

CERAPAN MIKROSKOPI DAN ANALISIS SITOMETRI *Streptococcus mutans* YANG DITINDAKKAN DENGAN EKSTRAK BATANG *Melastoma malabathricum* L.

ROHAZILA, M.H.^{1,3*}, NAZLINA, I.¹ and YAACOB, W.A.²

¹Pusat Pengajian Biosains dan Bioteknologi, Fakulti Sains Dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor.

²Pusat Pengajian Sains Kimia dan Teknologi Makanan, Fakulti Sains Dan Teknologi,
Universiti Kebangsaan Malaysia, 43600 Bangi, Selangor.

³Fakulti Pergigian, Universiti Sains Islam Malaysia,
Pandan Indah 55100 Ampang Kuala Lumpur

*E-mail: rohazilamohamad@gmail.com

ABSTRAK

Streptococcus mutans adalah bakteria yang terawal membentuk karies gigi pada manusia. Tujuan kajian ini adalah menentukan kesan ekstrak aseton batang *Melastoma malabathricum* terhadap *S. mutans* melalui cerapan mikroskopik dan pengambilan pewarna pendarfluor. Pengekstrakan bahagian batang *M. malabathricum* dengan menggunakan pelarut aseton menghasilkan 0.5 gram ekstrak aseton. Aktiviti anti-bakteria yang ditentukan melalui asai sebaran cakera menunjukkan ekstrak batang pada kepekatan 30 mg/mL merencat pertumbuhan bakteria dengan saiz diameter 15 mm. Kesan tindakan ekstrak terhadap *S. mutans* diperhatikan melalui cerapan mikroskopi menggunakan mikroskop elektron imbasan (SEM) dan mikroskop elektron transmisi (TEM). Hasil daripada cerapan mikroskopik menunjukkan bahawa ekstrak batang senduduk merosakkan bentuk asal sel dengan memecahkan permukaan dan dindingnya serta menyebabkan sitoplasma terkeluar. Asai pengambilan pewarna pendarfluor propidium iodida (PI) ke dalam sel yang dicerap melalui sitometri aliran menunjukkan berlaku kemasukan PI ke dalam sel yang dirawat dengan ekstrak. Pengambilan propidium iodida pada sel terawat mengesahkan berlaku gangguan pada ketelapan struktur membran sel. Berdasarkan pengamatan mikroskopi dan analisis sitometri dapat disimpulkan bahawa ekstrak aseton batang *Melastoma malabathricum* bertindak sebagai bahan antibakteria melalui kerosakan pada dinding sel serta mengganggu ketelapan struktur membran.

Kata kunci: Cerapan mikroskopi, analisis sitometri, *Streptococcus mutans* dan *Melastoma malabathricum*

ABSTRACT

Streptococcus mutans is the earliest bacteria that forms dental caries in humans. This study determines the effect of acetone extract from *Melastoma malabathricum* stem against *S. mutans* by microscopic observation and absorption of fluorescence dye. The extraction of *M. malabathricum* stem using acetone yielded 0.5 g of acetone extract. Anti-bacterial activity determined by disk diffusion assay showed that stem extract at the 30 mg/mL inhibit bacterial growth with inhibition zone diameter of 15 mm. The effect of the extract towards *S. mutans* by microscopic observation was done by Scanning Electron Microscope (SEM) and Transmission Electronic Microscope (TEM). Result from microscopic observation showed that the *M. malabathricum* extract damaged the cell's shape by rupturing the surface and the wall, causing the cytoplasm to leak. The assay using propidium iodide (PI) as the fluorescence dye showed that it was absorbed into the observed cell through flow cytometry analysis. The absorption of propidium iodide in treated cell confirmed the possibility of disturbance in the permeability of the cell membrane's structure. From the microscopic observation and cytometry analysis, it can be concluded that acetone extract of *M. malabathricum* act as anti-bacteria agent that cause damage to the cell wall and disturb the permeability of the membrane structure.

Key words: Microscopic observation, cytometry analysis, *Streptococcus mutans* and *Melastoma malabathricum*

* To whom correspondence should be addressed.

