

AKTIVITAS HAMBATAN BIOFILM LARUTAN IRIGASI EKSTRAK DAUN *STEVIA REBAUDIANA* BERTONI TERHADAP *CANDIDA ALBICANS*

Sinta Deviyanti¹, Nurani Hayati¹, Silva Abraham^{1,2}

¹ Departemen Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Prof. Dr. Moestopo (B)

² Direktorat Pengelolaan Laboratorium Sarana Penelitian Ilmu Pengetahuan dan Teknologi
Badan Riset dan Inovasi Nasional

Corresponding author: nuranihayati@moestopo.dsn.ac.id

Abstrak

Candida albicans merupakan jamur *oportunistic* yang sering dijumpai pada infeksi saluran akar gigi. Kemampuannya membentuk biofilm pada dentin dinding saluran akar gigi, menyebabkan peningkatan virulensi dan resistensinya terhadap NaOCL sebagai *gold standard* larutan irigasi. Ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni diketahui bersifat antijamur terhadap *Candida albicans*, namun data penelitian aktivitas terhadap pembentukan biofilm *Candida albicans* sangat terbatas. Penelitian ini bertujuan menganalisis aktivitas hambatan biofilm larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni terhadap jamur *Candida albicans*.

Penelitian eksperimental laboratorium *in vitro* dengan *post-test only with control group design*. Serial dilusi dilakukan untuk menyiapkan ekstrak daun *Stevia* 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 1,56%, dengan larutan NaOCL 2,5% sebagai kontrol positif dan media *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) sebagai kontrol negatif. Metode *crystal violet assay* untuk menilai aktivitas hambatan biofilm melalui pengukuran nilai densitas optik (OD) pada panjang gelombang 490nm.

Uji Kruskal-Wallis menunjukkan perbedaan signifikan ($p=0.000$) antara rata-rata nilai OD eksperimen. Uji Mann-Whitney U terdapat rata-rata nilai OD eksperimen seluruh larutan irigasi ekstrak daun *Stevia* lebih kecil signifikan dibandingkan kontrol negatif dan lebih besar signifikan dibandingkan kontrol positif ($p<0,05$). Larutan irigasi ekstrak daun *Stevia* menunjukkan rata-rata nilai persentase hambatan biofilm *C.albicans* berkisar 34,24%-69,70%, sedangkan kontrol positif sebesar 96,87%.

Aktivitas hambatan biofilm larutan irigasi ekstrak daun *Stevia* konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% terhadap *C.albicans* lebih kecil signifikan dibandingkan NaOCL 2,5% namun lebih besar signifikan dibandingkan kontrol negatif dengan rata-rata persentase aktivitas hambatan biofilm sebesar 34,24%-69,70%.

Kata Kunci : antibiofilm, *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Candida albicans*, larutan irigasi, perawatan saluran akar.

THE INHIBITORY ACTIVITY OF STEVIA REBAUDIANA BERTONI EXTRACT AGAINST CANDIDA ALBICANS AS IRRIGATION SOLUTION

Abstract

Candida albicans is an opportunistic fungus that is often found in root canal infections. Its ability to form biofilms causes increased its virulence and resistance to NaOCl, an irrigation solutions gold standard. *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extract is known as antifungal against *C.albicans*, yet research data on its inhibitory activity against the formation of *C.albicans* biofilms are limited.

This study is an in-vitro laboratory experimental with a post-test only control group design. Serial dilution was made to prepared the *Stevia* leaf extracts of 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125% and 1.56%, with 2.5% NaOCl solution as a positive control and Sabouraud Dextrose Broth (SDB) as a negative control. The biofilm inhibition activity was tested using the crystal violet assay method with optical density (OD) at 490 nm.

The Kruskal-Wallis test showed a significant difference ($p = 0.000$) between the average OD values. The Mann-Whitney U test showed that the average OD value of all *Stevia* leaf extract was significantly smaller than the negative control and significantly larger than the positive control ($p < 0.05$). The average percentage value of *C. albicans* biofilm inhibition was 34.24% -69.70%, while the positive control was 96.87%.

The *Stevia* leaf at 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125% has significantly smaller biofilm inhibition activity compared to 2.5% NaOCl but significantly greater than the negative control with an average value of *C. albicans* biofilm inhibition activity ranging from 34.24% -69.70%.

Keywords: antibiofilm, *Stevia rebaudiana* Bertoni, *Candida albicans*, irrigation solution, root canal treatment.

Pendahuluan

Perawatan endodontik memiliki tujuan utama untuk mengeliminasi mikroba dari sistem saluran akar gigi mengingat mikroorganisme, termasuk jamur dan produknya merupakan penyebab utama kelainan jaringan pulpa dan periradikuler.¹ Porsi terbesar jamur di dalam rongga mulut ditempati oleh spesies *C. albicans*, sebagai salah satu spesies jamur yang terdapat sebanyak 7%-17% dari seluruh mikrobiota saluran akar, gigi. Jamur *Candida albicans* ini berperan penting pada kasus kegagalan perawatan endodontik dan merupakan jamur yang paling banyak diisolasi dari sistem saluran akar gigi serta sering dijumpai pada kasus infeksi endodontik primer dan refraktori. *C. albicans* dapat beradaptasi pada berbagai macam tingkat pH, memproduksi enzim *degradative*, serta mampu mengubah ekspresi gen-nya sebagai respon terhadap kondisi lingkungan. *C.albicans* juga dapat mengubah morfologinya untuk menghindari respon sistem imun *host*.² *Candida albicans* diketahui mampu melekat pada permukaan biotik maupun abiotik dan berkolonisasi pada dinding dentin saluran akar gigi serta berpenetrasi ke dalam tubuli dentin pada dinding saluran akar gigi dan berproliferasi membentuk biofilm matang dalam waktu 24 jam.³ Samarayanake pada tahun 2024 mendefinisikan biofilm sebagai suatu komunitas mikrobial persisten, yang terbentuk pada permukaan jaringan keras dan lunak di dalam rongga mulut, yang terdiri dari baik bakteri-bakteri yang hidup ataupun mati beserta produk-produk ekstraselulernya bersama dengan senyawa- senyawa yang berasal dari saliva inang.⁴ Biofilm matang yang dibentuk oleh *Candida albicans* terdiri dari beberapa lapisan sel-sel *polymorphic* meliputi bentuk *hypha*, *pseudohypha* dan *yeast* yang melekat dalam bahan matriks ekstraseluler sehingga memiliki struktur yang tebal dan keras. Biofilm *Candida albicans* ini 10-100 kali lebih resisten terhadap respon imun *host* serta agen antijamur karena pertumbuhan dan metabolisme sel-nya lambat dan dilindungi oleh bahan polimer ekstraseluler atau EPS (*Extracellular Polymeric Substance*). Hal inilah yang menyebabkan biofilm di saluran akar gigi lebih sulit dibasmi bila dibandingkan dengan bentuk sel plankton *Candida albicans* dan sering menyebabkan infeksi endodontik *persistent/refractory*.³

