

PENGARUH VARIASI KONSENTRASI MEDIUM PERTUMBUHAN DAN IDENTIFIKASI BAKTERI PEMBENTUK BIOFILM ORAL

Rusli¹, Asni Amin^{2*}, Aqila Alviola Bani³

1) Prodi Apoteker dan Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim, Indonesia.
usli.rusli@umi.ac.id

2*) Prodi Magister Farmasi dan Laboratorium Farmakognosi Fitokimia, Fakultas Farmasi, Universitas Muslim, Indonesia.
asni.amin@umi.ac.id

3) Mahasiswa Fakultas Farmasi Universitas Muslim Indonesia, Indonesia.
1502090082@umi.ac.id

Abstract

*Oral biofilm is a collection of microorganisms such as bacteria and fungi that adhere to the surface of the oral cavity (teeth, tongue, roof of the mouth, and gums) and are covered by carbohydrates. Several types of bacteria form oral biofilms which trigger the formation of dental calculus and even dental caries. This study aimed to determine the concentration of oral bacterial growth medium and identify bacteria that form oral biofilms. The research method used a qualitative laboratory experimental design against several bacteria as oral biofilm formers, the bacteria were *Fusobacterium nucleatum* (FN), *Porphyromonas gingivalis* (PG), and *Streptococcus mutans* (SM). The bacteria were grown on a selective medium, it was *Brucella Blood Agar* with the addition of coagulated sheep blood with various concentrations of 5 and 10% under anaerobic conditions. The growing bacteria were identified by their morphology and Gram staining. The results of growing bacteria on *Brucella Blood Agar* (BBA) medium with coagulated sheep blood (CSB) at a concentration of 5% showed that FN bacteria did not grow, while PG and SM bacteria could grow. At 10% BBA medium, the three bacteria can grow. Identification results by Gram staining showed FN and PG bacteria including Gram-negative bacteria with pink cells. Meanwhile, SM bacteria include Gram-positive bacteria which show a blue color on their cells. The cell morphology of PG bacteria is in the form of coccobacillus, FN bacteria is in the form of bacilli and SM is in the form of coccus. The best media concentration for the growth of Gram-negative bacteria (FN and PG) and Gram-positive bacteria (SM) forming oral biofilms is media with a concentration of 10%.*

Keywords : *Oral Biofilms; Brucella Blood Agar, Growth Medium, Gram Stain, Oral Bacteria.*

Abstrak

Biofilm oral merupakan sekumpulan mikroorganisme baik bakteri, jamur ataupun kapang yang melekat di permukaan rongga mulut (gigi, lidah, langit-langit mulut, dan gusi) dan dibungkus oleh karbohidrat. Beberapa jenis bakteri pembentuk biofilm oral pencetus terbentuknya karang gigi bahkan karies gigi. Tujuan penelitian ini adalah untuk menentukan konsentrasi media tumbuh bakteri oral dan mengidentifikasi bakteri pembentuk biofilm oral. Metode penelitian menggunakan design experimental laboratorium kualitatif, terhadap bakteri oral pembentuk biofilm yaitu bakteri *Fusobacterium Nucleate* (FN), *Porphyromonas gingivalis* (PG), dan *Streptococcus mutans* (SM). Bakteri ditumbuhkan pada media selektif *Brucella Blood Agar* (BBA) dengan penambahan darah domba (*sheep blood*) tidak terkoagulasi dengan variasi konsentrasi 5 dan 10% dalam kondisi anaerob. Bakteri yang tumbuh diidentifikasi bentuk morfologi dan pewarnaan Gram. Hasil penumbuhan bakteri pada media *Brucella Blood Agar* (BBA) dengan darah domba tidak terkoagulasi (DDTK) konsentrasi 5% menunjukkan bahwa bakteri FN tidak mengalami pertumbuhan, sedangkan bakteri PG dan SM dapat tumbuh. Pada konsentrasi media BBA 10% ketiga bakteri dapat tumbuh. Hasil identifikasi dengan pewarnaan Gram menunjukkan bakteri FN dan PG termasuk bakteri Gram negatif dengan sel berwarna merah muda. Sedangkan pada bakteri SM termasuk bakteri Gram positif yang menunjukkan warna biru pada selnya. Adapun bentuk morfologi sel bakteri PG berbentuk coccobasil, bakteri FN berbentuk basil dan SM berbentuk coccus. Konsentrasi media yang terbaik bagi penumbuhan bakteri Gram negatif (FN dan PG) dan bakteri Gram positif (SM) pembentuk biofilm oral adalah media yang konsentrasinya 10%.

