

Efektivitas Pasta Gigi dengan Kandungan Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) dalam Memodulasi Adhesi *Streptococcus mutans* Terhadap Monosit

(Effectiveness of Toothpaste with Robusta Coffee Bean Extract (*Coffea canephora*) in Modulating *Streptococcus mutans* Adhesion to Monocytes)

Anindya Farida Ayu Afifah¹, Peni Pujiastuti², Depi Praharani²

¹Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember, Indonesia

²Bagian Periodonsia, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember, Indonesia

Abstrak

S. mutans dapat menginvasi pembuluh darah dan memicu respons monosit dengan cara adhesi. Pasta gigi dengan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) yang mengandung zat aktif yang diduga memiliki kemampuan untuk memodulasi adhesi. Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji kemampuan pasta gigi dengan ekstrak biji kopi robusta pada konsentrasi 0,78%; 1,56%; 3,12%; dan 6,25% pasta gigi dengan ekstrak biji kopi robusta dalam memodulasi adhesi *S. mutans* pada monosit. Jenis penelitian ini adalah percobaan laboratorium in vitro post-test only control group design. Sampel dibagi menjadi 2 kelompok: Kelompok kontrol (pasta plasebo) dan kelompok yang diberi perlakuan (pasta gigi yang mengandung 0,78%; 1,56%; 3,12%; dan 6,25% ekstrak biji kopi robusta). Pasta plasebo dan pasta gigi dengan ekstrak biji kopi robusta diencerkan menggunakan RPMI (1:10) sebelum dioleskan ke setiap sampel. Isolat monosit diinkubasi dengan pasta plasebo dan pasta gigi dengan ekstrak biji kopi robusta selama 2,5 jam, kemudian - terpapar *S. mutans* selama 4 jam. Indeks adhesi - ditentukan dengan menghitung jumlah rata-rata *S. mutans* yang melekat pada 100 monosit. Isolat monosit diinkubasi dengan pasta gigi dengan ekstrak biji kopi robusta selama 2,5 jam, kemudian dilanjutkan dengan paparan *S. mutans* selama 4 jam. Indeks adhesi dapat ditentukan dengan menghitung jumlah rata-rata *S. mutans* yang melekat pada 100 monosit Hasil $P < 0,05$ menunjukkan bahwa ada perbedaan yang signifikan antara kelompok perlakuan. Indeks adhesi tertinggi ditemukan pada konsentrasi 0,78% dengan 5,55% dan terendah pada konsentrasi 6,25% menunjukkan 1,37% Kesimpulan penelitian ini berdasarkan pasta gigi dengan konsentrasi ekstrak biji kopi robusta sebesar 0,78%; 1,56%; 3,12%; dan 6,25% mampu memodulasi dengan menghambat adhesi *S. mutans* terhadap monosit dengan konsentrasi paling efektif adalah 6,25%.

Kata kunci: Adhesi, Kopi Robusta, Monosit, *Streptococcus mutans*

Abstract

S. mutans can invade blood vessels which will trigger a monocyte response with adhesion. Excessive adhesion of *S. mutans* to monocytes can cause prolonged inflammation and tissue damage so adhesion must be modulated. - The purpose of this study was to examine the ability of toothpaste with robusta coffee bean extract concentrations of 0.78%; 1.56%; 3.12%; and 6.25% in modulating - the adhesion of *S. mutans* to monocytes. This - is an in vitro laboratory experiment using the post-test only control group design. The sample was divided into 2 groups: Control group (placebo paste) and the treated group (toothpaste containing 0.78%; 1.56%; 3.12%; and 6.25% of robusta coffee bean extract). Placebo paste and toothpaste with robusta coffee bean extract were diluted using RPMI (1:10) before being applied to each sample. Monocyte isolate was incubated with placebo paste and toothpaste with robusta coffee bean extract for 2.5 hours, then - exposed to *S. mutans* for 4 hours. The adhesion index - was determined by calculating the average number of *S. mutans* attached to 100 monocytes. The results $P < 0,05$ showed that there were significant differences between the treatment groups. The highest adhesion index was found at a concentration of 0.78% with 5,55% and the lowest at a concentration of 6.25% showed 1,37%. The conclusion of this study based on is that toothpaste with robusta coffee bean extract concentrations of 0.78%; 1.56%; 3.12%; and 6.25% were able to modulate by inhibiting the adhesion of *S. mutans* to monocytes with the most effective concentration is 6.25%.

