

COMPARISON OF ANTIFUNGAL EFFECTS OF 50% SIWAK (SALVADORA PERSICA) ETHANOL EXTRACT WITH NYSTATIN ORAL SUSPENSION ON CANDIDA ALBICANS BIOFILM (IN VITRO STUDY)

Ayatusyifa' Maghfyrany Sumarno*, Rina Kartika Sari**, Rahmawati Sri Praptiningsih***

*Undergraduate Student, Faculty of Dentistry, Sultan Agung Islamic University Semarang

**Department of Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Sultan Agung Islamic University Semarang

*** Department of Oral Biology Faculty of Dentistry, Sultan Agung Islamic University Semarang

Correspondence: rina.kartika@unissula.ac.id

Keywords:

Candida albicans,
Nystatin, *Siwak*

ABSTRACT

Background: *Candida albicans* is an opportunistic pathogen that grow and survive as a commensal. However, a number of predisposing factors can turn them into pathogens. Nystatin is an antifungal drug from the polyene group use to treat oral candidiasis. Siwak have various bioactive components that can affect oral health. Tannin, one of the chemical component of siwak, is known to have antifungal activity against *Candida albicans*. This study aim to compare the antifungal effect of 50% siwak and nystatin on the *Candida albicans* biofilm.

Method: This research method was an experimental type with a post test only control group design with a sample of 36 divided into 2 groups: 50% siwak and nystatin. Each group was incubated for 24 hours. The formation of biofilms was measured by calculating Optical Density using an ELISA-reader. Data analysis was performed using the Independent T-test.

Result: The results of the average optical density values obtained 50% siwak group was 2.64261 and nystatin group was 2.428. Independent T-test results obtained $p = .138$ ($p > 0.05$) which showed no significant difference in antifungal effects between 50% siwak and nystatin.

Conclusion: This research showed that 50% siwak extract and nystatin had an equivalent antifungal effect in reducing in vitro growth of *Candida albicans* biofilms.

PENDAHULUAN

Kandidiasis rongga mulut adalah infeksi oportunistik yang umum terjadi pada mukosa rongga mulut karena pertumbuhan berlebih spesies *Candida*, khususnya *Candida albicans*⁽¹⁾⁽²⁾. *Candida albicans* adalah flora normal yang dapat berubah menjadi organisme patogen akibat faktor predisposisi. Faktor predisposisi terbagi menjadi dua yaitu lokal dan umum. Faktor predisposisi lokal seperti penggunaan gigi tiruan, merokok, steroid inhalasi, steroid topikal, kuantitas dan kualitas saliva, dan ketidakseimbangan flora normal. Faktor predisposisi umum seperti penyakit

immunosupresif, obat immunosupresif, gangguan endokrin, dan kemoterapi⁽¹⁾. Secara klinis, kandidiasis dapat menimbulkan manifestasi di rongga mulut berupa infeksi superfisial seperti, Kandidiasis Pseudomembran Akut, Kandidiasis Keratonik Kronik, Kandidiasis Atrofik Akut, Kandidiasis Atrofik Kronis, dan Angular Cheilitis⁽²¹⁾.

Candida albicans dapat membentuk biofilm di atas permukaan benda abiotik maupun biotik⁽³⁾. Biofilm terbentuk melalui tiga tahap yaitu fase awal, fase intermediet, dan fase maturasi⁽⁴⁾. Fase awal merupakan proses *Candida albicans*

dalam bentuk *yeast* melekat pada suatu permukaan dalam waktu sekitar 60-90 menit⁽⁵⁾. Fase berikutnya adalah fase intermediet dimana sel *Candida albicans* berproliferasi dan ditandai dengan perubahan *yeast* menjadi hifa⁽⁵⁾⁽⁴⁾. Fase maturasi terbentuk biofilm yang kompleks dan terjadi dalam waktu setelah 24 jam⁽⁵⁾.

Siwak (*Salvadora persica*) memiliki berbagai komponen bioaktif yang dapat mempengaruhi kesehatan rongga mulut⁽⁶⁾. Tanin diketahui mempunyai aktivitas *antifungal* terhadap *Candida albicans*. Tanin diduga memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas enzim glikosiltransferase. Hambatan aktivitas kinerja enzim glikosiltransferase dapat menyebabkan dinding sel kehilangan rigiditas dan menyebabkan perlekatan *Candida albicans* pada sel epitel host akan berkurang secara signifikan⁽⁷⁾.

Nistatin adalah obat *antifungal* dari kelompok polien yang didapatkan dari *Streptomyces noursei*⁽⁸⁾. Nistatin bekerja dengan cara berikatan dan berinteraksi dengan ergosterol, sehingga mengakibatkan terbentuknya saluran di sepanjang membran sel. Sel akan mengalami perubahan permeabilitas dan menyebabkan kebocoran sehingga berujung pada kematian sel⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾.

