penggunaan antibiotik juga dapat meningkatkan resistensi *S. mutans*. Hal ini menyebabkan peningkatan pertumbuhan bakteri tersebut serta pembentukan biofilmnya semakin cepat.⁸ Upaya pencegahan karies pada orang dewasa yang sehat bisa dilakukan dengan menyikat gigi, *dental flossing* dan penggunaan obat kumur. Meskipun demikian, pada anak-anak dan pasien-pasien imunokompromis metode ini tidak efektif.⁹ Dengan demikian perlu dikembangkan metode untuk mengendalikan terbentuknya biofilm *S. mutans* untuk mencegah terjadinya karies gigi.

Indonesia terkenal dengan keanekaragaman hayati, dari total 40.000 jenis tanaman obat yang terkenal di dunia, sekitar 30.000 yang terdapat di Indonesia dan sekitar 7.500 jenis yang sudah diketahui manfaatnya sebagai bahan fitofarmaka.¹⁰ Salah satu tanaman yang mudah ditemukan sehari-hari adalah *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis atau yang dikenal dengan binahong. Tanaman ini berasal dari famili *Basellaceae* yang berasal dari China sejak abad ke-14 dan menyebar ke Asia Tenggara, Amerika,

Australia, dan Afrika.¹¹ Semua bagian dari binahong dapat dimanfaatkan mulai dari akar, batang dan daun.¹² Tanaman merambat ini mudah ditemukan di hutan, pagar, maupun tanah pada ketinggian 1.000-2.000 meter.¹³ Beberapa studi membuktikan bahwa *A. cordifolia* memiliki aktivitas farmakologi seperti antibakteri, antifungi, antihipertensi, vasodilator, dan anti-inflamasi.¹⁴ Kandungan fitofarmaka dari *A. cordifolia* sebagai antimikroba dibuktikan dari berbagai penelitian meliputi flavonoid, saponin, fenol, alkaloid, dan terperenoid.^{11,14,15} Penelitian Sukmawati, *et al.* menunjukkan konsentrasi inhibisi minimal dari *A. cordifolia* sebesar 512 ppm terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*.¹⁶ Studi lainnya yang meneliti tentang kemampuan antibakteri dari kombinasi *A. cordifolia* dan *Strobilanthes crispus* Bl, menunjukkan adanya aktivitas inhibisi dengan diameter zona inhibisi 9,20 mm dengan menggunakan Ceftriaxon sebagai kontrol positif. Zona inhibisi yang terbentuk adalah 10 mm. Uji ini dilakukan terhadap *Streptococcus sp* penyebab ulkus diabetikum.¹⁷

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menguji efek **antibiofilm** ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap *S. mutans* sebagai penyebab utama karies gigi.

METODE

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dari Komite Etik Penelitian Kesehatan (KEPK) Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana Yogya-

karta (no. 1181.B/C.16/FK/2022). Binahong didapatkan dari Merapi Herbal Farma, Yogyakarta (surat keterangan no. S/10/MFH-01/02/2020). *Streptococcus mutans* ATCC 25175 ditumbuhkan pada media *Brain-Heart Infusion Broth* (BHI; Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England) pada kondisi mikroaerobik pada 37°C. Suspensi stok bakteri dipersiapkan pada konsentrasi 0,5 McFarland atau $1,5 \times 10^8$ colony forming units (CFU)/ml.

Pembuatan ekstrak etanol daun binahong menggunakan metode maserasi, merupakan modifikasi penelitian terdahulu. Seratus gram simplisia daun binahong direndam dalam etanol 96% selama 24 jam dalam wadah tertutup. Ampasnya dalam rendaman kemudian diperas dan larutan rendaman disaring. Setelah disaring, ampas direndam kembali dalam etanol 96% selama 24 jam. Selanjutnya, larutan dievaporasi menggunakan *vacuum evaporator* dengan suhu 70°C yang bertujuan untuk menguapkan etanol dalam larutan tersebut. Ekstrak berbentuk pasta disimpan dalam almari es suhu 4°C sebelum digunakan. Ekstrak dalam bentuk pasta diencerkan menggunakan *dimethyl sulfoxide* 2% (DMSO, Merck, Germany) untuk mendapatkan konsentrasi awal ekstrak sebesar 15.000 µg/ml yang selanjutnya disaring menggunakan filter milipore (*Sartorius, Germany*) sebagai stok ekstrak.¹⁸