Keywords: Adhesion, Monocyte, Robusta coffee, *Streptococcus mutans*

Korespondensi (Correspondence): Anindya Farida, Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Jember, Jl. Kalimantan No. 37, Sumber Sari, Jember, Indonesia. Email: anindyaafifah2002@gmail.com

Streptococcus mutans yang memiliki kemampuan untuk melekat di permukaan gigi, memproduksi asam dan glukosa, serta membentuk *biofilm* pada plak gigi.¹ Adanya karies mampu meningkatkan kemampuan retensi plak pada permukaan gigi yang dapat menyebabkan terjadinya inflamasi di jaringan pulpa.² Proses inflamasi menyebabkan terjadinya pelepasan mediator kimia seperti histamin, sitokin, prostaglandin, dan leukotrien yang berperan dalam rekrutmen sel imun untuk memerankan proses fagositosis.³ Monosit memiliki kapasitas dalam fagositosis sebanyak 5-10 bakteri sebelum lisis.⁴

Selama proses fagositosis, monosit dan makrofag akan memproduksi ROS dimana ketika ROS diproduksi dalam jumlah berlebih atau ROS *burst* dapat menyebabkan kematian monosit karena kerusakan DNA, penurunan kemampuan monosit untuk berdiferensiasi menjadi makrofag, dan kerusakan jaringan.^{5,6} Untuk menjaga

kemampuan monosit agar tetap dapat melakukan fungsinya secara optimal, maka perlu dilakukan adanya modulasi. Modulasi sendiri merupakan upaya untuk mengatur, merubah, dan memengaruhi suatu sistem untuk mengontrol dan menyesuaikan respons dalam suatu proses atau sistem secara lebih efektif.⁷

Beberapa bahan herbal memiliki kemampuan sebagai imunomodulator yang bertujuan untuk memodulasi sistem imun tubuh agar tetap dapat bekerja secara efektif salah satunya adalah kopi robusta. Kopi robusta dinilai lebih baik daripada kopi arabika karena mengandung asam klorogenat dan flavonoid lebih tinggi yang berperan sebagai antiinflamasi. Bagian dari kopi robusta yang banyak dimanfaatkan adalah bagian biji dan daunnya namun, terdapat perbedaan komposisi dimana biji kopi robusta mengandung flavonoid dan asam klorogenat yang lebih tinggi dibandingkan

daunnya.⁸⁻¹⁰ Flavonoid diduga mampu menghambat adhesi bakteri karena dapat menyebabkan perubahan struktur tersier protein pada permukaan bakteri sehingga mengakibatkan penurunan hidrofobisitas sel dan - mengganggu proses adhesi bakteri¹¹. Selain itu, asam klorogenat diduga mampu menghambat adhesi bakteri dengan cara dengan merusak struktur dinding dari bakteri sehingga tidak dapat beradhesi.^{13,14}

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pasta gigi dengan kandungan ekstrak biji kopi robusta mampu mengurangi inflamasi dan menghambat terbentuknya plak.¹⁵ Pada penelitian sebelumnya yang dengan menggunakan pasta gigi dengan ekstrak biji robusta konsentrasi 0,78%; 1,56%; 3,12%; dan 6,25% menunjukkan hasil yang tergolong tidak toksik karena memiliki rata-rata viabilitas sel >90%.¹⁶ Akan tetapi, belum ada penelitian mengenai potensi pasta gigi dengan kandungan ekstrak biji kopi robusta (*Coffea canephora*) pada konsentrasi 0,78%; 1,56%; 3,12%; dan 6,25% dalam menghambat adhesi *S. mutans* terhadap monosit.

METODE PENELITIAN

Penelitian ini berjenis laboratoris *in vitro* dengan rancangan penelitian *post test only group control* – dengan sel monosit- diambil dari subjek penelitian dengan kriteria berjenis kelamin laki-laki, tidak merokok, tidak memiliki riwayat penyakit sistemik dan darah, dan bersedia mengisi *informed consent* sebagai subjek penelitian.

