

ARTIKEL PENELITIAN

Potensi ekstrak biji chia (*Salvia hispanica* L.) dalam menghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro*

Alfin Lanagusti*, Juni Handajani**, Tetiana Haniastuti**✉

*Program Studi S1 Kedokteran Gigi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

**Departemen Biologi Oral, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta, Indonesia

**JI Denta No 1 Sekip Utara, Yogyakarta, Indonesia; ✉ koresponden: haniastuti@ugm.ac.id

ABSTRAK

Streptococcus mutans merupakan bakteri gram positif yang berperan sebagai faktor etiologi utama karies dan koloni primer dalam pembentukan biofilm rongga mulut. Biji chia mengandung flavonoid dan asam fenolik yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak etanol biji chia terhadap pembentukan biofilm *S. mutans*. Penelitian eksperimental laboratoris ini menggunakan metode uji dengan *microtiter plate*. *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dikultur dalam BHI yang mengandung 1% sukrosa dan diberi perlakuan ekstrak biji chia 1,3%, 2,6%, 5,2%, klorheksidin glukonat 0,2% sebagai kontrol positif dan akuades sebagai kontrol negatif. Biakan bakteri diinkubasi selama 24 jam dalam 96-well *microplate* kemudian diwarnai dengan kristal violet 0,1% selama 15 menit. Densitas optik dibaca dengan *microplate reader* ($\lambda = 540$ nm). Data dianalisis dengan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *post-hoc U-Mann Whitney*. Uji *Kruskal-Wallis* menunjukkan perbedaan signifikan ($p < 0,05$) rerata persentase daya hambat pembentukan biofilm *S. mutans* pada setiap kelompok perlakuan. Uji *U-Mann Whitney* menunjukkan ekstrak etanol biji chia konsentrasi 1,3%, 2,6%, dan 5,2% memiliki kemampuan setara dalam pembentukan biofilm *S. mutans* meskipun masih lebih rendah dibandingkan klorheksidin 0,2%. Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak etanol biji chia mampu menghambat pembentukan biofilm *S. mutans* ATCC 25175.

Kata kunci: biji chia; biofilm; karies; pembentukan biofilm; *Streptococcus mutans*

ABSTRACT: *The potential of chia seed extract (Salvia hispanica L.) in inhibiting biofilm formation of Streptococcus mutans ATCC 25175 in vitro.* *Streptococcus mutans* is a gram-positive bacterium that acts as a major etiologic factor for caries and primary colony-forming oral biofilm. Chia seeds contain flavonoids and phenolic acids that can inhibit bacterial growth. This study aimed to determine the effect of ethanol extract of chia seeds on the formation of *S. mutans* biofilm. This laboratory study used the microtiter plate method. *Streptococcus mutans* ATCC 25175 was cultured in BHI supplemented with 1% sucrose and treated with 1.3%, 2.6%, 5.2% chia seed extract, 0.2% chlorhexidine gluconate (CHX) as a positive control and aquadest as a negative control. The culture bacteria were incubated for 24 hours in a 96-well microplate and then stained using 0.1% crystal violet for 15 minutes. The optical density was measured with a microplate reader ($\lambda = 540$ nm). The data were analyzed using the *Kruskal-Wallis* test followed by the *U-Mann Whitney* test. The *Kruskal-Wallis* test showed significant differences ($p < 0.05$) among groups. The *U-Mann Whitney* test showed that 1.3%, 2.6%, and 5.2% chia seed extract had equal ability in inhibiting the formation of *S. mutans* biofilm although its ability is less than chlorhexidine gluconate. In conclusion, the ethanol extract of chia seeds can inhibit the formation of *S. mutans* biofilm.