Kata kunci: Biofilm Oral, Bakteri Oral, Brucella Agar Darah, Media Tumbuh, Pewarnaan Gram.

PENDAHULUAN

Bakteri termasuk dalam kategori organisme prokariotik yang berarti tidak memiliki selubung inti. Bakteri membentuk biofilm untuk bertahan hidup mereka dan karenanya biofilm ada di mana-mana. Agregat bakteri yang menempel pada permukaan dan/atau satu sama lain dan tertanam dalam matriks buatan sendiri disebut biofilm bakteri. Matriks biofilm terdiri dari berbagai zat termasuk protein (misalnya fibrin), polisakarida (misalnya alginat) dan eDNA. Bakteri dalam biofilm, selain menerima perlindungan dari matriks, dapat menggunakan berbagai taktik bertahan hidup untuk menghindari sistem pertahanan inang. Mereka dapat mengganggu sistem kekebalan dan merusak jaringan lokal, menyebabkan infeksi akut.^{1,2} Karakteristik biofilm memiliki struktur terdiri dari mikro-koloni sel bakteri (15-20% volume) yang terdistribusi secara tidak acak dalam bentuk matriks atau glikokaliks (75-80% volume). Bakteri dalam gugus biofilm bersama-sama membentuk koloni sessile berbentuk jamur.³ Biofilm tidak hanya terdapat pada alat kesehatan tetapi juga pada bagian tubuh seperti permukaan kulit atau mukosa saluran pernapasan dan pencernaan.² Menurut American National Institutes of Health, lebih dari 80% infeksi mikroba dalam tubuh manusia disebabkan oleh biofilm, termasuk yang terjadi pada gigi dan rongga mulut.⁴ Beberapa penyakit yang disebabkan oleh biofilm oral yang terdapat pada rongga mulut adalah periodontitis, gingivitis, nekrosis jaringan, dan infeksi jaringan akibat terjadinya akumulasi biofilm pada dental biomaterial (gigi, dan gusi).⁵

Bakteri dapat membentuk biofilm dalam kondisi tertentu baik secara aerob maupun anaerob.⁶ Biofilm pada rongga mulut dan gigi atau lebih dikenal dengan biofilm oral, memiliki karakter khusus karena membutuhkan glikoprotein dari air liur inang untuk menempel. Beberapa jenis bakteri pembentuk biofilm oral meliputi *Fusobacterium nucleatum*, *Treponema spp*, *Tannerella forsythensis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Aggregatibacter actinomycetem-comitans*, *Streptococcus mutans*, dll.⁷

Media pertumbuhan mikroorganisme terdiri dari kombinasi nutrisi, atau zat makanan, yang dibutuhkan mikroorganisme untuk berkembang.⁸ Bakteri FN, PG dan SM merupakan bakteri pembentuk biofilm oral yang termasuk dalam golongan bakteri anaerob. Untuk menumbuhkan bakteri anaerob diperlukan medium yang diperkaya dengan darah, seperti media : Schaedler Blood Agar (SBA), Brucella Blood Agar (BBA), Brain Heart Infusion Agar (BHIA), dan media kompleks Trypticase Soy Base Agar (TSBA), dengan suplemen (hemin, vitamin K).⁹ Media Agar Darah digunakan untuk bakteri patogen berdasarkan daya hemolitiknya pada sel darah merah.¹⁰ Adapun darah yang umum digunakan dalam media Agar Darah adalah darah mamalia berupa darah domba dengan konsentrasi 5-10%.¹¹

