

MOUTHWASH FORMULATION OF BASIL OIL (*Ocimum basilicum L.*) AND IN VITRO ANTIBACTERIAL AND ANTIBIOFILM ACTIVITIES AGAINST *Streptococcus mutans*

FORMULASI MOUTHWASHMINYAK ATSIRI DAUN KEMANGI (*Ocimum basilicum L.*) SERTA UJI ANTIBAKTERI DAN ANTIBIOFILM TERHADAP BAKTERI *Streptococcus mutans* SECARA *IN VITRO*

Ardiana Dewi Yosephine, Martha Purnami Wulanjati, Teuku Nanda Saifullah, Puji Astuti*
Faculty of Pharmacy, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta

ABSTRACT

Basil leaves (Ocimum basilicum L.) contain essential oil that have been reported to have antibacterial activity. Based on this antibacterial activity, basil oil can be developed as mouthwash to prevent a dental plaque. This study aims to investigate the influence of tween 80 (as emulsifying agent) and glycerin (as stabilizer) on physical characteristics of the mouthwash, the ratio between tween 80 and glycerin for best stability, and in vitro antibacterial and antibiofilm activity of the mouthwash against Streptococcus mutans. Basil oil was extracted by water and steam distillation, then was formulated into mouthwash with a variation amount of tween 80 and glycerin. Antibacterial and antibiofilm activities were tested with micro dilution method. Result of study showed that tween 80 gives significant increase on viscosity and glycerin on specific mass when they were added at more than 2.5 mL in 50 mL mouthwash. From five formulas, formula with ratio of tween 80 and glycerin = 3.75 mL : 1.25 mL was found to be the best. Basil mouthwash showed in vitro antibacterial and antibiofilm activities against Streptococcus mutans. This product had MIC of 0.1 % v/v with 87,50 ± 3,33 % of bacterial inhibition. The MIC of biofilm formation and biofilm degradation was 0.1 % v/v and 0.2 % v/v, with % inhibition and degradation of 77,52 ± 0,82 % and 57,64 ± 6,09 %, respectively.
Key words : mouthwash, antibiofilm, Streptococcus mutans, Ocimum basilicum L.

ABSTRAK

Kemangi (Ocimum basilicum L.) mengandung minyak atsiri yang dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri. Berdasarkan sifat antibakterinya, maka minyak atsiri daun kemangi dapat dikembangkan menjadi mouthwash untuk mencegah timbulnya plak gigi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian tween 80 (emulgator) dan gliserin (stabilizer) pada sifat fisik mouthwash, mengetahui perbandingan tween 80 dan gliserin yang menghasilkan mouthwash dengan stabilitas terbaik, serta melihat aktivitasnya sebagai agen antibakteri dan antibiofilm terhadap Streptococcus mutans secara in vitro. Minyak atsiri diperoleh dengan cara distilasi air dan uap air. Minyak atsiri kemudian diformulasi menjadi sediaan mouthwash dan dilakukan variasi jumlah tween 80 serta gliserin untuk mengetahui pengaruhnya terhadap sifat fisik sediaan. Aktivitas antibakteri dan antibiofilm diuji dengan metode mikrodilusi. Hasil penelitian menunjukkan bahwa tween 80 berpengaruh signifikan terhadap kenaikan viskositas dan gliserin berpengaruh signifikan terhadap kenaikan massa jenis bila keduanya ditambahkan lebih dari 2,5 mL dalam 50 mL mouthwash. Dari lima formula yang dibuat, formula dengan perbandingan tween 80 dan gliserin = 3,75 mL : 1,25 mL ditemukan sebagai formula terbaik. Mouthwash daun kemangi menunjukkan aktivitas antibakteri dan antibiofilm terhadap Streptococcus mutans secara in vitro. Sediaan tersebut memiliki nilai KHM sebesar 0,1 % v/v dengan % penghambatan pertumbuhan bakteri sebesar 87,50 ± 3,33 %, sedangkan kadar optimum minyak atsiri daun kemangi yang mampu menghambat serta mendegradasi biofilm berturut-turut adalah 0,1 % v/v dan 0,2 % v/v dengan % penghambatan dan degradasi biofilm sebesar 77,52 ± 0,82 % dan 57,64 ± 6,09 %.
Kata kunci : mouthwash, antibiofilm, Streptococcus mutans, Ocimum basilicum L.