PENGENALAN

Famili Melastomaceae terdiri daripada tumbuhan yang terdapat di kawasan tropika dengan jumlah lebih daripada 4000 spesies di dunia. Salah satu daripada ahli tumbuhan famili ini adalah *Melastoma malabathricum* Linn atau dikenali sebagai senduduk dipercayai mampu mengubat penyakit-penyakit seperti ulser, sakit perut, cirit-birit dan juga sakit gigi. Jus pucuk daripada tumbuhan *M. malabathricum* telah digunakan untuk mengubati sakit gigi manakala air rebusan batang dan akar tumbuhan tersebut dipercayai mengurangkan sakit gigi dengan cara berkumur (Joffry *et al.*, 2012).

Streptococcus mutans merupakan bakteria yang menyebabkan karies gigi terbentuk pada gigi manusia. Bakteria ini mempunyai faktor kevirulenan yang penting dalam membantu pembentukan karies gigi iaitu enzim glukotransferase, gen isyarat kuorum penderiaan dan protein pengikat glukosa (Marcello *et al.*, 2005). Karies gigi merupakan masalah kesihatan mulut yang paling utama di kalangan masyarakat dunia. Sebanyak 90% masyarakat di dunia mempunyai masalah kesihatan gigi yang membimbangkan (Palombo, 2011).

Banyak kajian telah menggunakan mikroskop elektron (EM) untuk melihat kesan sebatian dalam aktiviti bio-lapisan bakteria. Mikroskop elektron dipilih untuk pemerhatian aktiviti biologi bakteria yang berinteraksi dengan sebatian kerana ia dapat menghasilkan imej yang lebih terperinci dari segi topografi permukaan dan komposisi sampel tersebut. Mikroskop elektron yang digunakan oleh Martinez *et al.* (2010) telah berjaya membezakan antara integriti struktur anti-biolapisan *Candida albicans* yang tidak dirawat dan dirawat oleh kitosan. Kajian oleh Alhede *et al.* (2012) juga telah menggunakan beberapa jenis mikroskop elektron untuk menentukan bentuk bio-lapisan yang terhasil daripada *Pseudomonas aeruginosa* dan telah melaporkan teknik ini amat sesuai digunakan kerana ia mempunyai resolusi yang diperlukan dan pembesarannya menawarkan pemerhatian yang lebih terperinci. Dalam kajian ini, kami telah menggunakan mikroskop elektron imbasan (SEM) dan mikroskop elektron transmisi (TEM) untuk menentukan bentuk bio-lapisan *S. mutans* yang dirawat dengan batang *M. malabathricum*.

Sitometri aliran merupakan kaedah yang boleh menentukan bilangan sel yang hidup dan mati. Penggunaan PI dalam analisis ini menentukan jumlah bakteria yang mati disebabkan oleh agen anti-bakteria. Ini kerana pewarna pendarfluor tidak boleh menembusi membran sel yang sihat. Peningkatan pengambilan PI oleh sel yang dirawat boleh dikaitkan dengan kerosakan pada struktur membran sel (Raja *et al.*, 2011) serta ketelapan membran sel.

BAHAN DAN KAEDAH

Penyediaan ekstrak

Sebanyak 800 gram serbuk batang *M. malabathricum* direndam dalam 1 L aseton dan digoncang selama 2 jam dalam alat penggongcang berorbit (Model LM-530RD, Taiwan). Hasil rendaman dituras melalui kertas turas Whatman No. 1. Hasil turasan dikeringkan menggunakan rotavap (Laborota 4000, Jerman). Ekstrak yang telah dikeringkan kemudiannya dilarutkan dalam dimetil sulfoksida (DMSO) 10% (i/i) untuk penyediaan stok pada 100 mg/mL.

Penentuan aktiviti anti-bakteria

Asai sebaran cakera digunakan bagi menyaring aktiviti anti-bakteria ekstrak aseton batang *M. malabathricum*. Bakteria ujian iaitu *S. mutans* (ATCC 25175) dikulturkan dalam agar Infusi Otak Jantung (BHI) dan dieram selama 24 jam dalam keadaan anaerobik pada suhu 37°C. Bilangan sel ujian pada 1×10^8 CFU mL⁻¹ dioptimumkan melalui kekeruhan kultur yang setara dengan piawai 0.5 Mc Farland dengan kaldu Mueller Hinton (MHB). Putik kapas steril digunakan untuk menyebarkan kultur tadi di seluruh permukaan agar Mueller Hinton (MHA). Cakera yang bersaiz 6 mm ditepukan dengan 20 µL ekstrak batang *M. malabathricum* pada kepekatan 10-30 mg/mL. Cakera antibiotik Penisilin (10U) digunakan sebagai kawalan positif manakala dimetil sulfoksida (DMSO) (10%, i/i) digunakan sebagai kawalan negatif. Diameter zon perencatan diukur setelah agar tersebut dieram pada 37°C dalam keadaan anaerobik selama 24 jam.