Uji antibakteri untuk menentukan *minimal inhibitory concentration* (MIC) dilakukan pada 96 well plate (Iwaki, Japan) menggunakan metode *broth microdilution*. Tiap sumuran diisi dengan media BHI cair

sebanyak 100 µl. Ekstrak daun binahong sebanyak 10 µl dengan berbagai seri konsentrasi (234,375, 468,75, 937,5, 1.875, 3.750, 7.500, dan 15.000 µg/ml) ditambahkan pada tiap sumuran dengan replikasi 3 kali. Tiga puluh menit kemudian pada tiap sumuran ditambahkan 10 µl suspensi *S. mutans* ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml). Kontrol positif menggunakan ciprofloxacin. Kultur kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah inkubasi, dilakukan pengamatan untuk menentukan MIC. Konsentrasi hambat minimal ditentukan dengan mengamati kultur dengan konsentrasi terkecil yang kejernihannya sama dengan atau mendekati kejernihan kultur kontrol positif.¹⁹ Pengamatan dilakukan oleh 3 orang yang berbeda.

Uji antibiofilm dilakukan dengan mengkultur bakteri bersama ekstrak pada *96 well plate flat bottom* dalam BHI cair dengan 3 replikasi. Konsentrasi awal ekstrak ditentukan di bawah konsentrasi MIC. Ekstrak daun binahong dengan berbagai konsentrasi (*serial dilution*, 0, 187,5, 375, 750, 1.500, dan 3.000 µg/ml) ditambahkan pada media sebelum bakteri diinokulasikan (replikasi 3 kali). Sepuluh menit kemudian bakteri ($1,5 \times 10^8$ CFU/ml) ditambahkan ke dalam media yang berisi ekstrak. Kultur diinkubasi pada 37°C selama 24 jam.

Setelah inkubasi, *plate* dikeluarkan dan media dibuang serta dicuci 1 kali menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) steril. Fiksasi dilakukan dengan menambahkan metanol absolut, didiamkan selama 15 menit. Metanol dibuang dan dicuci kembali menggunakan PBS. Biofilm yang terbentuk dicat

dengan menggunakan kristal violet selama 10 menit. Cat dibuang, dicuci menggunakan PBS steril 2 kali untuk membersihkan sisa cat dan menghilangkan bakteri yang tidak melekat. Biofilm yang melekat pada bagian dinding *96 well plate* dilepaskan dengan menggunakan etanol 95% kemudian ditransfer ke dalam *flatt bottom 96-well plate* baru dan dibaca menggunakan *mikroplate reader* (Thermo scientific, Rockford, Illionis, USA) dengan panjang gelombang 595 nm.

Analisis statistik pada penelitian diawali dengan uji normalitas menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas menggunakan uji *Levene*. Uji hipotesis menggunakan uji *One-way ANOVA*. Nilai signifikan (*p*) secara statistik < 0,05.