Tujuan dari penelitian ini adalah mengetahui perbandingan efek *antifungal* suspensi ekstrak etanol siwak 50% dengan suspensi oral nistatin terhadap biofilm *Candida albicans*. Manfaat dari penelitian ini memberikan informasi mengenai perbandingan efek *antifungal* suspensi ekstrak etanol siwak 50% dengan suspensi oral nistatin terhadap biofilm *Candida albicans*. Hipotesis penelitian ini adalah efek *antifungal* suspensi ekstrak etanol siwak 50% lebih besardibandingkan dengan suspensi oral nistatin terhadap biofilm *Candida albicans*.

METODE PENELITIAN

Ethical Clearence (EC) terutama pada penelitian Berdasarkan No. *Ethical Clearence* No.130/B.1-KEPK/SA-FKG/X/2019 penelitian ini merupakan penelitian dengan jenis metode eksperimental laboratoris murni dengan rancangan *post test only with control group design*. Perhitungan besar sampel berdasarkan rumus Federer, didapatkan jumlah sampel 18 *plate* pada setiap kelompok. Pada penelitian ini terdapat kelompok dengan perlakuan suspensi ekstrak siwak 50% dan suspensi oral nistatin, sehingga total sampel sebanyak 36 *plate*.

Pembuatan ekstrak menggunakan siwak yang telah dipotong kecil-kecil dan dikeringkan, selanjutnya digiling untuk membentuk serbuk. Serbuk siwak diekstraksi menggunakan pelarut etanol 96% dan dimaserasi selama 3x24 jam. Campuran yang didapat kemudian disaring lalu dipekatkan dengan rotary evaporator, kemudian diuapkan dengan *waterbath*⁽¹¹⁾. Suspensi ekstrak siwak dibuat dengan cara ekstrak siwak 100% dicampurkan dengan Na CMC dengan perbandingan 1:2⁽¹²⁾.

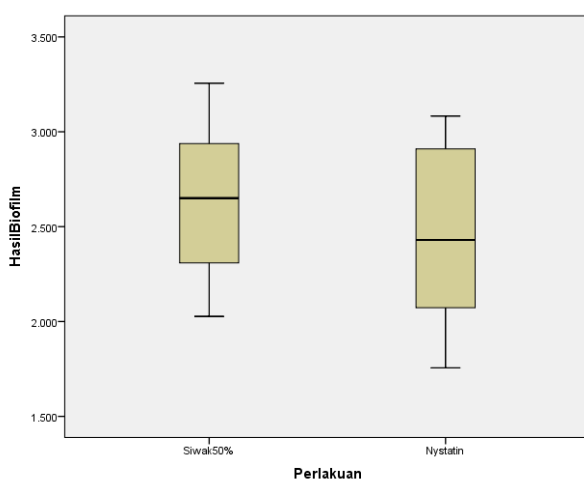
Pembuatan suspensi *Candida albicans* dilakukan dengan cara memasukkan 1 koloni ke dalam media pepton dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C, kemudian setarakan suspensi dengan larutan Mc Farland 0,5⁽¹³⁾. Sampel dibuat dengan membentuk pelikel terlebih dahulu pada well-plate. Pelikel dibuat dari saliva yang difilter menggunakan *syringe filter minisart* 0,22µm yang dimasukkan pada well-plate dan diinkubasi selama 2 jam pada suhu 37°C. Plate selanjutnya dibilas dengan phosphate buffer saline (PBS). Ambil suspensi *Candidaalbicans* sebanyak 200 µl letakkan pada well-plate yang telah terdapat pelikel, kemudian inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Bilas plate dengan larutan PBS. Masukkan pada plate 100 µl suspensi *Candida*

albicans dan 100 µl agen *antifungal* (suspensi ekstrak siwak 50%, suspensi oral nistatin) kemudian kembali inkubasi plate selama 24 jam pada suhu 37°C. Bilas plate dengan larutan PBS dandiam. Lakukan pewarnaan pada plate dengan memasukkan larutan kristal violet 1% dan diamkan selama 15 menit. Bilas plate dengan larutan PBS dan diamkan selama 5 menit. Cuci plate dengan menggunakan etanol 96% dan diamkan selama 15 menit. Pembacaan hasil dengan mengukur *optical density* menggunakan *ELISA-reader*⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾.

Data diambil dari nilai *optical density* hasil pembacaan *ELISA-reader* untuk melihat ketebalan biofilm yang terbentuk. Data yang telah terkumpul dilakukan analisis data menggunakan SPSS. Uji normalitas data dilakukan dengan *Shapiro Wilk* (jumlah sampel <50 per kelompok). Uji homogenitas dilakukan menggunakan uji *Levene Statistic*. Apabila data dinyatakan normal dan homogen (*asympt sig*>0.05), data dianalisis menggunakan uji *independent T- test*. Apabila data tidak normal dan tidak homogen (*asympt sig*<0.05) maka dilakukan analisis dengan uji *Mann-Whitney*.