PENDAHULUAN

Kemangi adalah tumbuhan berbatang pendek yang tumbuh di berbagai belahan dunia. Kemangi mengandung 3,7-dimetil-1,6-oktadien-3-ol (linalool 3,94 mg/g), 1-metoksi-4-(2-propenil) benzena (estragol 2,03 mg/g), metil sinamat (1,28 mg/g), 4-alil-2-metoksifenol (eugenol 0,896 mg/g), dan 1,8-sineol (0,288 mg/g) yang diidentifikasi dengan metode GC/MS (Lee et al., 2005). Secara tradisional, kemangi telah digunakan dalam penyembuhan pusing, batuk, diare, konstipasi, cacingan, gagal ginjal, dan kutil (Simonet et al., 1999).

Tanaman kemangi mengandung minyak atsiri yang banyak dilaporkan memiliki aktivitas antibakteri. Minyak atsiri ini telah digunakan sebagai bahan pembuatan minyak wangi, lotion, sabun, sampo, atau kosmetik (Kardinan, 2003). Aktivitas minyak atsiri daun kemangi sebagai antibakteri telah diteliti oleh Maryatiet al. (2007). Hasil penelitian menunjukkan bahwa minyak atsiri daun kemangi memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Suppakulet al. (2003) juga menyebutkan bahwa minyak atsiri daun kemangi menunjukkan aktivitas antimikroba terhadap sebagian besar bakteri Gram positif dan Gram negatif, jamur, dan kapang. Bila dilihat dari sifat antibakterinya, maka minyak atsiri daun kemangi dapat dikembangkan dalam bentuk *mouthwash* (obat kumur) untuk menjaga kebersihan dan kesehatan daerah rongga mulut.

Mouthwash yang akan dibuat termasuk dalam sediaan emulsi karena mengandung minyak dalam media air. Oleh karena itu perlu diuji pengaruh penambahan emulgator dan *stabilizer* terhadap sifat fisik *mouthwash* sehingga didapatkan formula *mouthwash* dengan stabilitas terbaik. *Mouthwash* yang mengandung minyak atsiri juga perlu diuji daya antibakteri dan antibiofilmnya. Biofilm sendiri adalah kumpulan mikroorganisme yang menempel di permukaan bidang sambil memproduksi *Extracellular Polymeric Substances* (EPS) (Donlan, 2002; Hall-Stoodley et al., 2004). Pembentukan biofilm pada struktur gigi berperan penting dalam inisiasi dan progresi dari karies (Kidd, 2004; Paeset al., 2006). Pengobatan pada permukaan dentin untuk mencegah pembentukan biofilm dan mereduksi pertumbuhan mikroba dapat mencegah timbulnya karies (Knight et al., 2007).

Korespondensi : Puji Astuti
Department UGM
E-mail : p.astuti@gmail.com

METODOLOGI

Daun kemangi diperoleh dari Balecatuur, Gamping, Sleman. Determinasi dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Fakultas Biologi UGM. Bahan yang dikumpulkan ± 8 kg dipetik daunnya, didestilasi uap dan air selama ± 4 jam. Minyak atsiri yang diperoleh dihitung rendemennya dan diuji indeks biasanya. Pembuatan *mouthwash* menggunakan tween 80, gliserin, *peppermint oil*, natrium benzoat, natrium sakarin, pewarna hijau, dan akuades. Biakan *S. mutans* diperoleh dari Fakultas Kedokteran Hewan UGM. Bahan untuk uji antibakteri dan antibiofilm adalah *mouthwash* "X", Standar McFarland II dan V, media NB, media NA, media BHI, sukrosa, larutan saline, kristal violet, etanol 96%.

Timbangan elektrik Sartorius BP 310 P, alat destilasi uap air dan air, piknometer, viskometer Ostwald Pyrex, mikropipet Socorex® 0,5-10 µL; 5-50 µL; dan 50-200 µL, inkubator Sakura IF-2B, oven Memmert, autoklaf Sakura AC-300 AE, *microplate flat-bottom polystyrene 96 wells*, *microplate flexible U-bottom PVC 96 wells*, dan Bio-rad® *microplate reader* Benchmark.