Candida albicans telah terbukti resisten terhadap larutan irigasi yang mengandung antimikroba, antara lain sodium hipoklorit. Sehingga sering menyebabkan kegagalan perawatan endodontik^{5,6,7} Aktivitas mikroorganisme termasuk jamur *Candida albicans* pada perawatan saluran akar gigi dapat dihambat dengan melakukan desinfeksi melalui prosedur irigasi dengan membilas saluran akar gigi menggunakan larutan-larutan medikasi. Syarat bahan larutan irigasi yang baik adalah harus memiliki efikasi yang tinggi terhadap berbagai mikroorganisme saluran akar baik anaerob maupun fakultatif serta bentuk tunggal maupun biofilm.⁸ Saat ini bahan larutan irigasi yang paling sering digunakan dalam kedokteran gigi adalah *sodium hypochlorite* (NaOCl) dengan kisaran konsentrasi 2,5%-5,25%.⁹ Larutan NaOCl terbukti memiliki kemampuan antimikroba yang baik dan melarutkan jaringan-jaringan nekrotik, jaringan pulpa vital serta komponen-komponen lapisan *smear* pada dentin saluran akar.^{8,10} Meskipun demikian, larutan irigasi NaOCl dapat menimbulkan reaksi alergi pada tubuh, tidak *biocompatible* serta bersifat toksik pada konsentrasi yang tinggi sehingga perlu dicari alternatif larutan irigasi dari bahan alami yang lebih *biocompatible*, aman serta efektif menghilangkan biofilm mikroorganisme, termasuk jamur *Candida albicans*.¹¹

Penggunaan bahan-bahan yang berasal dari alam kini semakin diminati dan berkembang. Berbagai tanaman telah digunakan untuk pengobatan berbagai infeksi dan penyakit karena kandungan senyawa aktif yang bersifat antibakteri dan antijamur. Ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertonii sebagai salah satu bahan herbal, telah terbukti memiliki aktivitas antimikroba baik terhadap berbagai bakteri maupun jamur.^{12,13} Penelitian oleh Deviyanti S dkk., pada tahun 2022 telah melaporkan kandungan fitokimia flavonoid, steroid, tanin, alkaloid dan saponin dalam ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertonii serta membuktikan bahwa seluruh konsentrasi larutan ekstrak yang diuji, mampu membentuk zona hambat pertumbuhan terhadap

mikroorganisme saluran akar yaitu *Enterococcus faecalis*.¹⁴ Kemampuan larutan ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 1,56% dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri *Enterococcus faecalis* dengan persentase hambatan biofilm sebesar 29,49-97,22% juga telah dilaporkan dari hasil penelitian Deviyanti S dkk pada tahun 2024.¹⁵ Penelitian lainnya oleh Hastuty A pada tahun 2019 juga telah membuktikan aktivitas antimikroba dan antibiofilm dari ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni terhadap strain bakteri *Bacillus sp* dan *Enterobacter sp*.¹⁶ Penelitian terkait aktivitas hambatan pembentukan biofilm dari larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni terhadap jamur *Candida albicans* hingga saat ini masih sangat terbatas dan jarang dilaporkan.

Metode Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium secara *in vitro*. Desain penelitian yang digunakan adalah *post-test only with control group*. Subjek penelitian yang digunakan adalah jamur *Candida albicans* ATCC (*American Type Culture Collection*) 10231 yang diperoleh dari Laboratorium MiCore FKG Trisakti, Jakarta. Daun *Stevia rebaudiana* Bertoni didapatkan dari perkebunan Desa Ciputri, Kecamatan Pacet, Kabupaten Cianjur kemudian dikeringkan dengan tidak berkontak langsung dengan sinar matahari, dan dilakukan determinasi di Laboratorium Karakterisasi Badan Riset dan Inovasi Nasional, Bogor. Metode maserasi dilakukan selama 3 hari dengan menggunakan pelarut *ethanol* 96% untuk pembuatan ekstrak. Sampel penelitian terdiri dari 9 kelompok, yaitu larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni dengan konsentrasi 100%. 50%. 25%. 12,5%, 6,25%. 3,125% dan 1,56%, kemudian larutan NaOCl 2,5% sebagai kontrol positif dan larutan *sabouraud dextrose broth* (SDB) sebagai kontrol negatif.

Pembuatan ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni

Daun kering *Stevia rebaudiana* Bertoni sebagai sampel penelitian dicacah menjadi menggunakan *blender*, kemudian diayak dengan menggunakan saringan *mesh* (40 *mesh*) agar diperoleh serbuk halus (*simplisia*).¹⁷ Sebanyak 175 gr *simplisia* daun *Stevia rebaudiana* Bertoni dibagi ke dalam 4 botol Duran dengan 3 botol masing-masing botol berisi 50 gr *simplisia* dan 1 botol berisi 25 gr *simplisia* lalu dilarutkan dalam pelarut *ethanol* 96% dengan perbandingan 1:10.^{18,19} Masing-masing botol dikocok setiap 15 menit selama 3 hari pada suhu kamar (25°C).¹⁷ Pemisahan residu dari filtrat dilakukan dengan cara menyaring menggunakan kertas saring pada corong kaca.^{18,19} Filtrat kemudian diuapkan dengan alat *rotary vacuum evaporator* pada suhu air 55°C, dengan kecepatan putaran 65 rpm dan tekanan pompa *vacuum* 417mBar yang diturunkan perlahan untuk memisahkan senyawa-senyawa bioaktif (*fitokimia*) dari pelarutnya sehingga diperoleh ekstrak kental.^{18,20} Ekstrak kental daun *Stevia rebaudiana* Bertoni yang diperoleh lalu ditimbang dan disimpan pada *frezzer* bersuhu -20°C dalam tabung *centrifuge*.¹²