Bahan utama yang diperlukan dalam penelitian ini, yaitu biji kopi robusta (*green beans*) didapat dari Pusat Penelitian Kopi dan Kakao (PUSLITKAKAO) Jember. Tahap pembuatan diawali dengan menghaluskan biji kopi robusta hingga halus, kemudian di ayak, dan di timbang sebanyak 400 gram. Setelah itu, dilakukan maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:2 selama 72 jam dengan menggunakan *water shaker bath incubator*. Setelah itu, dilakukan penguapan menggunakan *rotary evaporator* untuk emndapatkan ekstrak murni dengan konsentrasi 100%. Untuk pembuatan pasta, ekstrak murni tersebut dicampur dengan pasta plasebo. Pasta plasebo yang digunakan mengandung bahan magnesium karbonat, kalsium karbonat, gliserin, propilen glikol, trietanolamin (TEA), akuades steril, dan *oleum methae piperithae*. Proporsi perbandingan antara ekstrak murni dan pasta plasebo. kemudian dicampur hingga mendapatkan pasta gigi dengan ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 0,78%; 1,56%; 3,12; dan 6,25%.

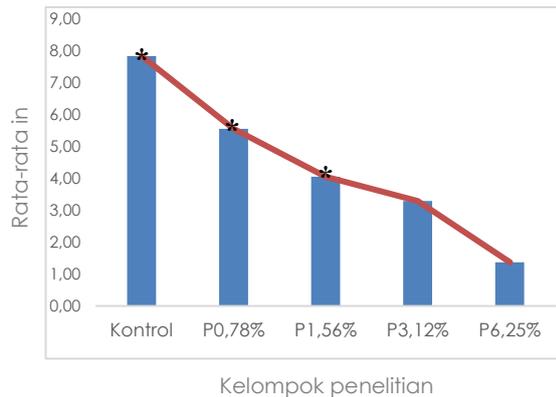
Pembuatan suspensi *S. mutans* dilakukan dengan cara menambahkan 10 cc aquades pada BHI-B di tabung erlemeyer kemudian di

sterilkan dan di tambahkan Vitamin K1 Hemin dan Ekstrak yeast. Selanjut sterilisasi dengan inkubator pada suhu 37°C selama 24jam. Pembuatan suspensi dapat dilakukan dengan cara mencampurkan 2 ml media dengan 1 ose *S. mutans* hingga mencapai konsentrasi 0,5 Mc Farland.

Isolasi monosit dilakukan dengan pengambilan darah dari subjek penelitian sebanyak 6ml, diberi heparin sebagai anti koagulan, dan ditambahkan RPMI dengan perbandingan 1:1. Selanjutnya, sampel darah di masukkan ke tabung falcon dan ditambahkan *Lymphoprep*1077 dan di sentrifugasi. Setelah di sentrifugasi, maka akan didapatkan 4 lapisan yaitu, plasma darah, *mononuclear*, *Lymphoprep* 1077, dan *Polymorphonuclear* RBCs. Selanjutnya, silakukan pengambilan pada lapisan *mononuclear* dan di pindahkan ke tabung lain serta dilakukan penambahan HBSS dengan perbandingan 1:10 dan ditambahkan *pen-strep* dan *Fungizone* untuk mencegah kontaminasi.