Penyediaan sampel untuk mikroskopi elektron imbasan (SEM)

Bakteria ujian iaitu *S. mutans* dihidupkan di atas agar BHI dengan 10% sukrosa dan dirawat dengan ekstrak batang *M. malabathricum* pada kepekatan 30 mg/mL. Selepas eraman selama 24 jam dalam keadaan anaerobik pada suhu 37°C, agar tersebut dipotong dengan saiz 5 mm × 5 mm dan dibasuh dengan penimbal fosfat (pH 7.1) sebanyak 2 kali. Agar yang dipotong kemudiannya dikeringkan dan dirawat dengan formalin 4% (i/i). Sampel dikeringkan dengan campuran air dan etanol [33%-99% (i/i)] secara berperingkat. Seterusnya sampel tersebut dilapisi dengan emas dan dicerap dengan menggunakan SEM (Leo 1450, United Kingdom). Bakteria yang dirawat dengan Penisilin (1 mg/mL) telah digunakan sebagai kawalan positif. Manakala bakteria yang tidak dirawat digunakan sebagai kawalan negatif.

Penyediaan Sampel untuk mikroskop elektron transmisi (TEM)

Bakteria ujian *S. mutans* yang dirawat dengan ekstrak pada kepekatan 20-30 mg/mL dihidupkan dalam kaldu BHI bersama-sama 10% (i/i) sukrosa pada suhu 37°C selama 24 jam dalam keadaan anaerobik. Sebanyak 1 mL daripada kultur tersebut diempar pada 13,000 rpm menggunakan mesin pengempar Ependorf 5415R (United Kingdom) selama 30 minit untuk pemendakan sel. Mendakan tersebut dirawat dengan formalin 4% (i/i) selama 24 jam dan kemudiannya distabilkan dengan osmium tetroksida. Seterusnya pengeringan berperingkat dengan alkohol dilakukan dan resin monomerik ditambah sebelum sampel dipotong dengan menggunakan ultra mikrotom. Morfologi bakteria yang terawat dicerap melalui mikroskop elektron transmisi (TEM) (Phylips CM12, Belanda) dan dibandingkan dengan bakteria yang dirawat dengan Penisilin (1 mg/mL) sebagai kawalan positif serta bakteria yang tidak dirawat sebagai kawalan negatif.

Asai Pengambilan Propidium Iodida

Tindakan ekstrak batang *M. malabathricum* terhadap kebolehtelapan membran sel *S. mutans* telah ditentukan melalui kaedah Asai Pengambilan Propidium Iodida (PI) (Cox *et al.*, 2001). Bakteria (100 mL) dikultur dalam kelalang mengandungi MHB selama 24 jam pada suhu 37°C secara anaerobik. Setelah sel diempar, ianya dibilas dan diampai dengan penimbal sodium fosfat (50 mmol) pH 7.1 sehingga mencapai kekeruhan 1×10^9 sel/mL ($OD_{610} = 0.7$). Sebanyak 1 mL larutan ditambah 19 mL penimbal bersama 30 mg/mL ekstrak dan dieram selama 60 minit dan 120 minit pada suhu bilik. Sebanyak 50 μ L alikuot larutan ditambah ke dalam mikrotiub yang mengandungi 950 μ L penimbal fosfat. Campuran kemudiannya dipindahkan dalam tiub FACS (Becton Dickinson, USA) yang mengandungi 5 μ L propidium iodida (kepekatan akhir PI adalah 10 μ g/mL) sebelum dianalisis melalui penjenisan sel diaktifkan-pendarfluor (FACS) menggunakan alat sitometer aliran (Becton Dickinson, Facsanto II USA).