HASIL

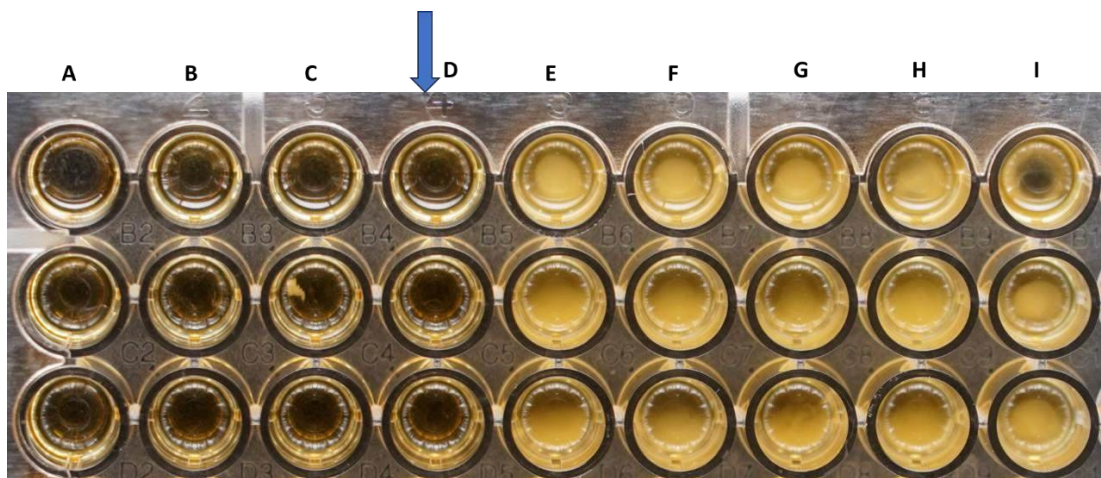
Hasil uji antibakteri menunjukkan bahwa nilai MIC ada pada konsentrasi 3.750 µg/ml (D, tanda panah). Hal ini ditunjukkan dengan kultur *S. mutans* pada BHI yang jernih yang sama dengan ciprofloxacin (A) sebagai kontrol positif (Gambar 1).

Hasil uji antibiofilm menunjukkan bahwa penghambatan terbentuknya biofilm *S. mutans* dimulai dari konsentrasi 187,5 µg/ml, yang ditandai dengan penurunan nilai densitas optik bila dibandingkan dengan kontrol negatif (0 µg/ml). Penurunan nilai densitas optik terus terjadi sampai dengan konsentrasi 3.000 µg/ml (Gambar 2).

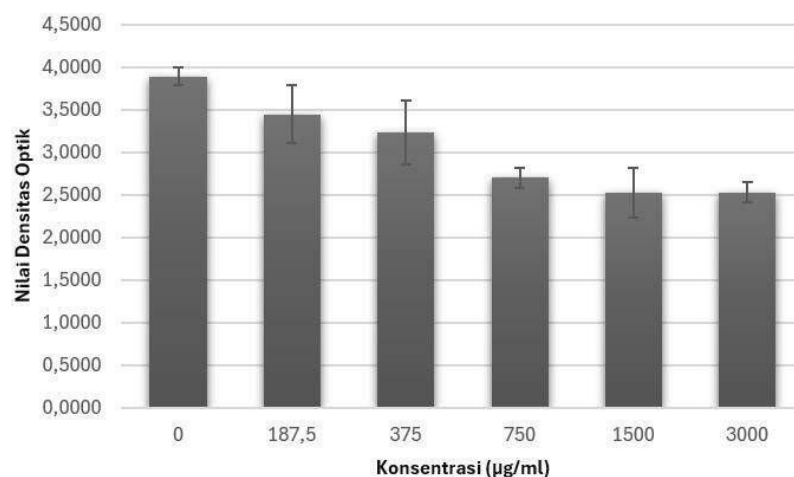
Uji normalitas dengan uji *Shapiro-Wilk* dan uji homogenitas dengan uji *Levene* menunjukkan bahwa data terdistribusi normal dan homogen. Berdasarkan hasil uji *One-way*

ANOVA, didapatkan nilai $p=0,000$, yang artinya terdapat perbedaan yang bermakna di antara kelompok-kelompok konsentrasi yang diuji. *Post Hoc Multiple Comparison* dilakukan untuk melihat adanya perbedaan antar kelompok konsentrasi. Terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan 187,5 $\mu\text{g/ml}$, 375 $\mu\text{g/ml}$, 750 $\mu\text{g/ml}$, 1.500 $\mu\text{g/ml}$ dan

3.000 $\mu\text{g/ml}$. Nilai densitas optik pada kelompok perlakuan ekstrak binahong konsentrasi 750 $\mu\text{g/ml}$ dengan 1.500 $\mu\text{g/ml}$ dan 3.000 $\mu\text{g/ml}$ tidak berbeda secara bermakna, tetapi nilai-nilai rerata tersebut lebih kecil dari pada nilai densitas optik kelompok kontrol. Diperkirakan tidak ada kenaikan daya hambat pada kelompok tersebut, sehingga konsentrasi efektif ditentukan pada 750 $\mu\text{g/ml}$.



