

**EFEK EKSTRAK ETANOL DAUN KEMANGI (*Ocimum sanctum*)
SEBAGAI PENGHAMBAT PEMBENTUKAN BIOFILM
Candida albicans SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh:

**Alexander Fernando
NIM. 165070107111002**

**PROGRAM STUDI KEDOKTERAN
FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2019

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai
Penghambat Pembentukan Biofilm *Candida albicans* secara *In Vitro*

Oleh :

Alexander Fernando
NIM. 165070107111002

Telah diuji pada

Hari : Selasa

Tanggal : 26 November 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

dr. Yoga Waranugraha, Sp. JP
NIP.19870122201903005

Pembimbing I/Penguji II,

Pembimbing II/Penguji III,

Prof.Dr.dr. Noorhamdani AS,DMM,Sp. MK(K)
NIP. 195011101980021001

dr. Cholid Tri Tjahjono, M.Kes, Sp. JP (K)
NIP. 196207241989031002

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter

dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan dibawah ini :

Nama : Alexander Fernando

NIM : 165070107111002

Program Studi : Program Studi Kedokteran, Fakultas Kedokteran,
Universitas Brawijaya

menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benarbenar hasil karya saya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya. Apabila di kemudian hari dapat dibuktikan bahwa Tugas Akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 17 November 2019

Yang membuat pernyataan,

Alexander Fernando

NIM: 165070107111002

KATA PENGANTAR

Puja dan puji syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa karena berkat limpahan kasih dan karunia-Nya Tugas Akhir yang berjudul “Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Candida albicans* Secara *In Vitro*” dapat terselesaikan.

Penulis sangat tertarik untuk mengangkat topik ini sebagai topik Tugas Akhir sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar sarjana, dikarenakan biofilm merupakan salah satu mekanisme bertahan *Candida albicans* terhadap antimikroba yang menjadi salah satu faktor penyebab resistensi. Sehingga, besar harapan penulis, apabila pembentukan biofilm dapat dihambat, maka risiko terjadinya resistensi pun dapat dikurangi.

Penulis menyadari bahwa terselesaikannya Tugas Akhir ini tidak akan terwujud tanpa dukungan, masukan, bantuan, dan keterlibatan berbagai pihak. Oleh karena itu, penulis mengucapkan banyak terima kasih dan penghargaan kepada:

1. Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp. MK (K), sebagai pembimbing pertama yang telah bersedia dengan segenap kesabarannya memberikan arahan, masukan, solusi dan berbagi ilmu kepada penulis dalam melakukan penelitian dan penyusunan Tugas Akhir ini.
2. dr. Cholid Tri Tjahjono, M.Kes, Sp. JP (K), sebagai pembimbing kedua yang telah memberikan waktunya untuk berdiskusi dengan penulis, serta berbagai masukan, kritik, dan saran yang sangat membangun dan membantu dalam proses penyusunan Tugas Akhir ini.
3. dr. Yoga Waranugraha, Sp. JP, selaku dosen penguji, yang telah bersedia meluangkan waktunya untuk memberikan masukan, arahan dan kritik yang membangun terhadap hasil akhir dari Tugas Akhir ini.
4. Dr. dr. Wisnu Barlianto, Msi.Med, Sp. A(K), dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan berbagai fasilitas bagi penulis untuk mengembangkan diri.
5. dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp.P(K), sebagai Ketua Program Studi Kedokteran yang telah memberikan kesempatan, bantuan dan dukungan dalam berbagai bentuk selama penulis menuntut ilmu di Program Studi Kedokteran di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

6. Segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB, yang telah membantu dalam proses administrasi, sehingga penyusunan Tugas Akhir ini dapat berjalan dengan lancar.
7. Analisis di laboratorium mikrobiologi FKUB, Pak Selamat, yang telah memberikan dedikasi, ilmu, dan waktunya untuk membantu penulis dalam menyelesaikan penelitian ini.
8. Kedua orang tua penulis Kheng Seng dan Lu Mi, saudara penulis, Viro, Willy, dan Gita atas segala dukungan, motivasi, semangat, doa dan kasih sayang yang diberikan, yang tentunya mendukung terselesaikannya Tugas Akhir ini.
9. Putu Ayu Tania Krisna Putri dan Putu Sri Maharani Utami sebagai teman seperjuangan dalam melakukan penelitian ini, atas semangat, bantuan, loyalitas dan kegigihan yang ditunjukkan dalam proses penelitian.
10. Made Kurnia, selaku kakak tingkat penulis yang telah bersedia memberikan arahan, masukan dan bantuan dalam penyusunan Tugas Akhir ini.
11. Desak Gede Yuliana, Rininta Arifianingsih, Fadhila Iswi Deandra, Reselina Utami, dan Livia Lailita S yang selalu mendukung dalam suka maupun duka.
12. Jones, Alvin, Feronia, Laksamana, dan Jose atas bantuannya untuk beradaptasi di tanah rantau.
13. Ihza, Hartya, Kevin, Novel, Putri, dan Donni Santoso yang selalu memberikan semangat dan mengingatkan satu sama lain selama masa studi ini.
14. Berbagai pihak yang telah berpartisipasi membantu dalam menyelesaikan Tugas Akhir ini yang tentunya tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Oleh karena itu, kritik dan saran sangat penulis harapkan untuk kemajuan penulis dan ilmu pengetahuan di masa yang akan datang. Akhir kata, semoga Tugas Akhir ini dapat memberikan banyak manfaat.

Malang, 17 November 2019

Penulis

ABSTRAK

Fernando, Alexander. 2019. **Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Candida albicans* Secara *In Vitro***. Tugas Akhir. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K), (2) dr. Cholid Tri Tjahjono, M.Kes, Sp. JP (K)

Latar Belakang: Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki efek anti jamur terhadap *Candida albicans* melalui penghambatan filamentasi sel ragi.

Tujuan: Untuk membuktikan efek ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap pembentukan biofilm *Candida albicans* secara *in vitro* dan mengetahui konsentrasi hambat biofilm minimal yang diperlukan.

Metode: Desain penelitian menggunakan *true experimental-post test only group* dengan metode tabung. 7 Konsentrasi berbeda dari ekstrak (0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, and 35%) digunakan dalam penelitian ini. Hasil bentukan cincin biofilm yang didapat, diukur secara kuantitatif menggunakan *Mean Gray Value* pada Adobe Photoshop CS6.

Hasil: Kenaikan konsentrasi ekstrak berbanding lurus dengan penipisan cincin biofilm pada tabung. Nilai Konsentrasi Hambat Minimal Biofilm (KHBM) ekstrak etanol daun kemangi adalah konsentrasi 20%. Uji korelasi *Pearson* menunjukkan korelasi sangat kuat dan signifikan ($r = 0,900$, $p=0,000$), dan uji komparasi *Oneway ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan nilai yang signifikan antara rerata tiap kelompok ($p=0,000$).

Kesimpulan: ekstrak etanol *Ocimum sanctum* dapat menghambat pembentukan biofilm *Candida albicans* secara *in vitro*.

Kata kunci: Biofilm, *Candida albicans*, ekstrak etanol *Ocimum sanctum*

ABSTRACT

Fernando, Alexander. 2019. **Effects of Basil Leaves Ethanol Extract (*Ocimum sanctum*) as Inhibitors for In Vitro *Candida albicans* Biofilm Formation.** Final Assignment. Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K), (2) dr. Cholid Tri Tjahjono, M.Kes, Sp. JP (K).

Background: Ethanol extract of basil leaves (*Ocimum sanctum*) has an antifungal effect on *Candida albicans* by inhibiting the filamentation of yeast cell.

Objectives: To prove the effect of ethanol extract of basil leaves (*Ocimum sanctum*) on the formation of *Candida albicans* biofilms in vitro and determine the minimum inhibitory concentration of biofilms needed.

Methods: The Design of this study is a true experimental post-test only group using tube method. 7 different extract concentrations (0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, and 35%) was used in this study. The results of biofilm ring formation obtained and measured quantitatively using Mean Gray Value in Adobe Photoshop CS6.

Results: Increase in extract concentration is directly proportional to the thinning of the biofilm ring on the tube. The value of Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) is reached at 20% extract concentration. Pearson correlation test showed a very strong and significant correlation ($r = 0.900$, $p = 0,000$), and the Oneway ANOVA comparison test showed a significant difference between the mean of each group ($p = 0,000$).

Conclusion: Ethanol extract *Ocimum sanctum* can inhibit the formation of *Candida albicans* biofilms in vitro.

Keywords: Biofilm, *Candida albicans*, ethanol extract *Ocimum sanctum*

DAFTAR ISI

	Halaman
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Pernyataan Keaslian Tulisan	iii
Kata Pengantar	iv
Abstrak	vi
Abstract	vii
Daftar Isi	viii
Daftar Tabel	xi
Daftar Gambar	xii
Daftar Lampiran	xiii
Daftar Singkatan	xiv
BAB I PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang Masalah	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.3.1 Tujuan Umum	4
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Praktis	5
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 <i>Candida albicans</i>	6
2.1.1 Taksonomi <i>Candida albicans</i>	8
2.1.2 Karakteristik Fungi	8
2.1.3 Identifikasi <i>Candida albicans</i>	9
2.1.3.1 Tes Germ Tube	10
2.1.3.2 Corn Meal <i>Candida</i> agar	10
2.1.3.3 Uji Biokimia	11
2.2 Biofilm	11
2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm	12
2.2.2 Pembentukan Biofilm pada <i>Candida albicans</i>	13
2.2.3 Quorum Sensing (QS) pada <i>Candida albicans</i>	14
2.2.4 Uji Pembentukan Biofilm	15
2.2.4.1 Metode Tabung	15
2.2.4.2 Metode Congo Red Agar	16
2.2.4.3 Metode Tissue Culture Plate	17



2.3 Kemangi (<i>Ocimum sanctum</i>)	17
2.3.1 Morfologi Kemangi	18
2.3.2 Taksonomi Kemangi	19
2.3.3 Daun Kemangi sebagai Antibiofilm.....	19
2.3.3.1 Linalool.....	19
2.3.3.2 Eugenol.....	20
BAB III KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	21
3.1 Kerangka Konsep	21
3.2 Hipotesis Penelitian	23
BAB IV METODE PENELITIAN	24
4.1 Rancangan Penelitian	24
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian.....	24
4.3 Sampel Penelitian	24
4.4 Pengulangan	25
4.5 Variabel Penelitian	25
4.5.1 Variabel Bebas.....	25
4.5.2 Variabel Tergantung	25
4.6 Definisi Operasional.....	26
4.7 Alat dan Bahan Penelitian	27
4.5.1 Alat dan bahan Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi.....	27
4.5.2 Alat dan Bahan Identifikasi Jamur	28
4.5.3 Alat dan bahan Identifikasi Biofilm.....	29
4.8 Prosedur Penelitian.....	37
4.8.1 Persiapan Ekstrak Daun Kemangi (<i>Ocimum sanctum</i>).....	29
4.8.2 Identifikasi Jamur	31
4.8.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm	32
4.8.3.1 Penelitian Pendahuluan.....	32
4.8.3.2 Penelitian Inti	34
4.8.4 Pengukuran <i>Mean Gray Value</i>	35
4.8.5 Analisis Data.....	35
4.9 Alur Kerja Penelitian.....	36
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	38
5.1 Hasil Penelitian	38
5.1.1 Hasil Ekstraksi Daun Kemangi (<i>Ocimum sanctum</i>)	38
5.1.2 Hasil Identifikasi Jamur	38
5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm.....	40
5.2 Analisis Data	43
5.2.1 Hasil Uji Normalitas dan Homogenitas Varian	43
5.2.2 Hasil Uji <i>Oneway ANOVA</i>	44
5.2.3 Hasil Uji <i>Post Hoc</i>	44



5.2.4 Hasil Uji Korelasi <i>Pearson</i>	46
5.2.5 Hasil Uji Regresi.....	47
BAB 6 PEMBAHASAN	49
BAB 7 PENUTUP	53
7.1 Kesimpulan.....	53
7.2 Saran.....	53
Daftar Pustaka.....	55
Lampiran.....	60



DAFTAR TABEL

Halaman

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran <i>Mean Gray Value</i> dengan Aplikasi <i>Adobe Photoshop CS6</i>	42
Tabel 5.2 Nilai Signifikan Kelompok terhadap Kelompok Lainnya pada Uji <i>Post Hoc</i>	44
Tabel 5.3 Rangkuman Hasil Uji <i>Post Hoc</i>	44



DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar 2.1 *Candida albicans* pada Pengecatan KOH..... 7

Gambar 2.2 Pembentukan Biofilm..... 13

Gambar 2.4 Kemangi..... 18

Gambar 3.1 Kerangka Konsep 21

Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian 37

Gambar 5.1 Hasil Akhir Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) pada botol..... 38

Gambar 5.2 Morfologi Koloni dan Sel *Candida albicans* 39

Gambar 5.3 Gambaran Mikroskopis Pseudohifa *Candida albicans* 40

Gambar 5.4 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pengulangan 4 Kali. 41

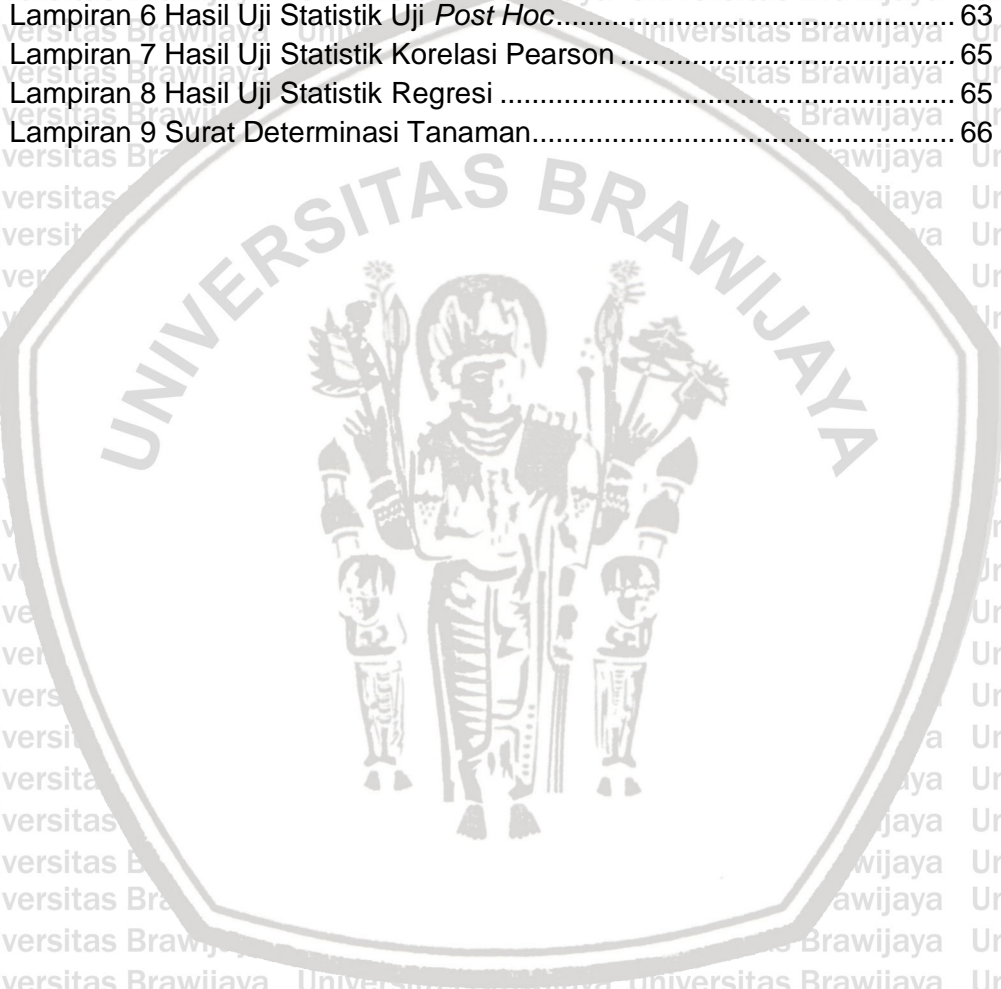
Gambar 5.5 Grafik pengukuran *Mean Gray Value*..... 42