Tahap uji adhesi dilakukan dengan mengambil 100 µl suspensi monosit dan diletakkan pada *coverslip* dan diinkubasi selama 20 menit pada suhu 37°C menggunakan *shaker incubator*. Selanjutnya, dilakukan resuspensi monosit menggunakan 1000 µl RPMI dan diinkubasi kembali pada suhu 37°C selama 30 menit. Setelah dipastikan tidak ada kontaminasi, pada kelompok kontrol dapat ditambahkan pasta plasebo, sedangkan pada kelompok perlakuan ditambahkan pasta gigi ekstrak biji kopi robusta konsentrasi 0,78%; 1,56%; 3,12; dan 6,25% sebanyak 100 µl dan diinkubasi selama 2,5 jam untuk melihat penyerapan ekstrak pada monosit. Tahap selanjutnya, media inkubasi dibuang dan diganti dengan RPMI sebanyak 1000 µl. Berikutnya, pada tiap well ditambahkan suspensi *S. mutans* sebanyak 0,5 McF, dan diinkubasi selama 4 jam, pada suhu 37°C, dan 5% CO₂. Selanjutnya dapat dilakukan pencucian menggunakan HBSS dan dilakukan fiksasi dengan methanol absolut selama 3 menit. Setelah itu, dapat dilakukan pengecatan giemsa pada masing-masing sampel selama 5-7 menit, kemudian bilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Perhitungan indeks adhesi dilakukan dengan cara melihat berapa banyak *S. mutans* yang melekat pada tiap 100 monosit dibagi dengan jumlah monosit yang diamati, yaitu 100 monosit dan dikalikan 100%. Perhitungan indeks adhesi dilakukan pada tiap kelompok penelitian dan kemudian dihitung rata-ratanya.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan menunjukkan bahwa indeks adhesi rata-rata dari *S. mutans* terhadap- monosit paling rendah yang berarti kemampuan dalam memodulasi adhesi *S. mutans* pada moosit paling besar terdapat pada kelompok ekstrak konsentrasi 6,25% dibandingkan dengan kelompok lain dan kontrol yang dapat dilihat. pada Gambar 1.



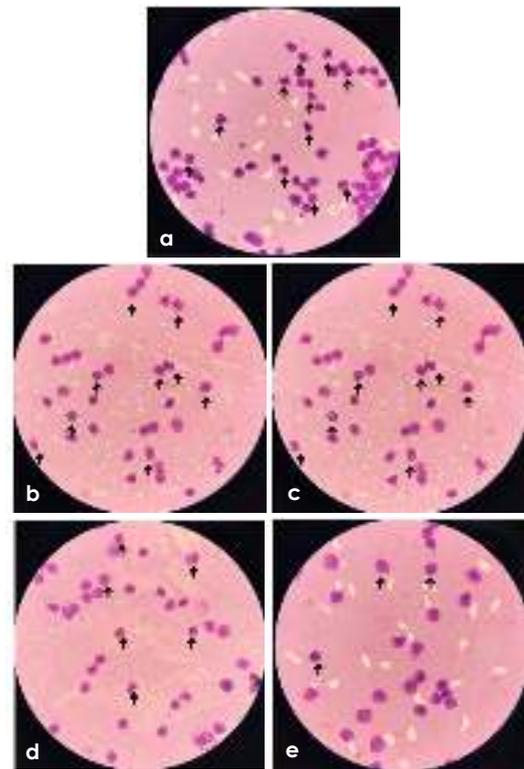
Gambar 1. Diagram rata-rata indeks adhesi *S. mutans* pada monosit

Berdasarkan hasil analisis yang dilakukan dari hasil penelitian, pada tahap uji normalitas dengan uji *Shapiro-wilk* didapatkan nilai signifikansi $p > 0,05$ yang menunjukkan bahwa data berdistribusi secara normal, dilakukan *levene test* untuk mengetahui homogenitas yang menunjukkan nilai 0,47 atau $p > 0,05$ yang berarti signifikan atau data bersifat homogen. Berdasarkan analisis data yang telah dilakukan, didapatkan hasil bahwa data tersebut berdistribusi secara normal dan homogen, sehingga dapat dilakukan uji parametrik *one-way anova* didapatkan nilai 0,00 atau $p < 0,05$ yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan dari seluruh Kelompok percobaan penelitian untuk mengetahui kemampuan memodulasi adhesi *S. mutans* terhadap monosit. Tahap selanjutnya, dilakukan uji *post hoc* LSD yang bertujuan untuk mengetahui kelompok sampel yang menunjukkan perbedaan. Uji *post hoc* LSD menunjukkan nilai $p < 0,05$ yang berarti seluruh kelompok penelitian menunjukkan terdapat perbedaan yang signifikan dapat dilihat pada Tabel 1. Gambaran mikroskopis adhesi *S. mutans* pada monosit dapat dilihat pada Gambar 3.

