

**UJI EFEKTIVITAS ANTIBIOFILM EKSTRAK METANOL RIMPANG KUNYIT
(*Curcuma longa*) TERHADAP *Candida albicans* ATCC 10231**

Karya Tulis Ilmiah

Untuk Memenuhi Sebagai Syarat
Memperoleh Derajat Sarjana Kedokteran

**Program Studi Kedokteran
Program Sarjana**



Oleh

Soviyanti Wulandari

16711059

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
2020**

**A STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF ANTIBIOFILM METHANOL EXTRACT OF TUMERIC
RHOMBUS (*Curcuma longa*) AGAINST *Candida Albicans* ATCC 10231**

Scientific Writing

As a Requirement for the Degree of Undergraduate Program in Medicine

Undergraduate Program in Medicine



الجامعة الإسلامية
الاستوائية
الاندونيسية

by:

Soviyanti Wulandari

16711059

**FACULTY OF MEDICINE
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
YOGYAKARTA
2020**

KARYA TULIS ILMIAH

**UJI EFEKTIVITAS ANTIBIOFILM EKSTRAK METANOL RIMPANG
KUNYIT
(*Curcuma longa*) TERHADAP *Candida albicans* ATCC 10231**

Disusun dan diajukan oleh:

ISLAM

Soviyanti Wulandari

16711059

Telah diseminarkan tanggal: 12 Oktober 2020

dan telah disetujui oleh :

Penguji

Pembimbing

Dr. dr. Farida Juliantina R., M. Kes

dr. Irena Agustiningtyas, M.Sc

NIK 017110101

NIK 097110404

Ketua Prodi Program Sarjana Kedokteran



dr. Umatul Khoiriyah, M. Med. Ed

NIK 047110101

disahkan oleh:

Dekan



dr. Linda Rosita, M. Kes., Sp. PK

NIK 017110102

UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA

PERNYATAAN PUBLIKASI

Bismillahirrahmaanirrahiim

Yang bertanda tangan di bawah ini, saya

Nama : Soviyanti Wulandari
NIM : 16711059
Judul KTI : Uji Efektivitas Antibiofilm Ekstrak Metanol Rimpang
Kunyit (*Curcuma longa*) terhadap *Candida albicans*
ATCC 10231
Dosen Pembimbing : dr. Irena Agustiningtyas, M.Sc

Dengan ini menyatakan bahwa :

Memberi Ijin kepada Perpustakaan FK UII mempublikasikan di repository UII, berupa :

- ~~Laporan KTI (full text)~~
- Abstrak saja
(coret yang tidak diperlukan)


Demikian pernyataan ini dibuat dengan sesungguhnya dan dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Yogyakarta, 29 Oktober 2020

Dosen Pembimbing


dr. Irena Agustiningtyas, M.Sc
NIK 097110404

Yang Menyatakan


Soviyanti Wulandari
16711059

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL (Bahasa Indonesia).....	i
HALAMAN JUDUL (Bahasa Inggris).....	ii
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN PUBLIKASI.....	iv
DAFTAR ISI	v
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN.....	x
HALAMAN PERNYATAAN.....	xi
KATA PENGANTAR.....	xii
INTISARI.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang Masalah.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	2
1.4 Keaslian Penelitian.....	3
1.5 Manfaat Penelitian	4
BAB II. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Telaah Pustaka	5
2.1.1 <i>Candida albicans</i>	5
2.1.2 Biofilm <i>Candida albicans</i>	6
2.1.3 Rimpang Kunyit.....	7
2.1.4 Kerangka Teori	10
2.1.5 Kerangka Konsep Penelitian	10
2.1.6 Hipotesis.....	10
BAB III. METODE PENELITIAN	11
3.1 Rancangan Penelitian	11
3.2 Tempat dan Waktu Penelitian	11
3.3 Subyek Penelitian	11
3.4 Identifikasi Variabel.....	11

3.4.2	Variabel Terikat.....	11
3.4.3	Definisi Operasional.....	11
3.5	Instrumen Penelitian.....	12
3.5.1	Alat Penelitian.....	12
3.5.2	Bahan Penelitian.....	12
3.6	Tahap Penelitian.....	12
3.6.1	Persiapan Rimpang Kunyit (<i>Curcuma longa</i>).....	12
3.6.2	Pembuatan Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit (<i>Curcuma longa</i>)	13
3.6.3	Uji Metabolit Sekunder.....	13
3.6.4	Sterilisasi Alat.....	14
3.6.5	Purifikasi dan Karakterisasi <i>Candida albicans</i>	14
3.6.6	Pembuatan suspensi <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 untuk Uji Antifungal.....	14
3.6.7	Penentuan Kadar Hambat Minimum dan Kadar Bunuh Minimum.....	15
3.6.8	Pembuatan suspensi <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 untuk Uji Biofilm dan Antibiofilm.....	17
3.6.9	Uji Pembentukan Biofilm <i>Candida albicans</i> ATCC 10231.....	17
3.6.10	Uji Kemampuan Antibiofilm.....	19
3.7	Metode Analisis Data.....	22
3.8	Etika Penelitian.....	22
BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN.....		23
4.1	Hasil.....	23
4.1.1	Gambaran Penelitian.....	23
4.1.2	Hasil Determinasi <i>Curcuma longa</i>	23
4.1.3	Hasil Ekstraksi Rimpang Kunyit <i>Curcuma longa</i>	23
4.1.4	Hasil Uji Metabolit Sekunder.....	23
4.1.5	Hasil Purifikasi dan Karakterisasi <i>Candida albicans</i>	24
4.2	Pembahasan.....	28
4.2.1	Pembahasan Purifikasi dan Karakterisasi <i>Candida albicans</i>	28
4.2.2	Pembahasan Penentuan KHM dan KBM.....	29
4.2.3	Pembahasan Pembentukan Biofilm.....	30
4.2.4	Pembahasan Uji Antibiofilm.....	30
BAB V. PENUTUP.....		33
5.1	Kesimpulan.....	33

5.2 Saran.....	33
DAFTAR REFERENSI	34



DAFTAR GAMBAR

	Halaman
Gambar 1 Morfologi <i>Candida albicans</i>	5
Gambar 2 Pembentukan biofilm pada <i>Candida albicans</i>	6
Gambar 4 <i>Curcuma longa</i>	7
Gambar 5 Kerangka Teori	10
Gambar 6 Kerangka Konsep.....	10
Gambar 7 Uji Antifungal.....	16
Gambar 8 Uji Pembentukan Biofilm	18
Gambar 9. Uji Antibiofilm	21
Gambar 10 Alur Kerja Penelitian.....	22
Gambar 11 pengecatan Gram dan KOH.....	24
Gambar 12 Pewarnaan dengan LPCB.....	24
Gambar 13 Hasil Uji Antifungal pada microplate dan SDA	25
Gambar 14 Hasil uji pertumbuhan biofilm <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 dan <i>Staphylococcus epidermidis</i> non biofilm	26
Gambar 15 Diagram Pembentukan Biofilm <i>Candida albicans</i> melalui Metode <i>Microtiter Plate Biofilm Assay</i> (OD _{620nm})	26
Gambar 16 Hasil Uji Antibiofilm	27
Gambar 17 Diagram Aktivitas Penghambatan Biofilm <i>Candida albicans</i> melalui Metode <i>Microtiter Plate Biofilm Assay</i> (OD _{620nm})	27

DAFTAR TABEL

	Halaman
Tabel 1 Tabel Keaslian Penelitian.....	3
Tabel 2 Kandungan kunyit	8
Tabel 3 Lanjutan.....	9
Tabel 4 Definisi operasional.....	12
Tabel 5 Hasil Uji Metabolit Sekunder	23
Tabel 6 Nilai absorbansi/OD Pembentukan Biofilm.....	26
Tabel 7 Densitas Optik penghambatan Biofilm <i>Candida albicans</i>	28
Tabel 8 Hasil analisis <i>post-hoc Bonfferoni</i>	28



DAFTAR LAMPIRAN

	Halaman
Lampiran I <i>Minimum information guideline to assess biofilm formation</i>	40
Lampiran II <i>Ethical Clearance</i>	41
Lampiran III Hasil Determinasi Tanaman Kunyit (<i>Curcuma longa</i>)	42
Lampiran IV Hasil Uji Metabolit Sekunder Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit	43
Lampiran V Analisis Statistik Aktivitas Penghambatan Biofilm	45



HALAMAN PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa Karya Tulis Ilmiah dengan judul “**Uji Efektivitas Antibiofilm Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit (*Curcuma longa*) terhadap *Candida albicans* ATCC 10231**” ini tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar kesarjanaan di suatu perguruan tinggi, dan sepanjang sepengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.



Yogyakarta, 2 Oktober 2020



Soviyanti wulandari

KATA PENGANTAR

Assalamu'alaikum Wr. Wb.

Bismillahirrahmanirrahim

Alhamdulillahirabbil'alamin, segala puji bagi Allah SWT yang telah memberikan hidayah, karunia serta limpahan rahmatNya sehingga Karya Tulis Ilmiah dengan judul **“Uji Efektivitas Antibiofilm Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit (*Curcuma Longa*) terhadap *Candida albicans* ATCC 10231”** ini dapat diselesaikan dengan baik. Shalawat serta salam kepada baginda Nabi Muhammad SAW karena dengan perantara beliau kita dapat menikmati indahnya Islam dan iman serta mengeluarkan kita dari kebodohan menuju dunia yang lebih baik dan beradab.

Karya Tulis Ilmiah yang saya buat ini untuk memenuhi persyaratan guna memperoleh gelar Sarjana Strata 1 (S1) pada Program Studi Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia. Selama proses pembuatan karya ini tidak lepas dari kendala dan kesulitan, namun berkat bimbingan, lantunan doa, arahan serta pertolongan dari berbagai pihak kepada penulis sehingga karya tulis ilmiah ini dapat terselesaikan. Maka dari itu pada kesempatan ini peneliti ingin mengucapkan terimakasih serta penghargaan yang mendalam kepada:

1. dr. Linda Rosita, M.Kes., Sp.PK selaku dekan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dan dr. Umatul Khoiriyah, M.Med.Ed, Ph.D, selaku ketua Program Studi Kedokteran Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia.
2. dr. Irena Agustiningtyas, M.Sc selaku pembimbing dan Dr. dr. Farida Juliantina R., M. Kes selaku penguji yang telah memberikan banyak arahan, saran, motivasi, bimbingan dan kemudahan dalam penyusunan karya tulis ini serta selalu memberikan kesempatan untuk peneliti terus belajar. Semoga Allah senantiasa menjaga dan merahmati beliau.
3. dr. Yasmini Fitriyati, Sp.OG selaku Dosen Pembimbing Akademik yang selalu memebrikan dukungan, doa dan motivasi kepada peneliti dalam menjalankan perkuliahan di fase preklinik.
4. Ayah dan ibu tersayang Ir. Solikamto dan Naomi Levirosa Salmun, Amd. yang senantiasa memberikan dukungan moral dan material, memberikan kasih sayang dan kesabaran luarbiasa yang tidak akan dapat Sovi balas sehingga Sovi dapat tumbuh dan belajar hingga

sekarang serta dapat menyelesaikan salah satu tahapan menuju seorang dokter yang dapat bermanfaat bagi agama dan juga bangsa. Semoga Allah senantiasa menyayangi mereka sebagaimana mereka menyayangi Sovi sejak kecil.

5. Bapak Afivudien selaku Laboran Mikrobiologi FKUII yang telah sabar dan membantu terlaksananya penelitian ini hingga selesai.
6. Adikku Dwi Ayu Setyaningrum yang selalu memberikan dukungan, doa dan pengingat yang sangat berharga hingga saat ini dan kepada teman yang selalu memberikan semangat dan doa, Ratu Syifa Qolbuna, Sausan, Tresna Domara, Husnul Khotimah, Kanesti Ismirajna Grehaswara T, Indah Rizqiatul Maula Hasim, Muhammad Fariz, Desi Arianing Arrum, Aji Nur Sahid, M. Hafiz Nurwahyu Aliffrananda, Cahaya Brigavida, Azhar, Annisa Muthia Ahmad, Medina Putri yang telah bersedia menemani, menghibur, membantu dalam segala lika liku dalam pengerjaan Karya Tulis ini dan kehidupan dalam suka dan duka.
7. Semua pihak yang terlibat dan telah membantu dalam penelitian dan penulisan Karya Tulis Ilmiah ini yang tidak dapat peneliti sebutkan satu persatu.

Dalam proses penulisan Karya Tulis Ilmiah ini, penulis menyadari masih terdapat banyak kekurangan dan ketidaksempurnaan didalamnya, makadari itu peneliti selaku penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun sehingga karya tulis ilmiah yang peneliti buat ini dapat memberikan manfaat bagi agama, bangsa dan pengembangan ilmu pengetahuan alam. Aamiin.

Billahitaufiq walhidayah,

Wallahamdulillah, Wassalamu'alaikum Wr.Wb.

Yogyakarta 2 Oktober 2020

Soviyanti Wulandari

UJI EFEKTIVITAS ANTIBIOFILM EKSTRAK METANOL RIMPANG KUNYIT (*Curcuma longa*) TERHADAP *Candida albicans* ATCC 10231

Soviyanti Wulandari¹, Irena Agustiningtyas²

¹Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

²Departemen Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia

INTISARI

Latar belakang: *Curcuma longa* Linn tanaman rempah yang termasuk kelompok jahe-jahean atau *Zingiberaceae* yang memiliki kemampuan sebagai antifungal, sehingga berpotensi dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* yang menyebabkan infeksi. Penelitian ini bertujuan untuk menguji efektifitas antibiofilm rimpang kunyit *Curcuma longa* sebagai alternatif dalam menghambat biofilm *Candida albicans*

Metode Penelitian: Penelitian dilakukan secara eksperimental *in vitro* dengan pendekatan *post-test only control group design*. Rimpang kunyit (*Curcuma longa*) dimaserasi dengan pelarut metanol. Ekstrak dibagi menjadi konsentrasi 80%,40%,20%,10% dan 5%. Uji antibiofilm menggunakan *microtiter plate biofilm assay* pada mikroplate *round-bottom 96 well*. Kemudian diamati dengan menghitung nilai absorbansi/densitas optik menggunakan *microplate reader* ($\lambda = 620 \text{ nm}$). Efektivitas sebagai antibiofilm juga dianalisis secara statistik dengan menggunakan One-Way ANOVA ($p < 0,05$) dilanjutkan *post-hoc Bonfferoni*.

Hasil: *Curcuma longa* pada konsentrasi ekstrak 20%,10%, dan 5% menunjukkan persentase konsentrasi penghambatan biofilm minimal sebesar 57,6%; 56,1%; dan 55,3%. Analisis statistik menunjukkan ekstrak uji memiliki efek sama dengan kontrol positif (antifungal).

Kesimpulan: Ekstrak metanol rimpang kunyit (*Curcuma longa*) memiliki efektifitas sebagai antibiofilm

Kata Kunci: *Curcuma longa*, antifungal, antibiofilm, *Candida albicans*, *microtiter plate*

**A STUDY OF THE EFFECTIVENESS OF ANTIBIOFILM METHANOL
EXTRACT OF TURMERIC RHOMBUS (*Curcuma longa*) AGAINST
Candida Albicans ATCC 10231**

Soviyanti Wulandari¹, Irena Agustiningtyas²

¹ Student of the Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia

² Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia

ABSTRACT

Background: *Curcuma longa* Linn herbal plants that belong to the Zingiberaceae gingers or who has the ability as an antifungal, so the potential to inhibit the growth of *Candida albicans* that causes the infection. This study aims to test the effectiveness of *Curcuma longa* turmeric rhizome antibiofilm as an alternative in inhibiting *Candida albicans* biofilm.

Method: The study was conducted in vitro experimental with a post-test only control group design approach. Turmeric rhizome (*Curcuma longa*) was macerated with methanol as a solvent. The extract was divided into concentrations of 80%, 40%, 20%, 10%, and 5%. Antibiofilm assay using a microtiter plate biofilm assay on 96 well round-bottom microplates. Then observed by calculating the absorbance value/optical density using a microplate reader ($\lambda = 620$ nm). The effectiveness as an antibiofilm was also analyzed statistically using One-Way ANOVA ($p < 0.05$) followed by post-hoc Bonfferoni.

Result: *Curcuma longa* extract at a concentration of 20%, 10%, and 5% showed biofilm inhibition of 57.6%, 56.1%; and 55.3%, respectively. Statistical analysis showed that the test extract had the same effect as a positive control (antifungal).

Conclusion: The methanol extract of turmeric rhizome (*Curcuma longa*) has effectiveness as an antibiofilm.