Gambar 5.6 Grafik Uji Regresi..... 48



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran 1 Proses Ekstraksi	60
Lampiran 2 Hasil Penelitian Pendahuluan	60
Lampiran 3 Hasil Penelitian Inti	61
Lampiran 4 Hasil Uji Statistik Normalitas dan Homogenitas	62
Lampiran 5 Hasil Uji Statistik <i>Oneway Anova</i>	62
Lampiran 6 Hasil Uji Statistik Uji <i>Post Hoc</i>	63
Lampiran 7 Hasil Uji Statistik Korelasi Pearson	65
Lampiran 8 Hasil Uji Statistik Regresi	65
Lampiran 9 Surat Determinasi Tanaman	66



DAFTAR SINGKATAN

- BHI** : *Brain Heart Infusion*
- CFU** : *Colony Forming Unit*
- CMA** : *Corn Meal Agar*
- CRA** : *Congo Red Agar*
- CYR1** : *Cyclic AMP Requirement (Adenylate Cyclase)*
- DMSO** : *Dimethyl Sulfoxide*
- DNA** : *Deoxyribonucleic Acid*
- EPS** : *Eksopolisakarida*
- IUPAC** : *International Union of Pure and Applied Chemistry*
- KBM** : *Kadar Bunuh Minimum*
- KHBM** : *Kadar Hambat Biofilm Minimum*
- KHM** : *Kadar Hambat Minimum*
- KOH** : *Kalium Hydroxide*
- LPCB** : *Lactophenol Cotton Blue*
- MBIC** : *Minimum Biofilm Inhibitory Concentration*
- MgSO4** : *Magnesium Sulfate*
- OD** : *Optical Density*
- PBS** : *Phosphate Buffer Saline*
- QS** : *Quorum Sensing*
- SDA** : *Sabouraud Dextrose Agar*
- SDB** : *Sabouraud Dextrose Broth*



HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Candida albicans* secara *In Vitro*

Oleh :
Alexander Fernando
NIM. 165070107111002

Telah diuji pada
Hari : Selasa
Tanggal : 26 November 2019
Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I


dr. Yoga Waranugraha, Sp. JP
NIP.198701222019031005

Pembimbing I/Penguji II,

Pembimbing II/Penguji III,



Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS DMM, Sp. MK(K)
NIP. 195011101980021001



dr. Cholid Tri Tjahjono, M. Kes. Sp. JP (K)
NIP. 196207241989031002

Mengetahui,
Ketua Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Tri Wahyu Astuti, M. Kes., Sp.P(K)
NIP. 196310221996012001

ABSTRAK

Fernando, Alexander. 2019. **Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm *Candida albicans* Secara *In Vitro***. Tugas Akhir. Program Studi Pendidikan Dokter, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K), (2) dr. Cholid Tri Tjahjono, M.Kes, Sp. JP (K)

Latar Belakang: Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki efek anti jamur terhadap *Candida albicans* melalui penghambatan filamentasi sel ragi.

Tujuan: Untuk membuktikan efek ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap pembentukan biofilm *Candida albicans* secara *in vitro* dan mengetahui konsentrasi hambat biofilm minimal yang diperlukan.

Metode: Desain penelitian menggunakan *true experimental-post test only group* dengan metode tabung. 7 Konsentrasi berbeda dari ekstrak (0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, and 35%) digunakan dalam penelitian ini. Hasil bentukan cincin biofilm yang didapat, diukur secara kuantitatif menggunakan *Mean Gray Value* pada Adobe Photoshop CS6.

Hasil: Kenaikan konsentrasi ekstrak berbanding lurus dengan penipisan cincin biofilm pada tabung. Nilai Konsentrasi Hambat Minimal Biofilm (KHBM) ekstrak etanol daun kemangi adalah konsentrasi 20%. Uji korelasi *Pearson* menunjukkan korelasi sangat kuat dan signifikan ($r = 0,900$, $p=0,000$), dan uji komparasi *Oneway ANOVA* menunjukkan adanya perbedaan nilai yang signifikan antara rerata tiap kelompok ($p=0,000$).

Kesimpulan: ekstrak etanol *Ocimum sanctum* dapat menghambat pembentukan biofilm *Candida albicans* secara *in vitro*.

Kata kunci: Biofilm, *Candida albicans*, ekstrak etanol *Ocimum sanctum*

ABSTRACT

Fernando, Alexander. 2019. **Effects of Basil Leaves Ethanol Extract (*Ocimum sanctum*) as Inhibitors for In Vitro *Candida albicans* Biofilm Formation.** Final Assignment. Medical Program, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Prof. Dr. dr. Noorhamdani AS, DMM, Sp.MK(K), (2) dr. Cholid Tri Tjahjono, M.Kes, Sp. JP (K).

Background: Ethanol extract of basil leaves (*Ocimum sanctum*) has an antifungal effect on *Candida albicans* by inhibiting the filamentation of yeast cell.

Objectives: To prove the effect of ethanol extract of basil leaves (*Ocimum sanctum*) on the formation of *Candida albicans* biofilms in vitro and determine the minimum inhibitory concentration of biofilms needed.

Methods: The Design of this study is a true experimental post-test only group using tube method. 7 different extract concentrations (0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, and 35%) was used in this study. The results of biofilm ring formation obtained and measured quantitatively using Mean Gray Value in Adobe Photoshop CS6.

Results: Increase in extract concentration is directly proportional to the thinning of the biofilm ring on the tube. The value of Minimum Biofilm Inhibitory Concentration (MBIC) is reached at 20% extract concentration. Pearson correlation test showed a very strong and significant correlation ($r = 0.900$, $p = 0,000$), and the Oneway ANOVA comparison test showed a significant difference between the mean of each group ($p = 0,000$).

Conclusion: Ethanol extract *Ocimum sanctum* can inhibit the formation of *Candida albicans* biofilms in vitro.

Keywords: Biofilm, *Candida albicans*, ethanol extract *Ocimum sanctum*

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Candida albicans merupakan suatu flora normal pada tubuh manusia. Jamur ini akan tumbuh berkoloni secara asimtomatik terutama di mukosa superficial seperti di dalam rongga mulut, saluran pencernaan, dan vagina (Ganguly dan Mitchel, 2011). Namun, jamur ini termasuk dalam patogen oportunistik dimana dapat berubah menjadi mikoba patogen penyebab infeksi (Mathe dan Van Jick, 2013). Faktor-faktor yang berperan dalam transisi *C. albicans* menjadi mikroba patogen antara lain: (1) Perubahan dalam mikrobiota inang (misalnya, karena antibiotik), (2) perubahan dalam respon imun pejamu (misalnya, selama stres, infeksi oleh mikroba lain, atau terapi immunosupresan), atau (3) variasi dalam lingkungan lokal (misalnya, perubahan pH atau kandungan nutrisi). *C. albicans* yang patogen kemudian akan menyebabkan berbagai infeksi mulai dari infeksi pada mukosa superficial hingga infeksi sistemik yang mengancam jiwa. Bahkan, *C. albicans* sendiri adalah salah satu agen yang paling sering diidentifikasi pada infeksi nosokomial.

Sebagai jamur dimorfik, kemampuan *C. albicans* untuk bertransisi dari organisme komensal menjadi patogen diakibatkan dari kemampuannya untuk berubah dari bentuk ragi menjadi bentuk hifa. Bentuk hifa ini kemudian bertanggung jawab terhadap patogenesis dari *C. albicans* (Chauvel *et al.*, 2012).

Selain itu, bentuk ini juga memiliki karakteristik unik untuk menghasilkan biofilm.

Bahkan, sebagian besar penyakit yang disebabkan oleh *C. albicans* terkait dengan

pembentukan biofilm pada permukaan inang maupun pada lingkungan abiotik (Mathe dan Van Dijck 2013).

Biofilm adalah kumpulan sel mikroorganisme yang melekat di suatu permukaan dan diselubungi oleh matriks polisakarida ekstraseluler (mengandung polisakarida, protein, dan DNA) yang dikeluarkan oleh organisme itu sendiri (Bjarnsholt *et al.*, 2013). Biofilm terbentuk karena mikroorganisme cenderung menciptakan lingkungan mikro dan relung (*niche*) mereka sendiri. Oleh karena itu, dalam biofilm, mikroba diberikan lingkungan yang stabil dan dapat mentoleransi konsentrasi antimikroba yang sangat tinggi (Van Acker *et al.*, 2014). Dampak dari biofilm ini pada kesehatan masyarakat sangat signifikan karena sel-sel yang dilepaskan dari biofilm dapat bermigrasi ke dalam aliran darah dan menyebabkan infeksi sistemik dengan kematian tinggi (Finkel dan Mitchell 2011).

Biofilm *C. albicans* memiliki kemampuan untuk melekat pada implan ataupun perangkat medis yang di pasang pada pasien. Hampir semua alat atau implan seperti: kateter vena urin dan sentral, alat pacu jantung, katup jantung mekanis, protesa sendi, lensa kontak, dan gigi palsu rentan terhadap biofilms dari *C. albicans* (Nobile dan Johnson, 2015). Setelah terbentuk pada implan di dalam tubuh, biofilm jamur memiliki potensi untuk menjadi infeksi pada aliran darah dan menyebabkan infeksi sistemik yang invasif terhadap jaringan dan organ (Tornu dan Van Djick, 2011).

Karena biofilm jamur sangat resisten terhadap obat antijamur, pengobatan yang dapat dilakukan pada infeksi hanya terbatas pada penggunaan dosis antijamur yang tinggi bersama dengan pelepasan implan atau perangkat medis.

Namun, perlu diketahui bahwa pelepasan beberapa implan seperti katup jantung dan sendi prostetik sangat mahal dan berbahaya bagi pasien. Selain itu,

pemberian agen antijamur dengan dosis tinggi (diberikan intravena) juga dapat menyebabkan komplikasi, termasuk kerusakan ginjal dan hati. Seringkali, perawatan ini tidak mungkin, karena banyak pasien tidak dapat mentoleransi efek samping tersebut (Andes et al., 2012). Oleh karena itu, diperlukan suatu alternatif lain untuk mengatasi permasalahan tersebut.

Permasalahan yang harus diatasi saat ini adalah upaya mencegah terbentuknya lapisan biofilm akibat infeksi patogen *Candida albicans*. Salah satunya adalah dengan pemanfaatan tanaman yang potensial untuk mencegah terbentuknya biofilm dari patogen oportunistik ini. Kandungan yang terkandung dalam tanaman yang dapat digunakan antara lain daun kemangi (*Ocimum sanctum*). Daun kemangi memiliki kandungan eugenol dan linalool. Pada penelitian yang dilakukan oleh Khan et al (2010), minyak atsiri daun kemangi dapat menghambat pertumbuhan dari *C. albicans*. Mekanisme kerja dari eugenol dan linalool sendiri menargetkan integritas struktural dan fungsional dari membran sitoplasma *Candida albicans*. Selain itu, *Ocimum sanctum* juga dapat menghambat transisi morfologi *C. albicans* dari bentuk ragi (*yeast*) menjadi bentuk *filamentous*, yang menjadi dasar patogenesis dari pembentukan biofilm oleh *Candida albicans* (Khan et al., 2014).

Berdasarkan pemaparan di atas dan memperhatikan sukarnya terapi akibat biofilm yang terbentuk dari infeksi jamur *Candida albicans*, maka perlu dilakukan penelitian terkait efektifitas ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) yang dalam menghambat pembentukan biofilm akibat *Candida albicans*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian di atas, maka penelitian ini ditujukan untuk menjawab rumusan masalah sebagai berikut :

Apakah ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki efek sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Candida albicans* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Membuktikan bahwa ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki efek antijamur sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Candida albicans* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

1. Mengetahui perbedaan hasil dari pemberian masing-masing konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Candida albicans* secara *in vitro*.
2. Mengetahui Kadar Hambat Minimal (KHM) dari ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) yang dapat menghambat pembentukan biofilm (MBIC = *Minimal Biofilm Inhibitory Concentration*) *Candida albicans* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademis

1. Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk menambah ilmu pengetahuan dalam bidang kesehatan mengenai manfaat ekstrak

etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Candida albicans*.

2. Dapat menambah ilmu yang dapat dikembangkan dalam melakukan terapi terhadap biofilm yang dibentuk *Candida albicans*.

1.4.2 Manfaat Praktis

Dapat digunakan sebagai dasar teori untuk mengembangkan penelitian dari ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*).



BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Candida albicans*

Candida albicans merupakan suatu flora normal pada tubuh manusia.

Jamur ini akan tumbuh berkoloni secara asimtomatik terutama di mukosa superficial seperti di dalam rongga mulut, saluran pencernaan, dan vagina (Ganguly dan Mitchel, 2011). Berbeda dengan spesies *Candida* lainnya, *Candida albicans* berifat dimorfik. *Candida albicans* dapat berbentuk sel ragi (*yeast cell*) dengan karakteristik gram positif, tidak memiliki kapsul, berbentuk oval hingga bulat dengan ukuran 3–6 μm . *Candida albicans* dalam bentuk ragi memperbanyak diri dengan membentuk blastospora, yaitu spora yang dibentuk dengan pembentukan tunas (*budding cell*) (Brooks *et al.*, 2013). Pada kondisi tertentu, *Candida albicans* dapat bertransisi menjadi bentuk yang invasif, yaitu bentuk kapang atau filamen (*filamentous*). Transisi morfologi ini diperantarai oleh beberapa faktor diantaranya serum, pH, dan nutrisi (Mayer *et al.*, 2013). Bentuk filamen ini dapat berupa pseudohifa ataupun hifa sejati (*True hyphae*). Transisi morfologi ini diperkirakan sebagai bentuk adaptasi *Candida albicans* terhadap respon pertahanan tubuh manusia (Tsui *et al.*, 2016). Pseudohifa terbentuk akibat ketidakmampuan tunas (*budding cell*) dari *blastospora* untuk melepaskan diri, sehingga sel tunas akan tumbuh memanjang seperti hifa. Berbeda dengan spesies *Candida* pada umumnya, *Candida albicans* juga dapat membentuk hifa sejati (*True hyphae*). Selain itu, *Candida albicans* juga membentuk klamidospora yang belum diketahui fungsinya. Tes morfologi sederhana dapat dilakukan untuk membedakan *Candida*

albicans dengan spesies *Candida*. Inkubasi *Candida albicans* pada serum selama 1-2 jam pada suhu 37°C akan membentuk hifa sejati atau tabung-tabung germinal (*germ tube*), dan pada media yang kurang bernutrisi (*corn meal agar*), *Candida albicans* akan membentuk klamidiospora (Mutiawati, 2016).