Uji hambatan pembentukan biofilm dengan *crystal violet assay*

Sebanyak 100µL larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni tiap konsentrasi uji, 100µL larutan NaOCL 2,5% dan 100µL larutan media SDB dimasukkan ke dalam *microplate polystyrene* 96 sesuai desain dengan menggunakan mikropipet. Kemudian 100µL suspensi *C.albicans* ATCC 10231 dalam media SDB ditambahkan ke dalam masing-masing *microplate well* sedangkan larutan *blank* dibuat dengan memasukkan 200µL dari tiap konsentrasi larutan uji ekstrak, serta kelompok kontrol tanpa paparan *C. albicans* ke masing-masing *well*. *Microplate well* diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C. Seluruh larutan dalam *microplate wells* dibuang dengan dibilas menggunakan *aquadest* steril, dan dikeringkan. *Microplate wells* kemudian difiksasi dengan cara dilewatkan diatas api. Sebanyak 200µL larutan *crystal violet* 0,5% dimasukkan ke setiap *microplate well*, lalu

dibiarkan di suhu ruang selama 30 menit. Larutan *crystal violet* 0,5% dalam tiap *microplate well* kemudian dibuang, biofilm dibilas tiga kali dibawah air keran mengalir dan dikeringkan. Sebanyak 200 µL larutan etanol 96% diinsersikan ke setiap sumur. Pengukuran nilai densitas optik (*Optical Density* atau OD) biofilm diukur menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 490 nm.^{18,21,22,23} Persentase hambatan pembentukan biofilm *C.albicans* dihitung menggunakan rumus :^{18, 19,24,25}

$$\% \text{ Hambatan Biofilm} = \frac{\text{OD kontrol negatif} - \text{OD Eksperimen}}{\text{OD kontrol negatif}} \times 100\%$$

Uji *Shapiro-Wilk* dilakukan untuk menentukan normalitas data rata-rata nilai OD awal dan OD eksperimen yang dilanjutkan dengan uji Kruskal-Wallis untuk melihat perbedaan signifikan antar variabel OD eksperimen yang diteliti serta uji Mann-Whitney U dilakukan untuk melihat perbedaan antar variabel OD eksperimen yang diteliti. Perhitungan menggunakan rumus kemudian dilakukan untuk memperoleh nilai persentase hambatan (inhibisi) pembentukan biofilm *C.albicans* oleh larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% dan 1,56% dibandingkan dengan kelompok kontrol positif yaitu larutan NaOCL 2,5% dan larutan media SDB sebagai kelompok kontrol negatif..Seluruh analisis data pada penelitian ini, dilakukan menggunakan aplikasi komputer SPSS versi 26.

Hasil

Hasil maserasi dan remaserasi sebanyak 1 kali dari 175 gr simplisia daun *Stevia rebaudiana* Bertoni menghasilkan ekstrak kental sebesar 95,2 gram.

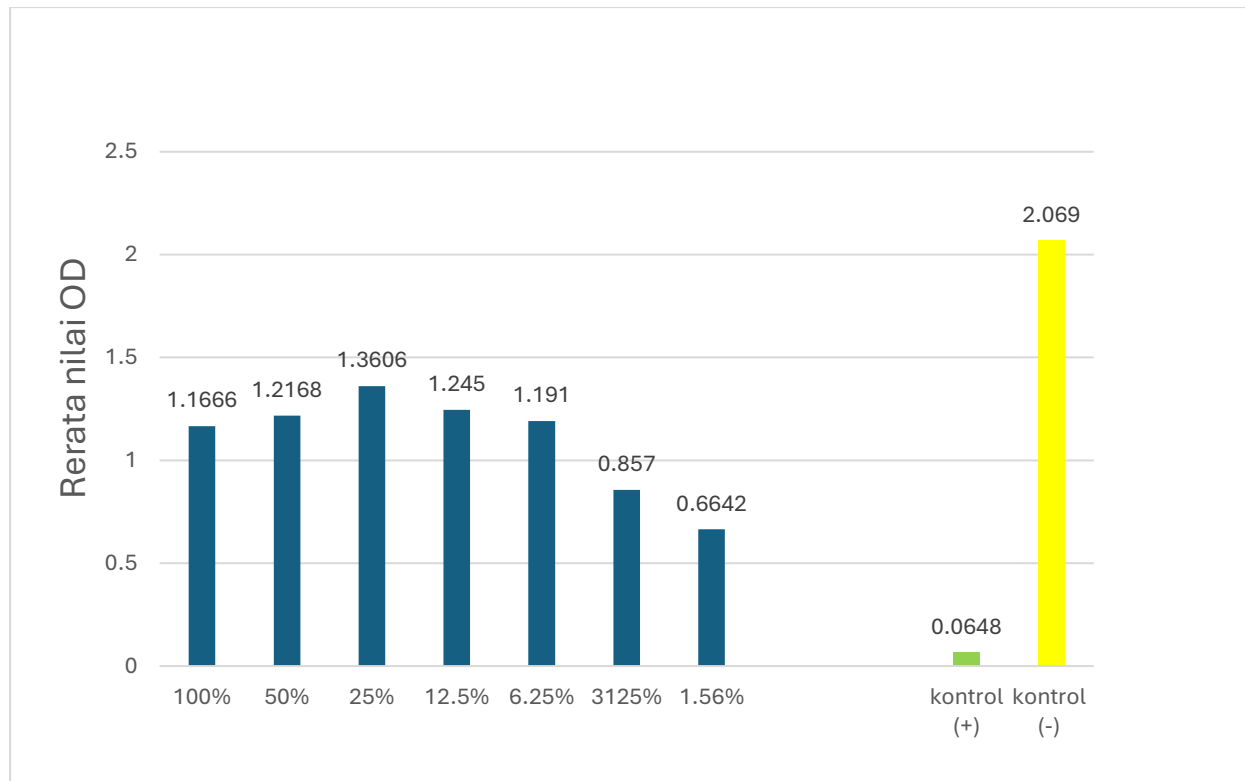
Uji Shapiro-Wilk memperlihatkan bahwa data variabel OD eksperimen larutan ekstrak *Stevia rebaudiana* Bertoni dengan konsentrasi 50% terdistribusi secara tidak normal ($p < 0,05$), sehingga dilakukan uji statistik non parametrik untuk pengolahan data. Hasil Uji Kruskal-Wallis pada rata-rata OD eksperimen biofilm *C. albicans* dari berbagai variasi konsentrasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni yang diuji, serta kontrol positif dan kontrol negatif menunjukkan perbedaan signifikan ($p = 0.000$) antara variabel rata-rata OD eksperimen yang diteliti terkait aktivitas hambatan pembentukan biofilm terhadap jamur *C.albicans* (Tabel 1)