Gambar 1. Nilai MIC terdapat pada kolom D (tanda panah), konsentrasi ekstrak 3750 $\mu\text{g/ml}$. Kejernihannya sama dengan ciprofloxacin (A) sebagai kontrol positif.



Gambar 2. Grafik penghambatan biofilm *S. mutans*

DISKUSI

Efek antibakteri dari ekstrak binahong terhadap *S. mutans* setelah inkubasi selama

24 jam terlihat pada konsentrasi 3750 $\mu\text{g/ml}$, tidak didapatkan adanya pertumbuhan *S. mutans*. Media pada konsentrasi ini jernih,

sama dengan media kontrol positif (ciprofloxacin). Aktivitas antibakteri dari daun Bina-hong dipengaruhi oleh senyawa fitokimia yang terkandung di dalamnya. Flavonoid menghambat pertumbuhan *S. mutans* dengan bereaksi dengan protein bakteri yang berujung pada denaturasi bakteri. Koagulasi protein pada dinding sel bakteri *S. mutans* mengakibatkan kerusakan membran sel bakteri dan peningkatan tekanan osmotik dalam sel sehingga menyebabkan sel bakteri *S. mutans* lisis dan mati.²⁰

Senyawa saponin dapat mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri sehingga dapat terjadi lisis dan peningkatan aktivitas lisosom sebagai sistem imun antimikroba.²¹ Terpenoid memiliki mekanisme dengan membran luar dan dalam dari bakteri, selain itu juga dapat berinteraksi dengan protein membran dengan bantuan alkaloid menghambat formasi enzim yang mengganggu respirasi sel.²²

Tanin mempunyai gugus fenol yang sifatnya antiseptik. Senyawa ini pun mampu membentuk senyawa kompleks dengan protein pada bakteri melalui ikatan hidrogen. Adanya ikatan hidrogen antara tanin dan protein, membuat suatu kondisi asam sehingga terjadi denaturasi protein dari bakteri sehingga metabolismenya terganggu.¹² Alkaloid memiliki kemampuan mengganggu komponen peptidoglikan bakteri. Senyawa ini juga mampu menghambat transpor yang bergantung pada ATP untuk senyawa melintasi membran sel bakteri.²³

Biofilm adalah komunitas mikroorganisme yang sangat dinamis dan terstruktur

yang melekat pada suatu permukaan dan dilingkupi suatu matriks ekstraseluler (*extra-cellular polymeric substances, EPS*).²⁴ Matrik ini merupakan tempat yang sesuai untuk pertumbuhan dan metabolisme bakteri. Kompleksitas struktur biofilm menghambat penetrasi antibiotik, menyebabkan pemberian agen antimikroba dan antibiotik secara konvensional tidak efektif dalam membasmi bakteri patogen dalam biofilm.²⁵

S. mutans merupakan bakteri predominan pada karies gigi karena kemampuannya untuk mensintesis glukosa untuk membentuk biofilm. Biofilm yang dibentuk oleh *S. mutans* menciptakan pH lingkungan rendah pada permukaan gigi, sehingga menyebabkan demineralisasi permukaan gigi.²⁶ Proses adhesi atau perlekatan yang terus menerus, agregasi, dan enkapsulasi *S. mutans* dan mikroorganisme lain menyebabkan pembentukan dan pematangan struktur biofilm.²⁷