Bentuk kapang atau filamen (*filamentous*) bertanggung jawab terhadap patogenesis dari *C. albicans* (Chauvel et al, 2012). Selain itu, bentuk ini juga memiliki karakteristik unik untuk menghasilkan biofilm. *Candida albicans* membentuk biofilm untuk membantu kelangsungan hidupnya, terutama saat membentuk koloni pada inang. Bahkan, sebagian besar penyakit yang disebabkan oleh *C. albicans* berhubungan dengan pembentukan biofilm pada permukaan inang maupun pada lingkungan abiotik seperti kateter dan implan medis (Mathe dan Van Dijck 2013).



Gambar 2.1 *Candida albicans* pada Pengecatan KOH (Mutiawati et al., 2016)

2.1.1 Taksonomi *Candida albicans*

Candida albicans merupakan jamur yang termasuk dalam genus *Candida*.

Candida albicans pertama kali dideskripsikan oleh Langebeck pada tahun 1839.

Berikut adalah taksonomi dari jamur *Candida albicans* (Tortora *et al.*, 2010):

Kingdom	: Fungi
Phylum	: Ascomycota
Class	: Saccharomycotina
Order	: Saccharomycetales
Family	: Saccharomycetaceae
Genus	: <i>Candida</i>
Spesies	: <i>Candida albicans</i>

2.1.2 Karakteristik Fungi

Meskipun sering disebut sebagai jamur dimorfik, *C. albicans* sebenarnya lebih tepat disebut sebagai organisme pleomorfik/*polyphenic* (sering juga disebut

sebagai pleomorphic) (Staniszewska *et al.*, 2012). *Candida albicans* secara umum mempunyai empat bentuk morfologi utama yaitu (Noble *et al.*, 2017):

1. Sel ragi, Di dalam biakan atau jaringan *Candida albicans* tumbuh sebagai sel ragi berbentuk oval dan bertunas (3-6 μm).
2. Pseudohifa, *Candida* juga membentuk pseudohifa saat tunas-tunasnya terus tumbuh tetapi gagal melepaskan diri sehingga menghasilkan rantai-rantai sel panjang yang menyempit atau mengecil di bagian sekat antar

3. Hifa sejati, Transisi morfologi bentuk sel ragi menjadi hifa sejati terjadi melalui pembentukan *germ tube* pada suhu 37°C yang ditingkatkan dengan pH yang mendekati netral. Diketahui, bentukan hifa sejatilah yang bertanggung jawab atas produksi biofilm oleh *Candida albicans*

4. *Chlamydospora*, dinding sel bulat dengan diameter 8-12 µm. *Chlamydospora* terbentuk jika *Candida albicans* di kultur pada medium kurang nutrisi seperti *Corn meal agar*.

Struktur sel *Candida albicans* terdiri atas dinding sel, membrane plasma, sitoplasma dan nukleus. Bagian pertama dari *C. albicans* yang berinteraksi dengan sel inang adalah dinding sel. Dinding sel *C. albicans* terdiri dari 2 lapisan utama yaitu *outer cell wall* yang tersusun atas mannoprotein dan *inner cell wall* yang tersusun atas β-1,6-glucan, β-1,3-glucan, dan chitin. Komponen β-glucan sendiri menyusun 50-60% komponen dinding sel. Membran sel *Candida albicans* terdiri dari fosfolipid ganda dimana lapisan terluar mengandung banyak komponen penyusun membran plasma seperti *phosphatidyl*, *choline*, *ergosterol* dan *sphingolipids* (Kapteyn *et al.*, 2000).

C. albicans melakukan asimilasi karbohidrat untuk mendapatkan sumber karbon dan energi untuk melakukan pertumbuhan sel. *Candida albicans* menggunakan glukosa, maltosa, dan sukrosa melalui proses asimilasi ini. Selain proses asimilasi, *C. albicans* juga melakukan proses fermentasi pada glukosa, maltosa dan sukrosa (Tjampakasari, 2006).

2.1.3 Identifikasi Karakteristik *Candida albicans*

Identifikasi jamur *Candida albicans* dapat dilakukan dengan pemeriksaan langsung menggunakan pemeriksaan gram, KOH, ataupun *lactophenol cotton blue* (LPCB). Keuntungan pemeriksaan ini dapat dilakukan dengan cara

sederhana, dan terlihat hubungan antara jumlah dan bentuk jamur dengan reaksi jaringan. Pemeriksaan langsung harus segera dilakukan setelah bahan klinis diperoleh sebab *Candida albicans* berkembang cepat dalam suhu kamar sehingga dapat memberikan gambaran yang tidak sesuai dengan keadaan klinis. Media agar berupa *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dapat digunakan untuk menumbuhkan *Candida albicans* (Brooks et al., 2013). Inkubasi dalam waktu 24 jam pada suhu 37°C pada media *Sabouraud* akan menghasilkan gambaran khas yaitu: koloni menonjol dari permukaan medium, permukaan pada koloni halus, licin, berwarna putih kekuning-kuningan, dan memiliki bau ragi (Siregar, 2005).

2.1.3.1 Tes *Germ Tube*

Untuk mengkonfirmasi jamur *Candida albicans*, dapat dilakukan tes *germ tube* dengan menggunakan serum dan diinkubasi selama 90 menit pada suhu 37°C. Kemudian diamati secara mikroskopis dimana *Candida albicans* pada kondisi tersebut akan membentuk hifa sejati atau tabung-tabung germinal (*germ tube*). *Germ tube* terlihat berbentuk bulat lonjong seperti tabung yang memanjang dari tunasnya (*yeast-cell*). Fenomena ini disebut juga sebagai fenomena Reynolds-Braude (Mutiawati, 2016).

2.1.3.2 *Corn Meal Candida Agar*

Corn meal Candida/CMA agar berguna untuk membedakan spesies *C. albicans* dengan spesies *Candida* yang lain. Media ini bertujuan untuk melihat bentuk *chlamydospores*. Bercak koloni yang diduga sebagai *C. albicans* ditanam pada CMA (pH 7) kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 48-72 jam. Pemeriksaan mikroskopis menunjukkan pertumbuhan *Candida* pada CMA akan memperlihatkan bentuk *chlamydospore* yang berukuran besar, sangat refraktif, dan berdingding tebal (Mutiawati, 2016).

2.1.3.3 Uji Biokimia

Reaksi biokimia dipakai untuk melihat perbedaan metabolisme jamur. Uji biokimiawi dilakukan dengan pemeriksaan asimilasi karbohidrat untuk konfirmasi spesies *Candida*. *Carbohydrate assimilation test* mengukur kekuatan sel ragi (yeast) dalam memaksimalkan karbohidrat tertentu sebagai bahan dasar karbon dalam metabolisme. Hasil reaksi positif mengindikasikan adanya pertumbuhan/perubahan pH yang terjadi pada media yang diuji dengan memanfaatkan gula sebagai bahan dasar. Pemeriksaan ini membutuhkan waktu inkubasi selama 10 hari pada suhu 37°C. Hasil produksi berupa gas dibandingkan pH standar merupakan indikasi adanya proses fermentasi. Uji ini dapat digunakan untuk mengidentifikasi jenis spesies isolat *Candida* yang lebih umum, seperti *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, dan *Candida lusitanae* (Brooks *et al.*, 2013).

2.2 Biofilm

Biofilm merupakan suatu agregat dari interaksi mikroorganisme yang menempel pada suatu permukaan dan berada pada suatu matriks eksopolisakarida (Madigan *et al.*, 2006). Pembentukan biofilm menjadi strategi mikroorganisme untuk bertahan hidup pada kondisi yang kurang baik. Satu spesies mikroorganisme atau lebih dari satu spesies dapat membentuk suatu biofilm. Setelah biofilm terbentuk, molekul *quorum sensing* yang dihasilkan oleh mikroorganisme akan terakumulasi dan mampu mengubah aktivitas metabolik pada mikroorganisme tersebut (Brooks *et al.*, 2013).

Biofilm secara umum tersusun atas koloni sel dan eksopolisakarida (EPS). EPS merupakan komponen penyusun 50% hingga 90% pada karbon organik

biofilm sehingga menjadikannya sebagai komponen utama pada biofilm. Fungsi dari EPS ini adalah sebagai penyusun struktural (*structural scaffold*) dari mikroorganisme dan juga berperan sebagai sistem proteksi dari sel yang berada di dalam biofilm. Sel mikroorganisme yang berada pada maktriks eksopolisakarida (EPS) dapat terlindungi dari sistem imun host. Matriks ini juga berperan sebagai sawar difusi terhadap obat antimikroba. Beberapa mikroorganisme termasuk *Candida albicans* yang menghasilkan biofilm menunjukkan adanya resistensi terhadap antifungal dibandingkan jamur yang tumbuh bebas tanpa adanya biofilm. Dampak pembentukan biofilm ini sangat besar untuk kesehatan karena sel mikroba yang berada pada biofilm ini dapat bermigrasi secara sistemik dan menyebabkan infeksi yang fatal (Finkel dan Mitchel 2011).

2.2.1 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Pembentukan biofilm mengikuti langkah-langkah penting (a) keterikatan pada permukaan (b) pembentukan koloni mikro (c) pembentukan struktur tiga dimensi (d) pembentukan biofilm, pematangan dan pelepasan (Costerton, 1999). Tahap pertama diawali ketika sel-sel mikroba berkumpul dan menempel pada suatu permukaan benda mati atau jaringan host. Mikroba akan menghasilkan lebih banyak faktor adhesif terutama untuk menempel pada host.. Proses penempelan terpengaruh oleh gaya *van der Waals*. Mikroba yang hidup bebas (sel planktonik) akan memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (*monolayer*) biofilm. Pada tahap ini sel planktonik banyak berubah menjadi sel biofilm yang perlekatannya masih bersifat reversibel (Donlan, 2002).

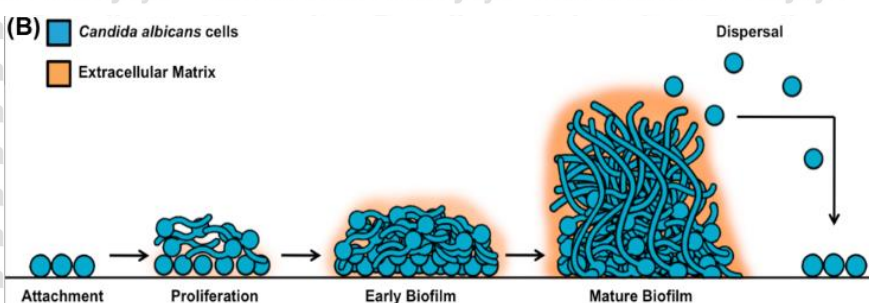
Pembentukan koloni mikro terjadi setelah mikroba menempel pada permukaan fisik / jaringan biologis dan pengikatan ini kemudian menjadi stabil yang berakibat pada pembentukan mikro-koloni. sel-sel mikroba tersebut

menempel secara permanen akibat terbentuknya matriks EPS. Matriks ini akan merekatkan jamur pada permukaan dan membentuk suatu *linking film*. Pada tahap mikrokoloni, sel-sel pada biofilm akan melanjutkan pertumbuhannya dan membentuk lapisan yang makin menebal. Namun, akibatnya mikroba yang melekat pada lapisan terdalam permukaan akan kekurangan zat-zat nutrisi dan terjadi akumulasi produk buangan yang bersifat toksik. Untuk mengatasi masalah ini, mikrokoloni akan berkembang menjadi struktur tiga dimensi yang mempunyai saluran atau pori-pori yang dapat dilewati oleh nutrisi dan produk metabolit dari semua sel (Gunardi, 2014).

Pada akhirnya, terjadi dispersi sel biofilm sehingga sel-sel tersebut akan berpindah dan membentuk biofilm baru. Pada biofilm baru ini, proses pembelahan sel jarang terjadi. Selanjutnya, sel akan membentuk eksopolisakarida dengan menggunakan sebagian besar energi guna memberikan nutrisi bagi mikroba selama berada dalam lapisan biofilm tersebut (Kumar *et al.*, 2017).

2.2.2 Pembentukan Biofilm pada *Candida albicans*

Proses patogenesis penyakit akibat infeksi *Candida albicans* sering diasosiasikan dengan kemampuannya dalam pembentukan biofilm. Proses pembentukan biofilm pada *Candida albicans* sama dengan proses pembentukan biofilm pada umumnya. Penelitian secara *in-vitro* menunjukkan pembentukan biofilm dalam waktu 24-48 jam.



Gambar 2.2 Pembentukan Biofilm (Tsui *et al.*, 2016)

Pada Gambar 2.2, Sel-sel ragi (*yeast cell*) pada *Candida albicans* akan melekat pada substrat membentuk fondasi sebagai lapisan basal sel ragi. Kemudian, proses ini diikuti dengan fase proliferasi sel disepanjang permukaan. Selain itu, terjadi proses filamentasi dimana sel ragi membentuk bentukan hifa sejati. Produksi hifa ini merupakan tanda utama dari terbentuknya biofilm pada *Candida albicans*. Setelah itu, terjadi akumulasi matriks EPS seiring dengan maturasi biofilm (Tsui *et al.*, 2016).

Tahapan terakhir adalah terjadi dispersi sel *Candida albicans* dari lapisan biofilm. Unikny, sel yang terdispersi mayoritas adalah sel ragi, hal ini menunjukkan transisi sel ragi menjadi hifa sejati dapat di balik (*reversible*) saat fase dispersi. Terlebih, analisis lebih lanjut menunjukkan bahwa sel ragi yang terdispersi menunjukkan fenotipe yang berbeda dengan sel planktonik (Mayer *et al.*, 2013). Sel terdispersi menunjukkan kemampuan adhesi yang lebih tinggi, kemampuan transisi morfologi yang lebih baik, dan meningkatnya patogenisitas pada model hewan coba. Temuan ini menunjukkan sel yang terdispersi menjadi lebih virulen yang akan membantu pembentukan biofilm baru dengan mudah (Tournu dan Van Dijck, 2012).

2.2.3 Quorum Sensing (QS) pada *Candida albicans*

Pembentukan biofilm *Candida albicans* bergantung pada kemampuannya untuk bertransisi antar morfologi yang berbeda. Untuk mengatur transisi tersebut, *Candida albicans* saling berkomunikasi melalui mekanisme *quorum sensing*. *Quorum sensing* adalah mekanisme yang digunakan mikroba untuk dapat berkomunikasi satu sama lain. Proses komunikasi tersebut memungkinkan mikroba berbagi informasi tentang densitas sel dan menyesuaikan ekspresi gen sesuai dengan itu (Rutherford dan Bassler, 2012).