Berdasarkan bentuk struktur dinding selnya pengelompokan bakteri terbagi dalam dua kelompok yaitu bakteri Gram positif dan bakteri Gram negatif.¹² Pewarnaan Gram merupakan metode yang paling umum untuk mencirikan bakteri dengan melihat morfologi sel antara lain sifat Gram, bentuk, dan penataan sel.¹³ Pewarnaan Gram menggunakan pewarnaan asam untuk bakteri Gram negatif dan pewarnaan basa

untuk bakteri Gram positif. Perbedaan mendasar dari hasil pewarnaan ditunjukkan oleh warna pada sel bakteri (struktur dinding sel). Warna merah muda yang dihasilkan dari pewarnaan bakteri adalah golongan bakteri Gram negatif, sedangkan terjadinya reaksi warna biru menunjukkan golongan bakteri Gram positif, hal ini karena bakteri Gram positif memiliki dinding sel yang dilapisi oleh zat peptidoglikan yang tebal (20-80 nm), sedangkan bakteri Gram negatif struktur kimia dinding selnya berupa lapisan peptidoglikan yang tipis (\pm 5–10) nm, dan juga memiliki polisakarida, lipoprotein dan membran luar.^{14,15}

Berdasarkan uraian di atas, untuk mengoptimalkan pertumbuhan bakteri dan menentukan kelompok bakteri Gram pembentuk biofilm oral yang akan diuji, maka perlu dilakukan observasi variasi konsentrasi media tumbuh menggunakan media Agar Darah terkoagulasi, dan mengidentifikasi bakterinya melalui pemeriksaan morfologi koloni dan pewarnaan Gram.

METODE

Penelitian ini menggunakan metode design eksperimen laboratoris bersifat kualitatif, dilakukan dari bulan Februari hingga April 2023, pembuatan media dan identifikasi bakteri dengan pengamatan morfologi koloni dan pewarnaan Gram dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi UMI.

Alat yang digunakan antara lain: Alat-alat gelas, petri dish, timbangan analitik (*O'houz*), autoklaf (*Memmert*), inkubator anaerob (*Memmert*), mikropipet (*Effendorf*), yellow tip dan blue tip, dan mikroskop binokuler (XSZ 107 BN). Adapun bahan yang digunakan: bakteri *Fusobacterium nucleatum* strain ATCC

25586, *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277, *Streptococcus mutans* strain ATCC 25175, Brucella Blood Agar (Oxoid), darah domba defibrinasi yang bersumber dari Laboratorium Dinas Kesehatan Provinsi SulSel, vit K (Otsuka), aquades, etanol 96%, Crystal Violet, Iodine Lugol, dan Safranin.

a. Penentuan konsentrasi media tumbuh

Pemilihan konsentrasi media tumbuh bakteri pada media Brucella Blood Agar s(BBA) dengan menggunakan senyawa esensial darah domba dengan variasi konsentrasi 5% dan 10%. Pembuatan media Agar Darah dilakukan dengan menimbang 2 gram *Brucella Agar Base* dan dilarutkan dengan 50 ml aquades dan aduk hingga homogen, kemudian disterilkan pada autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Didinginkan hingga suhu mencapai 45⁰-50⁰C, kemudian menambahkan darah domba steril yang sudah didefibrinasi dengan pemberian konsentrasi 5%, darah domba dikoagulasikan dengan vit K sebanyak 10 μ L dan dihomogenkan. Selanjutnya media dituang pada cawan petri sebanyak 15 mL, biarkan hingga memadat. Setelah itu dilakukan kultur tiga jenis bakteri pembentuk biofilm oral (FN, PG dan SM) masing-masing 1 ose pada media yang telah dibuat dengan metode streake plate pada media plate, dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam dalam suasana anaerob. Hal yang sama juga dilakukan untuk media pertumbuhan dengan konsentrasi darah domba 10%.

b. Identifikasi bakteri biofilm oral melalui pewarnaan Gram

Identifikasi dengan cara pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui morfologi sel koloni bakteri dan sifat Gramnya. Pewarnaan Gram mengacu pada prosedur

Holderman et al. 2017 dan Amin. et.al. 2017. Bakteri yang telah dikultur digores pada *microscope slides* (objek gelas) steril dan diteteskan NaCl, kemudian difiksasi, tambahkan larutan kristal violet diamkan selama 3 menit, Lugol selama 1 menit, etanol 95% selama 30 detik dan Safranin selama 2 menit. Warna biru keunguan yang terbentuk menandakan bakteri Gram

positif, sedangkan bakteri Gram negatif akan memberikan warna merah.^{14,16}

c. Identifikasi bentuk morfologi bakteri Gram pembentuk biofilm oral

Setelah dilakukan pewarnaan Gram, selanjutnya diidentifikasi bentuk morfologi koloni bakteri secara mikroskopik dan hasil pewarnaan bakteri Gram pada bakteri pembentuk biofilm.