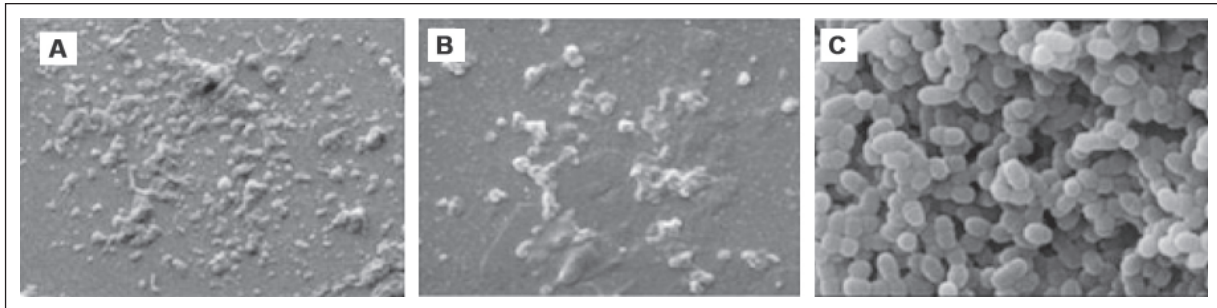
HASIL DAN PERBINCANGAN

Pengekstrakan dengan menggunakan aseton telah berjaya menghasilkan 0.5 g ekstrak batang *M. malabathricum*. Aseton merupakan pelarut yang polar dan akan melarutkan bahan aktif yang terikat pada cas yang dihasilkan oleh pelarut tersebut. Kebanyakan penyelidik menggunakan pelarut yang polar seperti metanol, etanol, aseton dan etil asetat untuk melarutkan kumpulan fenol pada sesuatu tumbuhan. Kumpulan fenol biasa ditemui dalam tumbuhan ubatan. Ia mempunyai aktiviti antiseptik dan antibakteria yang tinggi. Semakin tinggi kepolaran pelarut yang digunakan semakin banyak kumpulan fenol dapat dipencil daripada tumbuhan tersebut (Tomsone *et al.*, 2012). Ekstrak batang *M. malabathricum* pada kepekatan 30 mg/mL merencat pertumbuhan *S. mutans* dengan diameter zon perencatan sebesar 15 mm dan perencatan juga dilihat pada kepekatan lebih rendah (Jadual 1). Aktiviti perencatan pada bakteria semakin berkurangan dengan kepekatan ekstrak batang senduduk. Hal ini menunjukkan bahawa kepekatan ekstrak yang tinggi mengandungi bahan aktif yang banyak untuk merencatkan pertumbuhan bakteria dengan lebih besar berbanding dengan kepekatan ekstrak yang rendah. Kajian daripada Hannan *et al.* (2008) juga menunjukkan semakin tinggi kepekatan ekstrak biji *Nigella sativa*, semakin besar diameter zon perencatan pada *Staphylococcus aureus rintang metisilin* yang dihidupkan. Ini membuktikan bahawa kepekatan ekstrak adalah elemen penting untuk menentukan aktiviti antibakteria pada tumbuhan tersebut.

Cerapan mikroskopi perlu dilakukan terlebih dahulu untuk mengenalpasti tindakan ekstrak terhadap bakteria secara khusus dan tepat. Hasil cerapan SEM menunjukkan ekstrak batang senduduk telah memecahkan susunan bakteria daripada berantai kepada berselerakan (Rajah 1). Selain itu juga, morfologi bakteria dirawat berbeza dengan bakteria yang tidak dirawat iaitu bentuk kokus berubah menjadi lonjong dan kecut. Sel yang dirawat mempunyai permukaan yang kasar dan

Jadual 1. Diameter zon perencatan ekstrak batang *M. malabathricum* terhadap *S. mutans*

Diameter zon perencatan (mm)						
Ekstrak aseton <i>Melastoma malabathricum</i> (mg/mL)					Penisilin	DMSO
30	25	20	15	10	10U	
15±0.04	13±0.03	12±0.02	12±0.01	10±0.02	30	6