Fenomena *quorum sensing* pada *Candida albicans* ini terbukti oleh "efek inokulum," di mana pembentukan hifa ditekan pada sel dengan densitas yang tinggi, sementara kumpulan sel yang denistasnya rendah dapat mengalami germinasi menjadi bentuk *filamentous*. Mekanisme *quorum sensing* yang paling umum terjadi pada *Candida albicans* berhubungan dengan molekul farnesol dan tyrosol, yang disekresikan secara ekstraseluler oleh koloni pada biofilm. Farnesol menghambat transisi *Candida albicans* dengan menghambat adenilat siklase (Cyr1), bagian dari jalur pengaturan pusat yang berdampak pada pertumbuhan bentuk *filamentous*. Sebaliknya, tyrosol menstimulasi pembentukan *filamentous* melalui *germ tube*. Molekul lain yang berperan dalam *quorum sensing* *Candida albicans* termasuk diantaranya phenylethyl alcohol, tryptophol, dan MARS (zat autoregulatori morphogenic). Namun, mekanisme kerja molekul-molekul ini masih belum jelas (Mallick dan Bennet, 2013).

Quorum sensing mengatur pembentukan biofilm karena selain farnesol menghambat filamentasi, ia juga bertindak untuk menekan pembentukan biofilm secara keseluruhan. Namun, meskipun menghambat filamentasi, farnesol dan molekul *quorum sensing* lainnya juga dapat meningkatkan virulensi yang dimediasi oleh biofilm. Hal ini dilakukan, dengan promosi pembentukan sel ragi (*yeast cell*) yang lebih virulen pada fase dispersi (sehingga mengakibatkan penyebaran infeksi yang lebih mudah oleh *Candida albicans*) (Tsui *et al.*, 2016).

2.2.4 Uji Pembentukan Biofilm

2.2.4.1 Metode Tabung

Kultur jamur yang telah dibiarkan semalam diinokulasi pada tabung kaca borosilikat yang mengandung 10 mL campuran antara *Sabroud Dextrose Broth* dengan glukosa 10%. Tabung kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24

jam secara aerob. Selanjutnya, isi tabung dibuang dan dibersihkan dengan buffer saline fosfat pada pH 7,3 dan dikeringkan. Tabung kemudian diwarnai dengan 0,1% kristal violet selama 15 menit. Pewarnaan dibuang dan dibersihkan dengan air bersih dan dikeringkan pada posisi terbalik. Pembentukan biofilm positif jika tampak ada garis film yang melapisi bagian dinding dan dasar tabung. Jumlah biofilm dinilai sebagai 0 = tidak ada, 1 = lemah, 2 = sedang atau 3 = kuat. Metode ini mengukur MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) atau KHM (Konsentrasi Hambat Minimum) dan MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) atau KBM (Kadar Bunuh Minimum). Pada KHM, akan didapatkan larutan uji agen antimikroba pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa pertumbuhan mikroba. Larutan-larutan yang tergolong sebagai KHM akan dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba selama 24 jam. Pada KBM, media cair tetap terlihat jernih setelah diinkubasi (Ruchi *et al.*, 2015).

2.2.4.2 Metode Congo Red Agar

Metode *Congo Red Agar* (CRA) adalah metode yang sederhana dan dapat mendeteksi produksi biofilm secara kualitatif. Medium ini terdiri atas campuran *Brain Heart Infusion* (BHI) (37 g/L) yang dilengkapi dengan sukrosa (50 g/L), agar No 1 (10 g/L) dan *Congo Red* (0,8 g/L). Pewarnaan *Congo Red* disiapkan sebagai suatu larutan cair yang terkonsentrasi dan mengalami proses autoklaf (121°C selama 15 menit) agar dapat terpisah dengan medium konstituen lainnya. Selanjutnya, *Congo Red* akan ditambahkan pada agar BHI dan sukrosa pada suhu 55°C. *Congo Red Agar* akan diinokulasi pada organisme yang akan diuji dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam secara aerob. mikroba tergolong sebagai penghasil biofilm jika warna agar tampak hitam, kering, dan terdapat koloni kristalin (Ruchi *et al.*, 2015).

2.2.4.3 Metode *Tissue Culture Plate*

Candida albicans yang sudah teridentifikasi disimpan dalam media YNB + glukosa 100 mM selama satu malam. Mikroba kultur semalam selanjutnya dimasukkan ke tabung YNB (10 ml) dan diinkubasikan 37°C selama 24 jam. 200 µL suspensi jamur kemudian diisi pada *plate* dan diinokulasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian, isi dari *plate* dibuang lalu dibersihkan dengan 300 µL steril saline sebanyak 3 kali. Selanjutnya, diwarnai dengan menggunakan 150 µL kristal violet 2%, lalu dicuci melalui proses dekantasi. Kemudian, diberikan 150 µL 95% etanol dan dibiarkan selama 30 menit untuk melihat munculnya *optical densities* (OD) dari film jamur yang telah diwarnai. Jika OD dapat terlihat dengan menggunakan *microtiter plate reader* pada 600 nm, mikroba tersebut menghasilkan biofilm (Ruchi *et al.*, 2015).

2.3 Kemangi (*Ocimum sanctum*)

Kemangi (*Ocimum sanctum*) adalah sejenis tanaman hemafrodit yang tumbuh di daerah tropis yang banyak tumbuh di Indonesia. Tanaman kemangi tumbuh baik dari dataran rendah maupun di dataran tinggi. Kemampuan kemangi untuk beradaptasi di berbagai ketinggian menyebabkan tanaman ini mudah dibudidayakan berbagai topografi. Kemangi sudah lama dikenal dan dikonsumsi oleh masyarakat sebagai pelengkap masakan atau sebagai lalapan. Namun, kemangi dapat digunakan sebagai obat herbal. Penelitian fitokimia tanaman kemangi telah membuktikan adanya komponen flavonoid, glikosid, asam gallic, asam cafeic, dan minyak atsiri yang mengandung eugenol (70,5%) sebagai komponen utama (Hasan, 2016).

2.3.1 Morfologi Kemangi (*Ocimum sanctum*)

Tanaman kemangi (*Ocimum sanctum*) merupakan tanaman semak semusim dengan tinggi 30-150 cm, batangnya berkayu, segi empat, beralur, bercabang, dan memiliki bulu berwarna hijau. Daunnya tunggal berwarna hijau tersusun dari bawah keatas. Memiliki panjang tangkai daun 2,5-7,5 cm dan setiap helaian daun berbentuk elips hingga bulat telur, memanjang, ujung tumpul atau meruncing. Pangkal daun pasak hingga membulat, kedua permukaan berambut halus, bergelombang, tepi bergerigi lemah atau rata (Kusuma, 2010).

Bunga majemuk berbentuk tandan memiliki bulu tangkai pendek berwarna hijau, mahlota bunga berbentuk telur dengan warna keunguan. Jenis bunga hemafrodit, berwarna putih dan berbau wangi. Memiliki buah dengan bentuk kotak berwarna coklat tua, tegak, dan tertekan, ujung berbentuk kait melingkar. Panjang kelopak buah 6-9 mm. Biji berukuran kecil berwarna coklat tua, bertipe keras, dan waktu diambil segera membengkak, tiap buah terdiri dari empat biji. Akar tunggang dan berwarna putih (Depkes, 2001).



Gambar 2.4 Kemangi (Pattanayak et al., 2010)

2.3.2 Taksonomi kemangi (*Ocimum sanctum*)

Taksonomi kemangi (*Ocimum sanctum*) adalah sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae

Divisi : Spermatophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Lamiales

Famili : Lamiaceae

Genus : *Ocimum*

Spesies : *Ocimum sanctum* L.

(Pattanayak *et al.*, 2010)

2.3.3 Daun Kemangi sebagai Antibiofilm

Kandungan di dalam tanaman kemangi adalah saponin, flavonoid, tanin, dan minyak atsiri sebagai kandungan utama komponen daun kemangi. Daun kemangi dapat berperan sebagai antibiofilm karena mengandung beberapa komponen aktif antibiofilm seperti eugenol dan linalool (Manoharan *et al.*, 2017).

2.3.3.1 Linalool

Linalool (3,7-dimetil-1,6-oktadien-3-ol) adalah alkohol terpena yang umumnya ditemukan sebagai komponen volatil utama dari minyak esensial beberapa tanaman termasuk daun kemangi. Linalool merupakan komponen pewangi yang digunakan dalam produk pembersih. Baru-baru ini, linalool ditemukan mempunyai aktivitas antijamur dengan mengganggu integritas

membran *Candida albicans*. Selain itu, Linalool juga menghambat transisi morfologi *Candida albicans* melalui penghambatan pembentukan *germ tube*. Hal ini menjadi langkah utama dalam kemampuan inhibisi pembentukan biofilm *Candida albicans* oleh linalool (Manoharan *et al.*, 2017).

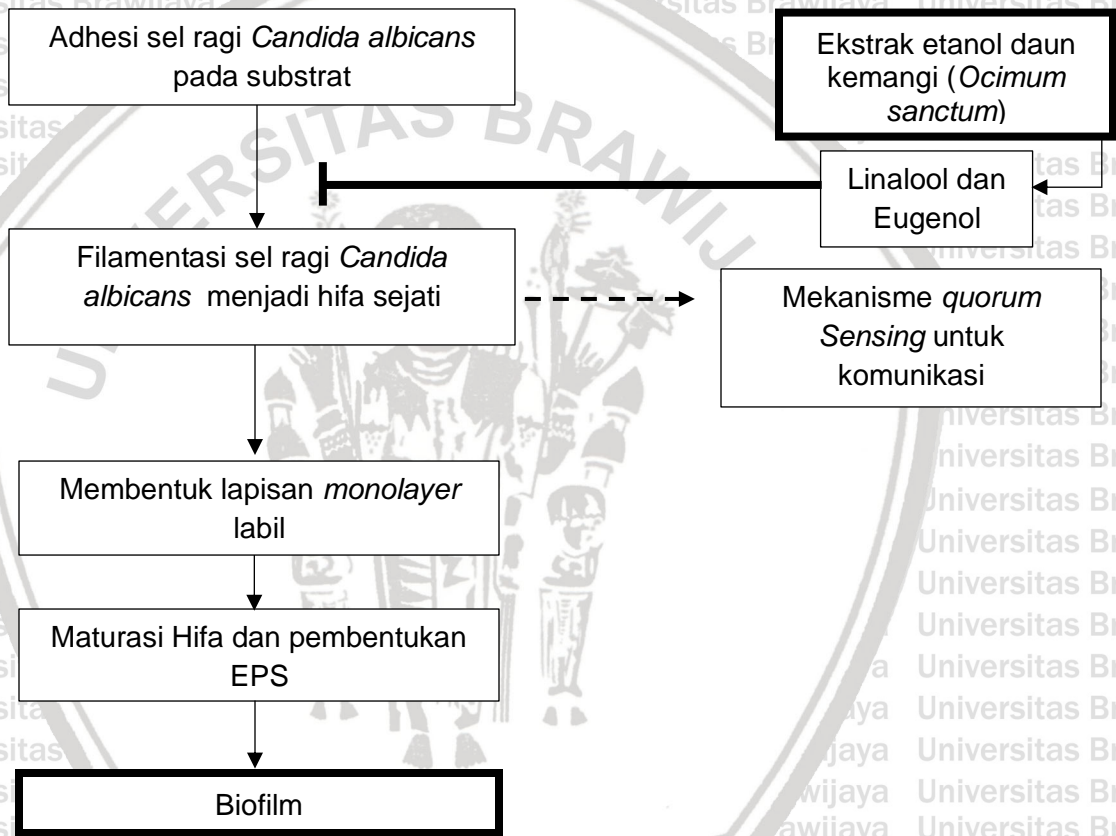
2.3.3.2 Eugenol

Eugenol merupakan salah satu komponen kimia dalam minyak atsiri yang terdiri atas tiga gugus fungsional yaitu alil, hidroksi dan metoksi. Eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$), dikenal dengan nama IUPAC 2-metoksi-4-(2-propenil) fenol termasuk keluarga alkilbenzena dari senyawa-senyawa fenol. Cairan tidak berwarna atau kuning pucat, bau cengkeh kuat dan menusuk, rasa pedas, berat molekul 164,20 kg/mol. Bila terpapar udara akan menjadi semakin lebih tua dan mengental. Memiliki berat jenis 1,064 dan 1,070 g/cm³. Sama seperti linalool, eugenol juga menghambat transisi morfologi *Candida albicans*. Eugenol dapat menginterferensi fase awal pembentukan biofilm maupun mengganggu integritas biofilm yang telah matur (Piras *et al.*, 2018).

BAB III

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep dan Hipotesis Penelitian

Keterangan :



: Variabel yang akan diteliti



: Penghambat pembentukan biofilm

: Variabel yang tidak diteliti

EPS

: *Extracellular Polymeric Substances*



Pada saat infeksi *Candida albicans* terjadi di dalam tubuh manusia, sel bebas *Candida albicans* akan membentuk biofilm. Sel-sel ragi (*yeast cell*) pada *Candida albicans* akan melekat pada substrat membentuk fondasi sebagai lapisan basal sel ragi. Kemudian, proses ini diikuti dengan fase proliferasi sel disepanjang permukaan. Selain itu, terjadi proses filamentasi dimana sel ragi membentuk bentuk hifa sejati. Proses ini membentuk lapisan *monolayer* yang labil. Setelah itu, terjadi akumulasi matriks EPS seiring dengan maturasi hifa. Morfologi hifa sejati *Candida albicans* inilah yang bertanggung jawab terhadap terbentuknya biofilm (Tsui *et al.*, 2016).

Pembentukan biofilm *Candida albicans* bergantung pada kemampuannya untuk bertransisi antar morfologi yang berbeda. Untuk mengatur transisi tersebut, *Candida albicans* saling berkomunikasi melalui mekanisme *quorum sensing*. Mekanisme *quorum sensing* yang paling umum terjadi pada *Candida albicans* berhubungan dengan molekul farnesol dan tyrosol, yang disekresikan secara ekstraseluler oleh koloni pada biofilm. Farnesol menghambat transisi *Candida albicans* dengan menghambat adenilat siklase (Cyr1), bagian dari jalur pengaturan pusat yang berdampak pada pertumbuhan bentuk *filamentous*. Sebaliknya, tyrosol menstimulasi pembentukan *filamentous* melalui *germ tube* (Mallick dan Bennet, 2013).

Senyawa yang terkandung pada ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) seperti linalool dan eugenol terlibat dalam mekanisme penghambatan sintesis biofilm. Linalool dan eugenol menghambat transisi morfologi *Candida albicans* dari bentuk sel ragi (*yeast cell*) menjadi bentuk *filamentous*. Hal ini terjadi melalui penghambatan pembentukan *germ tube* pada *Candida albicans*. Akibatnya, pembentukan biofilm *Candida albicans* dapat dihambat. (Manoharan *et al.*, 2017).

3.2 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) memiliki efek sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Candida albicans* secara *in vitro*.



BAB IV

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Dalam penelitian ini metode yang digunakan adalah *true* eksperimental *Candida albicans* dengan design *post-test only control group design* dan metode tabung. Kelompok kontrol adalah kelompok yang tidak mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak. Kelompok perlakuan adalah kelompok yang mendapat perlakuan berupa pemberian ekstrak dengan konsentrasi 3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, dan 100%. Penelitian inti dilakukan dengan konsentrasi 0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35%.

4.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Bahan utama penelitian berupa daun kemangi (*Ocimum sanctum*) didapatkan dari Materia Medica Batu. Proses ekstraksi etanol dilakukan di Politeknik Negeri Malang pada bulan Februari 2019. Penelitian inti ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada rentang waktu Februari – April 2019.