HASIL



Gambar 1. Penumbuhan bakteri Biofilm Oral pada media BBA dengan penambahan DDTK konsentrasi 5%



Gambar 2. Penumbuhan organoleptik koloni bakteri biofilm oral yang tumbuh pada media BBA dengan variasi konsentrasi DDTK

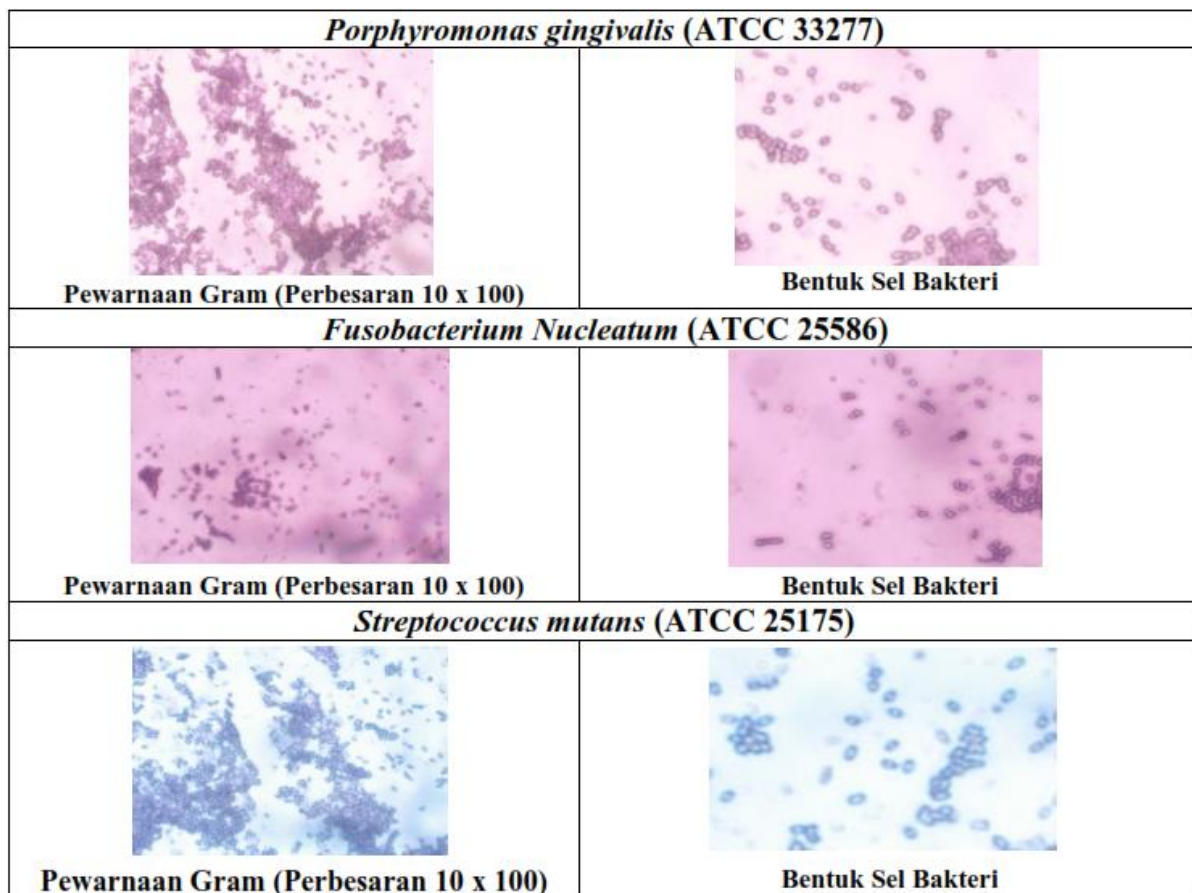
Tabel 1. Pengamatan organoleptik koloni bakteri biofilm oral yang tumbuh pada media BBA dengan variasi konsentrasi DDTK