Pembuatan Sediaan *Mouthwash* Daun Kemangi

Mouthwash daun kemangi dibuat sesuai dengan formula pada tabel I. Selanjutnya kelima *mouthwash* yang dihasilkan tersebut diuji secara fisik yang meliputi : uji organoleptis (rasa, bau, dan warna), penentuan viskositas menggunakan viskosimeter Ostwald, penetapan massa jenis menggunakan piknometer, serta uji stabilitas dengan metode *shock termic*. Uji stabilitas dengan metode *shock termic* dilakukan dengan cara menyimpan *mouthwash* pada suhu tinggi 60°C dan suhu rendah 4°C secara berselang-seling, masing-masing 1 hari. Perlakuan diulang 3 kali (selama 6 hari), lalu didiamkan pada temperatur kamar. Diamati sifat-sifat fisik yang berubah seperti adanya *creaming*, penampilan, bau, warna.

Selain *mouthwash* dengan kadar minyak atsiri 1 % seperti diatas, dibuat pula *mouthwash* dengan kadar minyak atsiri 2 % dan 4 % untuk mencari nilai optimum dari aktivitas antibakteri dan antibiofilmnya. *Mouthwash* dengan kadar minyak atsiri 2 % dan 4 % dibuat dengan komposisi eksipien yang sama dengan formula *mouthwash* yang memiliki stabilitas terbaik berdasarkan hasil uji fisik sebelumnya.

Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dengan Mikrodilusi

Nilai KHM ditentukan dengan metode mikrodilusi menggunakan *microplate flat-bottom polystyrene 96 wells* steril. Digunakan seri

konsentrasi minyak atsiri dalam sediaan *mouthwash* pada konsentrasi 0,05; 0,1; dan 0,2 % v/v. Suspensi *S. mutans* dibandingkan dengan Standar Mc Farland II (6×10^8 CFU/mL). Kontrol uji yang digunakan : *mouthwash* "X" 12 % v/v sebagai kontrol pembanding sediaan, suspensi bakteri sebagai kontrol positif pertumbuhan bakteri, sediaan *mouthwash* yang digunakan tanpa penambahan minyak atsiri sebagai kontrol pembawa, dan media NB saja sebagai kontrol media.

Stok *mouthwash* dan *mouthwash* "X" dimasukkan ke dalam *microplate* sebanyak 10 μ L tiap sumuran. Ditambahkan juga 165 μ L media NB pada tiap sumuran. Suspensi bakteri diinokulasikan sebanyak 25 μ L untuk tiap sumuran. *Microplate* diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Hasil uji antibakteri kemudian diukur nilai *optical density* (OD) pada panjang gelombang 595 nm dengan *microplate reader*.

Uji Penghambatan Pembentukan Biofilm

Pengujian dilakukan dengan menggunakan *microplate flexible U-bottom PVC 96-well*. Digunakan seri konsentrasi minyak atsiri dalam sediaan *mouthwash* pada konsentrasi 0,05; 0,1; dan 0,2 % v/v. Suspensi *S. mutans* dibandingkan dengan Standar Mc Farland V (15×10^8 CFU/mL). Kontrol uji yang digunakan : *mouthwash* "X" 6 % v/v sebagai kontrol pembanding, suspensi bakteri sebagai kontrol positif pertumbuhan bakteri, sediaan *mouthwash* yang digunakan tanpa penambahan minyak atsiri sebagai kontrol pembawa, dan media BHI + sukrosa 2 % saja sebagai kontrol media. Ke dalam masing-masing sumuran dimasukkan sebanyak 5 μ L larutan sampel *mouthwash*, 85 μ L media BHI + sukrosa 2%, serta 10 μ L suspensi bakteri lalu *microplate* diinkubasi pada 37°C selama 18-24 jam. *Microplate* dicuci dengan air mengalir. Tambahkan 125 μ L kristal violet 1% inkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Cuci *microplate* dengan air mengalir. Tambahkan etanol absolut 200 μ L dan inkubasi pada suhu ruang selama 15. Sebanyak 150 μ L larutan ditransfer ke *microplate flat-bottom polystyrene 96 wells*. Pengamatan dilakukan dengan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm.