Tabel 1. Hasil uji *post hoc* LSD

Kelompok K	P1	P2	P3	P4
K	-	0,000*	0,000*	0,000*
P1	-	0,000*	0,000*	0,000*
P2		-	0,000*	0,000*
P3			-	0,000*
P4				-

Keterangan:
(*) = Signifikan



Gambar 3. Gambaran mikroskopis adhesi *S. mutans* pada monosit yang ditunjukkan dengan tanda panah ditandai dengan gambaran *S. mutans* yang melekat terlihat seperti titik-bintik kecil (perbesaran 1000x, pewarnaan giemsa)

PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil penelitian dan uji statistik *Post-hoc* LSD yang telah dilakukan menunjukkan bahwa pasta gigi dengan kandungan ekstrak biji kopi robusta pada konsentrasi 6,25%; 3,12%; 1,56%; dan 0,78% memiliki kemampuan untuk memodulasi adhesi *S. mutans* terhadap monosit yang dibuktikan dengan adanya penurunan perlekatan dari *S. mutans* pada monosit pada konsentrasi 6,25% menunjukkan indeks adhesi sebanyak 1,37%, konsentrasi 3,12% menunjukkan indeks adhesi 3,29%, konsentrasi 1,56% menunjukkan indeks adhesi 4,05%, dan konsentrasi 0,78% menunjukkan indeks adhesi sebesar 5,55%. Sedangkan, pada kelompok kontrol yang berupa pasta plasebo tidak menunjukkan adanya kemampuan memodulasi dengan cara menghambat adhesi antara *S. mutans* terhadap monosit.

Pasta gigi dengan ekstrak biji kopi robusta pada konsentrasi 6,25% memiliki indeks adhesi *S.mutans* paling kecil yaitu berada pada angka 1,37% yang dapat disebabkan karena kematian *S.mutans* oleh karena daya antibakteri yang dimiliki oleh kopi robusta sehingga menyebabkan semakin sedikit jumlah bakteri yang dapat beradhesi dengan monosit.

Kopi robusta mengandung berbagai senyawa aktif seperti asam klorogenat, flavonoid, dan tanin yang diduga mampu memodulasi dengan cara menghambat adhesi *S. mutans*.¹² Asam klorogenat diduga memiliki kemampuan untuk merusak struktur dari membran sel bakteri yang dapat menyebabkan kebocoran metabolit intraseluler dan memicu inaktivasi sel. Kebocoran metabolit intraseluler ini dapat menurunkan fungsi adhesin yang dimiliki oleh bakteri sehingga dapat menurunkan fungsi adhesi bakteri pada monosit.¹⁷

Senyawa aktif lain yang terkandung pada ekstrak biji kopi robusta adalah Flavonoid yang merupakan senyawa fenol dengan kemampuan untuk merubah struktur protein bakteri yang akan menyebabkan perubahan tingkat hidrofobik dengan cara menyisip pada sisi hidrofobik dari protein, sehingga menurunkan hidrofobisitas menurun dan akan menyebabkan penggumpalan protein yang terletak pada permukaan bakteri. Penggumpalan protein tersebut juga dapat menimbulkan adanya gangguan fungsi pada adhesin bakteri yang dapat mengalami denaturasi sehingga tidak dapat berikatan dengan reseptor yang dimiliki oleh monosit.^{12,18}

Senyawa fenol lain seperti tanin juga terkandung di dalam biji kopi robusta, dimana tanin memiliki potensi untuk menghambat adhesi bakteri dengan cara berinteraksi dengan membran bakteri.¹⁹ Tanin berinteraksi dengan membran bakteri *S. mutans* dengan cara merubah tingkat fluiditas sel *host* ini dapat berdampak pada kemampuan adhesi bakteri. Semakin tinggi tingkat fluiditas dari membran plasma akan menghambat adhesi bakteri.²⁰

Senyawa aktif lainnya pada biji kopi robusta adalah trigonelin. Trigonelin sendiri diduga memiliki kemampuan untuk menghambat adsorpsi *S.mutans* pada saliva yang berdampak pada penurunan adhesi *S.mutans* pada permukaan gigi dan pembentukan biofilm dan menghambat sintesis enzim dan protein dari bakteri yang dapat menyebabkan terhambatnya pertumbuhan dan perlekatan bakteri ke permukaan sel *host*.²¹