Tabel 1. Rata-Rata Nilai OD Eksperimen Biofilm *C. albicans* Dari Larutan Irigasi Ekstrak Daun *Stevia rebaudiana* Bertoni

No	Sampel	Mean OD± Standar Deviasi	P
1.	Ekstrak Stevia 100%	1.1666 ± 0.04503	0.000*
2.	Ekstrak Stevia 50%	1.2168 ± 0.12867	
3.	Ekstrak Stevia 25%	1.3606 ± 0.12489	
4.	Ekstrak Stevia 12,5%	1.245 ± 0.12644	
5.	Ekstrak Stevia 6,25%	1.191 ± 0.18991	
6.	Ekstrak Stevia 3,125%	0.857 ± 0.17538	
7.	Ekstrak Stevia 1,56%	0.6642 ± 0.10444	
8.	NaOCL 2,5% (kontrol positif)	0.0648 ± 0.06844	
9.	Media pertumbuhan SDB (kontrol negatif)	2.069 ± 0.11369	

* $p < 0.05$ = signifikan dengan uji Kruskal-Wallis, N=5

Diagram rata-rata nilai OD eksperimen biofilm *C.albicans* dari berbagai variasi konsentrasi larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni yang diuji, serta kontrol positif dan kontrol negatif dapat dilihat pada Gambar 1.

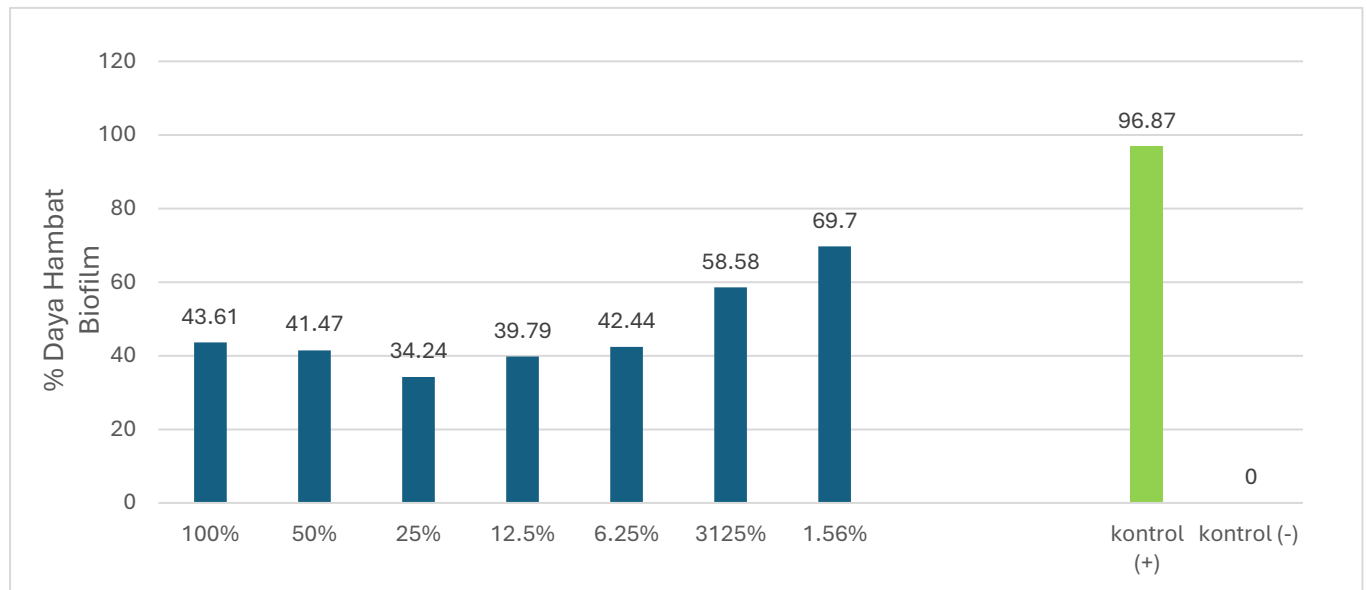


Gambar 1. Diagram rata-rata nilai OD eksperimen larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni terhadap biofilm *C.albicans*

Rerata nilai persentase hambatan biofilm *C.albicans* oleh larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni dapat dilihat pada tabel 2 dan gambar 2.

Tabel 2 Rerata Nilai Persentase Hambatan Ekstrak Daun *Stevia rebaudiana* Bertoni Terhadap Biofilm *C.albicans*

No	Sampel	% Hambatan Biofilm
1.	Ekstrak Stevia 100%	43,61
2.	Ekstrak Stevia 50%	41,47
3.	Ekstrak Stevia 25%	34,24
4.	Ekstrak Stevia 12,5%	39,79
5.	Ekstrak Stevia 6,25%	42,44
6.	Ekstrak Stevia 3,125%	58,58
7.	Ekstrak Stevia 1,56%	69,70
8.	NaOCL 2,5% (kontrol positif)	96,87
9.	Media SDB (kontrol negatif)	0



Gambar 2. Diagram rerata nilai persentase daya hambat larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni terhadap pembentukan biofilm *C.albicans*

Diskusi

Komunitas biofilm merupakan struktur kompleks dan dinamis yang berkumpul melalui kolonisasi beberapa mikroorganisme rongga mulut yang terdiri dari mikroorganisme dan produk-produk ekstraselulernya serta senyawa-senyawa dari saliva inang.^{4,7,26} Berbagai substansi yang diproduksi oleh biofilm seperti lipopolisakarida, enzim-enzim proteolitik, dan berbagai faktor virulensi lainnya dapat mengaktifasi sistem imun alamiah dan menginisiasi respon inflamasi, yang mengganggu homeostasis antara mikroba dan inang. Oleh karena sifat struktur biofilm yang kompak, serta dilindungi oleh matriks polimer biofilm, maka agen antimikroba kimia baik alami dan buatan lebih sulit untuk menghancurkan populasi biofilm secara adekuat.²⁷