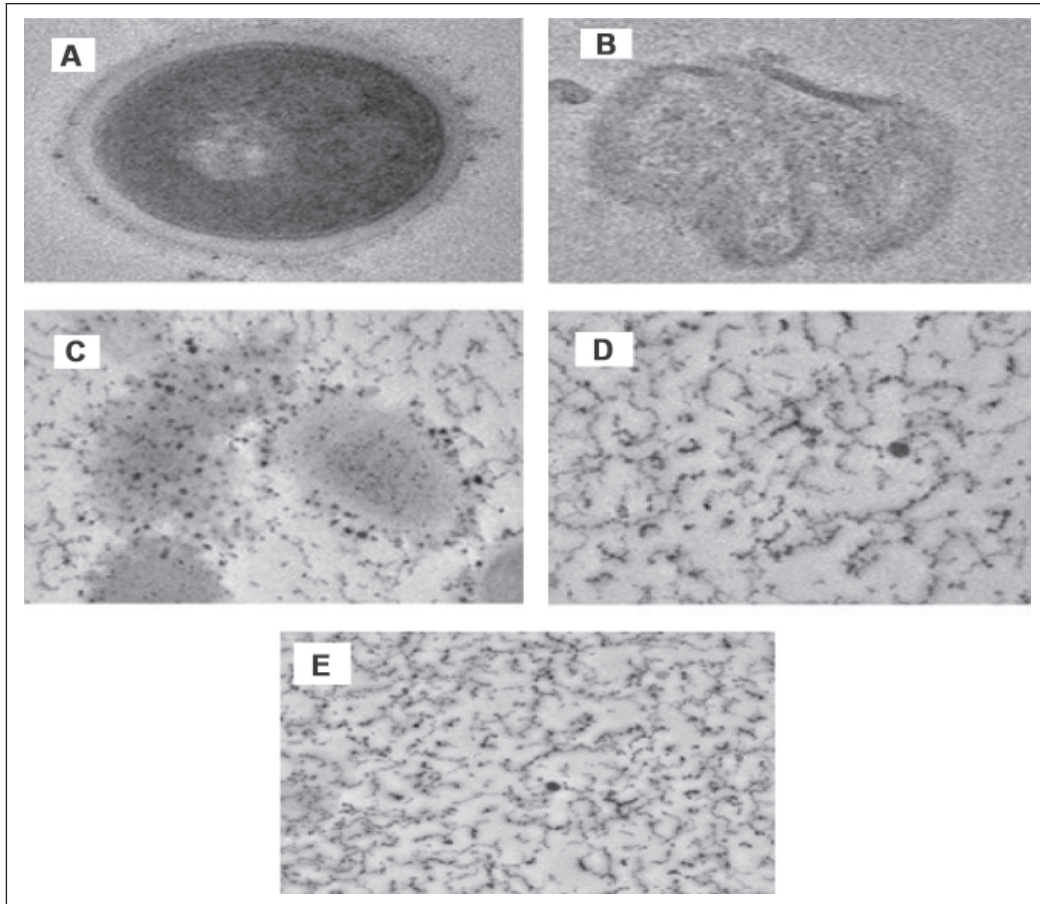
Rajah 1. Bakteria yang dicerap dengan SEM pada pembesaran 133200x, A: Bakteria yang dirawat dengan ekstrak kepekatan 30 mg/mL, B: Bakteria yang dirawat dengan Penisilin (1 mg/mL), C: Bakteria yang tidak dirawat.

berlubang. Berbeza dengan permukaan bakteria tidak dirawat yang lebih licin dan sempurna untuk membentuk morfologi bulat dan berlapis-lapis. Perbezaan ini sangat jelas ketara pada bakteria yang dirawat pada kepekatan 30 mg/mL (Rajah 1A). Bakteria yang tidak dirawat (Rajah 1C) menunjukkan ciri-ciri normal morfologi *S. mutans* iaitu berbentuk bulat dan tersusun secara khas dalam keadaan berantai (Marcello *et al.*, 2005). Morfologi bakteria yang dirawat dengan Penisilin (Rajah 1B) menunjukkan bahawa sel bakteria tersebut pecah sama sekali dan tidak menunjukkan bentuk-bentuk sel normal pada bakteria tersebut. Penisilin adalah antibiotik yang mengandungi cincin β -laktam dan bertindak memecahkan rantaian peptidoglikan dan melisis dinding sel bakteria (Bidault *et al.*, 2007).