Keywords: *Curcuma longa*, antifungal, antibiofilm, *Candida albicans*, microtiter plate

BAB I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang Masalah

Candida sp. adalah jamur patogen yang paling umum pada manusia dan merupakan agen penyebab dari kandidiasis superfisial dan sistemik, sehingga memberikan morbiditas berat pada jutaan individu di dunia (Zeuko´o *et al.*, 2016). *Candida sp.* adalah organisme komensal dan untuk menjadi patogen dibutuhkan keadaan immunosupresan inang. Oleh karena itu, faktor risiko umum dari infeksi *Candida sp.* termasuk penurunan kekebalan tubuh, diabetes melitus, dan faktor *iatrogenic* seperti penggunaan obat intravena, penggunaan antibiotik, dan cairan hiperlimentasi (Golia *et al.*, 2012). Kandidiasis merupakan penyakit oportunistik yang mengkhawatirkan karena terdapat peningkatan kejadian pada pasien dengan gangguan kekebalan, pasien yang menerima kemoterapi kanker anti bakteri yang agresif dan berkepanjangan, atau pada pasien yang menjalani transplantasi organ (Golia *et al.*, 2012).

Penelitian di wilayah Littoral Cameroon tepatnya di Rumah Sakit distrik Nylon menunjukkan prevalensi kandidiasis oral dan vagina pada tahun 2012 adalah 52,6% dan 29,7% (Njunda, A. L. *et al.*, 2012). Penelitian serupa di Rumah Sakit Baptis Mutengene di wilayah barat daya pada tahun 2013 menunjukkan prevalensi kandidiasis oral di antara pasien HIV adalah 66,7% (Njunda, L. A. *et al.*, 2013). Telah dilaporkan bahwa tingkat kematian oleh infeksi invasif adalah 40% dan *Candida albicans* bertanggung jawab atas 50-60% kasus kandidiasis invasif (Zeuko´o *et al.*, 2016). Salah satu faktor yang berpengaruh terhadap virulensi *Candida sp.* adalah kemampuan pembentukan komunitas mikroba yang menempel dan dikenal sebagai biofilm (Seneviratne *et al.*, 2008).

Pembentukan biofilm tersebut membantu mikroorganisme menghindari pertahanan dari inang, menjadi sumber infeksi yang persisten, dan meningkatkan resistensi terhadap agen antifungal (Golia *et al.*, 2012). Selain meningkatkan resistensi terhadap senyawa antifungal, biofilm pada *Candida* juga mengandung toksisitas senyawa yang tinggi (Shreaz *et al.*, 2011).

Beberapa antifungal seperti Amphotericin B dan agen fungisidal *polyene* efektivitasnya mulai menurun dan dapat menyebabkan hepatotoksitas serta nefrotoksitas. Oleh karena itu dibutuhkan antifungal yang lebih efektif dengan

tingkat toksisitas lebih rendah (Pan *et al.*, 2009). Menurut *World Health Organization* (WHO), 80% populasi dunia menggunakan terapi alami dan obat-obatan tradisional yang berasal dari alam (WHO, 2003). Kunyit (*Curcuma longa*), sebagai obat herbal tradisional yang sering digunakan di Asia Tenggara, memiliki banyak senyawa yang biasanya digunakan dalam makanan dan kosmetik. Berdasarkan penelitian terdahulu didapatkan bahwa *Curcuma longa* memiliki sifat terapeutik sebagai insektisida, antimikroba, antifungal, antimalaria, antiviral, dan antioksidan. Tanaman ini juga dilaporkan memiliki aktivitas toksik yang dapat mengganggu perkembangan miselium (Chen *et al.*, 2018).

Penelitian ini dilakukan karena belum adanya penelitian yang menguji tentang kegunaan *Curcuma longa* sebagai antibiofilm terhadap *Candida sp* dan agar lebih mengetahui efektifitas kunyit sebagai antibiofilm *Candida albicans*. Penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Pajaree Kawsud, Jindaporn Puripattanavong dan Rawee Teanpaisan pada tahun 2014 menggunakan *Curcuma zedoaria* sebagai antibiofilm terhadap *Candida albicans* ATCC 10231, *Candida albicans* ATCC 90028, dan beberapa jenis *Candida sp* lainnya. Sedangkan pada penelitian Chen *et al.*, 2018 *Curcuma longa* digunakan sebagai antifungal dari *Fusarium graminearum* (Chen *et al.*, 2018; Kawsud *et al.*, 2014).

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak metanol kunyit (*Curcuma longa*) efektif dalam menghambat biofilm *Candida albicans* ATCC 10231?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui efektifitas ekstrak metanol kunyit (*Curcuma longa*) terhadap biofilm *Candida albicans* ATCC 10231

1.4 Keaslian Penelitian

Tabel 1 Tabel Keaslian Penelitian

No	Nama Peneliti / Judul Penelitian	Tahun	Hasil Penelitian	Persamaan	Perbedaan
1.	Chylen Setiyo Rini, Jamilatur Rohmah, Leni Yuroh Widyaningrum/ Efektivitas Kunyit (<i>Curcuma longa</i> Linn) terhadap <i>Esherichia coli</i> dan <i>Bacillus subtilis</i>	2018	Ekstrak kering kunyit memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri <i>E. coli</i> dan <i>Bacillus subtilis</i> .	Variabel bebas: Kunyit	Subjek penelitian: <i>Candida sp</i> ATCC 10231 Sebelumnya: <i>E. coli</i> dan <i>Bacillus subtilis</i>
2.	Zeuko'o M. Elisabeth, Virginio C. Lopez, Sara M. Soto and Fekam B. Fabrice/ <i>Anti-candida biofilm properties of Cameroonian plant extracts</i>	2016	Ekstrak yang diteliti memiliki aktivitas antimikroba dan menghambat pembentukan biofilm pada konsentrasi yang diuji, dan menunjukkan kerja senyawa bioaktif dari ekstrak tanaman di daerah Cameroon	Subjek penelitian: <i>Candida sp</i> ATCC 10231	Variabel bebas: Curcuma longa Sebelumnya: tanaman pada daerah Cameroon
3.	Ciqiong Chen, Li Long, Fusheng Zhang, Qin Chen, Cheng Chen, Xiaorui Yu, Qingya Liu, Jinku Bao, Zhangfu Long / <i>Antifungal activity, main active components and mechanism of Curcuma longa extract against Fusarium graminearum</i>	2018	Ekstrak etanol <i>C. longa</i> dapat mengganggu sintesis protein penting dan enzim, yang akhirnya dapat menghambat pertumbuhan jamur. Efek antifungal ditemukan terkait gangguan sistem membran sel jamur, khususnya hambatan terhadap sintesis ergosterol dan rantai pernapasan.	Variabel bebas: Kunyit	Subjek penelitian: <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 Sebelumnya: <i>Fusarium graminearum</i>

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat:

1. Untuk mengetahui manfaat ekstrak metanol kunyit (*Curcuma longa*) dalam menghambat pembentukan biofilm *Candida albicans* ATCC 10231
2. Sebagai sumbang sih khasanah dalam ilmu pengetahuan mengenai bahan alam yang dapat bermanfaat sebagai antibiofilm terhadap *Candida albicans* ATCC 10231
3. Dapat digunakan sebagai salah satu acuan untuk studi lanjut mengenai pengobatan dari bahan alam khususnya mengenai ekstrak metanol kunyit (*Curcuma longa*)



BAB II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Telaah Pustaka

2.1.1 *Candida albicans*

Candida adalah jamur tipe yeast yang umumnya menyebabkan infeksi pada bagian kulit. *Candida* memiliki beberapa spesies yang bersifat sebagai patogen, dan yang paling umum adalah *Candida albicans* (Dowd, 2007). *Candida* merupakan jamur tipe yeast gram positif uniseluler yang bereproduksi dengan spora yang dibentuk langsung dari hifa tanpa adanya peleburan inti dan berbentuk tunas *Candida albicans* memiliki 3 bentuk morfologi yang berbeda yaitu yeast, pseudohifa dan hifa, kemampuan berubah antara bentuk dikontrol oleh genetik dan sejumlah faktor dari lingkungan (Bedard & Drummond, 2016). Morfologi *Candida albicans* ditunjukkan pada Gambar 1.



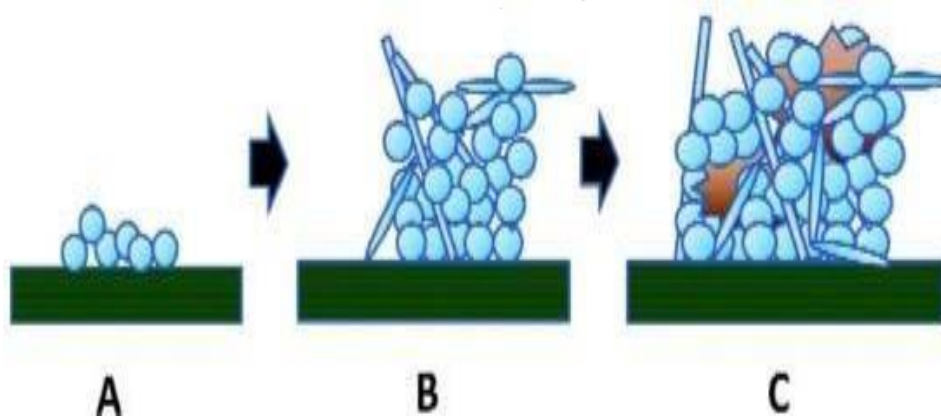
Gambar 1. Morfologi *Candida albicans* (Bedard & Drummond, 2016)

Candida albicans menyebabkan berbagai jenis infeksi yang dibagi menjadi 2 grup yaitu mucosal dan sistemik. Infeksi mucosal biasanya muncul pada wanita yang biasa disebut kandidiasis vulvovaginalis, sekitar 75% wanita dewasa akan mengalami setidaknya sekali selama hidup. *Candida albicans* dapat menginfeksi mulut atau oral kandidiasis yang dapat menjadi masalah pada bayi baru lahir dan usia lanjut (Bedard & Drummond, 2016)). Pada kejadian rekurensi kandidiasis vulvovaginalis, sel yeast *Candida albicans* yang awalnya mampu ditoleransi oleh sel inang dalam batas rendah di epitel vagina dengan cara dihambat transisinya agar tidak menjadi hifa, jika mengalami kegagalan hifa yang terbentuk dapat menjadi biofilm yang akan melekat kuat dan menyerang sel epitel dinding vagina. Biofilm kemudian bercampur dengan sel sel inflamasi, sisa sel epitel yang telah

dilisiskan dan cairan vagina menjadi keputihan yang merupakan salah satu gejala kandidiasis vulvovaginalis (Cassone, 2015). Infeksi sistemik atau kandidiasis diseminata adalah penyakit yang serius dan dapat terjadi ketika seorang pasien mengalami immunosupresi dan *Candida albicans* yang seharusnya dapat dikendalikan oleh sistem imun tubuh menyerang jaringan dan memasuki aliran darah. *Candida albicans* umumnya hidup di usus oleh karena itu, invasi dinding usus melalui ulkus atau luka dapat dianggap salah satu cara terjadinya kandidiasis diseminata. Selain itu *Candida albicans* juga dapat tumbuh pada perangkat medis seperti kateter intravena (Mayer *et al.*, 2013).

2.1.2 Biofilm *Candida albicans*

Biofilm dapat didefinisikan sebagai komunitas mikroorganisme yang terikat secara *irreversible* pada suatu permukaan, mengandung matriks ekopolimerik dan sifat fenotipik yang khas. Sifat fenotipik yang paling penting dari pembentukan biofilm adalah resistensi antimikroba, *Candida albicans* adalah salah satu spesies dari *Candida* yang mampu membentuk biofilm (Sida *et al.*, 2016). Terdapat hipotesis bahwa pembentukan biofilm *Candida albicans* terdiri 3 tahap yaitu fase awal berupa *adherence* sel ragi ke permukaan, fase menengah berupa pembentukan matriks ekstraseluler dengan pergantian dimorfik dari *yeast* ke bentuk hifa, dan fase pematangan berupa peningkatan rekrutmen bahan matriks ekstraseluler untuk membentuk struktur tiga dimensi dari biofilm (Wibawa, 2012). Proses pembentukan biofilm *Candida albicans* ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Pembentukan biofilm pada *Candida albicans* (Wibawa, 2012)

2.1.3 Rimpang Kunyit

Kunyit atau kunir adalah tanaman rempah yang terkenal di Asia Tenggara, kunyit termasuk kelompok jahe-jahean atau *Zingiberaceae* dengan nama latin *Curcuma longa* Linn. syn. *Curcuma domestica* Val. Selain digunakan sebagai bahan masakan, kunyit juga sering digunakan sebagai obat tradisional. Kunyit memiliki banyak manfaat yaitu sebagai antifungal, antibakterial, dan antioksidan (Zorofchian Moghadamtousi *et al.*, 2014).

Dalam taksonomi tanaman kunyit dikelompokkan sebagai berikut:

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Subdivisi : Angiosperms
Kelas : Monocotyledonae
Ordo : Zingiberales
Famili : Zingiberaceae
Genus : *Curcuma*
Species : *Curcuma longa*

Tanaman kunyit dapat tumbuh bercabang dengan tinggi 40-100 cm, memiliki batang semu, bulat, tegak dan membentuk akar atau rimpang dengan warna kuning dan tersusun dari pelepah daun. Kunyit memiliki daun tunggal berbentuk bulat telur yang dapat memanjang hingga 10-40 cm, memiliki lebar 8-13 cm dan tulang daun menyirip dengan warna hijau (Kusbiantoro & Purwaningrum, 2018).



Gambar 3. Kunyit (*Curcuma longa*) (Kusbiantoro & Purwaningrum, 2018).

Kunyit memiliki banyak kandungan zat metabolit sekunder, di antaranya adalah karbohidrat, protein, zat pati, asam amino, glikosida, flavonoid, alkaloid, tannin, dan saponin yang berhasil diisolasi dengan menggunakan metode ekstraksi metanol (Jyoti & Rajeshwari, 2012). Selain 10 metabolit sekunder tersebut, ekstrak metanol dapat menunjukkan lebih banyak zat metabolit sekunder daripada ekstrak etanol dimana ekstrak metanol terdapat 16 zat dan etanol 13 zat yang dijelaskan pada Tabel 2 dan 3 (Sawant & Godghate, 2013).

Tabel 2. Kandungan kunyit (Sawant & Godghate, 2013)

<i>Phytochemical</i>	<i>Acetone</i>	<i>Methanol</i>	<i>Ethanol</i>	<i>Chloroform</i>
Alkaloids				
Wagner's	+	+	+	-
Dragen droff's	+	+	+	+
Hager's	+	-	+	+
Saponin	+	+	+	+
Steroid	-	+	-	+
Tannin	+	+	+	-
Anthocyanin	+	+	+	+
Coumarin	-	+	-	-
Emodins	+	+	+	+
Protein	-	+	-	-
Amino Acid	-	+	-	-
Flavonoids				
10% NaOH	+	+	-	-
10% NH ₄ OH	+	+	-	-
Mg test	+	+	+	+
Zn test	-	+	-	-
Diterpenes	+	+	+	-
Phytosterol	+	+	-	-
Phenol	+	+	-	-
Phlobatannin	+	+	+	+
Leucoanthocyanin	+	+	+	+
Anthroquinone	+	+	+	+
Chalcones	+	+	+	+
Cardiac Glycosides				
Legal's test	+	+	+	+
Kellar-Killiani test	+	+	+	+

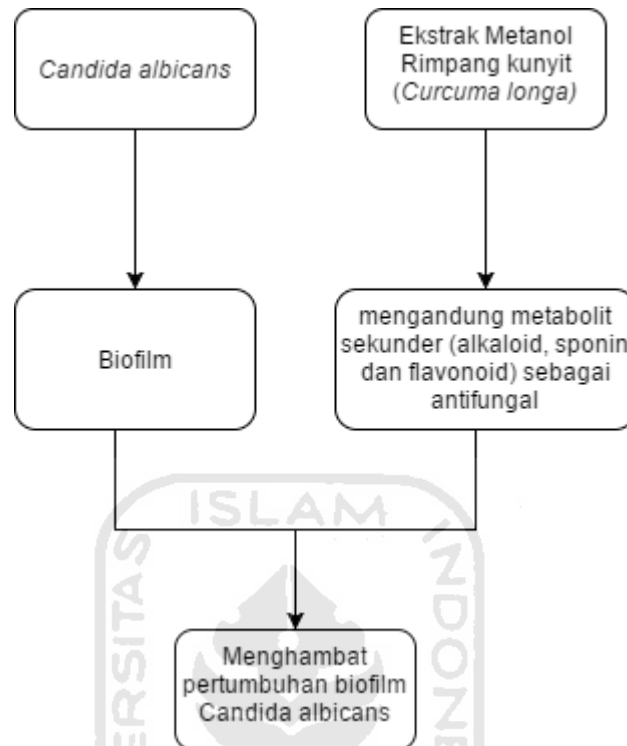
Tabel 3. Lanjutan

<i>Phytochemical</i>	<i>Acetone</i>	<i>Methanol</i>	<i>Ethanol</i>	<i>Chloroform</i>
Carbohydrate				
Molisch's	+	+	+	+
Barfoed	+	+	+	+
Iodine	+	-	+	+
Fehling	+	+	+	+
Benedict	-	-	-	-

Alkaloid dianggap memiliki aktivitas antimikroba yang bekerja dengan cara menghambat esterase, DNA, dan RNA polymerase. Alkaloid juga mampu menghambat respirasi sel dan memiliki peran dalam interkalasi DNA (Dewi *et al.*, 2019). Flavonoid dapat menghambat pertumbuhan jamur dengan cara menghambat pembelahan atau proliferasi sel dengan senyawa genestein, senyawa ini dapat mengikat protein di mikrotubulus dalam sel dan mampu mengganggu proses mitosis yang akhirnya mengganggu pertumbuhan jamur (Bhaskara, 2012). Saponin dapat mengganggu permeabilitas membran sel jamur, di mana peningkatan permeabilitas menyebabkan cairan intrasel keluar dan menyebabkan jamur mengalami kematian (Yanti *et al.*, 2016).