Kafein merupakan senyawa fenolik yang terkandung dalam biji kopi robusta. Kafein diduga mampu menghambat adhesi atau perlekatan dari *S.mutans* pada permukaan gigi dan menghambat pembentukan biofilm dengan cara mengambat kinerja dari enzim *glucosyltransferases* (GTFs) dalam mengkatalis sukrosa dan membentuk glukosa yang berperan pada perlekatan *S.mutans* ke permukaan enamel. Selain itu, GTF juga membentuk *Extracellular Polysaccharide* (EPs) yang berperan dalam stabilitas bakteri pada pembentukan biofilm.^{22,23} Ketika ekspresi dari enzim GTFs dihambat, maka akan berdampak pada pembentukan biofilm oleh

S.mutans dimana tujuan utama dari pembentukan biofilm adalah untuk mempermudah interaksi antara *S.mutans* dengan sel imun.²⁴ Ketika ekspresi dari GTFs dihambat, maka akan menyebabkan terjadinya penurunan adhesi antara *S.mutans* pada monosit.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, Pada variabel kontrol, menunjukkan hasil bahwa plasebo tidak mampu memodulasi adhesi *S.mutans* terhadap monosit. Hal tersebut terjadi karena plasebo merupakan pasta tanpa kandungan senyawa aktif.²⁵ Sedangkan, pada kelompok perlakuan yang diberi pasta gigi ekstrak biji kopi robusta yang memiliki kemampuan dalam memodulasi adhesi bakteri paling besar terdapat pada konsentrasi 0,78% menunjukkan dengan indeks adhesi 5,55% dan paling kecil pada konsentrasi 6,25% dengan indeks adhesi 1,37%. Hal tersebut, didukung oleh hasil penelitian yang menyatakan bahwa semakin tinggi tingkat konsentrasi ekstrak, semakin tinggi pula senyawa aktif yang terkandung di dalamnya.²⁶

DAFTAR PUSTAKA

1. Nomura Y, Fujita Y, Ishihara Y, Kakuta E, Okada A, Maki K, et al. Effects of Cariogenic Bacteria and Sealant Evaluated by International Caries Detection Assessment System. *Open Dent J.* 2020 Jan 15;13(1):512–9.
2. Shih YR V., Hwang Y, Phadke A, Kang H, Hwang NS, Caro EJ, et al. Calcium phosphate-bearing matrices induce osteogenic differentiation of stem cells through adenosine signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2014;111(3):990–5.
3. Zhdanova I V., Wurtman RJ. The pineal hormone (Melatonin). In: *Endocrinology: Basic and Clinical Principles: Second Edition.* 2005. p. 255–65.
4. Murphy K, Weaver casey. *Janeway's Immunobiology.* 9th ed. Zayetz E, editor. 2016.
5. Desforges JP, Sonne C, Dietz R, Levin M. Immunotoxic Effects of Environmental Pollutants in Marine Mammals. In: *Marine Mammal Ecotoxicology: Impacts of Multiple Stressors on Population Health.* Elsevier; 2021. p. 321–43.
6. Ponath V, Kaina B. Death of monocytes through oxidative burst of macrophages and neutrophils: Killing in trans. *PLoS One.* 2020 Jan 1;12(1).
7. Strzelec M, Detka J, Mieszczak P, Sobocińska MK, Majka M. Immunomodulation—a general review of the current state-of-the-art and new therapeutic strategies for targeting the immune system. Vol. 14, *Frontiers in Immunology.* Frontiers Media S.A.; 2023.
8. Anjani G, Widyastuti N, Masrurroh Z, Ayu R, Yuliana D, Almira VG, et al. Bioactive