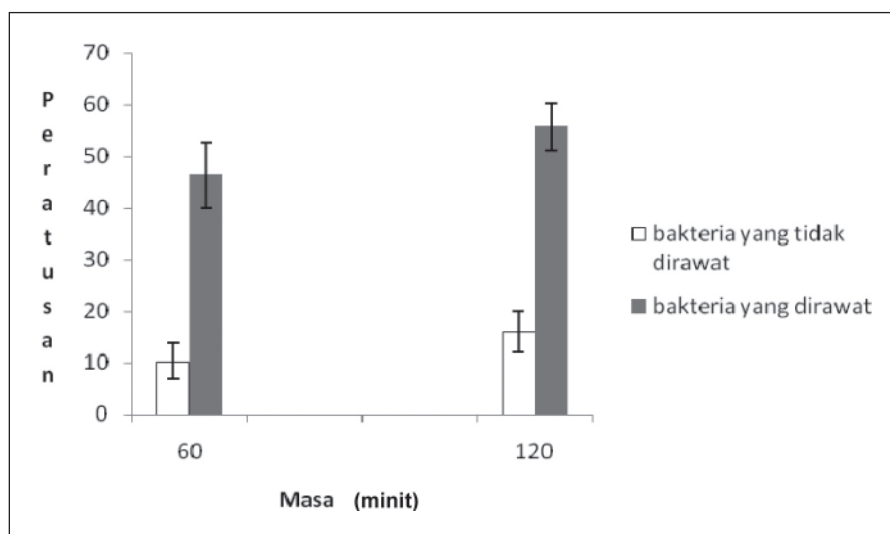
Mikroskopi elektron transmisi membolehkan kesan ekstrak terhadap bakteria dilihat dengan lebih terperinci terutama pada dinding sel dan sitoplasma bakteria yang telah dirawat (Rajah 2). Sel bakteria yang tidak dirawat didapati berbentuk kokus, mempunyai dinding sel yang utuh, membran sel, ruang periplasmik, kandungan sitoplasma dan kepadatan elektron yang tinggi (Rajah 2a). Tindakan dengan ekstrak batang senduduk pada kepekatan 20 mg/mL didapati mampu mencurahkan dinding sel *S. mutans* (Rajah 2b). Sel yang dirawat telah kehilangan bentuk kokus, namun masih mempunyai kandungan sitoplasma dan kepadatan elektron yang tinggi. Bakteria yang dirawat pada kepekatan 25 mg/mL menunjukkan sel tersebut kehilangan membran sel dan dinding sel, ruang periplasmik dan pengurangan kandungan sitoplasma (Rajah 2c). Manakala sel yang dirawat dengan 30 mg/mL ekstrak telah menunjukkan pengurangan kepadatan elektron, kehilangan bentuk kokus, membran sel dan dinding sel serta kehilangan kandungan sitoplasma yang banyak (Rajah 2d). Sel yang dirawat dengan Penisilin telah menunjukkan ia kehilangan keutuhan membran sel dan dinding sel (Rajah 2e). Kebanyakan agen anti-bakteria masuk melalui membran sel dan bertindak pada kawasan yang disasarkan. Hunt (1975) mencadangkan bahawa sebatian aktif yang

mempunyai rantai alkil akan merangsang ikatan hidrofobik dengan lipid yang ada pada membran sel. Interaksi hidrofobik ini adalah parameter penting untuk melihat perubahan integriti membran sel. Ia secara tidak langsung akan menunjukkan terdapat gangguan pada struktur membran tersebut. Daripada kajian ini adalah dicadangkan bahawa terdapat interaksi hidrofobik di antara kumpulan organik pada ekstrak batang *M. malabathricum* dengan lipid pada membran sel *S. mutans* lalu menyebabkan perubahan morfologi pada bakteria yang dirawat. Kajian oleh Alwash *et al.* (2013) yang menggunakan ekstrak metanol serta fraksi daripada daun *M. malabathricum* menunjukkan bahawa terdapat ketidak normalan serta kerosakan fizikal pada membran sel bakteria *S. aureus*. Kehadiran bahan *kaempferol-3-O-(2'',6''-di-O-p-trans-coumaroyl)- β -glucopyranoside* dicadangkan dalam kajian tersebut sebagai bahan aktif yang memberi kesan kepada perubahan morfologi bakteria yang dirawat. Bahan aktif yang terlibat dalam kajian ini walau bagaimanapun perlu dikenal pasti.