Keywords: chia seed; biofilm; caries; biofilm formation; *Streptococcus mutans*

PENDAHULUAN

Karies gigi merupakan penyakit kronis yang menyebabkan gigi berlubang.¹ Terjadinya karies dalam gigi seseorang disebabkan oleh 4 faktor penting yang saling berinteraksi yaitu substrat, *host*, mikroorganisme dan waktu. Mikroorganisme yang berperan penting dalam terjadinya karies antara lain *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, dan *Lactobacilli* yang terdapat dalam plak gigi.²

Sejak pertengahan 1960-an, diketahui bahwa *S. mutans* berperan penting dalam etiologi karies gigi. *Streptococcus mutans* adalah bakteri fakultatif anaerobik Gram positif yang bersifat asidogenik dan asidurik. Habitat alami dari *S. mutans* adalah rongga mulut manusia, lebih spesifik lagi pada *dental plaque* yang melekat pada permukaan jaringan keras gigi.³ Faktor virulensi *S. mutans* dalam menyebabkan karies,

antara lain: (i) kemampuannya untuk melekat pada gigi dan membentuk biofilm. Kemampuan *S. mutans* dalam melekat pada gigi karena adanya enzim glukosiltransferase (gtf), *glucan-binding protein* (Gbp protein), dan *cell surface protein antigen c* (PAC). Enzim gtf mampu mensintesis glukosa dari sukrosa yang dapat menyokong kolonisasi bakteri pada permukaan keras gigi dan berkontribusi untuk membentuk plak pada gigi. (ii) kemampuan untuk memetabolisme karbohidrat menjadi asam organik (asidogenik). *S. mutans* memetabolisme sukrosa dengan menghasilkan asam laktat. (iii) kemampuan untuk tahan terhadap kondisi lingkungan dengan pH rendah saat adanya perubahan ekologi plak diakibatkan oleh meningkatnya produksi asam laktat (asidurik).^{4,5,6}

Terdapat berbagai macam strategi pencegahan karies gigi, seperti kontrol plak dengan menyikat gigi dan penggunaan *dental floss*, aplikasi fluorida, serta *pit* dan *fissure sealant*.⁷ Salah satu kontrol plak yang paling sering digunakan adalah obat kumur. Obat kumur yang umum digunakan saat ini adalah klorheksidin glukonat. Klorheksidin glukonat adalah antiseptik bisbiguanida bersifat kationik dengan spektrum luas untuk bakteri Gram positif dan negatif. Akan tetapi, klorheksidin glukonat memiliki efek samping seperti perubahan warna kecoklatan pada gigi dan dorsum lidah, gangguan rasa, ulserasi pada mukosa oral, sensasi terbakar, dan pembengkakan kelenjar parotid.^{8,9} Oleh karena itu, perlu dilakukan penelitian untuk mendapatkan bahan alternatif yang bersifat sebagai antikaries. Salah satu alternatif biomaterial yang dapat dimanfaatkan adalah biji chia (*Salvia hispanica* L.) yang masih minim penelitiannya tetapi memiliki banyak khasiat.

Chia merupakan tanaman asli dari Meksiko dan Guatemala. Biji chia sudah dikonsumsi manusia sejak 5500 tahun lalu. Secara tradisional, biji chia digunakan oleh Bangsa Aztek dan Maya untuk pengobatan dan makanan.¹⁰ Biji chia memiliki banyak kandungan senyawa aktif yang dapat bermanfaat bagi kesehatan. Biji chia mengandung 25% sampai 40% *oil* dengan 60% terdiri dari *w-3 alpha linolenic acid* dan 20% terdiri