Sel-sel jamur *Candida albicans* juga diketahui dapat menempel satu sama lain dalam bentuk biofilm, yang merupakan bentuk komunitas multiseluler ragi dan hifa yang terbungkus dalam perlekatan polimer. Cara hidup biofilm dapat meningkatkan kemampuan sel untuk melawan respon imun inang dan agen antijamur, yang berkontribusi terhadap persistensinya di dalam saluran akar gigi. Biofilm *Candida albicans* serta kompleksitas sistem saluran akar, khususnya pada sepertiga apikal, dianggap sebagai penyebab utama periodontitis apikal yang resisten terhadap perawatan endodontik.²⁸

Pembersihan biofilm pada saluran akar gigi melalui triad perawatan endodontik merupakan elemen penting untuk keberhasilan perawatan endodontik.^{11,29} Desinfeksi menggunakan larutan irigasi merupakan strategi penting untuk meningkatkan keberhasilan perawatan endodontik.¹¹ Bahan irigasi yang ideal harus memiliki efektivitas tinggi terhadap mikroorganisme anaerob dan fakultatif baik dalam bentuk planktonik maupun biofilm, dapat membilas atau membersihkan dengan baik, mampu menonaktifkan endotoksin bakteri, mempunyai kemampuan untuk melarutkan jaringan organik nekrotik dan menghilangkan *smear layer*, tidak memberikan efek samping buruk pada dentin dan biokompatibel terhadap jaringan periradikular, dapat menonaktifkan endotoksin, dan bersifat non toksik ketika berkontak dengan jaringan vital serta tidak menyebabkan reaksi anafilaktik.^{11,30} Namun demikian, penggunaan bahan irigasi saluran akar yang umum digunakan saat ini masih memiliki kendala antara lain terkait sifatnya yang toksik terhadap jaringan, kaustik terhadap

gingiva dan jaringan mukosa rongga mulut hingga menyebabkan nekrosis pada jaringan periapikal.²⁹ Berdasarkan kendala-kendala tersebut maka penelitian mengenai bahan irigasi yang ideal hingga kini masih terus dikembangkan.

Stevia rebaudiana Bertoni merupakan tanaman perdu (semak) yang berasal dari Paraguay.¹⁷ Menurut Geuns yang dikutip oleh Brambilla E dkk., menyatakan bahwa daun *Stevia* memiliki kandungan *stevioside* dengan tingkat kemanisan 200-300 kali lebih tinggi dibandingkan gula tebu (sukrosa), sedangkan kandungan *rebaudioside A* memiliki tingkat kemanisan 250-450 kali lebih tinggi dibandingkan sukrosa.³¹ Tanaman *Stevia* memiliki manfaat terapeutik bagi kesehatan tubuh karena merupakan sumber pemanis alami yang bersifat rendah kalori dan memiliki khasiat antibakteri, antijamur, antivirus, antiinflamasi, antidiuretik, antihipoglikemia dan antikardiotonik.¹⁷

Stevia rebaudiana Bertoni telah diketahui dapat mencegah karies karena terbukti mampu merusak biofilm mikroorganisme, meningkatkan nilai pH, menghambat pembentukan ekstraseluler polisakarida (EPS) dan meregulasi gen-gen yang berkaitan dengan biofilm.^{32,33} Penelitian yang dilakukan oleh Guo M dkk., pada tahun 2023 telah menjelaskan bahwa *stevioside* yang terkandung dalam ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni dapat menghambat pertumbuhan planktonik maupun pembentukan biofilm *C. albicans* dan *Streptococcus mutans* secara signifikan. Penelitian tersebut menyatakan bahwa *stevioside* tidak memberikan kontribusi dalam pembentukan EPS dan asam pada kedua mikroorganisme, namun dapat mengubah struktur biofilm sehingga menurunkan viabilitas biofilm. Selain itu *stevioside* pada *Stevia rebaudiana* Bertoni juga dilaporkan dapat mengurangi pembentukan biofilm yang dibentuk oleh satu atau lebih *strain* mikroorganisme dan meningkatkan pH.^{34,35}

Hasil penelitian kami saat ini tampaknya sejalan dengan penelitian-penelitian sebelumnya yang memperlihatkan bahwa larutan irigasi dari ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni memiliki kemampuan dalam menghambat pembentukan biofilm.^{12,13,14,15,16} Penelitian kami saat ini membuktikan bahwa aktivitas hambatan pembentukan biofilm jamur *C.albicans* terbaik dari seluruh variasi konsentrasi larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni yang diuji, telah diperlihatkan oleh konsentrasi 1,56% dengan rerata nilai OD eksperimen sebesar 0,857 dengan rerata nilai persentase hambatan biofilm *C.albicans* sebesar 69,70% yang tidak memiliki perbedaan signifikan terhadap aktivitas hambatan biofilm dengan konsentrasi 3,125% dengan rerata nilai persentase hambatan biofilm *C.albicans* sebesar 58,58%. Rerata nilai persentase hambatan biofilm *C.albicans* yang terendah yaitu sebesar 34,24% diperlihatkan oleh konsentrasi 25%. Aktivitas hambatan pembentukan biofilm tersebut dinilai berdasarkan hasil pengukuran nilai OD menggunakan alat *microplate reader* dengan panjang gelombang 490 nm.³⁶ Pengukuran nilai OD menunjukkan densitas populasi dari kultur mikroorganisme atau massa biofilm yang terdiri dari sel-sel jamur dan matriks ekstraseluler biofilm.³⁷ Larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni pada konsentrasi 1,56% dan 3,125% juga memiliki aktivitas hambatan pembentukan biofilm *C.albicans* yang lebih tinggi secara signifikan dibandingkan dengan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12,5% dan 6,25% berdasarkan rerata nilai OD eksperimen dalam penelitian ini. Larutan irigasi NaOCl 2,5% sebagai kontrol positif menunjukkan aktivitas hambatan pembentukan biofilm *C.albicans* yang paling tinggi secara signifikan dibandingkan kontrol negatif dan seluruh variasi konsentrasi larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni yang diuji berdasarkan rerata nilai OD eksperimen sebesar 0,0648 dengan rerata nilai persentase hambatan terhadap biofilm *C.albicans* sebesar 96,87%. Kontrol negatif tidak menunjukkan aktivitas hambatan pembentukan biofilm terhadap *C.albicans* dan memiliki nilai rerata OD eksperimen terbesar signifikan yaitu 2,069 dibandingkan kontrol positif dan semua konsentrasi uji larutan irigasi ekstrak daun *Stevia* yang diuji .