Hasil penelitian ini menunjukkan kemampuan ekstrak daun binahong menghambat pembentukan biofilm *S. mutans* dengan konsentrasi efektif 750 µg/ml. Penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans* dipastikan terjadi pada konsentrasi 750 µg/ml, karena konsentrasi ini di bawah MIC yaitu 3.750 µg/ml. Adanya kompleksitas struktur biofilm yang menghambat penetrasi antibiotik, menyebabkan perlunya pengembangan metode penghambatan pembentukan biofilm ini dan ekstrak daun binahong dapat menjadi pilihan sebagai bahan antibiofilm. Metode penghambatan pembentukan biofilm penting dikembangkan karena

mikroorganisme dalam biofilm ini menunjukkan peningkatan resistensi yang signifikan terhadap agen antimikroba dan lingkungan eksternal yang ekstrim dibandingkan mikroorganisme planktonik.²⁸ Tidak dilakukan pengujian kandungan bahan fitokimia daun binahong pada penelitian ini, karena pemakaian daun binahong pada masyarakat yang telah berjalan selama ini adalah secara utuh. Meskipun demikian, ada kemungkinan respon *S. mutans* yang berbeda bila pelarut ekstrak berbeda. Saran untuk penelitian selanjutnya adalah membandingkan respons *S. mutans* terhadap ekstrak daun binahong dengan pelarut yang berbeda.

SIMPULAN

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun binahong dapat menghambat pertumbuhan *S. mutans* dengan konsentrasi hambat minimum 3.750 µg/ml serta menghambat pembentukan biofilm *S. mutans* pada konsentrasi efektif 750 µg/ml. Ekstrak etanol daun binahong dapat direkomendasikan sebagai bahan aplikasi topikal di rongga mulut yang potensial untuk mengontrol terbentuknya biofilm.

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti berterima kasih kepada Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, untuk dana penelitian dan fasilitas laboratorium dalam pengerjaan penelitian ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Kementerian Kesehatan Republik Indonesia. Kesehatan gigi dan mulut di Indonesia. Jakarta: Badan Kebijakan Pembangunan Kesehatan. 2024. Tersedia di: https://repository.badankebijakan.kemkes.go.id/id/eprint/5534/1/04%20factsheet%20Gigit_bahasa.pdf.
2. Suratri MAL, Putranto RH, Pracoyo N, Andayasari L, Edwin VA, Suryati T. Dental caries and habit of eating sweet foods, drinking sweet drinks, and brushing teeth correctly in the community aged 15-64 years. *Health Science Journal of Indonesia*. 2022;13(1):1-8.
3. Spatafora G, Li Y, He X, Cowan A, Tanner ACR. The evolving microbiome of dental caries. *Microorganisms*. 2024 Jan 7;12(1):121.
4. Melok AL, Lee LH, Yussof SAM, Chu T. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate-stearate inhibits the growth of *Streptococcus mutans*: A promising new approach in caries prevention. *Dent J (Basel)*. 2018 Aug 6;6(3):38.
5. Utamaningyias A, Pramesti HT, Balafif FF. The *Streptococcus mutans* ability to survive in biofilms and during dental caries formation: scoping review. *JDS*. 2022;7(2):150-8.
6. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019 Jan;7(1):10.1128/microbiolspec.gpp3-0051-2018.
7. Dianawati N, Setyarini W, Widjiastuti I, Ridwan RD, Kuntaman K. The distribution of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in children with dental caries severity level. *Dental Journal*. 2020 Mar;53(1):36-9.
8. Al-Shami IZ, Al-Hamzi MA, Al-Shamahy HA, Majeed ALAA. Efficacy of some antibiotics against *Streptococcus mutans* associated with tooth decay in children and their mothers. *On J Dent & Oral Health*. 2019;2(1):1-4.
9. Marsh PD, Moter A, Devine DA. Dental plaque biofilms: Communities, conflict and control. *Periodontol 2000*. 2011 Feb;55(1):16-35.
10. Salim Z, Munadi E, editors. Info komoditi tanaman obat. Badan Pengkajian dan Pengembangan Perdagangan Kementerian Perdagangan Republik Indonesia. 2017.
11. Alba TM, Pelegrin CMG de, Sobottka AM. Ethnobotany, ecology, pharmacology, and