Uji Degradasi Biofilm

Pengujian seperti pada uji penghambatan biofilm, tetapi pada awal dilakukan pembentukan biofilm dengan cara memasukkan suspensi bakteri 10 μ L dan media BHI+ sukrosa 2% sebanyak 90 μ L pada *microplate round bottom polystyrene 96 wells* dan inkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah terbentuk biofilm, *microplate* dicuci

dengan air mengalir. Dimasukkan 125 μ L larutan uji (6,25 μ L *mouthwash* dan 118,75 μ L media) pada masing-masing *well*, inkubasi suhu 37°C selama 18-24 jam. Kemudian, *microplate* dicuci kembali dengan air mengalir dan langkah selanjutnya seperti pada uji penghambatan pembentukan biofilm.

Cara Analisis

Hasil pembacaan *optical density* ditetapkan rerata dan parameter *standar deviation* (SD). Rumus yang digunakan untuk menghitung aktivitas penghambatan dan degradasi (Quave dkk. (2008), dengan modifikasi sebagai berikut :

$$\% \text{ penghambatan} = 1 - \frac{\text{OD sampel} - \text{OD blangko sampel}}{(\text{OD sampel} - \text{OD media})} \times 100\%$$

HASIL DAN PEMBAHASAN

Berdasarkan hasil determinasi diperoleh kepastian bahwa tanaman yang digunakan adalah marga *Ocimum* dan jenis *Ocimum basilicum* L. forma *citratum* Back. Dalam penelitian ini dihasilkan rendemen minyak atsiri sebesar 0,11 % v/b. Hasil penentuan indeks bias dari minyak atsiri daun kemangi pada suhu 20°C adalah 1,47783. Guenther (1949) menyebutkan bahwa indeks bias minyak atsiri daun kemangi adalah 1,52324. Perbedaan nilai ini bisa disebabkan karena perbedaan tempat tumbuh, perbedaan waktu panen, dan perbedaan perlakuan selama proses penanaman (Suppakul *et al.*, 2003; Zheljakov *et al.*, 2008).

Tween 80 Dan Gliserin Memberikan Pengaruh pada Formula *Mouthwash*

Berdasarkan hasil uji organoleptis, diketahui bahwa kelima *mouthwash* yang dihasilkan berwarna hijau, berasa *mint*, dan berbau campuran antara *mint* dan kemangi.

Pengujian viskositas dari *mouthwash* dilakukan menggunakan viskometer Ostwald pada suhu 29°C. Viskometer Ostwald merupakan viskometer untuk larutan Newtonian (Sinko, 2005). Meskipun *mouthwash* yang dibuat merupakan emulsi, namun karena kadar total fase minyak dalam *mouthwash* hanya 2 % dan selebihnya merupakan fase air maka *mouthwash* ini dapat digolongkan sebagai larutan Newtonian. Pada penelitian ini digunakan air sebagai larutan pembanding. Hasil uji viskositas selengkapnya tercantum pada tabel II. Perbedaan viskositas ini disebabkan karena perbedaan jumlah tween 80 dan gliserin yang ditambahkan pada masing-masing formula. Menurut Rowe *et al.*, (2006) tween 80 memiliki nilai viskositas sebesar

Tabel I. Formula Sediaan *Mouthwash* Minyak Atsiri Daun Kemangi

Bahan	Formula I	Formula II	Formula III	Formula IV	Formula V
Minyak atsiri (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Tween 80 (mL)	5	3,75	2,5	1,25	0
Gliserin (mL)	0	1,25	2,5	3,75	5
Peppermint oil (mL)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Na-benzoat (mL)	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Na-sakarín (mL)	3	3	3	3	3
Pewarna hijau	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.	q.s.
Aquades ad (mL)	50	50	50	50	50

Tabel II. Data Viskositas dan Massa Jenis *Mouthwash* dan Air Pada Suhu 29° C

Sampel	Viskositas (cPs)	Massa Jenis (g/mL)
Formula I	1,6624 ± 1,63x10 ⁻²	1,0014 ± 5,74x10 ⁻³
Formula II	1,6414 ± 2,92x10 ⁻²	1,0021 ± 6,14x10 ⁻³
Formula III	1,4877 ± 3,32x10 ⁻²	1,0048 ± 5,78x10 ⁻³
Formula IV	1,2132 ± 2,27x10 ⁻²	1,0193 ± 3,15x10 ⁻³
Formula V	1,3295 ± 1,17x10 ⁻²	1,0186 ± 5,68x10 ⁻³
Air	1,0317	0,99595