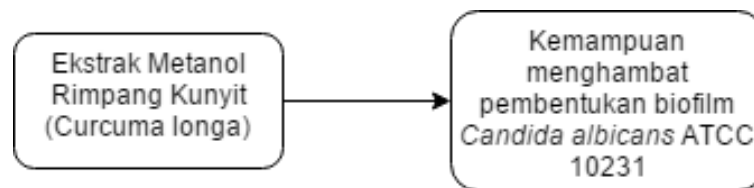
Tannin juga dianggap memiliki efek dalam menghambat pertumbuhan atau membunuh *Candida albicans*. Tannin bekerja dengan cara menyitukan dan mengendapkan protein dalam larutan dan menyebabkan munculnya senyawa yang tidak larut, tannin juga memiliki efek antioksidan dan antiseptik yang dapat berperan sebagai pertahanan tubuh terhadap *Candida albicans* (Bhaskara, 2012)

2.1.4 Kerangka Teori



Gambar 4. Kerangka Teori

2.1.5 Kerangka Konsep Penelitian



Gambar 5. Kerangka Konsep

2.1.6 Hipotesis

Ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) efektif dalam menghambat pertumbuhan biofilm *Candida albicans* ATCC 10231.

BAB III. METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan penelitian *post-test only control group design* secara *in vitro*. Metode yang digunakan adalah *Microtiter Plate Biofilm Assay* untuk melihat efek ekstrak kunyit (*Curcuma longa*) dalam menghambat pembentukan biofilm terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 (Hasan Zaba, 2015).

3.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Proses determinasi tumbuhan dilakukan di Laboratorium Sistemika Tumbuhan Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada dan untuk ekstraksi tanaman dilakukan di Laboratorium Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia (FMIPA UII). Uji biofilm *Candida albicans* dan kemampuan antibiofilm ekstrak metanol kunyit (*Curcuma longa*) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta. Penelitian dilakukan pada bulan Juli-September 2020.

3.3 Subyek Penelitian

Subjek penelitian ini adalah *Candida albicans* ATCC 10231 yang dibiakkan dari Balai Kesehatan Yogyakarta, dan ditumbuhkan sebagai biofilm.

3.4 Identifikasi Variabel

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah pemberian ekstrak metanol kunyit (*Curcuma longa*) dengan konsentrasi 80%, 40%, 20%, 10%, 5% kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah Nistatin 100.000 IU dan kontrol negatif yang digunakan adalah berupa suspensi bakteri dan media serta kontrol media.

3.4.2 Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah pertumbuhan biofilm *Candida albicans* ATCC 10231.

3.4.3 Definisi Operasional

Untuk memudahkan, maka definisi operasional variabel penelitian dijelaskan seperti yang tertera pada Tabel 4.

Tabel 4. Definisi operasional

Variabel	Definisi Operasional
Ekstrak kunyit	Ekstrak kunyit adalah rimpang kunyit yang dipotong tipis kemudian dikeringkan dan digiling halus. Setelah halus kemudian dimaserasi dengan metanol kemudian dilakukan penyaringan untuk memisahkan ekstrak dengan pelarut, pembuatan ekstrak dilakukan sesuai standar di Laboratorium Biologi FMIPA UII. Konsentrasi yang digunakan adalah: 80%, 40%, 20%, 10%, dan 5%.
Biofilm <i>Candida albicans</i>	Lapisan berisi matriks eksopolisakarida yang melekat pada permukaan (tabung dan <i>well</i>) dari kultur <i>Candida albicans</i> ATCC 10231 yang diinduksi oleh media SDB dan diinkubasi selama 24-72 jam pada suhu 37°C dinilai dari hasil pengukuran OD kemudian dibandingkan dengan hasil <i>ODcut off</i> yang didapatkan sebelumnya untuk mengetahui kekuatan biofilm yang terbentuk.

3.5 Instrumen Penelitian

3.5.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah *microplate round bottom 96's well*, timbangan analitik, lemari pendingin, oven, autoklaf, inkubator, bunsen, kawat ose, tabung reaksi, rak tabung reaksi, kapas, mikropipet, mikrotip, mikroskop cahaya, spektrofotometer, sonikator, desikator dan *microplate reader* ELISA.

3.5.2 Bahan Penelitian

Bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah jamur *Candida Albicans* ATCC 10231, akuades steril, NaCl fisiologis, cat gram, KOH, *Phosphate Buffered Saline* (PBS), larutan media *Sabouroud Dextrose Broth* (SDB), larutan media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) dan cat *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB).

3.6 Tahap Penelitian

3.6.1 Persiapan Rimpang Kunyit (*Curcuma longa*)

Tanaman kunyit (*Curcuma Longa*) didapatkan dari Erista Garden yang berada di Jl. Kaliurang KM 17,5, Dusun Demen, Area Sawah, Pakembinangun, Pakem, Sleman Regency, Special Region of Yogyakarta. Tanaman tersebut dibawa ke Laboratorium Sistemika Tumbuhan, Fakultas Biologi Universitas Gajah Mada untuk determinasi. Determinasi dilakukan untuk memastikan

klasifikasi dari tanaman yang digunakan dalam penelitian dengan cara mencocokkan bagian tumbuhan kunyit dengan literatur morfologi tumbuhan.

3.6.2 Pembuatan Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit (*Curcuma longa*)

Rimpang kunyit (*Curcuma longa*) dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan tanah yang masih menempel. Setelah itu kunyit yang sudah dibersihkan dikeringkan dari sisa air pencucian. Kemudian bahan tersebut dikirim ke Laboratorium Terpadu Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia bagian Biologi Farmasi untuk kemudian dilakukan ekstraksi. Proses ekstraksi dimulai dari perajangan sampel, pengeringan sampel pada *cabinet dry*, penyerbukan dengan alat miller yang menghasilkan serbuk simplisia kering, maserasi menggunakan pelarut metanol, penyaringan untuk memisahkan ekstrak dengan pelarut, penguapan, dan pengemasan.

3.6.3 Uji Metabolit Sekunder

Uji metabolit sekunder dalam penelitian ini dilakukan untuk mengidentifikasi kandungan zat metabolit sekunder atau zat aktif yang dimiliki kunyit. Kandungan metabolit sekunder yang diuji adalah flavonoid, alkaloid, polifenol, dan saponin yang berhasil diisolasi dengan menggunakan metode ekstraksi metanol (Jyoti & Rajeshwari, 2012). Uji ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia bagian Biologi Farmasi. Prosedur penapisan fitokimia yang dilakukan adalah sebagai berikut:

1. Flavonoid
 - 1) Timbang 1 gram sampel kemudian tambahkan 50 ml air panas, didihkan kemudian saring.
 - 2) Filtrat yang dihasilkan ditambahkan sedikit serbuk mg dan 5 ml HCl 2N.
 - 3) Kemudian ditambahkan *amil alcohol* selanjutnya dikocok kuat-kuat dan dibiarkan hingga terpisah. Terbentuknya warna kuning hingga merah yang didapatkan dengan amil alkohol menunjukkan adanya flavonoid.
2. Alkaloid
 - 1) Timbang 2 gram sampel kemudian dipanaskan dengan asam klorida 1% sebanyak 10 ml selama 30 menit dengan penangas air hingga mendidih kemudian di saring.

- 2) Hasil yang sudah disaring kemudian diberi *dragendrof* sebanyak 3 tetes.
 - 3) Terbentuknya warna orange menunjukkan adanya alkaloid.
3. Saponin
 - 1) Sebanyak 100 mg sampel dicampurkan dengan 10 ml kemudian dikocok selama 30 menit.
 - 2) Munculnya buih-buih +1-10 cm selama 10 menit menunjukkan adanya saponin
 4. Polifenol
 - 1) 2 gram sampel dipanaskan dengan 10 ml air selama 10 menit kemudian dididihkan di penangas air hingga mendidih kemudian disaring dalam keadaan panas.
 - 2) Setelah dingin ditambahkan FeCl_3 sebanyak 3 tetes.
 - 3) Warna ungu, hijau atau biru yang muncul menunjukkan adanya polifenol.

3.6.4 Sterilisasi Alat

Semua alat yang digunakan dalam penelitian ini disterilkan agar tidak terjadi kontaminasi yang dapat mempengaruhi hasil penelitian. Proses sterilisasi terdiri dari sterilisasi kering dengan api langsung dan oven pemanas dan sterilisasi basah dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

3.6.5 Purifikasi dan Karakterisasi *Candida albicans*

Purifikasi dan karakterisasi *Candida albicans* ATCC 10231 untuk memastikan kemurniannya dan memastikan *Candida albicans* ATCC 10231 tidak mengalami kontaminasi. Uji yang dilakukan adalah menginokulasi jamur pada media SDA, pewarnaan gram, uji KOH, dan pengecatan dengan *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB). Sebelumnya kawat ose yang akan digunakan untuk mengambil jamur disterilkan dulu dengan cara memanaskan hingga berpijar kemudian didinginkan. Identifikasi dilakukan dengan pengamatan morfologis, mikroskop pada jamur (Kadek Sri Jayanti & Jirna, 2018; Mutiawati, 2016).

3.6.6 Pembuatan suspensi *Candida albicans* ATCC 10231 untuk Uji Antifungal

Candida albicans ditumbuhkan pada media *Sabourauds Dextrose Agar* (SDA) dan diinkubasikan pada suhu 37°C selama 24 jam kemudian hasil biakan

diambil sebanyak satu ose dan dimasukkan dalam media SDB kemudian didiamkan dalam suhu ruang selama 18-24 jam (Wijaya *et al.*, 2014).

Selanjutnya suspensi tersebut divortex hingga keruh dan dilanjutkan pembacaan dengan spektrofotometri UV-Vis pada panjang gelombang 625nm sehingga didapat absorbansi pada rentang 0,08-0,13 ($1-2 \times 10^8$ CFU/mL) setara dengan 0,5 McFarland. Sebagai blangko digunakan media cair. Setelah persyaratan absorbansi dipenuhi, dilakukan pengenceran 1:20 dengan media cair sehingga didapatkan koloni sebanyak 1×10^6 CFU/mL kemudian suspensi hasil pengenceran dapat digunakan dalam pengujian aktivitas antifungal dengan metode mikrodilusi (Kurniati *et al.*, 2017; Wijaya *et al.*, 2014). Semua proses preparasi *Candida albicans* dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang sebelumnya telah dibersihkan dengan alcohol dan disterilkan dengan UV selama 2 jam sebelum digunakan (Masfufatun *et al.*, 2014; Putri *et al.*, 2017).

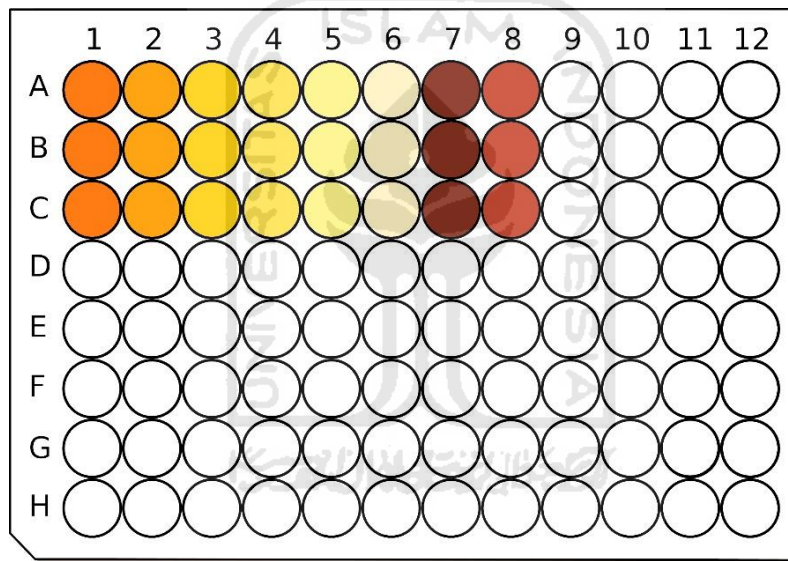
3.6.7 Penentuan Kadar Hambat Minimum dan Kadar Bunuh Minimum

Aktivitas antifungal ekstrak rimpang kunyit ditentukan dengan metode mikrodilusi menggunakan *microplate*. Metode mikrodilusi merupakan metode yang direkomendasikan *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Metode mikrodilusi dilakukan dengan beberapa kali pengenceran berseri dari ekstrak sampel yang digunakan dan diinokulasikan dengan suspensi *Candida* yang telah dibuat untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM) atau konsentrasi terkecil dimana tidak ada pertumbuhan jamur pada sumur yang digunakan dilihat secara visual dibandingkan dengan kontrol negatif (keruh). Sedangkan kadar bunuh minimum (KBM) didapatkan dari visualisasi media agar yang menunjukkan kejernihan dan tidak adanya pertumbuhan jamur. Percobaan ini dilakukan sebanyak tiga kali percobaan disaat bersamaan atau disebut dengan triplo. Selain itu dilakukan pengujian kesetaraan aktivitas ekstrak yang digunakan dengan antifungal yaitu Nistatin 100.000IU/mL (Puspitawati *et al.*, 2017).

Sebanyak 100 μ L akuades steril dimasukkan dalam sumuran A2 hingga A5 kemudian dimasukkan ekstrak 80% pada sumuran A1 dan A2 masing masing sebanyak 100 μ L, dihomogenisasi pada sumuran A2 lalu diambil sebanyak 100 μ L sehingga sumuran A2 konsentrasinya menjadi 40%, kemudian larutan yang sudah diambil dipindahkan ke sumuran A3 dan dihomogenisasi lalu diambil sebanyak 100 μ L sehingga sumuran A3 konsentrasinya menjadi 20%, begitu seterusnya secara berurutan sampai dengan sumuran A5. Langkah tersebut kemudian

diulangi pada sumuran B1-B5 dan C1-C5.

Kontrol positif yaitu antifungal Nistatin 100.000 IU/mL dimasukkan sebanyak 100 μ L ke sumuran A6, B6, dan C6. Kontrol media dimasukkan sebanyak 200 μ L media SDB ke dalam sumuran A7, B7 dan C7. Kontrol negatif dilakukan dengan dimasukkan media sebanyak 100 μ L ke dalam sumuran A8, B8, dan C8. Kemudian pada semua sumuran kecuali kontrol media dimasukkan 100 μ L suspensi jamur kemudian dihomogenisasi sehingga masing masing sumuran memiliki volume yang sama yaitu 200 μ L. *Microplate* kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang lalu masing masing sumuran ditanam pada media SDA dan diinkubasi ulang di suhu ruang. KHM dapat dilihat pada dasar sumuran setelah diinkubasi dan KBM dapat dilihat pada media SDA yang sudah diinkubasi.



Gambar 6. Uji Antifungal

Keterangan:

- A1,B1,C1 : 100 μ L ekstrak konsentrasi 80% + 100 μ L suspensi fungi
- A2,B2,C2 : 100 μ L ekstrak konsentrasi 40% + 100 μ L suspensi fungi
- A3,B3,C3 : 100 μ L ekstrak konsentrasi 20% + 100 μ L suspensi fungi
- A4,B4,C4 : 100 μ L ekstrak konsentrasi 10% + 100 μ L suspensi fungi
- A5,B5,C5 : 100 μ L ekstrak konsentrasi 5% + 100 μ L suspensi fungi
- A6,B6,C6 : 100 μ L Nistatin 100.000IU/mL + 100 μ L suspensi fungi
- A7,B7,C7 : 100 μ L media SDB+ 100 μ L suspensi fungi
- A8,B8,C8 : 200 μ L media SDB

3.6.8 Pembuatan suspensi *Candida albicans* ATCC 10231 untuk Uji Biofilm dan Antibiofilm

Pembuatan suspensi *Candida albicans* ATCC 10231 untuk uji biofilm dan antibiofilm hampir sama dengan pembuatan suspensi untuk uji antifungal. Semua preparasi dan pengerjaannya dilakukan secara aseptis dalam *Laminar Air Flow* (LAF) yang sudah dibersihkan dengan alkohol dan sudah disterilkan dengan UV selama 2 jam sebelum digunakan (Putri *et al.*, 2017).