4.3 Sampel Penelitian

Penelitian ini menggunakan ekstrak etanol daun kemangi *ocimum sanctum* dan sampel jamur uji yang digunakan pada penelitian adalah *Candida albicans* pembentuk biofilm yang diambil dari stok kultur milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.4. Pengulangan

Jumlah pengulangan yang dilakukan pada penelitian ini menggunakan rumus Federer sebagai berikut (Notobroto *et al.*, 2005).

$$(p-1)(n-1) \geq 15$$

$$(7-1)(n-1) \geq 15$$

$$6n - 6 \geq 15$$

$$6n \geq 21$$

$$n \geq 3,5$$

$$n \approx 4$$

Keterangan:

n = jumlah pengulangan tiap perlakuan

p = jumlah perlakuan (dosis ekstrak etanol daun kemangi): 0 (kontrol), 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35% = 7 perlakuan

Berdasarkan perhitungan di atas, maka besar sampel atau pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini paling sedikit adalah 4.

4.5. Variabel Penelitian

4.5.1a. Variabel Bebas

Variabel bebas adalah variabel yang disengaja atau ditentukan, dan dipelajari pengaruhnya terhadap variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dengan konsentrasi 0%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35%.

4.5.2. Variabel Tergantung

Variabel tergantung adalah variabel yang dipikirkan sebagai akibat atau keadaannya tergantung dari variabel-variabel lain. Variabel tergantung pada

penelitian ini adalah ketebalan biofilm jamur *Candida albicans* pembentuk biofilm untuk menentukan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM).

4.6 Definisi Operasional

1. *Candida albicans* adalah jamur yang termasuk dalam patogen oportunistik yang menyebabkan berbagai infeksi mulai dari mukosa superficial hingga sistemik yang mengancam jiwa. Sampel ini diperoleh dari isolat *Candida albicans* pembentuk biofilm yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.
2. Biofilm adalah agregat multiseluler yang membentuk lapisan padat pada permukaan suatu substrat atau medium. Pada penelitian ini biofilm dibentuk oleh *Candida albicans* di medium tabung.
3. Ekstrak *Ocimum sanctum* adalah hasil ekstraksi daun kemangi berbentuk cair dengan pelarut etanol. Ekstrak yang didapatkan dianggap memiliki kandungan ekstrak sebesar 100%. Adapun daun kemangi yang digunakan adalah daun kemangi yang didapat dari Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur, yang telah melewati proses ekstraksi dan evaporasi.
4. Konsentrasi Hambat Biofilm Minimal (KHBM) adalah konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terendah yang dapat menghambat pembentukan biofilm *Candida albicans*. Hal ini ditandai dengan tidak tampaknya bentukan cincin dan lapisan ungu kebiruan pada dinding dan dasar tabung. KHBM ditentukan jika nilai *Mean Gray Value* pada kelompok uji lebih rendah 10% dari nilai *Mean Gray Value* dinding tabung yang masih baru (Macià *et al.*, 2014).
5. Kontrol kuman adalah biakan *Candida albicans* murni yang tidak dicampur dengan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai

pembandingan pertumbuhan jamur jika tidak diberikan perlakuan. Kontrol kuman berlaku sebagai kontrol negatif.

6. Kontrol bahan adalah ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) murni yang tidak dicampur jamur *Candida albicans* dan digunakan untuk mengetahui apakah bahan yang digunakan steril dimana nilai kontrol bahan adalah 0 (tidak terdapat pertumbuhan mikroba jenis apapun).

Kontrol kuman berlaku sebagai kontrol positif.

7. Derajat pembentukan biofilm merupakan intensitas ketegasan warna cincin biofilm, yang dikuantifikasi dengan *Mean Gray Value*. Semakin tegas warna cincin biofilm yang terbentuk, semakin rendah nilai *Mean Gray Value*.

8. Konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini adalah 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35%. Konsentrasi ini akan diuji dan ditentukan dalam penelitian pendahuluan.

9. *Mean Gray Value* adalah skala intensitas warna pada program *Adobe Photoshop CS6*. Kisaran skala antara 0-255. Angka mendekati 0 berarti kepekatan warna tinggi. Sedangkan angka mendekati 255 berarti kepekatan warna rendah.

10. Nilai *Mean Gray Value* tabung kosong merupakan nilai yang didapat dari pengukuran *Mean Gray Value* pada dinding tabung yang tidak terbentuk cincin atau tidak terdapat perlakuan, yang akan digunakan sebagai nilai awal (Matthew, 2016).

4.7 Alat dan Bahan Penelitian

4.7.1 Alat dan Bahan untuk Pembuatan Ekstrak Daun Kemangi

1. Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*)
2. Pelarut etanol 96%

3. Timbangan analitik

4. Gelas kimia 250 ml

5. Sokhlet

6. Cawan petri

7. Penjepit cawan petri

8. Desikator

9. Spatula

10. Pemanas aquades

11. Kertas saring

12. Thimble

13. Oven

4.7.2 Alat dan Bahan untuk Kultur dan Identifikasi Jamur

1. Alat

- a. Tabung reaksi
- b. Ose
- c. Lampu spiritus dan Bunsen
- d. Inkubator
- e. Spektrofotometer
- f. Korek api
- g. Label
- h. Obyek glass dan kaca penutup
- i. Mikroskop

2. Bahan

- a. Biakan *Candida albicans* penghasil biofilm
- b. Medium Agar Sabouroud Dextrose
- c. Serum mammalia
- d. Bahan pewarnaan Gram : kristal violet, lugol, alkohol 90%, safranin

- e. Akuades steril
- f. Kertas penghisap atau tisu
- g. Minyak imersi

4.7.3 Alat dan Bahan Deteksi Biofilm

1. Biakan *Candida albicans* pembentuk biofilm
2. *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) dengan 1% glukosa (SDBglu)
3. Tabung reaksi
4. Dimethylsulfoxide (DMSO) 10%
5. *Phosphate Buffer Saline* (PBS) pH 7,3
6. Kristal violet
7. *Deionized water*
8. Ose
9. Pipet
10. *Beaker glass*
11. Inkubator

4.8 Prosedur Penelitian

4.8.1 Persiapan Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*)

1. Menggunakan 100 gr daun kering kemangi (*Ocimum sanctum*) dicuci bersih dan dikeringkan, kemudian di oven dengan suhu 40°-60° sehingga kandungan airnya berkurang.
2. Kemudian, daun kemangi yang kering tersebut di blender menjadi sediaan bubuk, kemudian dimasukkan kedalam gelas Erlenmeyer ukuran 1L lalu direndam dengan etanol 96% sampai volume 1L, kemudian dikocok sampai benar – benar tercampur, kurang lebih 30 menit dan diamkan satu malam sampai mengendap.

3. Setelah satu malam, diambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif yang sudah terambil, proses ini dilakukan sampai sebanyak 3 kali dan dilanjutkan dengan proses evaporasi.
4. Memasang evaporator set pada tiang permanen agar dapat digantung dengan kemiringan 30° - 40° terhadap meja dengan susunan dari bawah ke atas alat pemanas air, labu penampung hasil evaporasi, *rotatory evaporator* dan tabung pendingin.
5. Kemudian air dingin yang terhubung dengan bak penampung air dingin melalui selang plastik.
6. Hasil maserasi dimasukkan dalam labu evaporasi sedangkan *rotatory evaporator*, alat pompa sirkulasi air dingin dan alat pompa vakum dinyalakan.
7. Pemanas aquades juga dinyalakan sehingga hasil ekstraksi dalam tabung penampung evaporasi mendidih sampai dengan suhu 78°C (sesuai titik didih etanol 96%) dan etanol 96% mulai menguap.
8. Hasil penguapan etanol 96% dikondensasikan menuju labu penampung etanol 96% sehingga tidak tercampur hasil evaporasi dan uap lain tersedot pompa vakum.
9. Proses evaporasi dilakukan hingga volume hasil ekstraksi berkurang dan menjadi kental. Setelah kental evaporasi dihentikan dan hasil evaporasi diambil. Hasil evaporasi ditampung dalam cawan penguap kemudian di oven selama kurang lebih 1,5 sampai 2 jam untuk menguapkan pelarut yang tersisa. Setelah itu kita dapatkan hasil ekstraksi sebanyak 15 mL.
(Joshi *et al.*, 2011).

4.8.2 Identifikasi Jamur

a. Perbenihan pada Agar Sabouroud Dextrose

Jamur *Candida albicans* diinokulasi pada medium agar Sabouroud Dextrose dan diinkubasi pada incubator dengan suhu 37°C selama 18-24 jam. Selanjutnya, diamati tampakan berupa koloni dengan permukaan menonjol dari permukaan medium, permukaan koloni halus, berwarna putih kekuning-kuningan, dan memiliki bau ragi (Siregar, 2005).

b. Perwarnaan gram

Pewarnaan Gram bertujuan untuk memvisualisasi gambaran mikroskopik sel ragi *Candida albicans*. Pada pemeriksaan ini, *Candida albicans* akan menunjukkan gambaran sel ragi dengan atau tanpa *pseudohyphae*.

Prosedur pewarnaan Gram, yaitu:

1. Mengambil koloni *Candida albicans* dengan lidi kapas dari agar ke kaca benda yang sebelumnya sudah diberi lingkaran dengan spidol permanen
2. Menunggu sediaan sampai kering, lalu difiksasi di atas api bunsen, dengan mengayunkan sebanyak 3-5 kali
3. Meneteskan kristal violet di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 1 menit, bilas dengan akuades
4. Meneteskan lugol di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 1 menit, bilas dengan akuades
5. Meneteskan alkohol 96% di atas kaca benda, lalu ditunggu 5-10 detik, bilas dengan akuades
6. Meneteskan safranin di atas kaca benda, lalu ditunggu selama 30 detik, bilas dengan akuades
7. Mengeringkan sediaan dengan kertas penghisap

8. Mengamati sediaan dibawah mikroskop dengan perbesaran total dari terkecil yaitu 100x, 400x, dan terbesar 1000x menggunakan minyak imersi

9. Mengamati adanya sel ragi bewarna ungu yang menandakan bahwa terdapat sel ragi *Candida albicans*.

c. Uji pembentukan *Germ Tube*

Inokulasi koloni ragi (*yeast colony*) berumur 48-72 jam pada 2 ml serum mammalia dan diinkubasi pada suhu 37°C di dalam inkubator selama 2-3 jam. Hasil positif bila pada pemeriksaan mikroskopis ditemukan bentuk sel yang berkecambah seperti raket (*germ tube*) (Sjariffudin *et al.*, 2002).

4.8.3 Uji Hambat Pembentukan Biofilm

4.8.3.1 Penelitian Pendahuluan

1. Menyiapkan perbenihan cair *Candida albicans* dengan kepadatan 10^7 CFU/ml.

- *Candida albicans* yang sudah diidentifikasi dikultur dalam media SDBglu selama 24 jam dalam inkubator 35°C. Suspensi kemudian diukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang (λ) 520 nm.

- Dari nilai absorbansi dapat diperkirakan jumlah sel *Candida albicans* pada perbenihan cair dengan kalibrasi yang sudah diketahui yaitu absorbansi 0,38 setara dengan setara dengan kepadatan jamur pembentuk biofilm 10^7 CFU/ml.

- Untuk mendapatkan kepadatan jamur sebesar 10^7 CFU/ml. Maka menggunakan perhitungan :

$$N_1 \times V_1 = N_2 \times V_2$$

Keterangan:

N_1 = Nilai absorbansi suspensi (hasil spektrofotometri)

V_1 = Volume jamur yang akan ditambah pengencer

N_2 = Optical Density (0,38 = setara dengan 10^7 CFU/mL)

V_2 = Volume suspensi jamur (10mL)

- Dari hasil perhitungan tersebut diperoleh volume jamur yang akan ditambah pengencer untuk mendapat kepadatan 10^7 CFU/ml sebanyak 10ml. Di ketahui bahwa jumlah sel optimal untuk pembentukan biofilm *Candida albicans* adalah pada kepadatan 10^7 CFU/ml (Turan dan Demirbilek, 2018)

2. Mengisi tabung reaksi 1-6 dengan suspensi bakteri dalam medium SDBglu 2 ml, dan tabung kontrol diisi 4 ml.

3. Mencampurkan 2 ml larutan ekstrak dalam tiap tabung kecil ke dalam tabung reaksi 1-7 sehingga didapatkan larutan sebanyak 4 ml dengan konsentrasi ekstrak daun kemangi pada masing-masing tabung sebagai berikut:

Tabung 1: 0% (kontrol) Tabung 4: 12,5% Tabung 7: 100%

Tabung 2: 3,125% Tabung 5: 25%

Tabung 3: 6,25% Tabung 6: 50%

4. Mengisi tabung reaksi 1 – 7 dengan suspensi bakteri dari medium SDBglu dan ekstrak.

5. Menginkubasi keenam tabung selama 24 jam dengan suhu 37°C .

6. Mengeluarkan tabung dari inkubator setelah 24 jam dan mencuci dengan PBS (pH 7,3) serta mengeringkan airnya.

7. Memberikan kristal violet (0,1%) 0,5 ml, ditunggu selama 15 menit.

Kemudian, membuang kelebihan warna dan mencuci tabung dengan *deionized water*.

8. Mengeringkan tabung. Biofilm yang terbentuk dapat diamati sebagai sebuah film yang melapisi sisi dan dasar tabung. Jumlah biofilm yang terbentuk kemudian dinilai sebagai 1 = tidak ada atau lemah, 2 = sedang atau 3 = kuat (Ruchi *et al.*, 2015).

4.8.3.2 Penelitian Inti

1. Menyiapkan perbenihan cair bakteri dengan kepadatan 10^7 CFU/ml.
2. Menyiapkan tujuh tabung steril yang akan diisi dengan bakteri dan konsentrasi ekstrak yang ditentukan setelah uji pendahuluan, yaitu 0% (kontrol); 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; dan 35%.
3. Mengisi tabung reaksi 1 – 7 dengan suspensi bakteri dari medium SDBglu dan ekstrak etanol daun kemangi.
4. Kemudian keenam tabung tersebut diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam pada suhu 37°C.
5. Setelah 24 jam, keenam tabung tersebut dicuci dengan larutan PBS (pH 7,3), lalu dikeringkan.
6. Setelah kering, seluruh tabung dicat dengan kristal violet 0,1% sebanyak 4 ml atau hingga larutan kristal violet mengisi lebih tinggi dari batas larutan yang telah dibentuk pada masing – masing tabung. Diamkan selama 15 menit, kemudian buang larutan kristal violet dan cuci dengan air, kemudian dikeringkan.
7. Semua buangan dari tabung dimasukkan ke dalam lisol.
8. Pembentukan biofilm dapat diamati pada area *airfluid border* (area antara medium cair dan udara).

4.8.4 Pengukuran Mean Gray Value

Hasil pembentukan biofilm kemudian difoto dengan kamera digital. Untuk mengetahui intensitas warna pada area cincin dan dinding tabung pada masing-masing kelompok maka digunakan program aplikasi *Adobe Photoshop CS6*. *Mean Gray Value* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Semakin rendah nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tebal, sementara semakin tinggi nilai *Mean Gray Value* menunjukkan intensitas warna yang semakin tipis. Langkah-langkah dimulai dengan membuka program aplikasi, pilih *File* dan masukkan hasil foto kamera digital. Selanjutnya, pilih *tab Window* dan pilih *Measurement Log*, blok area yang akan dilihat intensitas warnanya dengan menggunakan *Rectangular Marquee Tool* lalu klik *Record Measurements* maka akan didapatkan nilai *Mean Gray Value* yang merupakan rata-rata dari intensitas warna pengecatan tabung (Andiyani., 2014).