dari *w-6 linoleic acid*. Kedua asam lemak tersebut diperlukan oleh tubuh manusia untuk kesehatan. Selain itu, komponen kimiawi aktif biji chia adalah *myricetin*, *quercetin*, *kaempferol*, *caffeic acid* yang termasuk dalam golongan *flavonols* dan *phenolic acids*. Penelitian sebelumnya membuktikan *quercetin* dan *kaempferol* dari tanaman chia dapat menghambat pembentukan biofilm.^{11,12} Menurut Zeng dkk.,¹¹ *quercetin* dan *kaempferol* dapat mengurangi massa biofilm dan meningkatkan pH biofilm. Menurut Guan dkk.,¹² *quercetin* dan *kaempferol* dapat menyebabkan pengurangan produksi asam oleh *S. mutans* dengan menghambat aktivitas enzim F-ATPase dan terbukti memiliki aktivitas antimikroba terhadap bakteri kariogenik, seperti *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis*, *Actinomyces viscosus*, *Actinomyces naeslundii*, dan *Lactobacillus rhamnosus*. Tujuan dari penelitian ini untuk mengetahui pengaruh ekstrak biji chia (*Salvia hispanica* L.) terhadap pembentukan biofilm *Streptococcus mutans*

METODE PENELITIAN

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan etik dengan dikeluarkannya surat No. 006338/KKEP/FKG-UGM/EC/2021 dari Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi UGM pada tanggal 26 Maret 2021. Penelitian ini menggunakan tanaman chia yang diperoleh dari daerah Alai, Sumatera Barat. Determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Sistemika Tumbuhan Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada. Surat determinasi tumbuhan No. 014926/S. Tb/XII/2020 menyatakan spesies tumbuhan adalah *Salvia hispanica* L.

Pembuatan Ekstrak Biji Chia

Biji chia dicuci dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 50 °C selama 24 jam untuk menghilangkan kandungan air di dalamnya. Biji chia yang telah kering kemudian digiling hingga didapatkan serbuk lalu diayak dengan ayakan ukuran 60 mesh. Sebanyak 100 g serbuk biji chia direndam dalam etanol 70% (perbandingan bahan dengan pelarut adalah 1:4 (b/v)). Proses maserasi dilakukan selama 24 jam sambil diaduk dengan

stirrer dengan kecepatan 120 rpm. Ekstraksi diulang sebanyak 3 kali. Ekstrak biji chia yang diperoleh disaring dengan filter selulosa (*fine pore*=0,45 µm). Maserat yang dihasilkan kemudian dipekatkan dengan cara menguapkan pelarutnya menggunakan *vaccum rotary evaporator* dengan tekanan rendah pada suhu 70 °C.

Pembuatan Suspensi Bakteri

Bakteri *Streptococcus mutans* ATCC 25175 dikultur dalam media *Brain Heart Infusion broth* (BHI-B) sebanyak 10 ml dan diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah disentrifugasi, bakteri disesuaikan kekeruhannya dengan standar McFarland 0,5 (1,5 x 10⁸ CFU/ml).

Uji Penghambatan pembentukan biofilm

Uji pengaruh ekstrak biji chia dalam menghambat biofilm menggunakan *U-bottom Polystyrene 96-well microplate*. Pada *microplate* dimasukkan 40 µl media BHI *broth* yang mengandung sukrosa 1%, 10 µl suspensi *S. mutans*, dan 50 µl variasi konsentrasi ekstrak biji chia (ekstrak konsentrasi 1,3%, 2,6%, dan 5,2%). Sebagai kontrol positif dimasukkan 50 µl klorheksidin glukonat, sedangkan sebagai kontrol negatif dimasukkan 50 µl akuades. Selanjutnya, *plate* diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah inkubasi, seluruh supernatan kultur dibuang dan sumuran dicuci 2 kali dengan 200 µl PBS. Selanjutnya, bakteri pada sumuran diwarnai dengan 200 µl kristal violet 0,1% selama 15 menit, kemudian dibilas dua kali dengan 200 µl PBS steril untuk menghilangkan warna yang tidak terserap. Sebanyak 200 µl etanol 100% ditambahkan ke setiap sumuran *microplate* dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Selanjutnya, sebanyak 150 µl larutan dari tiap sumuran dipindahkan ke *flat-bottom polystyrene 96 wells microplate* dan diukur absorbansinya menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 540 nm. Persentase daya hambat pada pembentukan biofilm *S. mutans* menggunakan rumus:¹³