Candida albicans yang sudah dibiakkan dalam SDA pada suhu ruangan selama 24 jam diambil menggunakan ose yang telah disterilkan di atas bunsen lalu didinginkan kemudian jamur yang sudah terambil dilarutkan dalam media SDB. Media SDB digunakan sebagai larutan pengencer karena memiliki kemampuan untuk menunjang pertumbuhan biofilm. Suspensi diperiksa kekeruhannya dan disetarakan dengan standar 0,5 McFarland secara visual dan diukur menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 625 nm dengan rentang absorbansi 0,08-0,13 yang setara dengan 1×10^8 CFU/mL (Kurniati *et al.*, 2017; Puspitawati *et al.*, 2017).

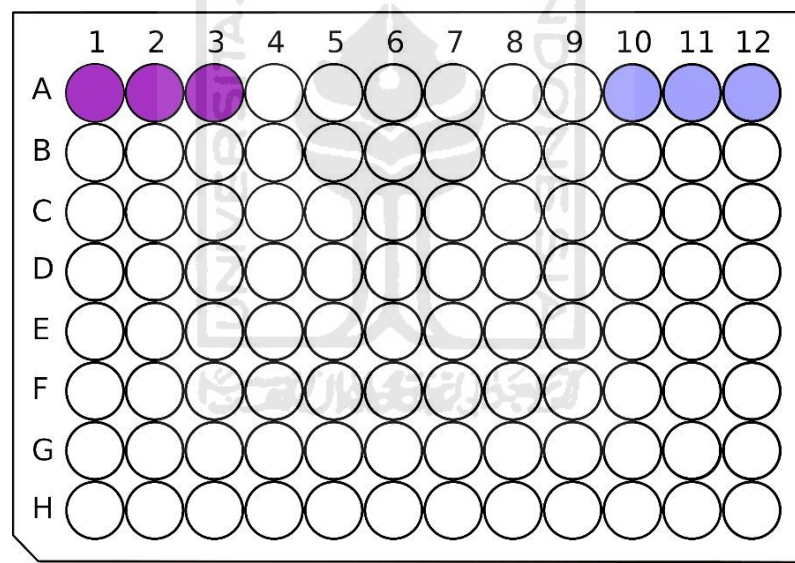
Media yang digunakan adalah SDB yang mampu menunjang pertumbuhan biofilm (Hosida *et al.*, 2018; Kurniati *et al.*, 2017). Konsentrasi yang digunakan untuk uji antibiofilm adalah 1×10^8 CFU/mL setara dengan standar 0,5 McFarland (Gani *et al.*, 2017; Jaliyanto, 2015). Microplate yang sudah diisi dengan media dan suspensi jamur kemudian di inkubasi selama 24-48jam sesuai dengan waktu optimum pembentukan biofilm (Dhanasekaran *et al.*, 2014). Kristal violet 0,1% digunakan sebagai pewarna biofilm (Hasan Zaba, 2015).

3.6.9 Uji Pembentukan Biofilm *Candida albicans* ATCC 10231

Pada uji pembentukan biofilm digunakan *Candida albicans* ATCC 10231 dan *Staphylococcus epidermidis* non biofilm yang digunakan sebagai kontrol negatif. Uji ini dilakukan tiga kali dan diambil nilai rata-ratanya. Pada sumuran A1 hingga A3 masing-masing dimasukkan 200 μ L suspensi *Candida albicans* ATCC 10231 dan pada sumuran A10 hingga A12 masing-masing dimasukkan 200 μ L suspensi *Staphylococcus epidermidis* non biofilm kemudian *microplate* diinkubasi selama 48jam pada suhu 37 °C (Hasan Zaba, 2015).

Setelah diinkubasi selama 48 jam, medium yang ada dalam *microplate* dibuang dengan cara mengocok dan membalikkan *microplate*. Kemudian *microplate* dicuci menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) steril sebanyak 3

kali dan memastikan membuang semua air yang tersisa setiap mencuci tujuannya adalah agar sel-sel *planktonic* dan komponen media yang tidak menempel hilang. Sumuran kemudian diwarnai menggunakan larutan kristal violet 0,1% sebanyak 200 μ L dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 15 menit, selanjutnya *microplate* dibilas menggunakan akuades steril selama 3-4 kali. Apabila terdapat warna ungu berbentuk cincin pada bagian dasar sumuran menunjukkan telah terbentuk biofilm. Kemudian ditambahkan 275 μ L asam asetat 33% ke dalam setiap sumuran yang sudah terdapat cincin berwarna ungu pada dasarnya untuk melarutkan kristal violet dan inkubasi ulang selama 15 menit (Hasan Zaba, 2015; O'Toole, 2010). Kemudian *optical density* (OD) diukur dengan panjang gelombang 620 nm pada *microplate reader* (Maghfirah *et al.*, 2017).



Gambar 7. Uji Pembentukan Biofilm

Keterangan :

A1, A2, A3: 200 μ L suspensi *Candida albicans* ATCC 10231

A10, A11, A12: 200 μ L suspensi bakteri *S. epidermidis* non biofilm

Pembentukan biofilm pada penelitian ini dinilai dengan cara membandingkan *Candida albicans* dengan kontrol negatif *Staphylococcus epidermidis* non biofilm. Pengulangan yang dilakukan sebanyak 3 kali, tujuannya adalah agar mendapatkan nilai rata-rata dan standar deviasi yang nantinya

digunakan untuk mencari OD *cut off* dengan rumus: (Turan & Demirbilek, 2018)

$$OD_{cut\ off} = OD_{rata-rata\ kontrol\ negatif} + (3 \times \text{standar deviasi } OD_{kontrol\ negatif})$$

Setelah didapatkan nilai OD_c, nilai tersebut dibandingkan dengan OD_{rata-rata} *Candida albicans* untuk mengetahui kemampuan *Candida albicans* ATCC 10231 dalam membentuk biofilm. Kemampuan membentuk biofilm pada *Candida albicans* ATCC 10231 dibagi menjadi 4 kelompok. Jika nilai OD ≤ OD_c artinya biofilm negatif atau tidak terbentuk biofilm, OD_c ≤ OD ≤ 2 x OD_c artinya *mildly positive for biofilm* atau terbentuk biofilm lemah, 2 x OD_c ≤ OD ≤ 4 x OD_c artinya *moderately positive for biofilm* atau terbentuk biofilm dengan kekuatan sedang dan 4 x OD_c ≤ OD artinya *intensely positive for biofilm* atau terbentuk biofilm kuat (Turan & Demirbilek, 2018).

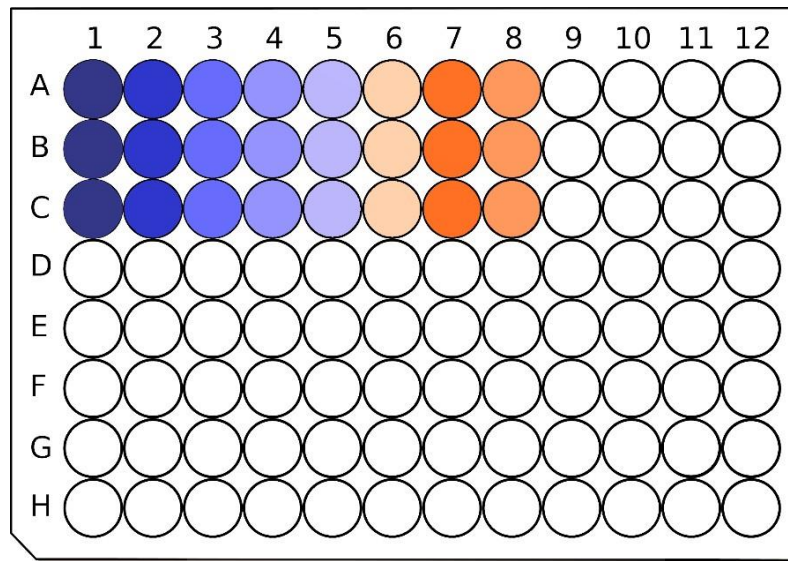
3.6.10 Uji Kemampuan Antibiofilm

Uji kemampuan antibiofilm dilakukan dengan menggunakan metode *microtiter plate biofilm assay* untuk mengetahui jumlah biofilm dengan cara diinterpretasikan pada kepekatan warna dari setiap sumuran *microplate* (Septiani *et al.*, 2017). Metode mikrodilusi dilakukan dengan pengenceran berderet pada *microplate round bottom 96's well*. Proses penghambatan pembentukan biofilm dilakukan dengan menggunakan ekstrak yang ada di bawah nilai KHM (Septiani *et al.*, 2017; Wulandari, 2017). Pada penelitian ini, uji antibiofilm menggunakan konsentrasi berseri dari 80% turun hingga 5% untuk melihat persentase penghambatan biofilm pada masing-masing seri pengenceran konsentrasi ekstrak.

Sebanyak 100 µL akuades steril dimasukkan dalam sumuran A2 hingga A5 kemudian dimasukkan ekstrak 80% pada sumuran A1 dan A2 masing masing sebanyak 100 µL, homogenisasi pada sumuran A2 lalu ambil 100 µL kemudian diambil sebanyak 100 µL sehingga sumuran A2 konsentrasinya menjadi 40%, kemudian larutan yang sudah diambil dipindahkan ke sumuran A3 dan dihomogenisasi lalu diambil sebanyak 100 µL sehingga sumuran A3 konsentrasinya menjadi 20%, begitu seterusnya secara berurutan sampai dengan sumuran A5. Langkah tersebut kemudian diulangi pada sumuran B1-B5 dan C1-C5. Kontrol positif yaitu antifungal Nistatin 100.000IU/mL dimasukkan sebanyak

100 μL ke sumuran A6, B6, dan C6. Kontrol media dimasukkan sebanyak 200 μL media SDB ke dalam sumuran A7, B7, dan C7. Kontrol negatif dilakukan dengan dimasukkan media sebanyak 100 μL ke dalam sumuran A8, B8, dan C8. Kemudian pada semua sumuran kecuali kontrol media dimasukkan 100 μL suspensi jamur kemudian dihomogenisasi sehingga masing masing sumuran memiliki volume yang sama yaitu 200 μL . *Microplate* kemudian diinkubasi selama 24-48 jam sesuai dengan waktu optimal pembentukan biofilm (Hasan Zaba, 2015; O'Toole, 2010; Paiva *et al.*, 2012).

Setelah diinkubasi selama 48 jam, medium yang ada dalam *microplate* dibuang dengan cara menggoyangkan dan membalikkan *microplate*. Kemudian *microplate* dicuci menggunakan *phosphate buffer saline* (PBS) steril sebanyak 3 kali dan memastikan semua PBS yang tersisa setiap mencuci terbuang, tujuannya adalah agar sel-sel *planktonic* dan komponen media yang tidak menempel hilang. Sumuran kemudian diwarnai menggunakan larutan kristal violet 0,1% sebanyak 200 μL dan diinkubasi dalam suhu ruang selama 15 menit, selanjutnya *microplate* dibilas menggunakan akuades steril selama 3-4 kali (Kurniati *et al.*, 2017; Traba & Liang, 2011). Apabila terdapat warna ungu berbentuk cincin pada bagian dasar sumuran menunjukkan telah terbentuk biofilm (Monteiro *et al.*, 2011; Traba & Liang, 2011). Tambahkan 275 μL asam asetat 33% ke dalam setiap sumuran yang sudah terdapat cincin berwarna ungu pada dasarnya untuk melarutkan kristal violet dan inkubasi ulang selama 15 menit (O'Toole, 2010; Traba & Liang, 2011). Kemudian *optical density* (OD) diukur dengan panjang gelombang 620 nm pada *microplate reader* (Maghfirah *et al.*, 2017).



Gambar 8. Uji Antibiofilm

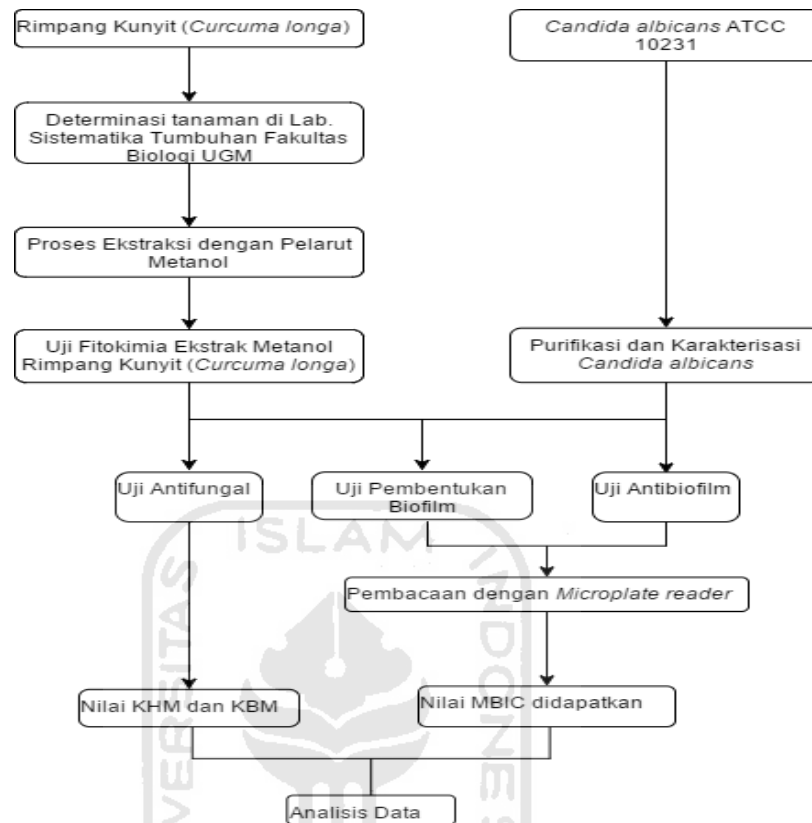
Keterangan :

- A1,B1,C1 : 100 μ L ekstrak konsentrasi 80% + 100 μ L suspensi fungi
- A2,B2,C2 : 100 μ L ekstrak konsentrasi 40% + 100 μ L suspensi fungi
- A3,B3,C3 : 100 μ L ekstrak konsentrasi 20% + 100 μ L suspensi fungi
- A4,B4,C4 : 100 μ L ekstrak konsentrasi 10% + 100 μ L suspensi fungi
- A5,B5,C5 : 100 μ L ekstrak konsentrasi 5% + 100 μ L suspensi fungi
- A6,B6,C6 : 100 μ L Nistatin 100.000IU/mL + 100 μ L suspensi fungi
- A7,B7,C7 : 200 μ L media SDB
- A8,B8,C8 : 100 μ L media SDB + 100 μ L suspensi fungi

Hasil pembacaan yang sudah didapatkan kemudian dimasukkan ke dalam rumus $MBIC_{50}$ untuk mengetahui kemampuan ekstrak metanol rimpang kunyit dalam menghambat biofilm. Rumus penghambatan biofilm: (Bakkiyaraj *et al.*, 2013).

$$\% \text{ penghambatan biofilm} = ((\text{OD kontrol} - \text{OD uji}) / \text{OD kontrol} \times 100)$$

Alur kerja penelitian disajikan pada Gambar 9 sebagai berikut:



Gambar 9. Alur Kerja Penelitian

3.7 Metode Analisis Data

Analisa data pada penelitian ini menggunakan SPSS. Nilai penghambatan pembentukan biofilm pada *Candida albicans* didapatkan dari nilai *Optical Dense* (OD) dari pembacaan *microplate reader*. Data nilai absorbansi atau OD yang sudah didapatkan dianalisis dengan *Saphiro wilk* dan *Levene's test* untuk mengetahui persebaran dan homogenitas data. Persebaran data normal apabila didapatkan nilai $p \geq 0,05$ kemudian dilanjutkan dengan uji *One Way ANOVA* untuk menguji signifikansi data. Selanjutnya uji *post hoc Bonfferoni* untuk mengetahui $MBIC_{50}$ (*Minimum Biofilm Inhibitory Concentration 50%*) ekstrak metanol rimpang kunyit terhadap pertumbuhan biofilm pada *Candida albicans* ATCC10231.