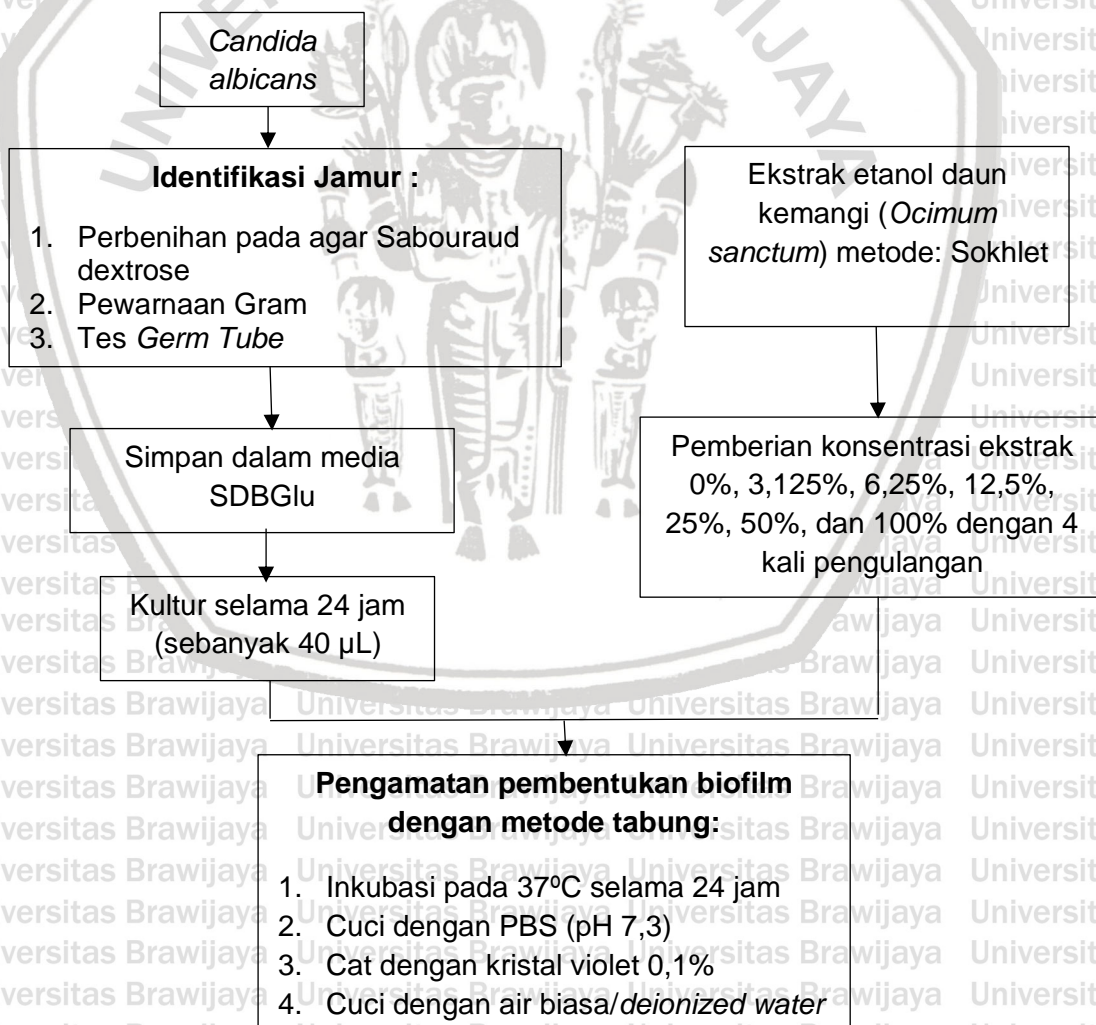
4.8.5 Analisis Data

Analisis hasil penelitian menggunakan analisis statistik SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 23.0 untuk *Windows*. Data dianggap signifikan jika $p < 0,05$. Langkah-langkah yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Uji normalitas data dengan *Kolmogrov Smirnov Test* untuk menentukan apakah data tersebar normal atau tidak tersebar normal dan homogen atau tidak homogen. *Shapiro-Wilk test* dilakukan apabila data berjumlah kurang dari 50 data.
2. Uji komparasi dengan cara *one way ANOVA* > 2 kelompok dengan syarat sebaran data harus normal dan varian data harus homogen. Jika tidak homogen, digunakan metode *Kruskel Wallis*.

3. Uji Post Hoc *Multiple Comparison* untuk mengetahui signifikansi masing-masing kelompok data.
4. Uji korelasi untuk mengetahui hubungan antara variabel dependen dan variabel independen. Pada data parametrik digunakan uji korelasi Pearson, sedangkan pada data non parametrik diuji dengan uji korelasi Spearman. Uji korelasi untuk mengetahui tebal biofilm *Candida albicans* dengan perubahan kadar ekstrak yang diberikan dan bentuk hubungannya (Dahlan, 2009)

4.9 Alur Kerja Penelitian



Hasil difoto dengan kamera digital

Ukur Mean Gray Value dengan Adobe Photoshop CS6

Analisis data dengan SPSS for Windows 23.0

Gambar 4.1 Alur kerja penelitian



BAB V

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

5.1.1 Hasil Ekstraksi Daun Kemangi (*Ocimum sanctum*)

Metode yang digunakan untuk mendapatkan ekstrak dari daun kemangi (*Ocimum sanctum*) adalah teknik maserasi. Setelah dikeringkan, daun kemangi direndam dalam etanol 96% selama 2 x 24 jam dan sisa pelarut pada ekstrak dihilangkan dengan pengeringan menggunakan oven pada suhu 40-50°C hingga mencapai bobot konstan ekstrak.



Ekstrak etanol
daun kemangi

Gambar 5.1 Hasil Akhir Ekstrak Etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) pada Botol

Keterangan: Ekstrak etanol daun kemangi yang ditunjuk oleh panah hitam diperoleh dengan metode maserasi menggunakan etanol 96%.

5.1.2 Hasil Identifikasi Jamur

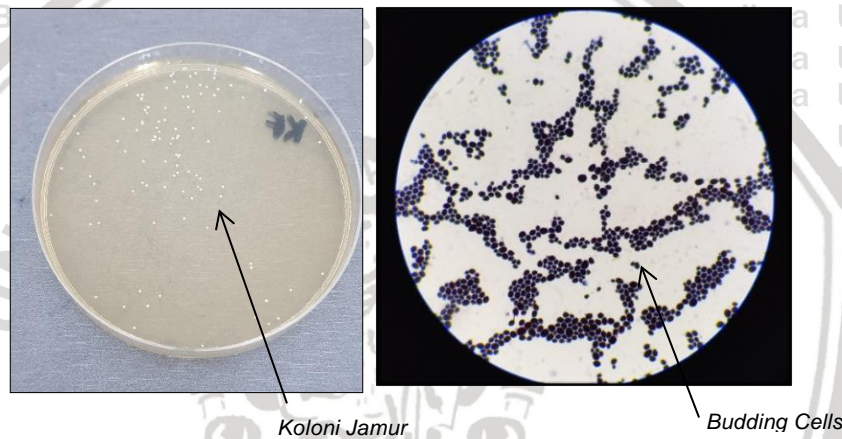
Mikroba yang digunakan adalah jamur *Candida albicans* yang merupakan isolat yang telah di kultur di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Identifikasi jamur ini diawali dengan isolat yang di-*streaking* pada Sabouraud Dextrose Agar (SDA).

Koloni yang terbentuk dari berbentuk bulat, sedikit cembung. Teksturnya halus,

licin dan terkadang sedikit berlipat-lipat, terutama pada koloni yang sudah tua.

Ukuran koloni dipengaruhi oleh umur biakan. Koloni berwarna putih kekuningan dan berbau asam seperti tape. Kemudian, Isolat *Candida albicans* diidentifikasi dengan metode pewarnaan Gram.

Perwarnaan Gram di bawah perbesaran 1000x pada mikroskop menunjukkan bentukan sel ragi (blastospora) berwarna ungu (gram positif). Jamur yang diamati berbentuk bulat, maupun oval seperti terlihat pada Gambar 5.2b.



Gambar 5.2 Morfologi Koloni dan Sel *Candida albicans* (a) Koloni jamur *Candida albicans* pada Medium SDA; (b) Pengecatan Gram Menunjukkan Sifat Gram Positif dan Terdapat *Budding Cells*

Keterangan: Panah hitam pada Gambar 5.2(a) menunjukkan koloni *Candida albicans* yang berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung. Pada Gambar 5.2(b) panah hitam menunjukkan adanya *budding cells* dari *Candida albicans* yang tercat ungu (gram positif).

Uji *germ tube* dilakukan untuk membedakan *Candida albicans* dengan spesies *Candida* lainnya melalui ditemukannya pseudohifa. Pada uji *germ tube* (Gambar 5.2), ditemukan bentuk sel yang berkecambah seperti raket (*germ tube*).



Gambar 5.3 Gambaran Mikroskopis Pseudohifa *Candida albicans*

Keterangan: Panah hitam menunjukkan gambaran *pseudohifa* pada uji *germ tube*. *Pseudohifa* pada Gambar 5.3 tampak berbentuk seperti raket

5.1.3 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm

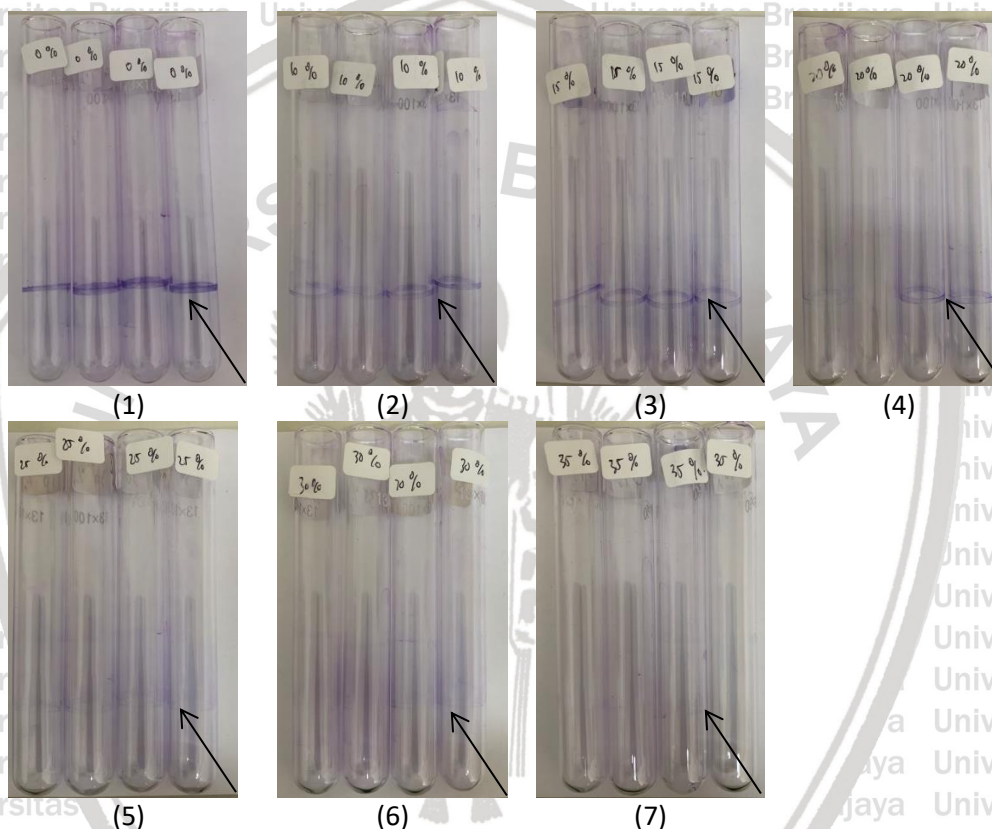
Uji pendahuluan merupakan prosedur awal untuk menentukan konsentrasi yang akan diteliti. Konsentrasi yang digunakan pada uji pendahuluan adalah 0%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 100%. Hasil uji menunjukkan mulai dari konsentrasi 20% sudah tidak ditemukan adanya pembentukan cincin biofilm pada area *airfluid border*. Berdasarkan hasil tersebut, konsentrasi yang digunakan pada penelitian inti yaitu 0%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; dan 35%.

Konsentrasi 0% merupakan kelompok kontrol negatif yang merupakan kontrol kuman tanpa pemberian ekstrak.

Pengamatan biofilm *Candida albicans* dilakukan pada intensitas cincin yang terbentuk pada *airfluid border*. Cincin yang terbentuk pada tabung difoto menggunakan kamera, kemudian dilakukan kuantifikasi dengan *Mean Gray Value* (MGV) menggunakan *Adobe Photoshop CS6* yang dinyatakan dalam skala 0 – 255. Pengukuran *Mean Gray Value* juga dilakukan pada tabung kosong untuk melihat nilai awal *Mean Gray Value* tabung kosong untuk tabung yang digunakan. Apabila *Mean Gray Value* pada kelompok perlakuan lebih kecil 10% dari *Mean Gray Value* tabung kosong yang masih baru, maka konsentrasi

pada kelompok tersebut merupakan Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM).

Pada penelitian ini, tabung kosong yang digunakan menunjukkan nilai *Mean Gray Value* sebesar 160,12. Nilai ini kemudian dibandingkan dengan *nilai Mean Gray Value* kelompok perlakuan, seperti terlihat pada Tabel 5.1, Gambar 5.4 dan 5.5.



Gambar 5.4 Hasil Uji Hambat Pembentukan Biofilm Pengulangan 4 kali.

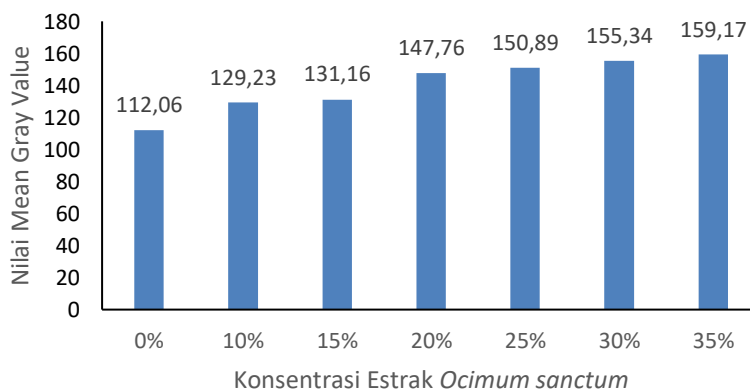
Keterangan: Panah hitam menunjukan biofilm *Candida albicans* yang terbentuk sebagai cincin pada perbatasan *air-fluid*. Konsentrasi dari pengujian uji tabung adalah: (1) 0%, (2) 10%, (3) 15%, (4) 20%, (5) 25%, (6) 30%, dan (7) 35%. Secara visual, cincin sudah mulai tidak nampak pada konsentrasi 20%.