Tabel III. Parameter Sediaan Cair Farmasi

	Stabil	Jernih	Sifat Organoleptis Tidak Berubah	Risiko Terjadinya Pemisahan Kecil
Formula I	√	√	√	-
Formula II	√	√	√	√
Formula III	√	-	√	√
Formula IV	-	-	√	-
Formula V	-	-	√	-

425mPa.s atau setara dengan 425 cPs. Berdasarkan hasil ANOVA dengan SPSS 17.0 didapatkan hasil bahwa viskositas formula I dan II memiliki perbedaan yang signifikan secara statistik dengan formula III, IV, V, dan air.

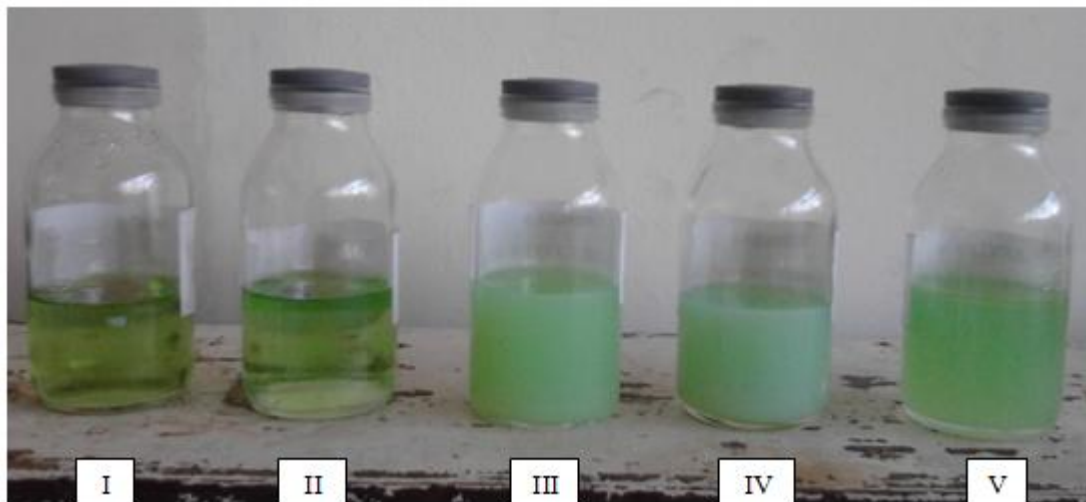
Hal ini menunjukkan bahwa penambahan tween 80 di atas 2,5 mL dalam 50 mL *mouthwash* daun kemangi akan mengubah nilai viskositasnya secara signifikan. Nilai viskositas *mouthwash* semakin menurun seiring dengan menurunnya jumlah tween 80 yang digunakan, namun nilai viskositasnya mengalami peningkatan pada formula V. Meskipun formula V tidak menggunakan tween 80, namun jumlah gliserin yang digunakan mencapai 10 % dari total volume. Gliserin memiliki nilai viskositas sebesar 1,143 cPs pada konsentrasi 5 % dan 1,311 cPs pada konsentrasi 10 % (Rowe *et al.*, 2006). Konsentrasi gliserin yang besar inilah yang menyebabkan naiknya nilai viskositas pada formula V.

Hasil ANOVA terhadap massa jenis *mouthwash* menunjukkan bahwa formula I, II, III, dan air memiliki perbedaan nilai massa jenis yang signifikan dengan *mouthwash* pada formula IV dan V. Berdasarkan literatur, nilai massa jenis tween 80 sebesar 1,06-1,09 g/mL (Budavari, 1996)

dan massa jenis gliserin pada 25°C sebesar 1,2620 g/mL (Rowe *et al.*, 2006). Nilai massa jenis *mouthwash* selengkapnya tercantum pada tabel II.