3.8 Etika Penelitian

Penelitian ini telah mendapatkan izin dari pihak Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia bahwa sampel penelitian ini diambil dari bahan biologi tersimpan.

BAB IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil

4.1.1 Gambaran Penelitian

Penelitian dengan judul Uji Efektivitas Antibiofilm Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit (*Curcuma longa*) Terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 telah berlangsung selama bulan Juli sampai September 2020. Penelitian ini menggunakan *Candida albicans* ATCC 10231 yang merupakan bahan biologi tersimpan yang didapatkan dari Balai Laboratorium Kesehatan Yogyakarta dan telah mendapat izin etik dengan nomor **26/Ka.Kom.Et/70/KE/X/2019**. Hasil keterangan lolos kaji etik dapat dilihat pada **Lampiran II**

4.1.2 Hasil Determinasi *Curcuma longa*

Hasil determinasi tanaman pada tanggal didapatkan bahwa tanaman yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Curcuma longa* L. dengan sinonim *Curcuma domestica* Valetton. Hasil determinasi dapat dilihat pada **Lampiran III**.

4.1.3 Hasil Ekstraksi Rimpang Kunyit *Curcuma longa*

Proses ekstraksi dilakukan di Laboratorium Terpadu Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Islam Indonesia bagian Biologi Farmasi selama 10 hari melalui proses perajangan sampel, pengeringan dengan oven, penyerbukan dengan alat miller, menghasilkan serbuk simplisia kering, maserasi menggunakan pelarut metanol, penyaringan untuk memisahkan ekstrak dengan pelarut, penguapan, dan pengemasan. Dari 1000 gram bahan segar didapat sebanyak 23,82 gram ekstrak.

4.1.4 Hasil Uji Metabolit Sekunder

Hasil uji metabolit sekunder *Curcuma longa* ditunjukkan pada **Tabel 5** dan **Lampiran IV**

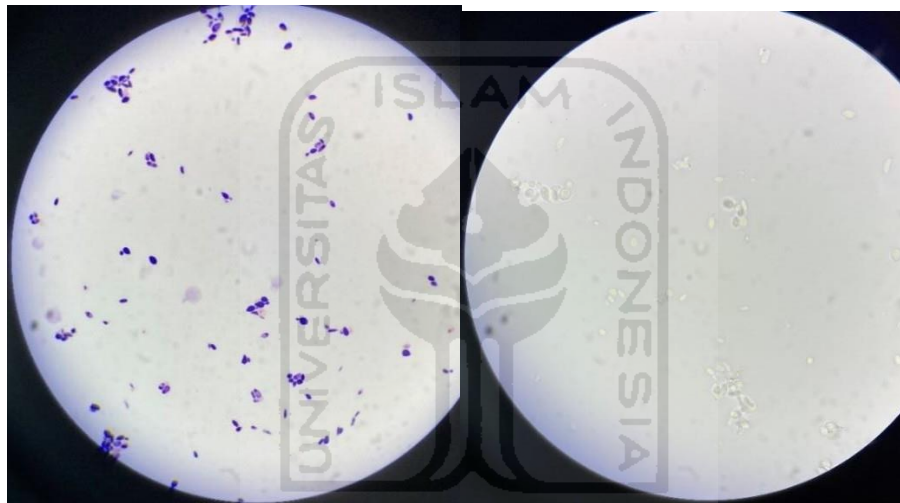
Tabel 5. Hasil Uji Metabolit Sekunder

Uji	Hasil	Teknik Analiis	Keterangan
Flavonoid	+	Visualisasi warna	Terbentuk fluoresensi warna kuning intensif
Alkaloid	+	Visualisasi warna	Terbentuk warna orange dengan pereaksi dagendrof
Saponin	+	Visualisasi Buih	Terbentuk buih setinggi 1 cm
Polifenol	+	Visualisasi warna	Terbentuk warna ungu biru

Keterangan: (+)= positif

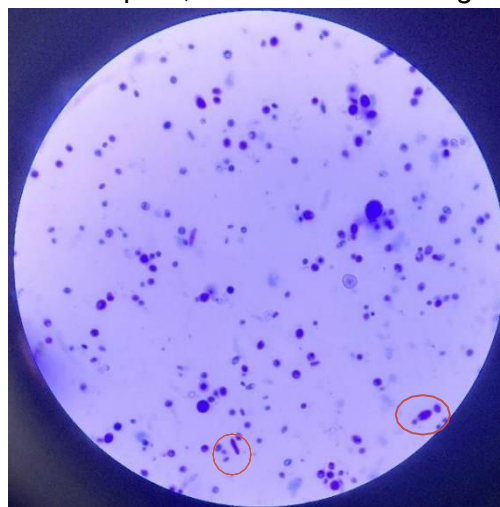
4.1.5 Hasil Purifikasi dan Karakterisasi *Candida albicans*

Purifikasi dan karakterisasi dilakukan untuk memurnikan dan memastikan bahwa yang diuji adalah *Candida albicans* ATCC 10231 tanpa adanya kontaminasi dari mikroba lainnya. Hasil purifikasi dan karakterisasi *Candida albicans* pada media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) didapatkan hasil adanya koloni fungal yang tumbuh berwarna putih kekuningan, dengan pengecatan gram secara mikroskopis menunjukkan gambaran seperti sekumpulan jamur dalam koloni berbentuk *budding* berwarna ungu yang terlihat melalui mikroskop cahaya dengan perbesaran 1000x dan dengan uji KOH didapatkan gambaran jamur dalam bentuk blastospora.



Gambar 10. Pengecatan Gram (kiri) dan KOH (kanan)

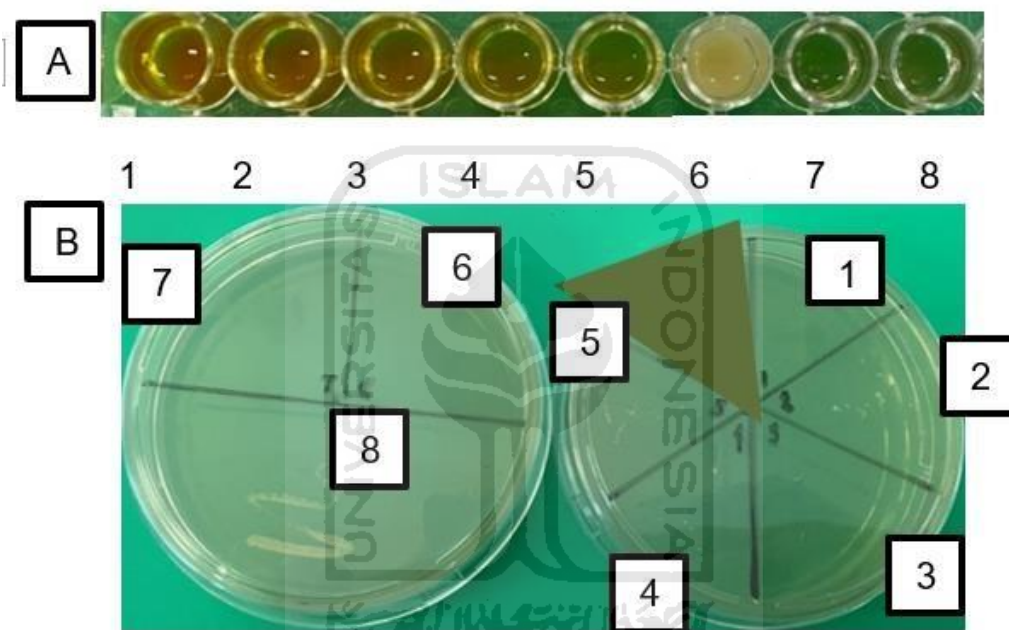
Berdasarkan pewarnaan dengan *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB) secara mikroskopis terlihat blastospora, *mother cell* dan *daughter cell*.



Gambar 11. Pewarnaan dengan LPCB

4.1.6 Hasil Penentuan KHM dan KBM pada Uji Antifungal

Uji antifungal dimulai dengan metode mikrodilusi cair pada *microplate* yang telah diinkubasi 24-48 jam kemudian dilanjutkan dengan inokulasi larutan uji setiap sumuran ke dalam media *Sabouroud Dextrose Agar* (SDA) kemudian di inkubasi ulang selama 24jam. Hasil uji antifungal untuk menentukan KHM dan KBM pada setiap sumuran konsentrasi ekstrak sesuai dengan penomoran pada cawan petri disajikan pada **Gambar 12**



Gambar 12. Hasil Uji Antifungal pada A) microplate dan B) pada SDA

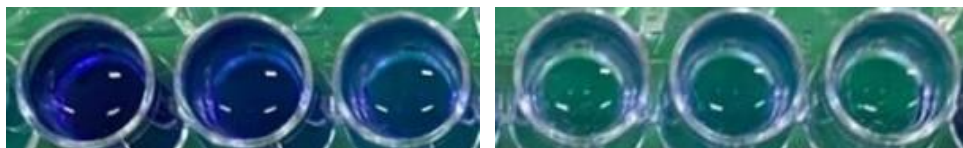
Keterangan:

- | | |
|--------------------|---------------------------------------|
| 1. Konsentrasi 80% | 5. Konsentrasi 5% |
| 2. Konsentrasi 40% | 6. Kontrol Positif Nistatin 100.000IU |
| 3. Konsentrasi 20% | 7. Kontrol Media |
| 4. Konsentrasi 10% | 8. Kontrol Negatif |

Pada cawan petri nomor 1 dengan ekstrak 80% setelah digoreskan tampak jernih dan tidak tampak adanya pertumbuhan jamur, sedangkan pada cawan petri berisi agar nomor 2 sampai dengan 5 masing masing konsentrasi ekstrak 40%, 20%, 10% dan 5% tampak adanya pertumbuhan jamur yang ditunjukkan adanya koloni mucoid yang tumbuh di atasnya.

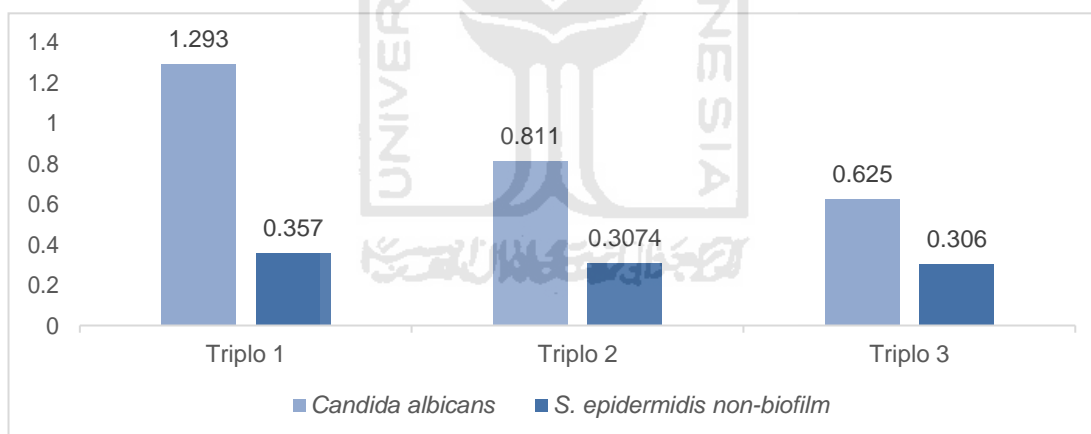
4.1.7 Hasil Pembentukan Biofilm *Candida albicans*

Pembentukan biofilm *Candida albicans* ATCC 10231 ditunjukkan dengan adanya cincin biofilm pada dasar sumuran yang terwarnai dengan kristal violet yang kemudian dilarutkan dengan asam asetat 33% sebanyak 275 μ L disajikan pada **Gambar 13**. *Staphylococcus epidermidis* non biofilm pada penelitian ini digunakan sebagai kontrol negatif.



Gambar 13. Hasil uji pertumbuhan biofilm *Candida albicans* ATCC 10231 (kiri) dan *Staphylococcus epidermidis* non biofilm (kanan)

Nilai absorbansi/OD dari uji pembentukan biofilm *Candida albicans* dan *Staphylococcus epidermidis* non biofilm disajikan pada **Gambar 14** dan **Tabel 6**



Gambar 14. Diagram Pembentukan Biofilm *Candida albicans* melalui Metode *Microtiter Plate Biofilm Assay* (OD_{620nm})

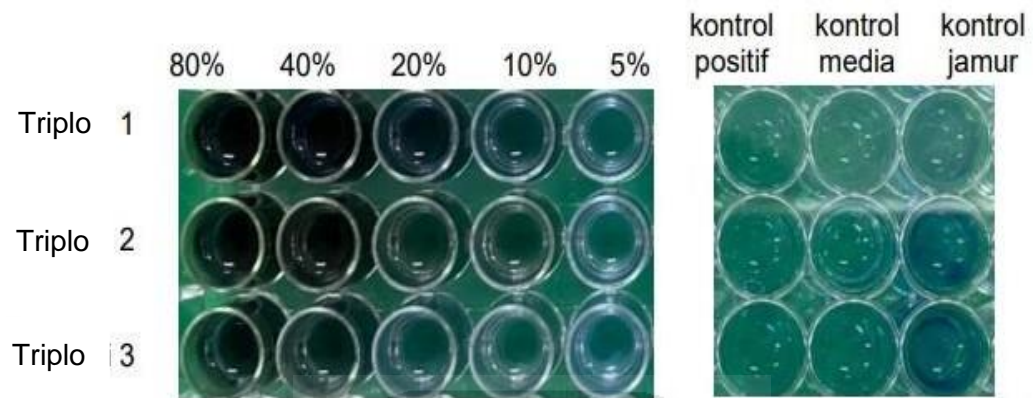
Tabel 6 Nilai absorbansi/OD Pembentukan Biofilm

Mikroorganisme	Triplo 1	Triplo 2	Triplo 3	Rata-rata	Standar Deviasi
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	1,293	0,811	0,625	0,909	0,345
<i>S. Epidermidis</i> non biofilm	0,357	0,307	0,306	0,324	0,029

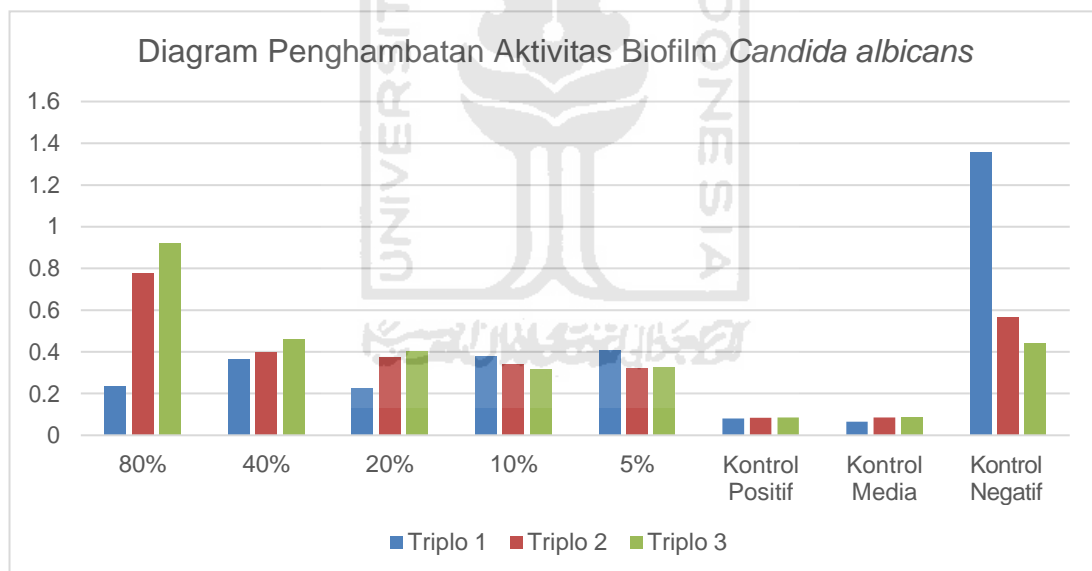
Data primer peneliti

4.1.8 Hasil Penentuan Kadar Hambat Biofilm Minimal pada Uji Antibiofilm

Hasil pengujian antibiofilm disajikan pada **Gambar 15** dan **Gambar 16**. Serta nilai OD rata-rata uji antibiofilm pada **Tabel 7**



Gambar 15. Hasil Uji Antibiofilm



Gambar 16. Diagram Aktivitas Penghambatan Biofilm *Candida albicans* ATCC 10231 melalui Metode Microtiter Plate Biofilm Assay (OD_{620nm})

Ketiga pengukuran ini nilai absorbansinya kemudian dianalisis dengan uji statistik (Lampiran V). Hasil uji normalitas menggunakan Uji *Saphiro wilk* didapatkan nilai $p > 0,05$ pada setiap kelompok larutan uji artinya data terdistribusi normal dan uji *Levene's test* didapatkan hasil $p > 0,05$ pada setiap kelompok larutan uji artinya data memiliki variansi yang sama atau homogen. Selanjutnya dilakukan uji *One Way-ANOVA* dan didapatkan nilai signifikansi 0,002. Hal ini menunjukkan

bahwa terdapat perbedaan secara bermakna secara signifikan pada kelompok uji. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan maka dilakukan uji lanjutan dengan *post hoc* jenis *Bonfferoni*.