Bakteri Uji	Pertumbuhan bakteri pada media BBA + DDTK 5%			Pertumbuhan bakteri pada media BBA + DDTK 10%		
	Hasil	Organoleptik Warna koloni	Organoleptik Bau koloni	Hasil	Organoleptik Warna koloni	Organoleptik Bau koloni
FN ATCC 25586	-	-	-	+	Hitam kecoklatan	Tajam dan khas
PG ATCC 33277	+	Hitam kecoklatan	Tajam dan khas seperti Urea	+	Hitam kecoklatan	Tajam dan khas seperti Urea

SM ATCC 25175	+	Kuning krem	Tidak berbau khas	+	Kuning krem	Tidak berbau khas
---------------------	---	-------------	----------------------	---	-------------	----------------------

Tabel 2. Hasil Identifikasi Bakteri Biofilm Oral dengan Pewarnaan Gram

Bakteri Uji	Hasil Pewarnaan Gram	Golongan Bakteri	Bentuk Koloni
FN ATCC 25586	Merah Muda	Gram Negatif	Basil
PG ATCC 33277	Merah Muda	Gram Negatif	Coccobasil
SM ATCC 25175	Ungu	Gram Positif	Coccus



Gambar 2. Hasil pewarnaan Gram dan morfologi bentuk koloni bakteri biofilm oral dengan pengamatan mikroskopik perbesaran 10 x100

PEMBAHASAN

Media Agar Darah (Blood Agar) adalah salah satu contoh media standar yang kaya akan nutrisi untuk mengisolasi bakteri patogen.¹⁷ Media Agar Darah mengandung 5-10% darah mamalia (biasanya darah domba) yang tidak beku. Penambahan darah bertujuan agar dapat membantu perbenihan menjadi lebih subur dan menumbuhkan bakteri yang sulit ditemukan pada perbenihan biasa. Selain

itu, media ini memiliki kemampuan untuk membedakan karakteristik bakteri dan kemampuan bakteri untuk menghancurkan eritrosit.¹¹ Pada media juga ditambahkan suplemen yang berfungsi membantu pertumbuhan bakteri anaerob yaitu vitamin K. BBA merupakan media pertumbuhan selektif untuk bakteri anaerob seperti bakteri FN, PG dan SM.

Berdasarkan hasil pengamatan perbedaan penumbuhan bakteri dari media dengan penambahan darah domba (sheep blood)

sebanyak 5% dengan 10% terjadi pada jenis bakteri FN. Pada media pertama yaitu penambahan darah domba dengan konsentrasi 5% menunjukkan bakteri ini tidak tumbuh, sedangkan pada media kedua yaitu penambahan darah domba konsentrasi 10% ternyata bakteri FN mengalami penumbuhan. Berbeda halnya pada jenis bakteri pembentuk biofilm oral lainnya yaitu PG dan SM, kedua jenis bakteri ini tumbuh dengan baik pada kedua konsentrasi media yang dibuat. Berdasarkan hasil yang diperoleh maka dari variasi konsentrasi DDTK yang terbaik untuk pertumbuhan bakteri FN adalah konsentrasi 10%.

Menurut Beutler et al. 1980 eritrosit atau sel darah merah mengandung nutrisi dan faktor pertumbuhan yang sangat kompleks bagi bakteri "fastidious", yaitu sekitar 27 asam amino yang berbeda, terdapat vitamin, antara lain: tiamin, riboflavin, peridoxin, nikotinamid, asam pentotenat dan vitamin C serta berbagai nukleotida. Untuk memenuhi kebutuhan protein pada bakteri pembentuk biofilm, maka ditambahkan darah domba pada media yang digunakan. Pertumbuhan bakteri pada media Agar Darah yang mengandung 5-10% darah domba dapat meningkatkan pigmentasi dari beberapa jenis bakteri. Perbedaan pigmentasi bakteri pada media dengan penambahan darah domba 5 % dan 10 % juga berbeda. Yang mana pada media dengan penambahan darah domba 10% hasil pigmentasi dari ketiga jenis lebih terang dibandingkan dengan media penambahan darah domba 5%. Peningkatan warna pigmentasi tersebut terlihat jelas pada jenis bakteri P. Gingivalis.¹⁸

Identifikasi bakteri melalui pewarnaan Gram termasuk metode untuk mengklasifikasikan spesies bakteri dalam dua golongan besar, yaitu bakteri Gram positif dan Gram negatif. Pengujian pewarnaan ini dilakukan dengan menganalisis sifat kimia dan karakteristik dari dinding sel bakteri. Zat warna yang digunakan bersifat asam atau basa. Kromofor, yang memiliki muatan positif, bertanggung jawab untuk memberikan warna pada zat warna basa.