Tabel 5.1 Hasil Pengukuran Mean Gray Value dengan Aplikasi Adobe Photoshop CS6

Konsentrasi	Pengulangan				Mean ± SD
	I	II	III	IV	
0%	106,74	129,37	109,29	102,84	112,06±11,84
10%	127,89	135,91	124,85	128,27	129,23± 4,71
15%	125,63	132,77	130,86	135,38	131,16± 4,13
20%	143,54	139,80	139,80	167,91	147,76±13,55
25%	142,20	156,40	148,61	156,36	150,89± 6,86
30%	149,24	157,17	157,11	157,83	155,34± 4,07
35%	159,31	156,82	161,01	159,54	159,17± 1,74

Mean Gray Value Tabung Kosong 160,12

Keterangan: Nilai Mean Gray Value yang rendah mencerminkan biofilm yang tebal. Sementara, nilai Mean Gray Value yang tinggi menandakan pembentukan biofilm yang tipis. Kadar hambat biofilm minimal (KHBm) dicapai bila hasil rerata Mean Gray Value 10% di bawah Mean Gray Value tabung kosong, yaitu 144,11 (10% dari 160,12). Dapat dilihat KHBm pada penelitian ini adalah pada konsentrasi 20%, di mana rerata Mean Gray Value 147,76.



Gambar 5.5 Grafik Pengukuran Mean Gray Value

Keterangan: Nilai Mean Gray Value meningkat seiring dengan meningkatnya konsentrasi *Ocimum sanctum*. Hal ini menunjukkan terjadinya penipisan lapisan biofilm *Candida albicans* yang terbentuk.

Gambar 5.5 menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi, maka nilai Mean Gray Value (MGV) dari biofilm tabung semakin besar.

Nilai MGV yang besar menandakan penipisan pembentukan biofilm.



5.2 Analisis Data

Analisis hasil pada penelitian ini menggunakan analisis statistik SPSS versi 24. Pertama, dilakukan uji normalitas dan homogenitas. Data *Mean Gray Value* yang diperoleh pada tabel 5.1 dianalisis menggunakan uji *Shapiro-Wilk* untuk mengetahui normalitas dan uji *Oneway ANOVA* dengan pilihan homogenitas. Kemudian dilakukan uji komparasi dengan *Oneway ANOVA* untuk memastikan adanya perbedaan signifikan antar kelompok data. Selanjutnya, dilakukan uji *Post Hoc Test multiple comparison test* metode *Tukey* untuk melihat signifikansi suatu kelompok data terhadap masing-masing kelompok data lainnya. Setelah itu dilakukan uji korelasi *Pearson* untuk mengetahui korelasi antara peningkatan konsentrasi ekstrak etanol *Ocimum sanctum* terhadap *Mean Gray Value*. Selanjutnya dilakukan uji regresi linear untuk mengetahui besarnya pengaruh konsentrasi ekstrak etanol *Ocimum sanctum* terhadap *Mean Gray Value*.

5.2.1 Uji Normalitas dan Homogenitas

Suatu data dianggap tersebar normal jika uji normalitas menunjukkan $p > 0,05$ dan dianggap homogen jika uji homogenitas menunjukkan $p > 0,05$. Hasil uji normalitas *Shapiro wilk* menunjukkan nilai $p = 0,088$ (Lampiran 4), maka disimpulkan bahwa data berdistribusi normal. Kemudian dari hasil uji homogenitas *Levene*, didapatkan nilai $p = 0,065$ (Lampiran 4), maka disimpulkan bahwa data bervariasi homogen. Berdasarkan hasil ini dapat dilakukan uji statistik parametrik.

5.2.2 Uji Oneway ANOVA

Uji *Oneway ANOVA* dilakukan untuk mengetahui tingkat perbedaan antara rerata tiap kelompok dalam keseluruhan data yang telah didapatkan. Data dianggap berbeda signifikan bila $p < 0,05$. Hasil uji menunjukkan nilai $p = 0,000$ (kurang dari 0,05), maka disimpulkan bahwa terdapat perbedaan antara rerata tiap kelompok yang signifikan (Lampiran 5).

5.2.3 Uji Post Hoc

Tabel 5.2 Nilai Signifikan Kelompok terhadap Kelompok Lainnya pada Uji Post Hoc

	0%	10%	15%	20%	25%	30%	35%
0%		0,068	0,033	0,000	0,000	0,000	0,000
10%	0,068		1,000	0,041	0,012	0,002	0,000
15%	0,033	1,000		0,084	0,026	0,004	0,001
20%	0,000	0,041	0,084		0,997	0,812	0,410
25%	0,000	0,012	0,026	0,0997		0,982	0,745
30%	0,000	0,002	0,004	0,812	0,982		0,992
35%	0,000	0,000	0,001	0,410	0,745	0,992	

Keterangan: Tabel 5.2 menunjukan nilai p antar kelompok pada uji *Post Hoc*. Metode yang digunakan adalah uji *Tukey HSD*

Tabel 5.3 Rangkuman Hasil Uji Post Hoc

	0%	10%	15%	20%	25%	30%	35%
0%		-	+	+	+	+	+
10%	-		-	+	+	+	+
15%	+	-		-	+	+	+
20%	+	+	-		-	-	-
25%	+	+	+	-		-	-
30%	+	+	+	-	-		-
35%	+	+	+	-	-	-	

Keterangan: Tabel 5.3 menunjukan rangkuman hasil uji *Post Hoc*. Tanda (+) menunjukan bahwa perbedaan antar kelompok signifikan ($p < 0,05$) sementara tanda (-) menunjukan bahwa perbedaan antar kelompok tidak signifikan ($p > 0,05$).

Uji *Post Hoc Multiple Comparison* digunakan untuk melihat signifikansi masing-masing kelompok data satu dengan lainnya (Lampiran 6). Metode *Post Hoc* yang digunakan adalah uji *Tukey HSD*. Perbedaan dianggap signifikan jika



nilai $p < 0,05$ pada masing-masing kelompok data. Rangkuman hasil uji *Post Hoc Multiple Comparison* dapat dilihat pada Tabel 5.2 dan 5.3. Tabel 5.2 menunjukkan nilai p dari hasil uji *Post Hoc Multiple*, sementara itu Tabel 5.3 menunjukkan signifikansi atau tidaknya data antar kelompok.

Kelompok data pertama adalah kontrol negatif, yaitu perlakuan tanpa pemberian ekstrak etanol *Ocimum sanctum* (konsentrasi 0%). Hasilnya adalah didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 10% ($p > 0,05$). Pada konsentrasi 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, dan 35% terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Kemudian hasil komparasi kelompok data kedua, yaitu perlakuan dengan konsentrasi ekstrak 10% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap perlakuan kontrol (0%) dan 15% ($p > 0,05$). Pada konsentrasi 20%, 25%, 30%, dan 35% terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Pada kelompok data ketiga, yaitu konsentrasi ekstrak 15% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap perlakuan dengan konsentrasi 10% dan 20% ($p > 0,05$). Pada konsentrasi 0%, 25%, 30%, dan 35% terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Pada kelompok data keempat, yaitu konsentrasi ekstrak 20% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 15%, 25%, 30%, dan 35% ($p > 0,05$). Pada konsentrasi 0% (kontrol) dan 10% terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Sedangkan pada kelompok data kelima, yaitu konsentrasi 25% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 20%, 30%, dan 35%. Pada konsentrasi 0% (kontrol), 10%, dan 15% terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Pada kelompok data keenam, yaitu konsentrasi 30% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 20%,

25%, dan 35% ($p > 0,05$). Pada konsentrasi 0% (kontrol), 10%, dan 15% terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Dan pada kelompok data terakhir, yaitu konsentrasi ekstrak 35% didapatkan perbedaan *Mean Gray Value* yang tidak signifikan terhadap konsentrasi 20%, 25%, dan 30% ($p > 0,05$). Pada konsentrasi 0% (kontrol), 10%, dan 15% terdapat perbedaan yang signifikan ($p < 0,05$). Sehingga dapat disimpulkan bahwa antar kelompok data yang berdekatan tidak terdapat signifikansi yang cukup. Namun, pada antar kelompok data dengan perbedaan konsentrasi yang jauh, terdapat perbedaan angka *Mean Gray Value* yang signifikan.

5.2.4 Uji Korelasi Pearson

Uji korelasi dilakukan untuk mengetahui keeratan dan bentuk hubungan antara dua variabel yang dinyatakan dengan koefisien korelasi. Hubungan signifikan ditunjukkan dengan $p < 0,05$, sedangkan nilai $p > 0,05$ menunjukkan bahwa korelasi tidak signifikan. Sementara, klasifikasi nilai korelasi Pearson dapat dilihat sebagai berikut (Sugiyono, 2007):

Nilai Korelasi 0 – 0,199 = sangat rendah

Nilai Korelasi 0,200 – 0,399 = rendah

Nilai Korelasi 0,400 – 0,599 = sedang

Nilai Korelasi 0,600 – 0,799 = kuat

Nilai Korelasi 0,800 – 1,000 = sangat kuat

Korelasi dapat bertanda positif dan negatif. Korelasi positif menunjukkan arah yang searah antar variabel. Sedangkan korelasi negatif menunjukkan arah yang berlawanan. Hasil uji korelasi Pearson menunjukkan hasil-hasil sebagai berikut:

1. Nilai $p = 0,000$, menandakan korelasi yang signifikan antara konsentrasi ekstrak daun kemangi dengan *Mean Gray Value*. (Lampiran 7)
2. Nilai korelasi (r) = 0,900, yang berarti korelasi antara konsentrasi ekstrak *Ocimum sanctum* dengan *Mean Gray Value* atau ketebalan biofilm sangat kuat.
3. Arah korelasi positif, sehingga disimpulkan semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun kemangi, semakin tinggi pula nilai *Mean Gray Value* yang menandakan semakin tipis cincin biofilm yang terbentuk.

5.2.5 Hasil Uji Regresi

Uji Regresi dilakukan untuk mengetahui besarnya pengaruh variabel bebas terhadap variabel tergantung. Adapun rumus persamaan regresi linear sederhana adalah sebagai berikut:

$$Y = a + bX$$

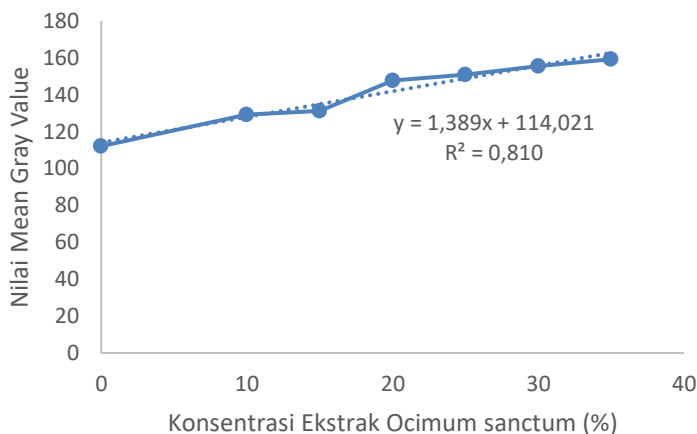
Keterangan:

Y = *Mean Gray Value*

a = angka konstan dari unstandardized coefficients

b = angka koefisien regresi

X = Konsentrasi (%)



Gambar 5.6 Grafik Uji Regresi

Keterangan: Grafik Uji Regresi menunjukkan rumus persamaan $Y = 1,389x + 114,021$ dengan nilai R^2 adalah 0,810

Dari hasil uji regresi yang dilakukan (lampiran 8), didapatkan bahwa nilai $a=114,021$, $b= 1,389$. Berdasarkan hasil tersebut maka dapat disimpulkan bahwa, *baseline* dari nilai Mean Gray Value biofilm *Candida albicans* yang terbentuk adalah 114,021 (nilai a) dan setiap penambahan konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi sebesar 5% akan menaikkan nilai Mean Gray Value sebesar 6,945 (diperoleh dari nilai b dikali 5). Nilai *R square* yang didapatkan dari uji regresi adalah sebesar 0,810. Hal ini berarti terdapat kemungkinan sebesar 81% hambatan pembentukan biofilm yang dipengaruhi oleh pemberian ekstrak daun kemangi. Sedangkan sisanya dipengaruhi oleh *confounding factor*.

BAB VI

PEMBAHASAN

Penelitian eksperimental ini menggunakan jamur *Candida albicans* yang didapat dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. *Candida albicans* ditanam pada media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA). Daun kemangi (*Ocimum sanctum*) yang digunakan berasal dari Kebun Materia medica, Batu. Daun kemangi *Ocimum sanctum* kemudian diekstraksi dengan pelarut etanol 96% di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Metode ini dilakukan karena prosedur dan peralatannya lebih sederhana serta lebih sesuai agar mendapatkan bahan aktif dari tanaman.

Uji pendahuluan dilakukan terlebih dahulu untuk menentukan konsentrasi yang akan diteliti. Konsentrasi yang digunakan adalah 0%; 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 100%. Hasil uji pendahuluan menunjukkan bahwa pada konsentrasi 25% sudah tidak ditemukan adanya pembentukan cincin biofilm pada area *airfluid border*. Berdasarkan hasil ditentukan konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian inti yaitu 0%; 10%; 15%; 20%; 25%; 30%; dan 35%.

Hasil penelitian inti dalam dilusi tabung selanjutnya didokumentasikan dengan kamera digital lalu diolah menjadi data kuantitatif. Dengan menggunakan aplikasi *Adobe Photoshop CS6*, dilakukan pengamatan data secara kuantitatif yaitu, melihat intensitas warna cincin pada tiap tabung. Intensitas warna pada cincin diukur dengan nilai *Mean Gray Value*. Rata-rata hasil *Mean Gray Value* diukur pada setiap konsentrasi dan kemudian dibandingkan dengan *Mean Gray Value* tabung yang kosong.

Berdasarkan hasil penelitian, ditunjukkan bahwa pada konsentrasi 0% hingga 35% terjadi kenaikan rata-rata *Mean Gray Value* yang berbanding lurus dengan kenaikan konsentrasi ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*).

Semakin tinggi nilai *Mean Gray Value* menunjukkan semakin tipisnya intensitas warna yang menandakan semakin tipisnya cincin yang terbentuk. Kadar Hambat Biofilm Minimal (KHBM) dicapai apabila hasil *Mean Gray Value* 10% di bawah *Mean Gray Value* tabung kosong (Maciá *et al.*, 2014). Pada penelitian ini didapatkan KHBM adalah 144,11 (10% dari 160,12). Berdasarkan penelitian ini, ditemukan bahwa nilai tersebut sudah tercapai pada konsentrasi 20%. Hasil penelitian ini membuktikan bahwa ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terbukti mampu menghambat pembentukan biofilm *Candida albicans*.

Hasil penelitian ini selaras dengan penelitian Lalitya (2017) mengenai penghambatan pembentukan biofilm *Burkholderia cepacia* menggunakan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dengan metode tabung. Pada penelitian tersebut digunakan 6 konsentrasi sebagai perlakuan, yakni 0%, 10%, 20%, 30%, 40% dan 50%. Hasil penelitian tersebut menunjukkan bahwa terdapat hubungan berbanding lurus antara peningkatan konsentrasi ekstrak daun kemangi terhadap penipisan intensitas cincin biofilm. Hasil dari penelitian tersebut menunjukkan bahwa secara visual cincin biofilm sudah tidak terbentuk pada konsentrasi 30%.