- chemistry of *Anredera cordifolia* (Basellaceae): a review. *Rodriguésia*. 2020;71:01042019.
12. Sugiaman VK, Pranata BMD, Susila RA, Pranata N, Rahmawati DY. Antibacterial activity, cytotoxicity, and phytochemicals screenings of binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) steenis) leaf extract. *J Adv Pharm Educ Res*. 2024;14(1):1-7.
13. Wijayanti D, Setiatin ET, Kurnianto E. Efek ekstrak daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) terhadap profil darah merah pada marmut (*Cavia cobaya*). *Jurnal Sain Veteriner*. 2016;34(1):75-83.
14. Leliqia NPE, Sukandar EY, Fidrianny I. Overview of efficacy, safety and phytochemical study of *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis. *Pharmacology Online*. 2017;1:124-31.
15. Helmidanora R, Sukawaty Y, Warnida H. Penetapan kadar flavonoid daun binahong (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) dengan spektrofotometri uv-vis. *Scientia J Far Kes*. 2020;10(2): 192-9.
16. Sukmawati IK, Dewi AC, Nurfajri A. Antibacterial activity test of binahong leaf (*Anredera cordifolia* (Ten) Steenis) against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Global Trends Pharm Sci*. 2021;12(2):9506-10.
17. Khairani U, Harlita TD, Aina GQ. Antibacterial effectiveness of a combination of *Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis and *Strobilanthes crispus* blume extract on inhibition of the growth of *Streptococcus* sp. causes of diabetic ulcers. *Trop H Med Res*. 2024 Aug. 31;6(2):1-10.
18. Brilliantti VG, Hutomo S, Sooi CM, Merry MS. Aktivitas penghambatan *Candida krusei* oleh ekstrak etanol batang brotowali (*Tinospora crispa* L.). *J Kdkt Meditek*. 2022 May 7;28(2):120-5.
19. Hutomo S, Putri DU, Welviyanda BC, Susilowati H. Inhibition effect of garlic (*Allium sativum*) extract on *Streptococcus sanguinis* biofilm formation involving bacterial motility mechanism. *Malaysian Journal of Medicine and Health Sciences*. 2021;17(2):169-74.
20. Dohude GA, Ginting FC. The effectivity of binahong (*Anredera cordifolia* (ten.) Steenis) leaves extracts for growth inhibition of *Streptococcus mutans* in oral cavity. *Journal of Dentomaxillofacial Science*. 2021;6(3):151-5.
21. Khan MI, Ahhmed A, Shin JH, Baek JS, Kim MY, Kim JD. Green tea seed isolated saponins exerts antibacterial effects against various strains of Gram positive and Gram negative bacteria, a comprehensive study in vitro and in vivo. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2018; 3486106:1-12.
22. Rahmawati F, Bintang M, Artika IM. Antibacterial activity and phytochemical analysis of *Geranium homeanum turez* leaves. *Curr Biochem*. 2017;4(3):13-22.
23. Mabhiza D, Chitemerere T, Mukanganyama S. Antibacterial properties of alkaloid extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Chem*. 2016;2016:6304163.
24. Flemming HC, Wingender J, Szewzyk U, Steinberg P, Rice SA, Kjelleberg S. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol*. 2016 Aug 11;14(9):563-75.
25. Cugini C, Shanmugam M, Landge N, Ramasubbu N. The role of exopolysaccharides in oral biofilms. *J Dent Res*. 2019 Jul;98(7):739-45.
26. Pitts NB, Zero DT, Marsh PD, Ekstrand K, Weintraub JA, Ramos-Gomez F, et al. Dental caries. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 May 25;3:17030.
27. Xue Z, Sendamangalam VR, Gruden CL, Seo Y. Multiple roles of extracellular polymeric substances on resistance of biofilm and detached clusters. *Environ Sci Technol*. 2012 Dec 18;46(24):13212-9.
28. Gao Z, Chen X, Wang C, Song J, Xu J, Liu X, et al. New strategies and mechanisms for targeting *Streptococcus mutans* biofilm formation to prevent dental caries: A review. *Microbiol Res*. 2023 Oct 14;278:127526.