Aktivitas hambatan pembentukan biofilm *C.albicans* dari larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni, diketahui karena adanya kandungan berbagai senyawa metabolit

sekundernya dengan aktivitas mikroba yang juga telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *E.faecalis* secara.^{12,38} Berdasarkan uji fitokimia yang telah dilakukan pada penelitian sebelumnya, larutan ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni terbukti memiliki kandungan senyawa aktif terpenoid, flavonoid, steroid, tannin, alkaloid, dan saponin.¹²

Aboh *et al* (2014) menyatakan bahwa flavonoid memiliki kemampuan sebagai antijamur karena dapat mengganggu fungsi kerja serta merusak membran dan dinding sel jamur.^{38,39} Selain itu kandungan fenol dan flavonoid yang terdapat dalam daun *Stevia rebaudiana* Bertoni juga dapat mendenaturasi ikatan protein pada membran sel jamur sehingga dapat mengakibatkan lisisnya sel jamur. Selanjutnya fenol juga dapat berikatan dengan protein *sulphydrile* pada jamur sehingga dapat mengakibatkan perubahan bentuk membran sel jamur.^{38,39} Kandungan senyawa metabolit sekunder *tannin* dalam ekstrak daun *Stevia* juga diketahui dapat mempengaruhi mekanisme biosintesis membran dan dinding sel jamur sehingga menurunkan volume sel jamur akibat perubahan permeabilitas membran sel.^{38,39}

Penelitian lainnya oleh Ahmad J dkk., pada tahun 2020 menyatakan bahwa ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni juga memiliki kandungan *carvacrol* yang merupakan turunan dari senyawa terpenoid.^{40,41} *Carvacrol* juga terdapat pada minyak esensial dengan aktivitas antijamur.⁴² Sifat antijamur yang terdapat pada *carvacrol* berasal dari kemampuannya dalam menghalangi produksi ergosterol dan merusak integritas struktur membran sel jamur.⁴³ Selain itu *carvacrol* diketahui bekerja dengan cara meningkatkan aktivitas anti fosfolipase, dan menghalangi fungsi-fungsi spesifik pada membran sel jamur. Hal ini tidak hanya menghambat populasi mikroba termasuk jamur namun juga meningkatkan permeabilitas membran sel jamur, menjadikan sel jamur lebih rentan dengan senyawa antimikroba lainnya.⁴³ *Carvacrol* memiliki sifat antimikroba dengan spektrum luas yang diperoleh dari interaksinya dengan membran sel mikroorganisme sehingga mengakibatkan perubahan permeabilitas membran sel terhadap berbagai ion, seperti kalium dan hidrogen. *Carvacrol* juga merupakan isomer dari *thymol* sehingga memiliki wangi yang serupa.^{44,45} Penelitian yang dilakukan oleh Balef HSS dkk juga menyatakan bahwa *carvacrol* memiliki aktivitas antijamur terhadap seluruh spesies *Candida* dengan nilai MFC 23,48 µg/ml.⁴²

Karakteristik rerata nilai persentase hambatan biofilm *C.albicans* dari larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni dalam penelitian kami ini memperlihatkan bahwa pada konsentrasi 100%, rerata nilai persentase hambatan biofilm sebesar 43,61% tampak mengalami penurunan secara bertahap hingga konsentrasi ekstrak *Stevia* 25% dengan rerata nilai persentase hambatan biofilm sebesar 34,24%. Rerata nilai persentase hambatan biofilm tersebut kemudian mengalami peningkatan kembali secara bertahap mulai dari konsentrasi ekstrak 12,5% yaitu sebesar 39,79% hingga rerata nilai persentase hambatan biofilm yang tertinggi dicapai oleh larutan irigasi ekstrak dengan konsentrasi 1,56% yaitu sebesar 68,25%. Menurut Febriana N dkk., yang dikutip oleh Rosyada AG dkk., pada tahun 2023, dijelaskan bahwa kondisi ini dapat terjadi karena semakin banyak kandungan senyawa kimia dalam suatu ekstrak, (konsentrasi tinggi pada batas tertentu) maka semakin tinggi juga efek antimikroba yang diberikan, tetapi apabila kandungan senyawa yang terlarut dalam ekstrak tersebut terlalu banyak (konsentrasi terlalu tinggi) maka dapat menyebabkan kejenuhan sehingga berpengaruh kepada daya antimikroba suatu ekstrak.³⁹ Penurunan daya antimikroba tersebut kemungkinan dapat menjadi penyebab dari penurunan aktivitas hambatan pembentukan biofilm atau rerata nilai persentase hambatan biofilm yang diperlihatkan oleh larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni dengan konsentrasi 100%, 50% dan 25% dalam penelitian kami ini.

Variasi konsentrasi ekstrak selanjutnya juga diketahui berperan dalam hambatan pembentukan biofilm karena konsentrasi suatu ekstrak akan mempengaruhi afinitas senyawa fitokimia untuk berpenetrasi ke reseptor di dinding sel mikroba.³⁹ Menurut Katzung BG yang dikutip oleh Rosyada AG dkk pada tahun 2023, menyatakan bahwa jumlah senyawa fitokimia yang terlarut dalam ekstrak, setidaknya harus berimbang dengan jumlah reseptor yang ada

sehingga penetrasi senyawa fitokimia ke sisi aktif reseptor dapat berlangsung optimal untuk memberikan efek berupa aktivitas hambatan biofilm yang baik.³⁹ Sehingga zat terlarut dalam ekstrak yang terlalu banyak, misalnya pada ekstrak dengan konsentrasi yang makin besar, dapat menyebabkan zat tersebut sulit berpenetrasi ke reseptor yang jumlahnya terbatas karena zat-zat yang berdesakan.