Adanya perbedaan ini disebabkan oleh perbedaan jumlah tween dan gliserin yang ditambahkan pada masing-masing formula. Literatur menunjukkan bahwa nilai massa jenis tween 80 hampir sama dengan air. Oleh karena itu dapat dikatakan bahwa penambahan tween 80 tidak memiliki pengaruh signifikan terhadap perubahan nilai massa jenis *mouthwash*. Berbeda halnya dengan pengaruh penambahan gliserin. Pengaruh penambahan gliserin pada formula I-III tidak memberikan perbedaan massa jenis yang signifikan dengan air. Namun saat dilakukan penambahan gliserin sebanyak 3,75 mL (pada formula IV) maka didapati bahwa nilai massa jenisnya menjadi berbeda signifikan dengan air. Perbedaan yang signifikan dengan massa jenis air juga terjadi pada formula V dengan penambahan gliserin sebanyak 5 mL.

Uji stabilitas fisik yang dilakukan terhadap *mouthwash* menggunakan metode *shock termic*. Prinsip dari metode ini adalah memberikan suasana yang ekstrim pada larutan uji untuk mengetahui kestabilannya. Berdasarkan uji *shock*



Gambar 1. Sediaan Mouthwash Daun Kemangi Formula I-V

Tabel IV. Hasil Uji Antibakteri dan Antibiofilm Mouthwash terhadap Pertumbuhan *S. Mutans* (n = 5)

Sampel	% Penghambatan Bakteri	% Penghambatan Biofilm	% Degradasi Biofilm
Mouthwash 0,2 %	96,68 ± 6,39	78,66 ± 1,93	57,64 ± 6,09
Mouthwash 0,1 %	87,50 ± 3,33	77,52 ± 0,82	48,22 ± 10,70
Mouthwash 0,05 %	44,11 ± 8,05	64,37 ± 3,05	41,54 ± 17,02
Kontrol pembawa	22,43 ± 2,67	16,11 ± 2,52	31,93 ± 26,53
Mouthwash "X" 12 %	92,04 ± 4,36		
Mouthwash "X" 6 %		58,78 ± 2,25	50,25 ± 9,51

termic, diperoleh hasil bahwa pada formula I sampai III tidak ditemukan adanya pemisahan antara fase air dan minyak. Pemisahan antara fase minyak dan air terjadi pada formula IV dan V. Berdasarkan kenampakannya secara visual, formula I dan II tampak jernih, sedangkan formula III-V terlihat keruh. Foto mouthwash daun kemangi formula I-V bisa dilihat pada gambar 1.

Berdasarkan hasil uji fisik yang dilakukan, maka sediaan mouthwash yang stabil adalah formula mouthwash nomor I-III, namun peneliti memilih formula II dengan perbandingan tween 80 dan gliserin sebesar 3,75 mL : 1,25 mL sebagai formula terbaik sesuai dengan parameter yang digunakan. Berikut ini adalah parameter sediaan cair yang baik menurut Anief (1999) serta Glass dan Haywood (2006) (tabel III) :

Mouthwash Daun Kemangi Memiliki Aktivitas Antibakteri

Mouthwash yang dibuat oleh peneliti memiliki kadar minyak atsiri kemangi sebesar 1 % v/v. Pemilihan kadar ini didasarkan pada hasil penelitian Wulanjati *et al.* (2011) yang menyatakan bahwa minyak atsiri daun kemangi

memiliki nilai KHM sebesar 1 % v/v. Selain dibuat kadar 1 % v/v, dibuat juga mouthwash dengan kadar 2 % v/v dan 4 % v/v untuk mengetahui nilai optimum dari aktivitas penghambatan antibakteri dan antibiofilm oleh mouthwash daun kemangi.

Sebanyak 10 µL mouthwash dari masing-masing kadar dimasukkan ke dalam microplate dan ditambahkan 165 µL media NB dan 25 µL suspensi bakteri *S. mutans*. Adanya penambahan media dan suspensi bakteri ke dalam sumuran menyebabkan terjadinya pengenceran kadar minyak atsiri dalam sumuran. Berdasarkan perhitungan, diketahui bahwa kadar akhir minyak atsiri daun kemangi pada sumuran sebesar 0,05 % v/v, 0,1 % v/v, dan 0,2 % v/v.