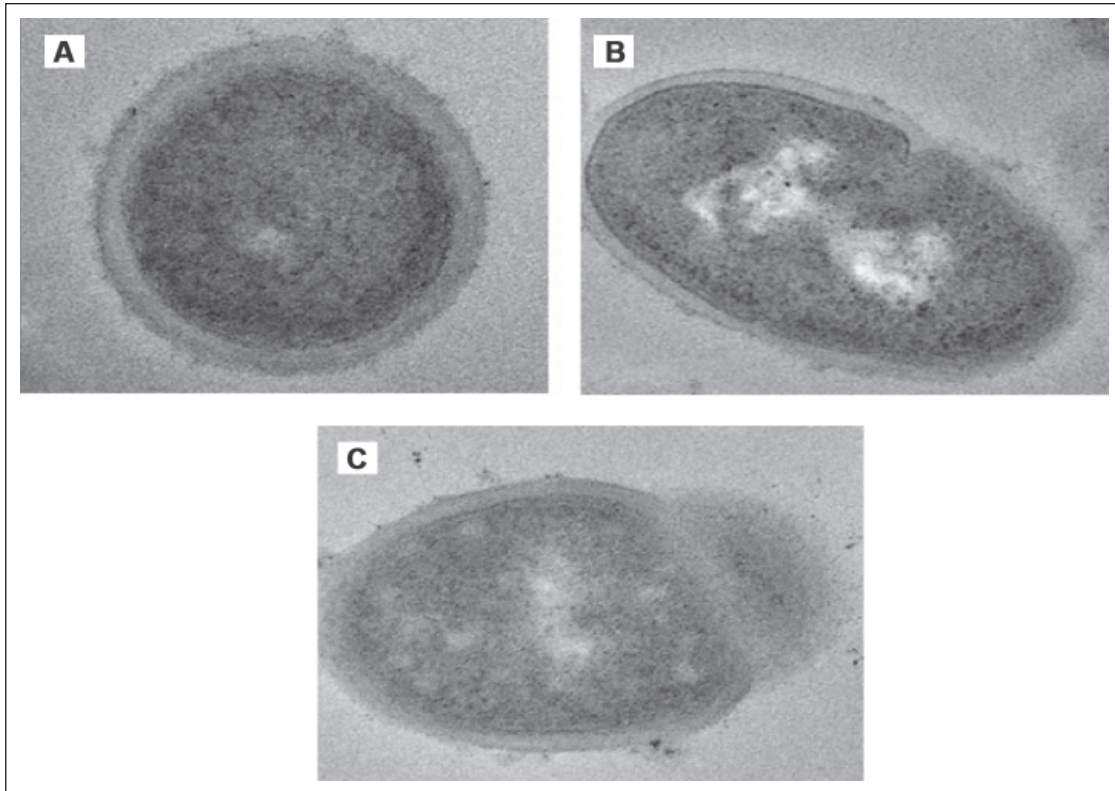
Kajian telah diteruskan lagi dengan mengkaji kesan ekstrak batang *M. malabathricum* terhadap integriti membran sel yang dirawat dengan asai PI. PI merupakan pewarna asid nukleik pendarfluor yang akan mengikat pada bakteria yang telah mati kerana kekurangan aktiviti kebolehtelapan (osmosis). Bakteria yang terawat didapati telah meningkatkan pengambilan PI berbanding dengan bakteria yang tidak di rawat selepas 60 minit dan 120 minit (Rajah 3). Peningkatan ini boleh berlaku disebabkan oleh perubahan struktur membran sel. Berdasarkan kajian ini, dicadangkan ekstrak batang senduduk didapati mengubah struktur membran sel dan seterusnya menyebabkan gangguan aktiviti kebolehtelapan pada bakteria tersebut. Perubahan struktur membran sel ini telah disahkan dalam pemerhatian pada mikroskop elektron transmisi (Rajah 4). Hasil daripada teknik tersebut menunjukkan membran sel yang telah dirawat dengan ekstrak pada minit ke 60 (Rajah 4B) telah mula menunjukkan perubahan daripada bulat kepada lonjong. Pada minit ke 120 pula, membran



Rajah 2. Bakteria yang dicerap dengan menggunakan TEM pada pembesaran 170000x, A: Sel bakteria yang tidak dirawat, B: Sel bakteria yang dirawat dengan 20 mg/mL ekstrak, C: Sel bakteria yang dirawat dengan 25 mg/mL ekstrak, D: Sel bakteria yang dirawat dengan 30 mg/mL ekstrak, dan E: Sel bakteria yang dirawat dengan Penisilin (1 mg/mL).



Rajah 3. Pengambilan propidium iodida ke dalam sel bakteria *S. mutans* yang dirawat dengan ekstrak batang *M. malabathricum* pada kepekatan 30 mg/mL meningkat berbanding bakteria yang tidak dirawat.



Rajah 4. Mikrograf mikroskopi elektron transmisi menunjukkan perubahan membran sel pada bakteria yang dirawat pada minit 0 (A), 60 (B) dan 120 (C) dengan 30 mg/mL ekstrak batang *M. malabathricum*.

sel tersebut telah mula terurai sedikit (Rajah 4C). Terdapat kajian lain juga telah mencadangkan bahawa agen anti-bakteria yang mengganggu ketelapan membran sel akan meningkatkan pengambilan PI oleh bakteria yang diuji. Kajian daripada Raja *et al.* (2011) mendapati *S. aureus* ATCC 29213 yang dirawat dengan sebatian aktif yang dipencilkan daripada *Boswellia serrata* telah meningkatkan pengambilan PI berbanding dengan bakteria yang tidak dirawat.