Adanya perbedaan dalam penelitian ini terkait dalam hal proses ekstraksi serta patogen yang digunakan. Selain itu, penelitian lain oleh Susanto *et al.* (2013) menggunakan metode mikrodilusi menunjukkan minyak atsiri daun kemangi (*Ocimum basilicum* L.) dapat secara efektif menghambat biofilm bakteri *Streptococcus mutans*. Pada penelitian tersebut digunakan 5 konsentrasi sebagai perlakuan, yakni 0,0625%, 0,125%, 0,25%, 0,5%, dan 1%. Hasil

penelitian tersebut menunjukkan nilai IC_{50} (*half maximal inhibitory concentration*)

penghambatan biofilm sebesar 0,168%. Adanya perbedaan dalam penelitian ini terkait dalam hal proses ekstraksi kandungan, metode yang digunakan, dan patogen yang digunakan. Kedua penelitian ini menunjukkan bahwa, secara umum kandungan yang terdapat di dalam daun kemangi memiliki kemampuan penghambatan *biofilm* pada beberapa patogen baik bakteri gram negatif, gram positif, maupun jamur seperti *Candida albicans*.

Pada penelitian Mubarak *et al* (2018) menunjukkan bahwa biofilm *Candida albicans* juga dapat dihambat pertumbuhannya oleh ekstrak metanol rumput laut *Gracilaria verrucosa* menggunakan metode mikrodilusi. Pada penelitian tersebut digunakan 6 kelompok perlakuan, yakni 6,25%, 12,5%, 25%, 50%, 75% dan 100%. Dari penelitian tersebut dibahas bahwa aktivitas degradasi biofilm terbaik ada pada konsentrasi 25%. Selain itu, penelitian lain oleh Ardiansyah *et al*. (2019) menggunakan metode mikrodilusi menunjukkan ekstrak etanol temulawak (*Curcuma xanthorrhiza*) (dapat secara menghambat biofilm *Candida albicans*. Pada penelitian tersebut digunakan 7 kelompok perlakuan, yakni 20%, 25%, 30%, 35%, 40% dan 45%. Dari penelitian tersebut dibahas bahwa KHBM dari ekstrak etanol temulawak tercapai pada konsentrasi 35%.

Berdasarkan kedua penelitian tersebut, terlihat bahwa ekstrak etanol daun kemangi lebih baik karena sudah dapat memberikan KHBM pada konsentrasi 20%.

Pembentukan biofilm *Candida albicans* bergantung pada kemampuannya untuk bertransisi antar morfologi yang berbeda. Untuk prevensi pembentukan biofilm, transisi morfologi dari bentuk ragi menuju bentuk *filamentous* perlu dihambat. Berdasarkan penelitian Khan *et al* (2014), ditemukan bahwa

kandungan *Ocimum sanctum* dapat menghambat transisi morfologi *C. albicans*,

yang menjadi dasar patogenesis dari pembentukan biofilm (Khan et al., 2014).

Daun kemangi dapat berperan sebagai antibiofilm karena mengandung beberapa komponen aktif antibiofilm seperti eugenol dan linalool. Linalool dan

Eugenol menghambat transisi morfologi *Candida albicans* melalui penghambatan pembentukan *germ tube* (Manoharan et al., 2017).

Penghambatan transisi tersebut, diperantarai dengan kemampuan eugenol dan linalool dalam meregulasi gen Efg1, Tec1, Bcr1, Ndt80, Brg1, dan Rob1. Gen-gen tersebut bertanggung jawab terhadap adhesi dan pembentuka hifa pada *Candida albicans* (Nobile dan Johnson, 2015). Berdasarkan uraian tersebut, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol daun kemangi memiliki sebagai penghambat pertumbuhan biofilm *Candida albicans* secara *in vitro*.

Keterbatasan penelitian ini adalah pengamatan terhadap biofilm dan efek dari perlakuan yang diberikan hanya setelah masa inkubasi selesai, tidak dilakukan secara *real time* (waktu ke waktu sepanjang masa inkubasi). Oleh karena itu, belum dapat diketahui perubahan intensitas biofilm dari waktu ke waktu. Karena keterbatasan metode dan bahan, Belum ditentukan secara pasti zat aktif dari ekstrak etanol daun kemangi yang memiliki kemampuan menghambat biofilm. Selain itu, belum diketahui pula efek lama penyimpanan ekstrak terhadap kandungan dan efektivitas dari zat aktif yang terkandung didalamnya, sehingga perlu dilakukan eksplorasi kembali metode dan lama penyimpanan ekstrak. Selain itu, dapat dipertimbangkan juga penggunaan isolat dari pasien, baik yang masih sensitif terhadap antimikroba ataupun yang telah resisten untuk generalisasi hasil penelitian yang lebih luas.

BAB VII

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil pemberian ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap pembentukan biofilm *Candida albicans*, dapat disimpulkan bahwa:

1. Ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) dapat menghambat pembentukan biofilm *Candida albicans* secara *in vitro*.
2. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*), semakin besar daya hambat pembentukan biofilm *Candida albicans* secara *in vitro*.
3. Kadar Hambat Biofilm Minimum (KHBM) dari ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap pembentukan biofilm *Candida albicans* secara *in vitro* adalah pada konsentrasi 20%

7.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan saya menyarankan hal-hal sebagai berikut:

1. Penelitian lebih lanjut mengenai zat aktif pada daun kemangi (*Ocimum sanctum*) yang memiliki efek menghambat pembentukan biofilm.
2. Penelitian lebih lanjut mengenai dosis efektif ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *Candida albicans* tanpa menimbulkan efek toksik.

3. Penelitian lebih lanjut mengenai uji toksisitas ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*).
4. Penelitian lebih lanjut mengenai efek lama simpan ekstrak terhadap efektivitas ekstrak daun kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai penghambat biofilm *Candida albicans*.
5. Potensi untuk mengembangkan penelitian yang menggunakan ekstrak etanol daun kemangi (*Ocimum sanctum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm *Candida albicans* secara *in vivo*.



DAFTAR PUSTAKA

Andes, D.R., Safdar, N., Baddley, J.W., Playford, G., Reboli, A.C., Rex, J.H., Sobel, J.D., Pappas, P.G. dan Kullberg, B.J., 2012. Impact of treatment strategy on outcomes in patients with candidemia and other forms of invasive candidiasis: a patient-level quantitative review of randomized trials. *Clinical infectious diseases*, 54(8): 1110-1122.

Andiyani DZP. 2014. *Efek Ekstrak rimpang Jahe Merah (Zingiber officinale var. Rubra) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm pada Staphylococcus aureus Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Univearsitas Brawijaya, Malang.

Ardiansyah, S., Hashiinah, F., Farida, R. and Puspitawati, R., 2019. Javanese Turmeric (*Curcuma Xanthorrhizxa* Roxb.) Ethanol Extract Has Inhibitory Effect on The Development of Intermediate Phase of *Candida Albicans* Biofilm. *Journal of International Dental and Medical Research*, 12(2): 460-464.

Bjarnsholt, T., Alhede, M., Alhede, M., Eickhardt-Sørensen, S.R., Moser, C., Kühl, M., Jensen, P.Ø. dan Høiby, N., 2013. The in vivo biofilm. *Trends in microbiology*, 21(9): 466-474.

Brooks, G. F., Jawetz, E., Melnick, J. L., dan Adelberg, E. A., 2013. *Jawetz, Melnick & Adelberg's medical microbiology*, 26th edition, McGraw-Hill Medical, New York.

Chauvel, M., Nesseir, A., Cabral, V., Znaidi, S., Goyard, S., Bachellier-Bassi, S., Firon, A., Legrand, M., Diogo, D., Naulleau, C. dan Rossignol, T., 2012. A versatile overexpression strategy in the pathogenic yeast *Candida albicans*: identification of regulators of morphogenesis and fitness. *PLoS One*, 7(9): 45912.

Christensen, G.D., Simpson, W.A., Anglen, J.O. dan Gainor, B.J., 2000. *Handbook of Bacterial Adhesion*, Humana Press, New Jersey.

Costerton, J.W., Stewart, P.S. and Greenberg, E.P., 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *science*, 284(5418): 1318-1322.

Dahlan M.S. 2009. *Statistik untuk Kedokteran Kesehatan*. Salemba Medika, Jakarta.

Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2001. *Inventaris tanaman obat Indonesia Jilid I*. Jakarta : Departemen Kesehatan RI.

Finkel, J.S. and Mitchell, A.P., 2011. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nature Reviews Microbiology*, 9(2): 109.

Ganguly, S. and Mitchell, A.P., 2011. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology*, 14(4): 380-385.

Gunardi, W.D., 2014. Peranan Biofilm dalam Kaitannya dengan Penyakit Infeksi. *Jurnal Kedokteran Meditek*, 15(39):1-9.

Hasan, H. dan Ariyani, D.D., 2016. Pengaruh Ekstrak Daun Kemangi (*Ocimum Basilicum* L) Terhadap Daya Tetas Telur Ikan Lele Dumbo (*Clarias Gariepinus*) yang Diinfeksi Jamur *Saprolegnia* sp. *Jurnal Ruaya: Jurnal Penelitian dan Kajian Ilmu Perikanan dan Kelautan*, 4(1).

Kapteyn, J.C., Hoyer, L.L., Hecht, J.E., Müller, W.H., Andel, A., Verkleij, A.J., Makarow, M., Van Den Ende, H. dan Klis, F.M., 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Molecular microbiology*, 35(3): 601-611.

Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L.A. dan Manzoor, N., 2010. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis dan membrane integrity. *Research in microbiology*, 161(10): 816-823.

Khan, A., Ahmad, A., Xess, I., Khan, L.A. dan Manzoor, N., 2014. *Ocimum sanctum* essential oil inhibits virulence attributes in *Candida albicans*. *Phytomedicine*, 21(4): 448-452.

Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N.Z. dan Hasnain, S.E., 2017. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 307(8): 481-489.

Kusuma, W., 2010. *Efek Ekstrak Daun Kemangi (Ocimum sanctum L.) terhadap Kerusakan Hepatosit Mencit akibat Minyak Sawit dengan Pemanasan Berulang*. Disertasi. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Lalitya, W. 2017. *Efek Ekstrak Etanol Daun Kemangi (Ocimum Sanctum) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm Burkholderia Cepacia Secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Macià M.D., Rojo-Molinero E., 2014. dan Oliver A., Antimicrobial susceptibility testing in biofilm-growing bacteria. *Clinical Microbiology and Infection*, 20(10): 981–990.

Madigan M.T., Martinko J.M., dan Brock T.D., 2006. *Brock Biology of Microorganisms*. 11th Edition, Pearson Prentice Hall, New Jersey, pp: 617-619.

Mallick E.M., dan Bennett R.J., 2013. Sensing of the Microbial Neighborhood by *Candida albicans*. *PLoS Pathog*, 9(10): e1003661.

Manoharan, R.K., Lee, J.H., Kim, Y.G., Kim, S.I. dan Lee, J., 2017. Inhibitory effects of the essential oils α -longipinene and linalool on biofilm formation and hyphal growth of *Candida albicans*. *Biofouling*, 33(2): 143-155.

Mathé, L. dan Van Dijck, P., 2013. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current genetics*, 59(4): 251-264.

Matthew J. 2016. *Efek Ekstrak Daun Teh Hijau (Camellia sinensis var. assamica) Sebagai Penghambat Pembentukan Biofilm pada Aggregatibacter actinomycetemcomitans secara In Vitro*. Tugas Akhir. Tidak diterbitkan, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang.

Mayer, F.L., Wilson, D. dan Hube, B., 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*, 4(2): 119-128.

Mubarak, Z., Humaira, A., Gani, B.A. and Muchlisin, Z.A., 2018. Preliminary study on the inhibitory effect of seaweed *Gracilaria verrucosa* extract on biofilm formation of *Candida albicans* cultured from the saliva of a smoker. *F1000Research*, 7(2018): 684-689.

Mutiawati, V.K. 2016. Pemeriksaan Mikrobiologi pada *Candida albicans*. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 16(1): 53-63.

Nobile, C.J. dan Johnson, A.D., 2015. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annual review of microbiology*, 69(2015): 71-92.

Noble, S.M., Gianetti, B.A. dan Witchley, J.N., 2017. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nature Reviews Microbiology*, 15(2): 96.

Notobroto BH. 2005. *Penelitian Eksperimental dalam Materi Praktikum Teknik Sampling dan Penghitungan Besar Sampel Angkatan III*. Lembaga Penelitian Universitas Airlangga. Surabaya.

Pattanayak, P., Behera, P., Das, D. dan Panda, S.K., 2010. *Ocimum sanctum* Linn. A reservoir plant for therapeutic applications: An overview. *Pharmacognosy reviews*, 4(7): 95.

Piras, A., Gonçalves, M.J., Alves, J., Falconieri, D., Porcedda, S., Maxia, A. and Salgueiro, L., 2018. *Ocimum tenuiflorum* L. and *Ocimum basilicum* L., two spices of Lamiaceae family with bioactive essential oils. *Industrial Crops and Products*, 113(2018): 89-97.

Ruchi T, Sujata B, Anuradha D. 2015. *Comparison of Phenotypic Methods for the Detection of Biofilm Production in Uro-Pathogens in a Tertiary Care Hospital in India*. <http://www.ijcmas.com/vol-4-9/Tayal%20Ruchi,%20et%20al.pdf>.

Rutherford ST, Bassler BL. 2012. *Bacterial Quorum Sensing: Its Role in Virulence and Possibilities for Its Control*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3543102/>.

Siregar, R.S. 2005. *Penyakit Jamur Kulit*. ECG, Jakarta.

Sjarifuddin, P.K. dan Wahyuningsih, R., 2012. ISOLASI SPESIES CANDIDA DARI TINJA PENDERITA HIV/AIDS. *Makara Seri Kesehatan*, 6(2): 50-55.

Staniszewska, M., Bondaryk, M., Siennicka, K., dan Kurzatkowski, W., 2012. Ultrastructure of *Candida albicans* pleomorphic forms: phase-contrast microscopy, scanning and transmission electron microscopy. *Polish Journal of Microbiology*. 61(2): 129–35.

Susanto, L.R.D., Nuryanti, A. and Wahyudi, I.A., 2012. Efek Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum Basilicum L.*) Sebagai Agen Penghambat Pembentukan Biofilm *Streptococcus Mutans*. *Insisiva Dental Journal*, 2(1).

Tjampakasari, C.R., 2006, *Cermin Dunia Kedokteran Volume 151: karakteristik Candida albicans*.

Tortora, G. J., Funke, B. R., dan Case, C. L., 2010. *Microbiology: An introduction*, edisi kesepuluh. Pearson Benjamin Cummings, San Fransisco.

Tournu, H. dan Van Dijck, P., 2012. Candida biofilms and the host: models and new concepts for eradication. *International journal of microbiology*, 2012: 1-16.

Tsui, C., Kong, E.F. dan Jabra-Rizk, M.A., 2016, Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and disease*. 74(4).

Turan, H. dan Demirbilek, M., 2018. Biofilm-forming capacity of blood-borne *Candida albicans* strains and effects of antifungal agents. *Revista Argentina de microbiologia*, 50(1): 62-69.

Van Acker, H., Van Dijck, P. dan Coenye, T., 2014. Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in microbiology*, 22(6): 326-333.