Microplate uji diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C sesuai dengan penelitian Aneja *et al.* (2010). Hasil uji antibakteri kemudian diukur intensitasnya pada panjang gelombang 595 nm dengan microplate reader. Kemampuan antibakteri ditunjukkan dengan besarnya % penghambatan pertumbuhan bakteri dari masing-masing sampel uji. Hasil uji aktivitas antibakteri dari mouthwash daun kemangi terhadap *S. mutans* tercantum pada tabel IV.

Berdasarkan analisis GC-MS yang dilakukan Wulanjati (2012) terhadap minyak atsiri daun kemangi, ditemukan hasil bahwa komponen utama yang terdapat didalamnya adalah geraniol atau E-sitral (43,74 %), nerol atau Z-sitral (31,19 %), linalool (7,03 %), nerol (6,93 %), dan geraniol (4,62 %).

Linalool, nerol, dan geraniol merupakan terpenoid alkohol. Alkohol diketahui memiliki aktivitas bakterisidal (membunuh bakteri) daripada bakteriostatik (menghambat bakteri) pada sel vegetatif. Dorman dan Deans (2000) menyebutkan bahwa terpenoid alkohol dapat menghambat aktivitas pertumbuhan bakteri melalui mekanisme denaturasi protein bakteri. Nerol dan geraniol merupakan monoterpen aldehyd. Aldehyd diketahui memiliki aktivitas antimikroba yang kuat. Diketahui bahwa gugus aldehyd yang terkonjugasi pada atom karbon ikatan rangkap memiliki elektronegativitas yang tinggi. Elektronegativitas yang tinggi ini diperkirakan memiliki hubungan yang linear dengan meningkatnya aktivitas antibakteri (Dorman dan Deans, 2000).

Salah satu parameter yang sering digunakan pada uji aktivitas antibakteri adalah Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). KHM merupakan kadar terkecil yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri secara kasat mata. Konsentrasi terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan tidak adanya kekeruhan pada sumuran. Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa *mouthwash* kemangi ini memiliki nilai KHM sebesar 0,1 % v/v.

Mouthwash Daun Kemangi Mampu Menghambat Pertumbuhan Biofilm

Larutan uji, media, dan suspensi bakteri dimasukkan ke dalam *microplate*. Selanjutnya *microplate* diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C sehingga akan terbentuk biofilm pada permukaan sumuran. *Microplate* dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan larutan uji, kemudian ditambahkan 125 µL kristal violet 1 % ke dalam sumuran dan diinkubasi selama 15 menit pada suhu ruang. Kristal violet akan mewarnai biofilm sehingga terbentuk cincin berwarna ungu di sekeliling sumuran. *Microplate* kembali dicuci untuk menghilangkan sisa kristal violet yang tidak berikatan dengan biofilm yang terbentuk. Kemudian ditambahkan 200 µL etanol 96 % dan diinkubasi pada suhu ruang selama 15 menit. Etanol 96 % digunakan untuk melarutkan warna kristal violet yang terikat pada biofilm. Banyaknya kristal violet yang terlarut berbanding lurus dengan jumlah biofilm yang terbentuk. Namun demikian, faktor fisika, kimia, dan biologis

juga dapat mempengaruhi ikatan kristal violet dan biofilm. Faktor-faktor tersebut antara lain adalah faktor struktural yang mempengaruhi difusi pewarna, perbedaan morfologi dan fisiologi dari setiap sel, dan interaksi kimia antara komponen senyawa dalam tanaman dengan pewarna itu sendiri (Niu dan Gilbert, 2004). Selanjutnya sejumlah 150 µL larutan ditransfer ke *microplate flat-bottom 96 wells* untuk dilakukan pembacaan nilai OD menggunakan *microplate reader* pada panjang gelombang 595 nm. Hasil penelitian bisa dilihat pada tabel IV.

Kontrol pembawa memiliki nilai % penghambatan biofilm sebesar 18,864 %. Nilai % penghambatan ini diduga berasal dari natrium benzoat dan *peppermint oil* yang digunakan dalam formulanya. Natrium benzoat yang digunakan sebagai pengawet memiliki sifat bakteriostatik (Rowe *et al.*, 2006). Berdasarkan hasil di atas, maka kadar minyak atsiri daun kemangi yang optimum dalam menghambat pembentukan biofilm adalah kadar 0,1 % v/v.