Persentase daya hambat =

$$1 - \left(\frac{\text{OD perlakuan} - \text{OD blanko perlakuan}}{\text{OD kontrol} - \text{OD blanko kontrol negatif}} \times 100\% \right)$$

Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian ini adalah persentase penghambatan biofilm pada bakteri yang merupakan data kuantitatif berskala rasio. Hasil uji normalitas *Saphiro-Wilk* menunjukkan data normal tetapi hasil uji homogenitas *Levene's Test* menunjukkan data tidak homogen sehingga data dianalisis statistik menggunakan uji non-parametrik *Kruskal-wallis* dengan signifikan $\alpha = 0,05$ dilanjutkan dengan uji *post hoc U Mann-Whitney*.

HASIL PENELITIAN

Hasil penelitian mengenai pengaruh ekstrak biji chia terhadap pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro* menunjukkan terjadi penghambatan pembentukan biofilm bakteri *S. mutans* ATCC 25175 pada kelompok perlakuan ekstrak biji chia konsentrasi 1,3%, 2,6%, dan 5,2%. Data rerata persentase daya hambat pembentukan biofilm disajikan pada tabel 1. Persentase penghambatan biofilm ekstrak konsentrasi 5,2% memiliki rerata persentase penghambatan biofilm *S. mutans* tertinggi dan persentase penghambatan biofilm ekstrak konsentrasi 1,3% dan 2,6% memiliki rerata persentase penghambatan biofilm *S. mutans* yang hampir sama.

Hasil uji *Kruskal-Wallis* memberikan nilai $p = 0,003$ ($p < 0,05$) yang mengindikasikan bahwa ekstrak biji chia memiliki pengaruh signifikan dalam menghambat pembentukan biofilm *S. mutans*. Data kemudian diuji *Post Hoc* dengan uji *U-Mann-Whitney* untuk mengetahui signifikansi perbedaan persentase daya hambat antara 2 kelompok perlakuan.

Tabel 1. Rerata dan standar deviasi persentase penghambatan biofilm *S. mutans* ATCC 25175 oleh ekstrak biji chia

Perlakuan	n	Rerata dan Standar Deviasi (%)
Ekstrak 1,3%	4	20,74 ± 1,174
Ekstrak 2,6%	4	20,15 ± 3,790
Ekstrak 5,2%	4	26,48 ± 5,426
CHX	4	100,00 ± 0,00

Tabel 2. Hasil uji U-Mann Whitney persentase daya hambat biofilm *S. mutans*

	Ekstrak 1,3%	Ekstrak 2,6%	Ekstrak 5,2%	Kontrol positif
Ekstrak 1,3%		0,663	0,248	0,014*
Ekstrak 2,6%		0,149	0,149	0,014*
Ekstrak 5,2%				0,014*
Kontrol positif				

Dari hasil uji U-Mann Whitney diketahui bahwa tidak terdapat perbedaan persentase penghambatan biofilm *S. mutans* yang signifikan antara ekstrak 1,3%, ekstrak 2,6%, dan ekstrak 5,2% ($p > 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak 1,3%, ekstrak 2,6% dan ekstrak 5,2% memiliki kemampuan setara dalam menghambat pembentukan biofilm *S. mutans*. Namun, terdapat perbedaan persentase penghambatan biofilm *S. mutans* yang signifikan antara ketiga konsentrasi ekstrak tersebut dengan klorheksidin glukonat, mengindikasikan bahwa kemampuan ketiga konsentrasi uji ekstrak biji chia dalam menghambat pembentukan biofilm *S. mutans* masih dibawah klorheksidin glukonat.