Tabel 7. Densitas Optik penghambatan Biofilm *Candida albicans*

Perlakuan	Absorbansi				% Penghambatan
	1	2	3	Rata-rata	
Ekstrak 80%	0,235	0,776	0,922	0,644	18,101
Ekstrak 40%	0,364	0,397	0,461	0,407	48,210
Ekstrak 20%	0,227	0,373	0,401	0,334	57,578
Ekstrak 10%	0,380	0,339	0,316	0,345	56,146
Ekstrak 5%	0,407	0,320	0,328	0,352	55,299
Kontrol Positif	0,081	0,084	0,085	0,083	89,395
Kontrol Media	0,066	0,085	0,086	0,079	
Kontrol Negatif	1,356	0,564	0,441	0,787	

Data primer peneliti

Hasil analisis *post-hoc Bonfferoni* pada semua kelompok uji tidak didapatkan perbedaan bermakna yang seharusnya ditunjukkan dengan nilai $p < 0,05$ (hasil signifikan) yang berarti semua larutan uji memiliki kemampuan yang sama dengan kontrol positif sebagai antibiofilm *Candida albicans*.

Tabel 8. Hasil analisis *post-hoc Bonfferoni*

	E80%	E40%	E20%	E10%	E5%	KP	KM	KN
E80%	-	1,000	1,000	1,000	1,000	0,870	0,830	1,000
E40%	1,000	-	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	0,208
E20%	1,000	1,000	-	1,000	1,000	1,000	1,000	0,080
E10%	1,000	1,000	1,000	-	1,000	1,000	1,000	0,920
E5%	1,000	1,000	1,000	1,000	-	1,000	1,000	0,101
KP	0,087	1,000	1,000	1,000	1,000	-	1,000	0,003
KM	0,083	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	-	0,003
KN	1,000	0,208	0,080	0,092	0,101	0,003	0,003	-

Data primer peneliti

Keterangan: E= Konsentrasi Ekstrak; KP = Kontrol Positif; KM= Kontrol Media; KN= Kontrol Negatif.

4.2 Pembahasan

4.2.1 Pembahasan Purifikasi dan Karakterisasi *Candida albicans*

Pewarnaan gram adalah langkah awal yang biasanya dilakukan untuk karakterisasi dan klasifikasi bakteri berdasarkan karakteristik pewarnaan yang memungkinkan bakteri untuk diperiksa menggunakan mikroskop dan diamati

morfologinya. Meskipun pewarnaan gram sering digunakan untuk mengidentifikasi dan mengklasifikasikan bakteri, pewarnaan gram juga bisa digunakan pada mikroorganisme lain seperti *yeast* dan *fungi* (Mutiawati, 2016; Thairu *et al.*, 2014). Ukuran yeast pada umumnya 10-20 kali ukuran bakteri sehingga penggunaan metode ini sebagai identifikasi tidak menjadi masalah. Namun, kadang akan muncul endapan yang masih tetap bisa dibedakan dengan *yeast* karena endapan biasanya berwarna ungu tua homogen sedangkan *yeast* terdapat bintik bintik dan endapan biasanya berbentuk bulat sempurna sedangkan *Candida* umumnya berbentuk oval (Barenfanger & Drake, 2001).

Hasil purifikasi *Candida albicans* dengan pengecatan gram menunjukkan karakteristik berupa terlihatnya koloni berbentuk *budding* berwarna ungu, yang mana hasilnya sama dengan penelitian yang dilakukan Bhagat dan Desai (2014) menyatakan bahwa *Candida albicans* berwarna ungu dan membentuk *budding*. Warna ungu yang muncul pada pengecatan gram *Candida albicans* terjadi karena *Candida albicans* memiliki struktur dinding sel yang sama dengan bakteri gram positif yang mengandung kitin dan peptidoglikan yang mampu mempertahankan zat warna kristal violet (Bhagat BP & Desai PB, 2014; Rezeki *et al.*, 2017)

Pemeriksaan *Candida albicans* dengan Larutan KOH digunakan untuk membersihkan material klinis agar *fungi/yeast* dapat terlihat lebih mudah (Byrne, 2013; Ghannoum & Isham, 2009). Gambaran pseudohifa maupun blastospora dapat terlihat melalui pemeriksaan dengan mikroskop (Mutiawati, 2016).

Hasil pewarnaan *Lactophenol Cotton Blue* (LPCB) dapat menemukan *yeast* dalam bentuk blastospora, klamidiospora maupun *germ tubes*, hal ini dikarenakan *cotton blue* berfungsi untuk memberikan warna biru pada sel *fungi*, asam laktat berfungsi untuk memperjelas latar dan menegaskan struktur yang dimiliki *fungi*, gliserol memiliki fungsi untuk menjaga fisiologi sel dan mencegah sel kekurangan cairan serta kristal fenol yang dapat membunuh *fungi* (Kadek Sri Jayanti & Jirna, 2018).

4.2.2 Pembahasan Penentuan KHM dan KBM

Pengujian antifungal pada *microplate* didapatkan hasil konsentrasi 40%, warna larutan dalam sumuran konsentrasi 40% terlihat jernih jika dibandingkan dengan kontrol negatif sehingga larutan uji dengan pengenceran berseri konsentrasi 40% ekstrak metanol rimpang kunyit (*Curcuma longa*) merupakan nilai KHM (Anggara *et al.*, 2015; Dinastutie *et al.*, 2015; Septiani *et al.*, 2017)

Pada konsentrasi 80% adalah konsentrasi yang dapat menghentikan pertumbuhan *Candida albicans*. Hal ini ditunjukkan dengan warna jernih dan tidak adanya pertumbuhan *Candida albicans* pada cawan petri. Sampel pada disc 1 yaitu larutan uji pengenceran berseri konsentrasi 80% ekstrak metanol rimpang kunyit (*Curcuma longa*) dinyatakan sebagai nilai KBM (Kurniati *et al.*, 2017; Septiani *et al.*, 2017).

Berbeda dengan penelitian Zaki Mubarak, *et al* (2010) yang mana didapatkan KHM pada konsentrasi 12,5% sebesar 6,6 mm yang berarti memiliki respon hambat pertumbuhan lemah terhadap *Candida albicans* dari ekstrak etanol rimpang kunyit (*Curcuma longa*). Perbedaan dapat terjadi karena banyak faktor, salah satunya adalah penggunaan pelarut dalam pembuatan ekstrak. Penelitian serupa juga dilakukan oleh Mousumi dan Choudurry (2010) dengan menggunakan ekstrak metanol rimpang kunyit dengan konsentrasi 100% dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* (Mubarak *et al.*, 2017; Sinha & Choudhury, 2010).

Berdasarkan penelitian yang dilakukan Shagufta, *et al* (2010), didapatkan bahwa perbedaan varietas kunyit berpengaruh terhadap kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Kunyit yang berasal dari varietas Kasur menunjukkan daya hambat terbaik dengan diameter zona hambat 20,6 mm diikuti dengan varietas Faisalabad dengan diameter zona hambat sebesar 12,2 mm dan varietas Bannu dengan diameter zona hambat sebesar 7 mm. berdasarkan hasil penelitian dapat dijelaskan bahwa kuantitas zat aktif yang terdapat pada kunyit dipengaruhi oleh pelarut yang digunakan dalam pembuatan ekstrak dan faktor lingkungan di mana kunyit tumbuh seperti kondisi tanah, nutrisi dan iklim (Mubarak *et al.*, 2015; Naz *et al.*, 2010).

4.2.3 Pembahasan Pembentukan Biofilm

Nilai *ODcut off* yang didapatkan dari perhitungan kontrol negatif (*S. epidermidis* non biofilm) sebesar 0,4106. Rata-rata biofilm *Candida albicans* ATCC 10231 adalah sebesar 0,9094 yang merupakan nilai yang ada di antara $2 \times OD_{cut\ off}$ dan $4 \times OD_{cut\ off}$ sehingga dapat disimpulkan bahwa *Candida albicans* ATCC 10231 yang digunakan dalam penelitian ini merupakan *moderately positive for biofilm* (Turan & Demirbilek, 2018).

4.2.4 Pembahasan Uji Antibiofilm

Spesies *Candida* umumnya hidup komensal di 75% orang sehat dan biasanya menyebabkan infeksi oportunistik pada pasien dengan kompresi imun,

kemampuannya dalam membentuk biofilm memiliki peran >65% dari infeksi yang dialami manusia (Weerasekera *et al.*, 2016). Kunyit memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Candida albicans* karena kunyit memiliki kandungan komponen aktif berupa *curcuminoid* yang terdiri atas *curcumin*, *bisdementhoxycurcumin*, dan *dementhoxycurcumin*. Curcumin merupakan senyawa fenol yang memiliki sifat antifungal dengan mekanisme merusak dinding sel dan denaturasi protein sel sehingga sel lisis (Mubarak *et al.*, 2017). Selain fenol, kunyit juga memiliki kandungan flavonoid yang memiliki aktivitas antibiofilm (Rabin *et al.*, 2015). Salah satu penelitian yang dilakukan terhadap 500 jenis flavonoid menunjukkan bahwa dari 10 jenis yang diteliti aktif dapat menghambat pertumbuhan biofilm sebesar 85%, 47 jenis flavonoid dengan keaktifan sedang mampu menghambat 40% dan 443 flavonoid tidak aktif kurang dari 40% namun masih mampu menghambat pertumbuhan biofilm (Manner *et al.*, 2013). Pada penelitian lainnya didapatkan bahwa 18 dari 28 senyawa terpenoid menunjukkan aktivitas penghambatan biofilm pada *Candida albicans* (Raut *et al.*, 2013).

Umumnya antibiofilm menggunakan konsentrasi dibawah KHM seperti KHM 1/2, KHM 1/4 dan KHM 1/8 karena diharapkan adanya respon penghambatan maksimal dari ekstrak tersebut kemudian diukur untuk mendapatkan nilai ODnya (Fitria, 2018, Wulandari, 2017). Nilai OD dapat mengindikasikan tinggi atau banyaknya mikroorganisme yang dapat bertahan setelah pemberian uji. Nilai OD yang besar disebabkan oleh pewarnaan kristal violet yang dilakukan dan adanya kekeruhan atau banyaknya mikroorganisme di dalamnya. Oleh karena itu nilai OD berbanding terbalik dengan penghambatan (Nugrahani *et al.*, 2016). Berdasarkan rumus persen penghambatan yang sudah dijelaskan sebelumnya dapat ditarik kesimpulan bahwa semakin tinggi nilai absorbansi/OD larutan uji maka semakin rendah persentase penghambatannya (Djais *et al.*, 2019; Pu *et al.*, 2014; Wulandari, 2017). Nilai absorbansi/OD yang didapatkan pada uji dengan pengenceran berseri apabila dibandingkan dengan kontrol positif menunjukkan nilai yang lebih rendah. Bila dilihat nilai absorbansi/OD, aktivitas penghambatan pertumbuhan *Candida albicans* yang paling baik dihasilkan pada konsentrasi 20% yaitu sebesar 0,37 dan memiliki persentase penghambatan sebesar 57.6%. Bila dibandingkan dengan kontrol positif yang tersusun atas Nistatin 100.000 IU dan suspensi jamur memiliki nilai absorbansi/OD sebesar 0,0834 dengan persentase

penghambatan sebesar 89.4%. Hal ini menggambarkan bahwa persentase penghambatan pada kontrol positif lebih tinggi daripada larutan uji ekstrak pengenceran berseri. Nilai persentase penghambatan oleh larutan uji ekstrak pengenceran berseri mencapai syarat $MBIC_{50}$ yaitu konsentrasi penghambatan biofilm yang didapatkan minimal 50% (Mahmoudabadi *et al.*, 2014; Pu *et al.*, 2014).

Karena penelitian memiliki sebaran data normal dan variansi yang sama/homogen, selanjutnya dilakukan uji One-Way ANOVA dan didapatkan nilai signifikansi 0.002. Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna secara signifikan pada kelompok larutan uji. Untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda signifikan, maka dilakukan uji lanjutan *post hoc Bonfferoni* menunjukkan bahwa dari kontrol media dan kontrol negative memiliki hasil yang signifikan yaitu terdapat peningkatan dari biofilm jamur, kontrol antifungal dan kontrol negative menunjukkan hasil signifikan yang berarti kontrol antifungal memiliki efek sebagai antibiofilm dan mampu menekan aktivitas/pertumbuhan jamur. Sedangkan hubungan dari kontrol antifungal dan perlakuan atau larutan uji dengan kontrol media memiliki efek yang mendekati normalnya. Kemudian hubungan antara perlakuan dengan antifungal dan perlakuan dengan perlakuan lain memiliki efek yang sama sehingga didapatkan hasil tidak signifikan.

Ekstrak metanol rimpang kunyit *Curcuma longa* memiliki aktivitas penghambatan biofilm *Candida albicans* paling baik pada konsentrasi 20%. Persentase penghambatan yang dimiliki sudah melebihi 50% namun masih dibawah persentase penghambatan yang dimiliki oleh Nistatin 100.000 IU. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa ekstrak metanol rimpang kunyit *Curcuma longa* menunjukkan aktivitas penghambatan yang sama dengan kontrol positif dan sudah mencapai *Minimum Biofilm Inhibition Concentration* ($MBIC_{50}$) > 50%.

BAB V. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Ekstrak metanol rimpang kunyit (*Curcuma longa*) efektif menghambat pembentukan biofilm *Candida albicans* ATCC 10231 pada konsentrasi 20%, 10%, dan 5%.

5.2 Saran

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kandungan kimia yang lebih spesifik dari rimpang kunyit (*Curcuma longa*) dan mengetahui mekanisme yang terjadi pada aktivitas penghambatan biofilm *Candida albicans*.
2. Melakukan teknik pengukuran lain seperti *Scanning Electron Microscope* (SEM) atau *Confocal Laser Scanning Microscope* (CLSM) agar dapat mengetahui secara kualitatif dan kuantitatif pertumbuhan biofilm yang terjadi



DAFTAR REFERENSI

- Allkja, J., Bjarnsholt, T., Coenye, T., Cos, P., Fallarero, A., Harrison, J. J., *et al.*, 2020. Minimum information guideline for spectrophotometric and fluorometric methods to assess biofilm formation in microplates. *Journal Pre-proof Minimum*, 2, 100010. <https://doi.org/10.1016/j.bioflm.2019.100010>
- Anggara, E. D., Suhartanti, D., Mursyidi, A., 2015. Uji Aktivitas Antifungi Fraksi Etanol Infusa Daun Kepel (*Stelechocarpus burahol*, Hook F&Th.) Terhadap *Candida albicans*. Yogyakarta.
- Bakkiyaraj, D., Nandhini, J. R., Malathy, B., Pandian, S. K., 2013. The anti-biofilm potential of pomegranate (*Punica granatum* L.) extract against human bacterial and fungal pathogens. *Biofouling*, 29(8), 929–937. <https://doi.org/10.1080/08927014.2013.820825>
- Barenfanger, J., & Drake, C. A., 2001. Interpretation of Gram Stains for the Nonmicrobiologist. *Laboratory Medicine*, 32(7). Diambil dari <https://academic.oup.com/labmed/article/32/7/368/2657180>
- Bedard, M., & Drummond, R. A., 2016. *Candida albicans* Category: Pathogens and Disease. UK.
- Bhagat BP, & Desai PB., 2014. *Vulvovaginal Candidiasis: Isolation and Identification of Candida from Reproductive Age group Woman*. *Research Journal of Recent Sciences* (Vol. 3). Diambil dari www.isca.me
- Byrne, B. A. (2013). Laboratory Diagnosis of Fungal Diseases. In *Equine Infectious Diseases: Second Edition*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-0891-8.00046-4>
- Cassone, A., 2015. Vulvovaginal *Candida albicans* infections: Pathogenesis, immunity and vaccine prospects. *BJOG: An International Journal of Obstetrics and Gynaecology*. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/1471-0528.12994>
- Chen, C., Long, L., Zhang, F., Chen, Q., Chen, C., Yu, X., *et al.*, 2018. Antifungal activity, main active components and mechanism of *Curcuma longa* extract against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE*, 13(3), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194284>
- Dewi, S., N. Y. R. S. Assegaf, S., & Natalia, D., 2019. *Efek Ekstrak Etanol Daun Kesum (Polygonum minus Huds.) sebagai Antifungi terhadap Trichophyton rubrum*. *Jurnal Kesehatan Andalas* (Vol. 8). Diambil dari <http://jurnal.fk.unand.ac.id>
- Dhanasekaran, D., Vinothini, K., Latha, S., Thajuddin, N., & Panneerselvam, A. , 2014. Human dental biofilm: Screening, characterization, in vitro biofilm formation and antifungal resistance of *Candida* spp. *Saudi Journal for Dental Research*, 5(1), 55–70. <https://doi.org/10.1016/j.ksujds.2013.10.001>
- Dinastutie, R., Ys, P., Yuni, D., Hidayati, N., 2015. *Uji Efektifitas Antifungal Ekstrak Kulit Pisang Kepok (Musa acuminata x balbisiana) Mentah Terhadap Pertumbuhan Candida albicans Secara In Vitro Antifungal Effectivness Test of Unripe Kepok Banana Peel (Musa acuminata x balbisiana) towards*