HASIL PENELITIAN

Hasil perbandingan nilai rata-rata *optical density* biofilm *Candida albicans* :



Gambar 1. Rata-rata nilai *optical density* biofilm *Candida albicans*

Berdasarkan Gambar 1, diketahui rata-rata nilai *optical density* biofilm *Candida albicans* kelompok siwak 50% lebih tinggi dibandingkan kelompok nistatin.

Hasil dari uji normalitas dan uji homogenitas adalah hasil uji normalitas didapatkan nilai sig. (P) .508 pada kelompok siwak 50% dan .099 pada kelompok nistatin (sig. (P)>0.05) sehingga menunjukkan data terdistribusi normal. Hasil uji homogenitas didapatkan nilai sig. (P) .112 (sig. (P)>0.05) maka sebaran semua data kelompok dinyatakan homogen.

| Kelompok | Sig. |
|-----------|------|
| Siwak 50% | .138 |
| Nistatin | |

Tabel 1. Hasil uji *Independent T-Test*

Pada Tabel 1 hasil dari uji *Independent T-Test* didapatkan nilai sig. (P)0.138 ($p > 0,05$) yang menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang signifikan antara 2 kelompok.

DISKUSI

Pada penelitian didapatkan hasil nilai rata-rata *optical density* pada kelompok uji (siwak konsentrasi 50%) lebih tinggi daripada kelompok kontrol (nistatin) dan pada penelitian ini didapatkan hasil kelompok uji dan kelompok kontrol memiliki efek *antifungal* yang setara dalam menurunkan biofilm *Candida albicans* secara *in vitro*. Hasil penelitian terdahulu menunjukkan bahwa ekstrak siwak dengan konsentrasi 50% efektif menghambat pertumbuhan koloni *Candida albicans*⁽⁷⁾. Penelitian terdahulu mengenai *Candida albicans* pada plat resin akrilik yang

direndam dalam ekstrak siwak menunjukkan hasil adanya hambatan pertumbuhan *Candida albicans* oleh ekstrak siwak⁽¹⁵⁾.

Dinding sel jamur merupakan struktur penting yang berperan dalam mengontrol permeabilitas sel, melindungi sel dari tekanan osmotik serta mekanik, dan berperan dalam interaksi antara sel jamur dengan *host* yang kemudian akan mempengaruhi respon imun *host*⁽²⁰⁾. Sel jamur membutuhkan sejumlah *carbohydrate active enzymes* yang meliputi glikosiltransferase, glikosilhidrolase, dan transglikosidase (enzim dengan aktivitas glikosiltransferase dan glikosilhidrolase) untuk membangun dinding sel. Glukan dan kitin sintase diklasifikasikan sebagai glikosiltransferase⁽¹⁷⁾. Salah satu jenis enzim glikosiltransferase adalah 1,3 β -glukan sintase, yaitu enzim yang memiliki tanggung jawab dalam konstruksi dinding sel jamur dan berperan dalam sintesis β -glukan. β -glukan adalah polisakarida yang merupakan salah satu komposisi primer dinding sel *Candida albicans* dan merupakan polisakarida yang paling dominan dalam menyusun dinding sel *Candida albicans*⁽⁷⁾. 1,3 β -glukan merupakan komponen utama dinding sel *Candida albicans*⁽¹⁷⁾.

Tanin merupakan komponen kimia pada siwak yang diduga memiliki kemampuan untuk menghambat aktivitas enzim glikosiltransferase. Sehingga apabila kinerja enzim glikosiltransferase dihambat, maka dinding sel akan kehilangan rigiditas dan menyebabkan perlekatan *Candida albicans* pada sel epitel *host* akan berkurang secara signifikan⁽⁷⁾. Disfungsi pada regulasi dinding sel dapat mengurangi sifat adhesi *Candida albicans*⁽¹⁸⁾.

Matriks ekstraseluler menentukan karakteristik dari biofilm spesies *Candida* dan dapat memberikan perlindungan dari sistem imun *host* dan agen *antifungal*. Komposisi matriks dari

biofilm *Candida albicans* terdiri dari karbohidrat, protein, fosfor, dan heksosamin. Komponen utama karbohidrat adalah 1,3 β -glukan, zat tersebut berada di dinding sel biofilm *Candida albicans* dan sebagai bagian dari matriks ekstraseluler⁽¹⁹⁾. 1,3 β -glukan merupakan komponen utama matriks ekstraseluler yang diproduksi oleh *Candida albicans* dalam pertumbuhan biofilm⁽¹⁷⁾.