PEMBAHASAN

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak biji chia mampu menghambat proses pembentukan biofilm bakteri *S. mutans* ATCC 25175. Ekstrak biji chia mampu menghambat pembentukan biofilm kemungkinan karena zat aktif yang terkandung di dalamnya memiliki aktivitas antimikroba dan antibiofilm. Penelitian sebelumnya membuktikan bahwa biji chia dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram positif (*A. baumannii*, *E. coli*, dan *A. hydrophila*) dan bakteri Gram negatif (*B. subtilis*, *S. aureus*, dan *M. tuberculosis*).¹⁴ Penelitian Divyapriya dkk. (2016)¹⁵ membuktikan biji chia mampu membentuk zona hambat pertumbuhan pada bakteri patogen penyakit periodontal, yaitu *A. Actinomycescomitans*, *P. gingivalis*, dan *F. nucleatum*. Penelitian Elshafie dkk. (2018)¹⁶ membuktikan bahwa biji chia dapat menghambat jamur fitopatogen (*P. expansum*, *Sclerotinia sclerotiorum* dan *Fusarium oxysporum*) dan bakteri (*Pseudomonas syringae*, *E. coli*, dan *P. savastanoi*).

Kemampuan penghambatan pembentukan biofilm oleh biji chia kemungkinan karena kandungan zat aktif flavonoid (*myricetin*, *quercetin*, *kaempferol*, *rutin*, *daidzin*, *genistein*, *genistin*, *glycitein* dan *glycitin*) dan asam fenolik.¹⁴ Mekanisme pembentukan biofilm *S. mutans* melalui 2 mekanisme, yaitu *sucrose-independent* dan *sucrose-dependent*.⁶ Kandungan biji chia diduga memiliki kemampuan menghambat biofilm *S. mutans* melalui kedua mekanisme tersebut. Mekanisme *sucrose-independent* adalah perlekatan *S. mutans* pada permukaan gigi bergantung pada hidrofobisitas dan Antigen I/II yang terlibat dalam pembentukan awal biofilm.¹⁷ Flavonoid terbukti dapat menghambat perlekatan bakteri dengan menurunkan hidrofobisitas bakteri.¹⁸ Mekanisme *sucrose-dependent* adalah pembentukan biofilm *S. mutans* dengan bantuan enzim glukosiltransferase yang mengubah sukrosa menjadi glukon (EPS). Pada penelitian ini, penambahan sukrosa 1% pada media BHI dapat memungkinkan terjadinya mekanisme *sucrose dependent*. Ekstrak biji chia mengandung *quercetin*, *kaempferol*, dan *myricetin* dapat menghambat aktivitas glukosiltransferase terutama GTFB, GTFC dan GTFD. Oleh karena itu, pembentukan biofilm terhambat karena glukon yang berperan sebagai perlekatan bakteri tidak terbentuk.¹⁹ Flavonoid juga mengurangi α -hemolysin dan eksotoksin bakteri sehingga menghambat pembentukan koloni bakteri. α -hemolysin memiliki peran primer dalam interaksi antar sel pada saat pembentukan biofilm.²⁰

Mekanisme antibakteri pada sumuran kultur bakteri *S. mutans* dibuktikan dengan adanya penurunan massa biofilm bakteri yang menempel pada dasar sumuran *microplate*. Hal

ini disebabkan oleh kandungan flavonoid pada ekstrak biji chia. Mekanisme kerja dari flavonoid menghambat bakteri *S. mutans* adalah flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri. Aktivitas flavonoid mengakibatkan penurunan fungsi *barrier* membran bakteri sehingga menyebabkan kebocoran intramembran. Hal ini menyebabkan agregasi bakteri menurun dan koloni bakteri yang terbentuk di dasar sumuran *microplate* berkurang.²¹ *Quercetin* juga menghambat rantai transpor elektron dan sintesis ATP dengan cara mencegah hidrolisis ATP. Hal ini mengganggu energi utama pada bakteri sehingga menghambat pertumbuhan bakteri.²²