Sebaliknya pada zat warna asam bagian yang berperan memberikan zat warna memiliki muatan negatif. Karena muatan negatif yang tinggi pada permukaan sel, zat warna basa lebih banyak digunakan. Beberapa zat warna yang bersifat asam yang sering digunakan antara lain: Cristal violet, Methilen blue, Safranin, Fuchsin dan Malachite Green. Adapun zat warna yang bersifat basa antara lain: Eosin, Congo Red dan lain-lain.

Untuk memastikan keberadaan bakteri yang telah dikultur pada media darah adalah benar jenis bakteri yang diuji dan tidak terkontaminasi oleh keberadaan bakteri lain, maka uji konfirmasi pewarnaan Gram penting dilakukan. Adapun hasil uji pewarnaan Gram pada bakteri PG yang diamati dengan mikroskop perbesaran 10x100 menunjukkan koloni bakteri warna merah muda dan berbentuk kokobasil. Terbentuknya warna merah muda pada bakteri PG disebabkan adanya pengikatan dinding sel bakteri Gram negatif terhadap warna akhir yaitu safranin. Pengikatan pewarna safranin terjadi karena lemak yang terkandung di membran luar bakteri larut saat etanol ditetaskan, sehingga melepaskan kristal violet yang pertama kali diberikan. Bakteri Gram negatif adalah bakteri yang tidak dapat mempertahankan zat warna kristal violet ketika dicuci dengan alkohol dalam proses pewarnaan Gram, sehingga menyebabkan berubah menjadi warna merah jika diamati di mikroskop. Cristal violet terlepas dari permukaan sel bakteri PG, memungkinkan safranin yang berwarna merah menempel pada permukaan sel bakteri.¹⁹ Sementara dari hasil uji perwarnaan Gram pada bakteri FN terbentuk warna merah muda pada sel bakteri dengan bentuk koloni berupa basil, ini menunjukkan FN tergolong bakteri Gram negatif.²⁰

Hasil pengamatan pada bakteri SM menghasilkan warna ungu dan berbentuk kokkus, dan tergolong bakteri Gram positif. Warna ungu yang terbentuk karena kandungan peptidoglikan yang tebal dan lapisan lemak yang tipis pada dinding sel

bakterinya sehingga *Crystal violet* dapat terikat kuat dengan dinding selnya. Lugol digunakan untuk memperkuat ikatan tersebut, dan alkohol atau etanol untuk menghilangkan lapisan lemaknya yang tipis, sehingga pada bakteri Gram positif meskipun warna ungu pada *Crystal violet* sedikit luntur, namun dinding sel bakteri tetap dipenuhi dengan warna ungu.²¹

KESIMPULAN

Penumbuhan bakteri pembentuk biofilm oral pada media BBA yang terbaik untuk ketiga bakteri uji FN, PG dan SM adalah dengan konsentrasi DDTK 10%, dan bakteri PG, dan FN termasuk dalam bakteri Gram negatif, sedangkan bakteri SM tergolong bakteri Gram positif. Data ini dapat menjadi acuan bagi penelitian lanjutan bila menggunakan bakteri yang sama.