- Candida albicans in vitro*. *Majalah Kesehatan FKUB* (Vol. 2).
- Djais, A. A., Jemmy, Putri, N., Putri, A. R., Darwita, R. R., & Bachtiar, B. M., 2019. Biofilm formation of candida albicans exposed to ethanol extract of propolis. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 11(1), 210–213. <https://doi.org/10.22159/ijap.2019.v11s1.18344>
- Dowd, F. J., 2007. *Candida Albicans Infections*. Omaha. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60909-2>
- Fitria, A., 2018. The Bactericidal and Antibiofilm Activity of Stem Bark of *Jatropha multifida* L. Against *Staphylococcus aureus* and MRSA. *Jurnal Eksakta*, 18(1), 42–55. <https://doi.org/10.20885/eksakta.vol18.iss1.art5>
- Gani, B. A., Alghassani, A. Q., Mubarak, Z., Winiati Bachtiar, E., & Bachtiar, B. M., 2017. [JDS]. *J Syiah Kuala Dent Soc*, 2(1), 33–39.
- Ghannoum, M. A., & Isham, N. C., 2009. Chapter 16 - Dermatophytes and dermatophytoses. In *Clinical Mycologi* (hal. 375–384). UK: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4160-5680-5.10016-7>
- Golia, S., Hittinahalli, V., Sangeeta, K. T., & Vasudha, C. L., 2012. Study of Biofilm Formation as a Virulence Maker in *Candida* Species Isolated from Various Clinical Specimens. *Journal of Evolution of Medical and Dental Sciences*, 1(6).
- Hasan Zaba, F., 2015. Daya Hambat Kombinasi Ekstrak *Cinnamomum burmannii*, *Vigna unguiculata*, dan *Papain* dari Lateks *Carica papaya* Terhadap Biofilm *Candida albicans*. Universitas Airlangga.
- Hosida, T. Y., Cavazana, T. P., Henriques, M., Pessan, J. P., Delbem, A. C. B., & Monteiro, D. R., 2018. Interactions between *Candida albicans* and *Candida glabrata* in biofilms: Influence of the strain type, culture medium and glucose supplementation. *Mycoses*, 61(4), 270–278. <https://doi.org/10.1111/myc.12738>
- Jalianto., 2015. Uji Aktivitas Antijamur Ekstrak Etanol Biji Buah Langsung (*Lansium domesticum* Corr.) Terhadap Jamur *Candida albicans* Secara *In vitro*. Universitas Tanjungpura, Pontianak.
- Jyoti, S., & Rajeshwari, S., 2012. Evaluation of Phytochemical Constituent in Conventional and Non Conventional Species of Curcuma. *IRJP*, 3(8), 203–204. Diambil dari www.mokshaph.com.
- Kadek Sri Jayanti, N., & Jirna, I. N., 2018. Isolasi *Candida albicans* Dari Swab Mukosa Mulut Penderita Diabetes Melitus Tipe 2. *Jurnal Teknologi Laboratorium*, 7(1), 1. <https://doi.org/10.29238/teknolabjournal.v7i1.103>
- Kawsud, P., Puripattanavong, J., & Teanpaisan, R., 2014. Screening for anticandidal and antibiofilm activity of some herbs in Thailand. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(9), 1495–1501. <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i9.16>
- Kurniati, N. F., Garmana, A. N., & Aziz, N., 2017. Aktivitas Antibakteri dan Antijamur Ekstrak Etanol Akar, Bunga, dan Daun Turi (*Sesbania grandiflora* L. POIR). Bandung.
- Kusbiantoro, D., & Purwaningrum, Y., 2018. Pemanfaatan kandungan metabolit

- sekunder pada tanaman kunyit dalam mendukung peningkatan pendapatan masyarakat. *Jurnal Kultivasi*, 17(1), 544–549.
- Maghfirah, F., Saputri, D., 2017. Aktivitas Pembentukan Biofilm Streptococcus Mutans dan Candida Albicans Setelah Dipapar Dengan Cigarette Smoke Condensate dan Minuman Probiotik. *Caninus Denstistry*, 2(1), 12–19.
- Mahmoudabadi, A. Z., Zarrin, M., & Kiasat, N., 2014. Biofilm formation and susceptibility to amphotericin B and fluconazole in *Candida albicans*. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(7). <https://doi.org/10.5812/jjm.17105>
- Manner, S., Skogman, M., Goeres, D., Vuorela, P., & Fallarero, A., 2013. Systematic exploration of natural and synthetic flavonoids for the inhibition of *Staphylococcus aureus* biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(10), 19434–19451. <https://doi.org/10.3390/ijms141019434>
- Masfufatun, Sudibya, A., & Kumala I., N., 2014. Potensi Ekstrak Protein *Candida albicans* Sebagai Bioreseptor Pada Imunosensor untuk Diagnosa Kandidiasis. *Ilmiah Kedokteran* (Vol. 3). Surabaya.
- Mayer, F. L., Wilson, D., & Hube, B., 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.4161/viru.22913>
- Monteiro, D. R., Gorup, L. F., Silva, S., Negri, M., de Camargo, E. R., Oliveira, R., et al., 2011. Silver colloidal nanoparticles: antifungal effect against adhered cells and biofilms of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Biofouling*, 27(7), 711–719. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.599101>
- Mubarak, Z., Gani, B. A., & Mutia., 2017. Daya Hambat Kunyit (*Curcuma longa* linn) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. *Cakradonya Dental Journal*, 11, 1–7.
- Mutiawati, V. K., 2016. Pemeriksaan Mikrobiologi pada *Candida albicans*. *Jurnal Kedokteran Syiah Kuala*, 16(1).
- Naz, S., Ilyas, S., Aslam, F., & Ali, A., 2010. Antibacterial activity of *Curcuma longa* varieties against different strains of bacteria phytoremediation potential of *Catharanthus roseus* View project Plant Proteins Actively Responding to Microbes and their Role in Cell Physiology View project. *Pakistan Journal of Botany*, 42(1), 455–462. Diambil dari <https://www.researchgate.net/publication/216321183>
- Njunda, A. L., Nsagha, D. S., Assob, J. C. N., Kamga, H. L., & Teyim, P., 2012. In vitro antifungal susceptibility patterns of *Candida albicans* from HIV and aids patients attending the Nylon Health District hospital in Douala, Cameroon. *Journal of Public Health in Africa*, 3(1), 4–7. <https://doi.org/10.4081/jphia.2012.e2>
- Njunda, L. A., Assob, J. C. N., Nsagha, S. D., Kamga, H. L. F., Ndellejong, E. C., & Kwenti, T. E., 2013. Oral and Urinary Colonisation of *Candida* Species in HIV/AIDS Patients in Cameroon. *Basic Sciences of Medicine*, 2(1), 1–8. <https://doi.org/10.5923/j.medicine.20130201.01>
- Nugrahani, N., Kunarti, S., & Setyowati, A., 2016. *Konsentrasi Efektif Daya Antibiofilm Kitosan Cangkang Udang terhadap Streptococcus Viridans* (The

- Effective Concentration of Antibiofilms Capacity from Shrimp Shells Chitosan towards Streptococcus Viridans*). *Conservative Dentistry Journal* (Vol. 6).
- O'Toole, G. A., 2010. Microtiter dish Biofilm formation assay. *Journal of Visualized Experiments*, (47). <https://doi.org/10.3791/2437>
- Paiva, L. C. F., Vidigal, P. G., Donatti, L., Svidzinski, T. I. E., & Consolaro, M. E. L., 2012. Assessment of in vitro biofilm formation by Candida species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. *Micron*, 43(2–3), 497–502. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.09.013>
- Pan, C. Y., Chen, J. Y., Lin, T. L., & Lin, C. H., 2009. In vitro activities of three synthetic peptides derived from epinecidin-1 and an anti-lipopolysaccharide factor against Propionibacterium acnes, Candida albicans, and Trichomonas vaginalis. *Peptides*, 30(6), 1058–1068. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.02.006>
- Pu, Y., Liu, A., Zheng, Y., & Ye, B., 2014. In vitro damage of Candida albicans biofilms by chitosan. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 8(3), 929–934. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1839>
- Puspitawati, R., Lewiyonah, R., Herdiantoputri, R. R., Gultom, F. P., & Suniarti, D. F., 2017. Eradication effect of javanese turmeric (Curcuma xanthorrhiza roxb.) extract on the early phase of candida albicans biofilm. *International Journal of Applied Pharmaceutics*, 9(Special Issue 2), 117–120. <https://doi.org/10.22159/ijap.2017.v9s2.29>
- Putri, M. H., Sukini, & Yodong., 2017. *Mikrobiologi* (1 ed.). Jakarta: Kementrian Kesehatan RI.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O., 2015. Agents that inhibit bacterial biofilm formation. *Future Medicinal Chemistry*. Future Science. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.7>
- Raut, J. S., Shinde, R. B., Chauhan, N. M., & Mohan Karuppayil, S., 2013. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by Candida albicans. *Biofouling*, 29(1), 87–96. <https://doi.org/10.1080/08927014.2012.749398>
- Rezeki, S., Chismirina, S., & Iski, A., 2017. Pengaruh Ekstrak Daun Sirih Merah (Piper crocatum) Terhadap Pertumbuhan Candida albicans. *J Syiah Kuala Dent Soc*, 2(1), 52–62.
- Sawant, R. S., & Godghate, A. G., 2013. Qualitative Phytochemical Screening of Rhizomes of *Curcuma longa* Linn. *International Journal of Science, Environment and Technology*, 2(4), 634–641. Diambil dari www.ijset.net
- Seneviratne, C. J., Jin, L., & Samaranayake, L. P., 2008. Biofilm lifestyle of Candida: A mini review. *Oral Diseases*. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2007.01424.x>
- Septiani, V., Choirunnisa, A., & Kahfi syam, A., 2017. Uji Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol Daun Karuk (*Piper sarmentosum* Roxb.) Terhadap *Streptococcus mutans* dan *Candida albicans*. *Kartika Jurnal Ilmiah Farmasi*, 5, 7–14.
- Shreaz, S., Bhatia, R., Khan, N., Imran Ahmad, S., Muralidhar, S., Basir, S. F., et

- al.*, 2011. Interesting anticandidal effects of anisic aldehydes on growth and proton-pumping-ATPase-targeted activity. *Microbial Pathogenesis*, 51(4), 277–284. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2011.05.005>
- Sida, H., Shah, P., Pethani, J., Patel, L., & Shah, H., 2016. Study of biofilm formation as a virulence marker in *Candida* species isolated from various clinical specimens. *International Journal of Medical Science and Public Health*, 5(5), 842. <https://doi.org/10.5455/ijmsph.2016.24082015139>
- Sinha, M., & Choudhury, M. D., 2010. Antimicrobial Activity of some selected plants from southern assam. *Assam University Journal of Science and Technology*, 6, 58–65.
- Thairu, Y., Usman, Y., & Nasir, I., 2014. Laboratory perspective of gram staining and its significance in investigations of infectious diseases. *Sub-Saharan African Journal of Medicine*, 1(4), 168. <https://doi.org/10.4103/2384-5147.144725>
- Traba, C., & Liang, J. F., 2011. Susceptibility of *Staphylococcus aureus* biofilms to reactive discharge gases. *Biofouling*, 27(7), 763–772. <https://doi.org/10.1080/08927014.2011.602188>
- Turan, H., & 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. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.05.003>
- Weerasekera, M. M., Wijesinghe, G. K., Jayarathna, T. A., Gunasekara, C. P., Fernando, N., Kottegoda, N., *et al.*, 2016. Culture media profoundly affect *Candida Albicans* and *Candida tropicalis* growth, adhesion and biofilm development. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 111(11), 697–702. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160294>
- WHO., 2003. *Traditional medicine Report by the Secretariat Global Situation*
- Wibawa, T., 2012. *Candida albicans* biofilm: formation and antifungal agents resistance. *J Med Sci* (Vol. 44).
- Wijaya, C. H., Rachmatillah, A. F., & M. Bachtiar, B., 2014. Penghambatan Cajuputs Candy Terhadap Viabilitas Khamir *Candida albicans* Secara *In Vitro* [Inhibition of Cajuputs Candy Toward the Viability of *Candida albicans* by using *In Vitro* Assay]. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*, 25(2), 158–167. <https://doi.org/10.6066/jtip.2014.25.2.158>
- Wulandari, A., 2017. *Uji Aktivitas Ekstrak Kloroform dan Etil Asetat dari Rimpang Temu Hitam (Curcuma aeruginosa Roxb.) Terhadap Produksi Biofilm Staphylococcus aureus dan Candida albicans*. Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.
- Y. Bhaskara, G., 2012. Uji Daya Antifungi Ekstrak Etanol Daun Salam (*Syzygium polianthum* [Wight] Walp.) Terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 Secara *In Vitro*. Universitas Muhammadiyah Surakarta.
- Yanti, N., Samingan, & Mudatsir., 2016. Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Gal Manjakani (*Quercus infectoria*) Terhadap *Candida albicans*. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Pendidikan Biologi* (Vol. 1).
- Zeuko´o, M. E., Virginio, C. L., Sara, M. S., & Fekam, B. F., 2016. Anti-candida

biofilm properties of Cameroonian plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*, 10(35), 603–611. <https://doi.org/10.5897/jmpr2016.6163>

Zorofchian Moghadamtousi, S., Abdul Kadir, H., Hassandarvish, P., Tajik, H., Abubakar, S., & Zandi, K., 2014. A review on antibacterial, antiviral, and antifungal activity of curcumin. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation. <https://doi.org/10.1155/2014/186864>



LAMPIRAN

Lampiran I *Minimum information guideline for spectrophotometric and fluorometric methods to assess biofilm formation in microplates* (Allkja et al., 2020).