Pada penelitian ini, kemampuan penghambatan pembentukan biofilm oleh ekstrak biji chia konsentrasi 2,6%, 1,3%, dan 5,2% adalah setara, tetapi masih lebih rendah dibandingkan klorheksidin glukonat. Hal ini kemungkinan terjadi karena konsentrasi ekstrak etanol biji chia tergolong kecil sehingga kandungan zat aktif metabolit sekunder belum cukup berdampak pada penghambatan pembentukan biofilm *S. mutans*. Menurut Brookes dkk.,²³ pemakaian klorheksidin glukonat dengan konsentrasi tinggi (> 0,1%) dapat menyebabkan kebocoran pada komponen utama intraseluler pada sel bakteri sehingga terjadi efek bakterisidal (lisis sel dan kematian). Bila dibandingkan dengan penelitian sebelumnya dengan bakteri patogen periodontal, konsentrasi biji chia yang dapat menyamai kekuatan penghambatan pertumbuhan bakteri klorheksidin glukonat adalah > 50%.¹⁵ Dari hasil penelitian ini disarankan untuk dilakukan penelitian dengan menggunakan konsentrasi ekstrak yang lebih besar.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol biji chia mampu menghambat pembentukan biofilm *Streptococcus mutans* ATCC 25175 *in vitro*. Ekstrak etanol biji chia konsentrasi 1,3%, 2,6% dan

5,2% memiliki kemampuan menghambat biofilm *S. mutans* ATCC 25175 yang setara meskipun masih lebih rendah dibandingkan klorheksidin glukonat.

PERNYATAAN PENULIS

Naskah ini merupakan bagian dari tugas akhir yang disusun oleh penulis pertama dibawah bimbingan penulis lain, sebagai salah satu syarat untuk menyelesaikan pendidikan jenjang Strata 1 di Program Studi S1 Kedokteran Gigi FKG UGM.

DAFTAR PUSTAKA

1. Akarshan Z. Dental Caries-Diagnosis, Prevention and Management. Turkey: Interchopen; 2018. 1-2.
2. Alissa V, David L, Taylor P, Deborah D, David D. Mutans streptococci and lactobacilli: colonization patterns and genotypic characterization of cariogenic bacterial species in American Indian Children. *Front Dent Med.* 2021; 2: 2-8. doi: 10.3389/fdmed.2021.740900
3. Farkash Y, Feldman M, Ginsburg I, Steinberg D, Shalish M. Polyphenols inhibit *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* Biofilm formation. *Dent J.* 2019; 7(2): 1-2. doi: 10.3390/dj7020042
4. Kooltheat N, Kamuthachad L, Anthapanya M, Samakachan N, Sranujit RP, Potup P, Ferranite A, Usuwanthim K. Kaffir lime leaves extract inhibits biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Nutrition.* 2016; 32(4): 486-490. doi: 10.1016/j.nut.2015.10.010
5. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfast JK, Freires IA, Abranches J, Bradhy LJ. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr.* 2019; 7(1): 10. doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0051-2018
6. Matsumoto-Nakano M. Role of *Streptococcus mutans* Surface Proteins for Biofilm Formation. *Jpn Dent Sci Rev.* 2017; 54(1): 22-29. doi: 10.1016/j.jdsr.2017.08.002
7. Lee JH, Park JH, Cho HS, Joo SW, Cho MH, dan Lee J. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus*