KESIMPULAN

Kesimpulan dari penelitian ini adalah ekstrak siwak 50% dan nistatin memiliki efek *antifungal* yang setara dalam menurunkan biofilm *Candida albicans* secara *in vitro*.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada drg. Rina Kartika Sari, SP.PM, drg. Rahmawati Sri Praptiningsih, M.MedEd, dan drg. Rizki Amalina, M.Si atas arahan dan bimbingan yang diberikan dalam penelitian yang dilakukan. Ucapan terima kasih kepada keluarga dan teman-teman yang selalu memberi semangat serta memotivasi selama penelitian dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Glick M. Burket's Oral Medicine 12th Edition. Shelton, Connecticut: People's Medical Publishing House; 2015.
2. Pedersen Aml. Oral Infections And General Health: From Molecule To Chairside. Oral Infections And General Health: From Molecule To Chairside. Switzerland: Springer; 2015. 1–149 Hal.
3. Mayer FI, Wilson D, Hube B. *Candida Albicans* Pathogenicity Mechanisms. *Virulence*. 2013;4(2):119–28.
4. Wibawa T. *Candida Albicans* Biofilm: Formation And Antifungal Agents Resistance. *J Med Sci (Berkala Ilmu Kedokteran)*. 2015;44(02):1–9.
5. Gulati M, Nobile Cj. *Candida Albicans* Biofilms: Development, Regulation, And Molecular Mechanisms. *Microbes Infect*. 2016;18(5):310–21.
6. Haque Mm, Alsareii Sa. A Review Of The Therapeutic Effects Of Using Miswak (*Salvadora Persica*) On Oral Health. Saudi

- Med J. 2015;36(5):530–43.
7. Maharani S, Santoso O. Pengaruh Pemberian Larutan Ekstrak Siwak (Salvadora Persica) Pada Berbagai Konsentrasi Terhadap Pertumbuhan Candida Albicans. J PDGI. 2012;61(2):61–4.
 8. Tripathi K. Essentials Of Pharmacology For Dentistry. Jaypee Brothers Medical Publishers; 2016.
 9. Dowd Fj, Johnson Bs, J. Am. Pharmacology And Therapeutics For Dentistry 7th Ed. Vol. 46. Elsevier; 2017.
 10. Apsari As, Adiguna Ms. Resistensi Antijamur Dan Strategi Untuk Mengatasi. Media Dermato-Venereologica Indones. 2013;40:89–95.
 11. Adzakiyah T, Lipoeto I, Kasuma N. Pengaruh Berkumur Dengan Larutan Ekstrak Siwak (Salvadora Persica) Terhadap PH Saliva Rongga Mulut. J Sains Farm Klin.2016;2(1):74–7.
 12. Hermayanti. Uji Efek Tonikum Ekstrak Daun Ceguk (Quisqualis Indica L .) Terhadap Hewan Uji Mencit (Mus Musculus). J Bionature. 2013;14:95–9.
 13. Gani Ba, Alghassani Aq, Mubarak Z, Bachtiar Ew, Bachtiar Bm. Potensi Cigarette Smoke Condensate Terhadap Peningkatan Pembentukan Biofilm Candida Albicans Isolat. J Syah Kual Dent Soc. 2017;2(1):52–62.
 14. Wijaya, C. Hanny; Rachmatillah, A. Fieki; Bachtiar Bm. Penghambatan Cajuputs Candy Terhadap Viabilitas Khamir Candida Albicans Secara In Vitro. Teknol Dan Ind Pangan Ipb. 2014;
 15. Rieuwpassa Ie, Sudjarwo I, Sumintarti S, Mudjari S, Achmad H, Rasyid F. Influence Of Acrylic Resin Denture Base Soaking Length In Siwak Extract Solution (Salvadora Persica) On The Growth Of Candida Albicans. Pesqui Bras Odontopediatria Clin Integr.2018;18(1):3–8.
 16. Munro Ca. Chitin And Glucan, The Yin And Yang Of The Fungal Cell Wall, Implications For Antifungal Drug Discovery And Therapy. Vol. 83, Advances In Applied Microbiology. Elsevier; 2013. 145–172 Hal.
 17. Gow Nar, Hube B. Importance Of The Candida Albicans Cell Wall During Commensalism And Infection. Curr Opin Microbiol. 2012;15(4):406–12.
 18. Silva S, Rodrigues Cf, Araújo D, Rodrigues Me, Henriques M. Candida Species Biofilms' Antifungal Resistance. J Fungi. 2017;3(1).
 19. Suryaningsih A, Chumaeroh S, Benyamin B. Uji EFEKTIFITAS EKSTRAK ANGGUR MERAH (Vitis Vinivera) TERHADAP PERTUMBUHAN CANDIDA ALBICANS SECARA IN VITRO. MEDALI (Media Dent Intelekt. 2015;2:5–8.
 20. Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species. Front Microbiol. 2020;10(January):1–13