DAFTAR PUSTAKA

1. Vestby LK, Grønseth T, Simm R, Nesse LL. Bacterial Biofilm And Its Role In The Pathogenesis Of Disease. Vol. 9, Antibiotics. 2020.
2. Schulze A, Mitterer F, Pombo JP, Schild S. Biofilms By Bacterial Human Pathogens: Clinical Relevance - Development, Composition, And Regulation - Therapeutical Strategies. Microbial Cell. 2021;8(2).
3. Saini R, Saini S, Sharma S. Biofilm: A Dental Microbial Infection, Journal of Natural Science, Biology and Medicine. 2011. Vol. 2.p. 71–5.
4. Ferretti JJ, Stevens DL, Fischetti V. A Streptococcus Pyogenes: Basic Biology to Clinical Manifestations. 2016.
5. Rosyada AG, Prihastuti CC, Sari DNI, Setiawati S, Ichsyani M, Laksitasari A, et al. Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Etanol Kulit Bawang Merah (*Allium Cepa* L.) Dalam Menghambat Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran. 2023. 35(1):34.
6. Robbani MH, Wahjono HD. Identifikasi Teknologi Pencegahan Pembentukan Biofilm Di Permukaan Sensor Yang Digunakan Pada Teknologi Onlino. Jurnal Air Indonesia. 2019;10(1).
7. Huang R, Li M, Gregory RL. Bacterial interactions in dental biofilm, Virulence. 2011; Vol. 2.
8. Egwuatu TO, Ogunsola FT, Okodugha IM, Jide B, Arewa DG, Osinupebi OA. Effect of Blood Agar from Different Animal Blood on Growth Rates and Morphology of Common Pathogenic Bacteria. J.Adv Microbiol. 2014;04(16).
9. Guerrant RL, Walker DH, Weller PF. Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, and Practice. 2011.
10. Turista DDR, Puspitasari E. The Growth of *Staphylococcus aureus* in The Blood Agar Plate Media Of Sheep Blood And Human Blood Groups A, B, AB, and O. Jurnal Teknologi Laboratorium. 2019;8(1).
11. Entjang I. Mikrobiologi & Parasitologi. Bandung: PT Citra Aditya Bakti; 2003.
12. Afifah N, Putri DH, Irdawati I. Isolation and Identification of Endophytic Bacteria from the Andalas Plant Stem (*Morus macroura* Miq.). Bioscience. 2018 May 3;2(1):72.
13. Amin SS, Ghozali Z, Rusdiana M, Efendi S. Identifikasi Bakteri dari Telapak Tangan dengan Pewarnaan Gram Identification of Bacteria from Palms with Gram Stain. CHEMVIRO: Jurnal Kimia dan Ilmu Lingkungan. 2023;1(1).
14. Holderman M V., De Queljoe E, Rondonuwu SB. Identifikasi Bakteri Pada Pegangan Eskalator Di Salah Satu Pusat Perbelanjaan Di Kota Manado. Jurnal Ilmiah Sains. 2017;17(1).
15. Fatmariza M, Inayati N, Analisis Kesehatan J, Kemenkes Mataram P.

- Tingkat Kepadatan Media Nutrient Agar Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Analisis Medika Bio Sains*. 2017;4(2).
16. Amin A, Radji M, Mun'im A, Rahardjo A, Suryadi H. Halitosis Activity Against Volatile Sulfur Compound Of Methyl Mercaptan Component From Burahol (*Stelechocarpus burahol*) Fruit Extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 2017;10(5).
 17. Niederstebruch N, Sixt D, Benda BI, Banboye N. A Suitable Blood Agar Containing Human Blood Especially For The Use In Laboratories Of Developing Countries. *J Infect Dev Ctries*. 2017;11(5).
 18. Beutler E, SK Srivastava. Composition of The Erythrocyte. In Wiliam J.E, Beutler, E. *Hematology*. Second Edition. USA: McGraw-Hill Book Company; 1980. 135–139 p.
 19. Alibasyah ZM, Ningsih DS, Fadhilla Ananda S. Daya Hambat Minuman Probiotik Yoghurt Susu Sapi Terhadap *Porphyromonas gingivalis* Secara In Vitro. *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society*. 2018;3(2).
 20. Lindawati Y, Primasari A, Suryanto D. *Fusobacterium Nucleatum* : Bakteri Anaerob pada Lingkungan Kaya Oksigen (Dihubungkan dengan Staterin Saliva). *Talenta Conference Series: Tropical Medicine (TM)*. 2018;1(1).
 21. Andayani R, Chismirina S, Kumalasari I. Pengaruh Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi*) Terhadap Interaksi *Streptococcus sanguinis* Dan *Streptococcus mutans* Secara In Vitro. *Cakradonya Dent J*. 2014;6(2).