Rerata nilai OD eksperimen larutan NaOCl 2,5 % sebagai kontrol positif yang lebih besar signifikan ($p < 0,05$) dibandingkan kontrol negatif dan seluruh konsentrasi larutan irigasi ekstrak daun *Stevia rebaudiana* Bertoni yang diuji dalam penelitian kami ini, menunjukkan aktivitas hambatan pembentukan biofilm *C.albicans* yang paling besar signifikan dibandingkan kontrol negatif dan seluruh konsentrasi ekstrak yang diuji dengan rerata nilai persentase hambatan biofilm *C.albicans* yang paling tinggi yaitu 96,87%. Aktivitas hambatan biofilm jamur dari larutan NaOCl 2,5 % sebagai kontrol positif dalam penelitian kami ini menurut Sirtes G dkk., yang dikutip oleh El Sayed M dkk., pada tahun 2021, dapat terjadi melalui mekanisme pelepasan asam *hypochlorous* Ketika sodium hypochlorite bercampur dengan air. Asam ini memiliki *chlorine* aktif sebagai agen pengoksidasi yang sangat kuat yang mengoksidasi gugus -SH secara permanen dari enzim-enzim metabolik esensial yang akan mempengaruhi proses-proses metabolik mikroorganisme termasuk jamur *C.albicans*.⁴⁰

Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa larutan irigasi ekstrak daun *stevia rebaudiana* Bertoni memiliki aktivitas hambat terhadap pembentukan biofilm jamur *Candida albicans*.

Referensi

1. Thakur D.V, Kaur D.M, Jamwal P, Thakur B. 2% Chlorhexidine in Root Canal Treatment: A review. Journal of Current Medical Research and Opinion. 2020; 770-774
2. Baumgartner JC, Hutter Jw, Siqueira JF. Endodontic microbiology and treatment of infections. In: Cohen S. Hargreaves KM. Pathways of the Pulp 12th Edition. St. Louis: CV Mosby, 2021: 589-91
3. Yoo YJ, Kim AR, Perinpanayagam H, Han SH, Kum KY. *Candida albicans* Virulence Factors and Pathogenicity for Endodontic Infections. Microorganisms. 2020; 26;8(9):1300. doi: 10.3390/microorganisms8091300. PMID: 32858856; PMCID: PMC7563224.
4. Samarayanake, Lakshman. Essential Microbiology for Dentistry. 6th ed. Churchill Livingstone Elsevier (diunggah oleh dentalebooks.com). 2024: 273-313
5. Kumar J, Sharma R, Sharma M, Prabhavathi V, Paul J, Chowdary CD. Presence of *Candida albicans* in Root Canals of Teeth with Apical Periodontitis and Evaluation of their Possible Role in Failure of Endodontic Treatment. J Int Oral Health; 2015: Feb 7(2):42-5. PMID: 25859106; PMCID: PMC4377149
6. Qutieshat A, Al Harthy N, Al Busaidi S, Al Sadoon A, Al Sayahien D, Sedqi M, Al Rashdi S, Al Ghammari S. Antimicrobial Irrigation Solutions in Root Canal Treatment: A Glance at the Past, the Present, and the Future. Open Dent J; 2023: 17: e187421062306010. <http://dx.doi.org/10.2174/18742106-v17-230621-2023-5>
7. Karpiński TM, Korbecka-Paczowska M, Ożarowski M, Włodkowiec D, Wyganowska ML, Seremak-Mrozikiewicz A, Cielecka-Piontek J. Adaptation to Sodium Hypochlorite and Potassium Permanganate May Lead to Their Ineffectiveness Against *Candida albicans*. Pharmaceuticals (Basel). 2024: Nov 17;17(11):1544. doi: 10.3390/ph17111544. PMID: 39598453; PMCID: PMC11597340.
8. Torabinejad M, Walton RE, Fouad AF. Endodontics Principles and Practice. 5th ed. St.Louis : Elsevier Saunders.2015 : 273-283,349.

9. Basudan SO. Sodium hypochlorite use, storage, and delivery methods: A Survey. *Saudi Endod J*; 2019; 9:27-33
10. Darrag AM. Effectiveness of Different Final Irrigation Solution on Smear Layer Removal in Intraradicular Dentin. *Tanta Dental Journal*; 2014;11:93-99
11. Cohen S, Hargreaves KM. *Pathways of the Pulp* 12th Edition. St. Louis: CV Mosby, 2021: 599-781
12. MM, Alvarado MO, Sanchez ML. Antibacterial Activity of Extract of *Stevia rebaudiana* Bertoni Against *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medicinal Plant Research*; 2017;11(25):414-418
13. Nied MM. Influence of *Stevia rebaudiana* on Oral Health-Literature Review. *Revista da Faculdade Odontogica de Porto Alegre*. 2019;2:83-90.
14. Deviyanti S, Abraham S, Pasiga DP. Antibacterial potential *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extract on the growth of *Enterococcus faecalis* bacteria. *Azerbaijan Medical Journal*; 2022;62(10):5671-5680.
15. Deviyanti S, Abraham S, Hayati N. Antibiofilm Potential of *Stevia Rebaudiana* Bertoni Leaf Extract Irrigated Solution against The Bacteri *Enterococcus Faecalis* ATCC 29212. *International Journal of Pharmaceutical and Bio Medical Science*; 2024; 4 (12): 980–990. <https://doi.org/10.47191/ijpbms/v4-i12-10>
16. Hastuty A. Antibiofilm and antimicrobial activities of papaya (*Carica papaya* L.) and stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni) leaf extracts against three biofilm-forming bacteria. *Journal of Microbial Systematics and Biotechnology*; 2019;1(1): 19–29
17. Sumaryono dan Sinta MM. *Budidaya Tanaman Stevia*. Bogor: Pusat Penelitian Bioteknologi dan Bioindustri Indonesia; 2015:1-2.
18. Tobi CHB, Saotarini O, Rahmawati I. Aktivitas Antibiofilm Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Biji Pinang (*Areca catechu* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Journal of Pharmaceutical Science and Clinical Research*. 2020;01:56-70.
19. Suhartono S, Soraya C, Shabira P. Antibiofilm Activity of Neem Leaf (*Azadirachta indica* A.Juss) Ethanolic Extract Against *Enterococcus faecalis* In Vitro. *Dental Journal*; 2023;56(2):98-103.
20. Chandra A. Studi Awal Ekstraksi Batch Daun *Stevia rebaudiana* dengan variable Jenis Pelarut dan Temperatur Ekstraksi. *Pros Sem Nas Masy Biodiv Indon*; 2015;1(1):114-115.
21. Besan EJ, Rahmawati I, Saptarini O. Aktivitas Antibiofilm Ekstrak dan Fraksi-Fraksi Bunga Telang (*Clitoria ternatea* L) Extract and Fraction Terhadap *Staphylococcus aureus*. *Pharmaceutical Journal of Indonesia*; 2023;20(01):1-11.
22. Hayati N, Widyarman A.S, Roeslan B.O. Effectiveness of Grapefruit (*Citrus paradisi*) and Lime (*Citrus aurantifolia*) against pathogenic root canal biofilms. *International Journal of Pharmaceutical Research*; 2020: July-Sep Vol 12, Issue 3
23. Zheng JX, Wu Y, Lin ZW, Pu ZY, Yao WM, Chen Z, Li DY, Deng QW, Qu D, Yu ZJ. Characteristics of and Virulence Factors Associated with Biofilm Formation in Clinical *Enterococcus faecalis* Isolates in China. *Front Microbiol*; 2017: Nov 24;8:2338.
24. Fouad AF. *Endodontic Microbiology*. 2nd ed. Singapore: John Wiley & Sons. 2017:129-170
25. Fathi M, Ghane M, Pishkar L. Phytochemical Composition, Antibacterial and Antibiofilm Activity of *Malva sylvestris* Against Human Pathogenic Bacteria. *J Nat Pharm Prod*; 2022;17(1):e114164
26. Marsh, D. P., Martin, V. M. *Oral Microbiology*. 6th ed. Churchill Livingstone Elsevier; 2016:78-90
27. Khalaf H, Palm E, Bengtsson T. Cellular Response Mechanisms in *Porphyromonas gingivalis* Infection [Internet]. *Periodontitis - A Useful Reference*. InTech; 2017.