	<i>Staphylococcus aureus</i> spp.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> spp.	<i>Candida albicans</i>
Inoculum preparation			
Media	TSB, TSB wS*, LBb**, Water ^{8,11,18,36-41}	TSB, TSB wS*, LBb**, LB**, BHI**, MHI**, T-broth**, AB* ^{8,42-49}	YNB**, YPD**, RPMI-1640**, SDB** ^{8,50-57}
Inoculum incubation temperature (°C)	35-37 ^{8,11,18,36-41}	25-37 ^{8,42-49}	30-37 ^{8,50-57}
Incubation time (hours)	0***,24 ^{8,11,18,36-41}	0***,24 ^{8,42-49}	12-24 ^{8,50-57}
Inoculum shaking conditions	0-200 rpm/min ^{8,11,18,36-41}	0-250 rpm/min ^{8,42-49}	0-200 rpm/min, Roller drum ^{8,50-57}
Inoculum concentration / OD / growth phase at harvest	10 ⁷ -10 ⁸ CFU/mL, 0.5 McFarland, OD _{600nm} =0.1 ^{8,11,18,36-41}	10 ⁷ -10 ⁸ CFU/mL, OD _{600nm} =0.0025, OD ₅₉₅ =1.5 ^{8,42-49}	10 ⁶ -10 ⁸ CFU/mL, OD _{600nm} =1 ^{8,50-57}
Biofilm growth			
Media	TSB, LB**, BHI** ^{8,11,18,36-41}	TSB, T-broth**, AB**, BHI**, MHI** ^{8,42-49}	YNB**, YPD**, RPMI-1640**, ASM**, SDB**, PBS**** ^{8,50-57}
Incubation temperature (°C)	35-37 ^{8,11,18,36-41}	25-37 ^{8,42-49}	37 ^{8,50-57}
Incubation time (hours)	18-48 ^{8,11,18,36-41}	2-48 ^{8,42-49}	2-48 ^{8,50-57}
Shaking conditions	0-200 rpm/min ^{8,11,18,36-41}	0-180 rpm/min ^{8,42-49}	0-120 rpm/min ^{8,50-57}
Biofilm Assessment			
Washing agent	Water, Saline, PBS****, MilliQ water ^{8,11,18,36-41}	Saline, Water, PBS*** ^{8,42-49}	PBS****, Water, Saline ^{8,50-57}
Washing (x times)	1-3 ^{8,11,18,36-41}	1-3 ^{8,42-49}	1-3 ^{8,50-57}
Crystal violet concentration	0.01-2.3 % ^{8,11,18,36-41}	0.1-2 % ^{8,42-49}	0.02-1 % ^{8,50-57}
Staining time	1-20 min ^{8,11,18,36-41}	5-30 min ^{8,42-49}	5-45 min ^{8,50-57}
Solubilisation agent	33 % acetic acid, 95-100 % ethanol ^{8,11,18,36-41}	30-33 % acetic acid, 95-100 % ethanol, DMSO**** ^{8,42-49}	30-33% acetic acid, 95 % ethanol, 0.1% Triton-X ^{8,50-57}
Absorbance wavelength (nm)	540-595 ^{8,11,18,36-41}	550-595 ^{8,42-49}	540-595 ^{8,50-57}
*wS – with Supplement (i.e. added yeast and/or glucose) **TSB- Tryptic Soy Broth; LBb – Luria Bertani broth; BHI- Brain Heart Infusion; LB – Lysogeny broth; MHI – Mueller-Hinton broth; T-broth – Terrific broth; AB – minimal growth media; YNB – Yeast Nitrogen Base; YPD – Yeast Peptone Dextrose; SDB – Sabaurand Dextrose Broth; RPMI-1640 - Roswell Park Memorial Institute-1640 medium; ASM – Artificial Saliva Medium; ***0 – Inoculum prepared directly from agar culture ****PBS- Phosphate buffered saline; DMSO – Dimethyl sulfoxide			

576 Table 3. Example of the variability in protocol conditions of crystal violet assays for
577 three different example microorganisms

Lampiran II *Ethical Clearance*

FAKULTAS
KEDOKTERAN

Gedung Dr. Soekiman Wijosandjjo
Kampus Terpadu Universitas Islam Indonesia
Jl. Kaliurang km 14,5 Yogyakarta 55584
T. (0274) 898444 ext. 2096, 2097
F. (0274) 898459 ext. 2007
E. fk@uii.ac.id
W. fk.uui.ac.id

Nomor : 26/Ka.Kom.Et/70/KE/X/2019

KETERANGAN LOLOS KAJI ETIK
ETHICAL APPROVAL

Komite Etik Penelitian Kedokteran dan Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Islam Indonesia dalam upaya melindungi hak asasi dan kesejahteraan subyek penelitian kedokteran dan kesehatan, telah mengkaji dengan teliti protokol berjudul :

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Islamic University of Indonesia, with regards of the protection of human rights and welfare in medical and health research, has carefully reviewed the research protocol entitled :

"Uji Efektivitas Antibiofilm Ekstrak Metanol Kunyit (*Curcuma Longa*) terhadap *Candida albicans* ATCC 10231"

Peneliti Utama : Soviyanti Wulandari
Principal Investigator

Nama Institusi : Program Studi Pendidikan Dokter FK UII
Name of the Institution

dan telah menyetujui protokol tersebut diatas.
and approved the above-mentioned protocol.

Yogyakarta, 31 Oktober 2019

Ketua
Chairman




Soviyanti Wulandari, M.Sc, Sp.PK

**Ethical Approval* berlaku satu tahun dari tanggal persetujuan

**Peneliti berkewajiban

1. Menjaga kerahasiaan identitas subyek penelitian
2. Memberitahukan status penelitian apabila :
 - a. Setelah masa berlakunya keterangan lolos kaji etik, penelitian masih belum selesai, dalam hal ini *ethical clearance* harus diperpanjang
 - b. Penelitian berhenti di tengah jalan
3. Melaporkan kejadian serius yang tidak diinginkan (*serious adverse events*)
4. Peneliti tidak boleh melakukan tindakan apapun pada subyek sebelum penelitian lolos kaji etik dan *informed consent*

Lampiran III Hasil Determinasi Tanaman Kunyit (*Curcuma longa*)


UNIVERSITAS GADJAH MADA
FAKULTAS BIOLOGI
LABORATORIUM SISTEMATIKA TUMBUHAN
Jalan Teknika Selatan Sekip Utara Yogyakarta 55281 Telpun (0271) 6482262/6492272; Fax: (0271) 8580839

SURAT KETERANGAN
 Nomor : 014884/5.Tb./VIII/2020

Yang bertanda tangan dibawah ini, Kepala Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi UGM, menerangkan dengan sesungguhnya bahwa,

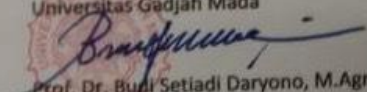
Nama : Soviyanti Wulandari
 NIM : 16711059
 Asal instansi : Fakultas Kedokteran Ull Yogyakarta

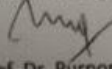
telah melakukan identifikasi tumbuhan dengan hasil sebagai berikut,

Kingdom : *Plantae*
 Divisio : *Trocheophyta*
 Class : *Liliopsida*
 Ordo : *Zingiberales*
 Famillia : *Zingiberaceae*
 Genus : *Curcuma*
 Species : *Curcuma longa* L.
 Sinonim : *Curcuma domestica* Valetton
 Namalokal : Kunyit

identifikasi tersebut dibantu oleh Prof. Dr. Purnomo, M.S.
 Demikian surat keterangan ini diberikan untuk dapat dipergunakan seperlunya.

Yogyakarta, 06 Agustus 2020
 Kepala Laboratorium
 Sistematika Tumbuhan
 Fakultas Biologi UGM

Mengetahui,
 Dekan Fakultas Biologi
 Universitas Gadjah Mada

 Prof. Dr. Budi Setiadi Daryono, M.Agr.Sc.
 NIP. 197003261995121001


 Prof. Dr. Purnomo, M.S.
 NIP. 195504211982031005

Lampiran IV Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Metanol Rimpang Kunyit (*Curcuma longa*)


LABORATORIUM PENGUJIAN OBAT, MAKANAN DAN KOSMETIK
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA
 Jl. Kaliurang KM. 14,5 Sleman Yogyakarta - Telp. [0274] 898444 ext. 3037 - Fax. [0274] 896439

Nomor: 072/LPOMK/VII/2020
 Number
 Halaman: 2 dari 3
 Page

SERTIFIKAT PENGUJIAN
TEST RESULT
TEST CERTIFIED

No	Uji	Hasil	Kesimpulan	Pustaka
1	Flavonoid	Terbentuk warna kuning 	+ Flavonoid	Terbentuk fluoresensi warna kuning intensif (Depkes RI, 1979)
2	Alkaloid	Terbentuk warna orange dengan pereaksi dragendrof 	+ Alkaloid	Terbentuk warna orange dengan pereaksi dragendrof (Depkes RI, 1979)



LABORATORIUM PENGUJIAN OBAT, MAKANAN DAN KOSMETIK
UNIVERSITAS ISLAM INDONESIA

Jl. Kaliurang KM. 14,5 Sleman Yogyakarta - Telp. (0274) 898444 ext. 3037 - Fax. (0274) 896439





SERTIFIKAT PENGUJIAN Nomor: 072/LPOMK/VII/2020

Number

Halaman: 3 dari 3

Page

TEST CERTIFIED
HASIL PENGUJIAN
TEST RESULT

No	Uji	Hasil	Kesimpulan	Pustaka
3	Terbentuk buih setinggi 1 cm 	+ Saponin	Buih 1-10 cm selama 10 menit (Depkes RI, 1979)	Terbentuk buih setinggi 1 cm 
4	Terbentuk warna ungu biru 	+ Polifenol	Terbentuk warna ungu biru (Depkes RI, 1979)	Terbentuk warna ungu biru 

Yogyakarta, Juni 2020

Manajer Teknis

Ari Wibowo, M.Sc., Apt

NIP. 066130404

Catatan : 1. Hasil pengujian ini hanya berlaku untuk sampel yang diuji

Notes These test result are only valid for the tested samples

2. Sertifikat ini tidak boleh diperbanyak/digandakan tanpa izin dari Manajer Teknis Laboratorium

The certificate shall not be reproduced (copied) without the written permission of the laboratory Technical Manager

Lampiran V Analisis Statistik Aktivitas Penghambatan Biofilm *Candida albicans* oleh Ekstrak Rimpang Kunyit (*Curcuma longa*)

a. Uji normalitas *One-Sample Shapiro-Wilk*

Tujuan : untuk melihat normalitas distribusi dari data densitas optik uji penghambatan biofilm

Hipotesis :

- H_0 : Data densitas optik dari uji penghambatan biofilm terdistribusi normal
- H_a : Data densitas optik dari uji penghambatan biofilm terdistribusi tidak normal

Pengambilan Kesimpulan

- Jika nilai signifikansi $\geq 0,05$ maka H_0 diterima
- Jika nilai signifikansi $\leq 0,05$ maka H_0 ditolak

Kelompok	Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Nilai	Ekstrak 80%	.309	3	.901	3	.387
	Ekstrak 40%	.248	3	.969	3	.660
	Ekstrak 20%	.329	3	.869	3	.292
	Ekstrak 10%	.240	3	.975	3	.694
	Ekstrak 5%	.354	3	.822	3	.168
	Kontrol Antifungal	.278	3	.940	3	.527
	Kontrol media	.365	3	.799	3	.111
	Kontrol negatif	.278	3	.940	3	.528

a. Lilliefors Significance Correction

Kesimpulan: Data densitas optik penghambatan biofilm seluruh kelompok terdistribusi normal ($p \geq 0,05$).

b. Uji homogenitas *Levene*

Tujuan : untuk melihat homogenitas dari data densitas optik penghambatan biofilm

Hipotesis :

- H_0 : data densitas optik penghambatan biofilm homogen
- H_a : data densitas optik penghambatan biofilm tidak homogen

Pengambilan Kesimpulan:

- Jika nilai signifikansi $\geq 0,05$ maka H_0 diterima
- Jika nilai signifikansi $\leq 0,05$ maka H_0 ditolak

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df1	df2	Sig.
Nilai	Based on Mean	6.958	7	16	.001
	Based on Median	1.543	7	16	.223
	Based on Median and with adjusted df	1.543	7	4.462	.341
	Based on trimmed mean	6.316	7	16	.001

Kesimpulan : data densitas optic penghambatan biofilm homogen ($p \geq 0,05$) kemudian dilanjutkan dengan uji One-Way ANOVA.

c. Uji One-Way ANOVA

Tujuan : untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan secara bermakna dari data densitas optic penghambatan biofilm

Hipotesis :

- H_0 : data densitas optic penghambatan biofilm tidak berbeda secara bermakna
- H_a : data densitas optic penghambatan biofilm berbeda secara bermakna

Pengambilan Kesimpulan

- Jika nilai signifikansi $\geq 0,05$ maka H_0 diterima
- Jika nilai signifikansi $\leq 0,05$ maka H_0 ditolak

ANOVA					
Nilai	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.574	7	.225	5.751	.002
Within Groups	.626	16	.039		
Total	2.200	23			

Kesimpulan : densitas optic biofilm berbeda secara bermakna ($p \leq 0,05$), kemudian dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

d. Uji Beda Nyata Terkecil(BNT) terhadap densitas biofilm

Tujuan : untuk menentukan data densitas penghambat biofilm kelompok mana yang memberikan nilai yang berbeda secara bermakna dengan data densitas penghambatan biofilm kelompok lainnya.

Hipotesis :

- H_0 : data densitas penghambatan biofilm tidak berbeda secara bermakna
- H_a : data densitas penghambatan biofilm berbeda secara bermakna

Pengambilan Keputusan

- Jika nilai signifikansi $\geq 0,05$ maka H_0 diterima
- Jika nilai signifikansi $\leq 0,05$ maka H_0 ditolak

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Nilai

Bonferroni

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Ekstrak 80 %	Ekstrak 40 %	.2368667	.1614724	1.000	-.367012	.840745
	Ekstrak 20 %	.3105667	.1614724	1.000	-.293312	.914445
	Ekstrak 10 %	.2993000	.1614724	1.000	-.304578	.903178
	Ekstrak 5 %	.2926333	.1614724	1.000	-.311245	.896512
	Kontrol Antifungal	.5613667	.1614724	.087	-.042512	1.165245
	Kontrol media	.5653000	.1614724	.083	-.038578	1.169178
	Kontrol negatif	-.2578000	.1614724	1.000	-.861678	.346078
Ekstrak 40 %	Ekstrak 80 %	-.2368667	.1614724	1.000	-.840745	.367012
	Ekstrak 20 %	.0737000	.1614724	1.000	-.530178	.677578
	Ekstrak 10 %	.0624333	.1614724	1.000	-.541445	.666312
	Ekstrak 5 %	.0557667	.1614724	1.000	-.548112	.659645
	Kontrol Antifungal	.3245000	.1614724	1.000	-.279378	.928378
	Kontrol media	.3284333	.1614724	1.000	-.275445	.932312
	Kontrol negatif	-.4946667	.1614724	.208	-1.098545	.109212
Ekstrak 20 %	Ekstrak 80 %	-.3105667	.1614724	1.000	-.914445	.293312
	Ekstrak 40 %	-.0737000	.1614724	1.000	-.677578	.530178
	Ekstrak 10 %	-.0112667	.1614724	1.000	-.615145	.592612
	Ekstrak 5 %	-.0179333	.1614724	1.000	-.621812	.585945
	Kontrol Antifungal	.2508000	.1614724	1.000	-.353078	.854678
	Kontrol media	.2547333	.1614724	1.000	-.349145	.858612
	Kontrol negatif	-.5683667	.1614724	.080	-1.172245	.035512
Ekstrak 10 %	Ekstrak 80 %	-.2993000	.1614724	1.000	-.903178	.304578
	Ekstrak 40 %	-.0624333	.1614724	1.000	-.666312	.541445
	Ekstrak 20 %	.0112667	.1614724	1.000	-.592612	.615145
	Ekstrak 5 %	-.0066667	.1614724	1.000	-.610545	.597212
	Kontrol Antifungal	.2620667	.1614724	1.000	-.341812	.865945
	Kontrol media	.2660000	.1614724	1.000	-.337878	.869878
	Kontrol negatif	-.5571000	.1614724	.092	-1.160978	.046778
Ekstrak 5 %	Ekstrak 80 %	-.2926333	.1614724	1.000	-.896512	.311245
	Ekstrak 40 %	-.0557667	.1614724	1.000	-.659645	.548112
	Ekstrak 20 %	.0179333	.1614724	1.000	-.585945	.621812
	Ekstrak 10 %	.0066667	.1614724	1.000	-.597212	.610545
	Kontrol Antifungal	.2687333	.1614724	1.000	-.335145	.872612
	Kontrol media	.2726667	.1614724	1.000	-.331212	.876545
	Kontrol negatif	-.5504333	.1614724	.101	-1.154312	.053445

Dependent Variable: Nilai

Bonferroni

(I) Kelompok	(J) Kelompok	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95 % Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
Kontrol Antifungal	Bkstrak 80 %	-.5613667	.1614724	.087	-1.165245	.042512
	Bkstrak 40 %	-.3245000	.1614724	1.000	-.928378	.279378
	Bkstrak 20 %	-.2508000	.1614724	1.000	-.854678	.353078
	Bkstrak 10 %	-.2620667	.1614724	1.000	-.865945	.341812
	Bkstrak 5 %	-.2687333	.1614724	1.000	-.872612	.335145
	Kontrol media	.0039333	.1614724	1.000	-.599945	.607812
	Kontrol negatif	-.8191667	.1614724	.003	-1.423045	-.215288
Kontrol media	Bkstrak 80 %	-.5653000	.1614724	.083	-1.169178	.038578
	Bkstrak 40 %	-.3284333	.1614724	1.000	-.932312	.275445
	Bkstrak 20 %	-.2547333	.1614724	1.000	-.858612	.349145
	Bkstrak 10 %	-.2660000	.1614724	1.000	-.869878	.337878
	Bkstrak 5 %	-.2726667	.1614724	1.000	-.876545	.331212
	Kontrol Antifungal	-.0039333	.1614724	1.000	-.607812	.599945
	Kontrol negatif	-.8231000	.1614724	.003	-1.426978	-.219222
Kontrol negatif	Bkstrak 80 %	.2578000	.1614724	1.000	-.346078	.861678
	Bkstrak 40 %	.4946667	.1614724	.208	-.109212	1.098545
	Bkstrak 20 %	.5683667	.1614724	.080	-.035512	1.172245
	Bkstrak 10 %	.5571000	.1614724	.092	-.046778	1.160978
	Bkstrak 5 %	.5504333	.1614724	.101	-.053445	1.154312
	Kontrol Antifungal	.8191667	.1614724	.003	.215288	1.423045
	Kontrol media	.8231000	.1614724	.003	.219222	1.426978

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