Sebagai kesimpulan, cerapan mikroskopi menunjukkan bahawa ekstrak aseton batang *M. malabathricum* mempunyai aktiviti anti-bakteria terhadap *S. mutans* dengan tindakan pencuraian dinding sel seterusnya menyebabkan pengeluaran sitoplasma berlaku. Pengesahan tindakan terhadap dinding sel serta membran ini ditentukan melalui peningkatan pengambilan propidium iodida pada sel yang dirawat. Kajian seterusnya perlu dilakukan bagi memahami bagaimana berlakunya pemecahan dinding sel dan membran sel pada bakteria yang dirawat dengan ekstrak aseton *M. malabathricum*.

PENGHARGAAN

Kajian ini telah dibiayai melalui geran Universiti Kebangsaan Malaysia (BKBP-FST-K006401) dan Universiti Sains Islam Malaysia (PPP/FPg-1-14411).

RUJUKAN

- Alhede, M., Qvortrup, K., Liebrechts, R., Høiby, N., Givskov, M.C. & Bjarnsholt, T. 2012. Combination of microscopic techniques reveals a comprehensive visual impression of biofilm structure and composition. *Federation European Microbiology Society Immunology and Medical Microbiology*, **65**(2): 335-342.
- Alwash, M.S., Ibrahim, N. & Ahmad, W.A.Y. 2013. Identification and mode of action of antibacterial components from *Melastoma malabathricum* Linn leaves. *American Journal of Infectious Diseases*, **9**(2): 46-58.
- Bidault, P., Chandad, F. & Grenier, D. 2007. Risk of bacterial resistance associated with systemic antibiotic therapy in periodontology. *Journal of the Canadian Dental Association*, **73**(8): 721-725.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Markham, J.L., Gustafson, J.E., Warmington, J.R. & Wyllie, S.G. 2001. Determining the anti-microbial actions of tea tree oil. *Molecules*, **6**: 87-91.
- Hannan, A., Saleem, S., Chaudhary, S., Barkaat, M. & Arshad, M.U. 2008. Anti bacterial activity of *Nigella sativa* against clinical isolates of methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal Ayub Medical College Abbottabad*, **3**: 72-74.

- Hunt, W.A. 1975. The effects of aliphatic alcohols on the biophysical and biochemical correlates of membrane function. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **56**:195-210.
- Joffry, M.S., Yob, N.J., Rofiee, M.S., Meor Mohd Affendi, M.M.R., Suhaili, Z., Othman, F., Md Akim, A., Md Desa, M.M.N. & Zakaria, Z.A. 2012. *Melastoma malabathricum* (L) smith ethnomedicinal uses, chemical constituents, and pharmacological properties. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, **Article ID 258434**: 1-48.
- Marcello, H.N., Jose Francisco, H., Marlise, I.K., Regianne, U.K. & Reginaldo, B.G. 2005. Transmission, diversity and virulence factors of *Streptococcus mutans* genotypes. *Journal of Oral Science*, **47(2)**: 59-64.
- Martinez, L.R., Mihi, M.R., Tar, M., Cordero, R.J., Han, G., Friedman, A.J., Friedman, J.M. and Nosanchuk, J.D. 2010. Demonstration of antibiofilm and antifungal efficacy of chitosan against Candidal biofilms, using an *in vivo* central venous catheter model. *Journal Infection Disease*, **201**: 1436-1440.
- Palombo, E.A. 2011. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: Potential application in the prevention and treatment of oral disease. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, **Article ID 680354**: 1-15.
- Raja, A.F., Ali, F., Khan, I.A., Shawl, A.S., Arora, D.S., Shah, B.A. & Taneju, S.C. 2011. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto-b-boswellic acid from *Boswellia serrata*. *Biomedical Central Microbiology*, **11**: 54-63.
- Tomsone, L., Kruma, Z. & Galuburda, R. 2012. Comparison of differences solvents and extractions methods for isolation phenolic compounds from Horseradish roots. *World Academy of Science Engineering and Technology*, **64**: 903-908.