- components and antibacterial activity in Robusta coffee leaves (*coffea canephora*). Vol. 12, 1374 | International Journal of Pharmaceutical Research. 2020.
9. Diana S, Amalia N, Kania Tri Putri D. Effect Of Robusta Coffee Beans And Arabica Extract Gel As Inflammation Pulp Material. DENTINO JURNAL KEDOKTERAN GIGI. 2023 Sep;8(2):187–92.
 10. Valenzuela L, Serna-Jiménez JA, Martínez K. Coffee By-Products: Nowadays and Perspectives [Internet]. 2020. Available from: www.cafedecolombia.com
 11. Schnarr L, Olsson O, Kümmerer K. Biodegradation of flavonoids – Influences of structural features. Chemosphere. 2024 Jul 1;359:142234.
 12. Kurniawati A, Sulistyani, Rahmah A. Peran Ekstrak Daun Wungu (*Graptophyllum Pictum* L. Griff) Terhadap Adhesi *Streptococcus Mutans* Pada Neutrofil. Cakradonya Dental Journal [Internet]. 2019 [cited 2024 Feb 25];11. Available from: https://repository.unej.ac.id/bitstream/handle/123456789/101535/F.%20KG_Jurnal_Atik%20Kurniawati_PERAN%20EKSTRAK%20DAUN%20WUNGU.pdf?sequence=1&isAllowed=y
 13. Setiawan B. Pengaruh Preventif Ekstrak Green Coffee(*Coffea canephora*) Terhadap Ekspresi Transforming Growth Factor Beta (TGF-β) Dan Histopatologi Jejunum Tikus Putih Model Gastroentitis Infeksi *Escherichia coli* [Internet]. 2018 [cited 2024 May 18]. Available from: <http://repository.ub.ac.id/id/eprint/161465/1/Beny%20Setiawan.pdf>
 14. Farahdila NA, Pujiastuti P, Sari DS. Daya Hambat Pasta Gigi yang Mengandung Ekstrak Biji Kopi Robusta (*Coffea canephora*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Secara In Vitro (Inhibitory Power of Robusta Coffee Bean Extract (*Coffea canephora*) Toothpaste Against the Growth of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* In Vitro). 2024.
 15. Pujiastuti P, Sakinah NN, Da'at Arina YM, Wahyukundari MA, Praharani D, Sari DS. The potential of toothpaste containing Robusta coffee bean extract in reducing gingival inflammation and dental plaque formation. Dent J. 2023;56(2):109–14.
 16. Wahyukundari M. Analisis Aktivitas Sitotoksik dan Antioksidan Pasta Gigi Berbasis Ekstrak Biji Kopi Robusta Secara In-vitro. Jember; 2023.
 17. Wang L, Pan X, Jiang L, Chu Y, Gao S, Jiang X, et al. The Biological Activity Mechanism of Chlorogenic Acid and Its Applications in Food Industry: A Review. Vol. 9, *Frontiers in Nutrition*. Frontiers Media S.A.; 2022.
 18. Faleye OS, Lee JH, Lee J. Selected flavonoids exhibit antibiofilm and antibacterial effects against *Vibrio* by disrupting membrane integrity, virulence and metabolic activities. *Biofilm*. 2023 Dec 15;6.
 19. Schestakow A, Hannig M. Effects of experimental agents containing Tannic acid or Chitosan on the bacterial biofilm formation in situ. *Biomolecules*. 2020 Sep 1;10(9):1–17.
 20. Ong LL, Lin CH. Adhesion, infection, and therapeutic treatment of *Helicobacter pylori*: a review on current aspects and future promise. Vol. 6, *Discover Applied Sciences*. Springer Nature; 2024.
 21. Robertson K. Microbiology and Mechanisms of Oral Malodour. Kingston University London; 2020.
 22. Zhang Q, Ma Q, Wang Y, Wu H, Zou J. Molecular mechanisms of inhibiting glucosyltransferases for biofilm formation in *Streptococcus mutans*. Vol. 13, *International Journal of Oral Science*. Springer Nature; 2021.
 23. Akhlaghi N, Sadeghi M, Fazeli F, Akhlaghi S, Menhati M, Sadeghi M. The antibacterial effects of coffee extract, chlorhexidine, and fluoride against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus plantarum*: An in vitro study. 2019 Oct;16(5):346–53.
 24. Utamaningtyas A, Pramesti H, Balafif F. The *Streptococcus mutans* ability to survive in biofilms and during dental caries formation: scoping review. 2020 Oct 10;7(2):150–8.
 25. Jorret PL, Hernandez L, García FG, Molero FG, López EPF, Tvarijonaviciute A. A clinical study on the efficacy and tolerability of a new topical gel and toothpaste in patients with xerostomia: A randomized controlled trial. *J Clin Med*. 2021 Dec 1;10(23).
 26. Tinasy N. Indonesian Journal of Chemical Science Effects of Extraction Methods on Total Phenolic Content, Total Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of Extract Mango Leaves (*Mangifera indica* L.) [Internet]. Vol. 13, *J. Chem. Sci*. 2024. Available from: <http://journal.unnes.ac.id/sju/index.php/ijcs>