- aureus. Biofouling. 2013; 29(5): 491-499.
doi: 10.1080/08927014.2013.788692
8. Yue J, Yang H, Liu S, Song F, Guo J, Huang C. Influence of naringenin on the biofilm formation of *Streptococcus mutans*. J Dent. 2018; 76: 24-31. doi: 10.1016/j.jdent.2018.04.013
 9. Prasad KARVP, John S, Deepika V, Pmijendra KS, Reddy BR, Choncholi S. Anti-Plaque efficacy of herbal and 0.2% chlorhexidine gluconate mouthwash: a comparative study. J Int Oral Health. 2015; 7(8): 98-102.
 10. Ullah R, Nadeem M, Khalique A, Imran M, Mehmood S, Javid A, Hussain J. Nutritional and therapeutic perspectives of Chia (*Salvia hispanica* L.): a review. J Food Sci Technol. 2015; 53(4): 1750-1758.
doi: 10.1007/s13197-015-1967-0
 11. Zeng Y, Nikikova A, Abdelsalam H, Li J, Xiao J. Activity of quercetin and kaempferol against *Streptococcus mutans* Biofilm. Arch Oral Biol. 2018; 98: 9-16.
doi: 10.1016/j.archoralbio.2018.11.005
 12. Guan X, Zhou Y, Liang X, Xiao J, He L, Li J. Effect of compounds found in *Nidus Vespae* on the growth and cariogenic virulence factors of *Streptococcus mutans*. Microbiol Res. 2012; 167(2): 61-68.
doi: 10.1016/j.micres.2011.03.002
 13. Haniastuti T, Puspasari TA, Hakim ER, Tandelilin RT. Potential effect of giant freshwater prawn shell nano chitosan in inhibiting the development of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* Biofilm in Vitro. Int J Dent. 2023; 2023: 8890750.
doi: 10.1155/2023/8890750
 14. Guzel S, Ulger M, Ozay Y. Antimicrobial and antiproliferative activities of Chia (*Salvia Hispanica* L.) seeds. International Journal of Secondary Metabolite. 2020; 7(3): 174-180.
doi: 10.21448/ijsm.722574
 15. Divyapriya GK, Veeresh DJ, Yavagal PC. Evaluation of antibacterial efficacy of chia (*Salvia hispaica*) seeds extract against *Propyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*-an in vitro study. International Journal of Ayurveda and Pharma Research. 2016; 4(4): 22-26.
 16. Elshavie HS, Aliberti L, Amato M, Feo VD, Camele I. Chemical composition and antimicrobial activity of chia (*Salvia hispanica* L.) essential oil. Eur Food Res Technol. 2018; 244(9): 1675-1682.
 17. Veloz JJ, Alvear M, Salazar LA. Antimicrobial and antibiofilm activity against *Streptococcus mutans* of individual and mixtures of the main polyphenolic compounds found in Chilean propolis. Biomed Res Int. 2019; 7.
doi: 10.1155/2019/7602343
 18. Venegas GG, Gomez-Mora JA, Meraz-Rodriguez MA, Flores-Sanchez MA, Ortiz-Miranda MA. Effect of flavonoids on antimicrobial activity of microorganisms present in dental plaque. Heliyon. 2019; 5(12): 1-6. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e03013
 19. Slobodnikova L, Fialova S, Rendekova K, Kovac J, Mucaji P. Antibiofilm activity of plant polyphenols. Molecules. 2016; 21(12): 1-15.
doi: 10.3390/molecules21121717
 20. Caiazza NC, O'Toole GA. Alpha-toxin is required for biofilm formation by *Staphylococcus aureus*. JB. 2003; 185(10): 3214-3217.
doi: 10.1128/JB.185.10.3214-3217.2003
 21. Sabir A. Aktivitas antibakteri flavonoid propolis *Trigona* sp terhadap bakteri *Streptococcus mutans* (in vitro). Maj Ked Gigi (Dent J). 2005; 38(3): 135-141.
doi: 10.20473/j.djmgk.v38.i3.p135-141
 22. Gorniak I, Bartoszewski R, Kroliezewski J. Comprehensive review of antimicrobial activities of plant flavonoids. Phytochem Rev. 2019; 18: 241-727.
doi: 10.1007/s11101-018-9591-z
 23. Brookes ZLS, Bescos R, Belfied LA, Ali K, Roberts A. Current uses of chlorhexidine of management of oral disease: a narrative review. J Dent. 2020; 103: 1-9.
doi: 10.1016/j.jdent.2020.103497