28. Alshanta OA, Shaban S, Nile CJ, McLean W, Ramage G. *Candida albicans* biofilm heterogeneity and tolerance of clinical isolates: implications for secondary endodontic infections. *Antibiotics*; 2019; no. 8: 204
29. Mathew ML, Somasundaram J. Complications of Root Canal Irrigation – A review. *Indian Journal of Public Health Research & Development*; 2020; June Vol 11 no.6. 390-4
30. Kandaswamy D, Venkateshbabu N. Root canal irrigants. *J.Conserv.Dent..JCD*; 2016; (13).256
31. Brambilla E, Cagetti MG, Ionescu A, Campus G, Lingström P. An in vitro and in vivo Comparison of the Effect of *Stevia rebaudiana* Extracts on Different Caries-Related Variables : A Randomized Controlled Trial Pilot Study. *Caries Res.* 2014;48:19–23.
32. Kishta, Derani M, Neiva GF, Boynton JR, Kim YE, Fontana M. The antimicrobial potential of stevia in an in vitro microbial caries model. *Am.J.Dent* (29). 2016. 87-92
33. Ganter J, Hellwig E, Doerken S, Al-Ahmad A. In vitro evaluation of the cariogenic potential of rebaudioside A compared to sucrose and xylitol. *Clin.Oral Ivestig* (24). 2020. 113-22
34. Ajagannanavar SL, Shamarao S, Battur H, Tikare S, et.al. Effect of aqueous and alcoholic stevia (*Stevia rebaudiana*) extracts against *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus acidophilus* in comparison to chlorhexidine: an in vitro study. *J Int Soc Prev Community Dent*; 2014;4. 116-21
35. Escobar E, Piedrahita M, Gregory RL. Growth and viability of *Streptococcus mutans* in sucrose with different concentrations of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Clin Oral Investig*; 2020; 24. 3237-42
36. Maulina SA, Soulissa AG, Widyarman AS. Antibiofilm Effect of Rambutan Leaf Extract (*Nephelium lappaceum* L.) on Selected Periodontal Pathogens. *Journal of Indonesian Dental Association*; 2023;5(2):57-61.
37. Mira P, Yeh P, Hall BG. Estimating Microbial Population Data From Optical Density. *PLoS One*; 2022; 17(10):1-8.
38. Deviyanti S, Abraham S, Pasiga DP. Effectivity of irrigation solution from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaf extract on the growth of *Enterococcus faecalis* bacteria. *International Journal of Phamaceutical and Bio Medical Scienc*; 2024; 4(3):176-181.
39. Rosyada AG, Prihastuti CC, Sari DNI, Setiawati, Ichsyani M, Laksitasari A, Andini RF, Kurniawan AA. Aktivitas Antibiofilm Ekstrak Etanol Kulit Bawang Merah (*Allium cepa* L) dalam Menghambat Pembentukan Biofilm *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Jurnal Kedokteran Gigi Universitas Padjadjaran*; 2023; 35 (1).
40. El sayed M, Ghanerad N, Shabanpour Z, Shabanpoor M, Rahimi F. Comparing The Antifungal Effect of Sodium Hypochlorite Gel versus Different Type of Root Canal Medicaments at Different Time Intervals Using The Agar Diffusion Test: An In Vitro study. *International Journal of Dentistry*; 2021: 1-10.
41. Ahmad J, Khan I, Blundell R et al. *Stevia rebaudiana* Bertoni ,: an updated review of its health benefits, industrial applications, and safety. *Trends Food Sci Technol*; 2020; (100) 177-89
42. Balef HSS, Hosseini SS, Asgari N, Sohrabi A, Mortazavi N. The inhibitory effects of carvacrol, nystatin, and their combination on oral candidiasis isolates. *BMC Research Notes*; 2024; (17) 104
43. Mączka W, Twardawska M, Grabarczyk M, Wińska K. Carvacrol-A Natural Phenolic compound with Antimicrobial properties. *Antibiotics (Basel)*; 2023;12(5):824
44. Bhat V, Sharma SM, Shetty V, Shastry CS, Rao CV, Shenoy S, Saha S, Balaji S. Characterization of Herbal Antifungal Agent, *Origanum vulgare* against oral *Candida* Spp.

Isolated from patients with Candida-Associated denture stomatitis: an in Vitro study. Contemp Clin Dent; 2018;9(Suppl 1):S3-S10

45. Hosseini SS, Yadegari MH, Rajabibazl M, Ghaemi EA. Inhibitory effects of carvacrol on the expression of Secreted aspartyl proteinases 1–3 in fluconazoleresistant Candida albicans isolates. Iran J Microbiol; 2016;8(6):401–409.