Mouthwash Daun Kemangi Mampu Mendegradasi Biofilm

Kemampuan degradasi biofilm dari senyawa terkait dengan kemampuan penetrasi senyawa ke dalam biofilm yang terbentuk, yakni mampu berpenetrasi pada lapisan EPS atau lapisan lendir yang menyelubungi bakteri. Selain itu, kemampuan senyawa dalam mendegradasi biofilm adalah menghilangkan EPS pada biofilm yang sudah terbentuk (Ardani *et al.*, 2010).

Hasil uji degradasi biofilm seperti pada tabel IV menunjukkan nilai yang lebih rendah daripada hasil uji antibakteri dan penghambatan biofilm. Nilai % degradasi kontrol pembawa juga tampak lebih tinggi dari hasil kedua uji sebelumnya. Hal ini dikarenakan adanya kontribusi efek antibakteri dari natrium benzoat dan *peppermint oil* yang digunakan, sesuai dengan penjelasan sebelumnya. Berdasarkan hasil di atas, maka kadar minyak atsiri daun kemangi yang optimum dalam menghambat pembentukan biofilm adalah kadar 0,2 % v/v.

Rendahnya nilai % degradasi biofilm ini menunjukkan bahwa *mouthwash* minyak atsiri daun kemangi kurang efektif sebagai agen pendegradasi biofilm. Kemungkinan penyebabnya adalah karena *mouthwash* yang dibuat tidak memiliki kemampuan yang tinggi dalam berpenetrasi ke dalam lapisan EPS yang menyelubungi bakteri serta melenyapkan lapisan EPS tersebut.

KESIMPULAN

Tween 80 memberikan pengaruh signifikan terhadap kenaikan nilai viskositas dan gliserin memberikan pengaruh signifikan terhadap nilai kenaikan massa jenis bila keduanya ditambahkan sebanyak lebih dari 2,5 mL dalam 50 mL *mouthwash* daun kemangi. Formula terbaik berdasarkan hasil evaluasi dari berbagai uji fisik yang dilakukan adalah formula II dengan perbandingan tween 80 dan gliserin = 3,75 mL : 1,25 mL. *Mouthwash* daun kemangi memiliki nilai KHM sebesar 0,1 % v/v dengan % penghambatan pertumbuhan bakteri sebesar $87,50 \pm 3,33$ %, sedangkan kadar optimum minyak atsiri daun kemangi yang mampu menghambat serta mendegradasi biofilm berturut-turut adalah 0,1 % v/v dan 0,2 % v/v dengan % penghambatan dan degradasi biofilm sebesar $77,52 \pm 0,82$ % dan $57,64 \pm 6,09$ %.

DAFTAR PUSTAKA

- Aneja, K. R., Joshi, R., dan Sharma, C., 2010, The Antimicrobial Potential of Ten Often Used Mouthwashes Against Four Dental Caries Pathogens, *Jundishapur J Microbiol*, **3(1)**, 15-27.
- Anief, M., 1999, *Sistem Dispersi, Formulasi Suspensi, dan Emulsi*, 70-78, Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Ardani, M., Pratiwi, S. U. T., dan Hertiani, T., 2010, Efek Campuran Minyak Atsiri Daun Cengkeh dan Kulit Batang Kayu Manis sebagai Antiplak Gigi, *Majalah Farmasi Indonesia*, **(21)3**, 191-201.
- Budavari, S., 1996, *The Merck Index*, 12th Edition, 7742, Merck Research Laboratories, New Jersey.
- Donlan, R. M., 2002, Biofilms: Microbial Life on Surfaces, *Emerg Infect Dis*, **8**, 881-890.
- Dorman, H. J. D. dan Deans, S. G., 2000, Antimicrobial Agents from Plants: Antibacterial Activity of Plant Volatile Oils, *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308-316.
- Glass, B. D. dan Haywood, A., 2006, Stability Considerations in Liquid Dosage Forms Extemporaneously Prepared From Commercially Available Products, *J Pharm Pharmaceut Sci*, **9(3)**, 398-426.
- Guenther, E., 1949, *The Essential Oils*, Volume 3, 413-415, D. Van Nostrand Company Inc., New York.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., dan Stoodley, P., 2004, Bacterial Biofilms: From the Natural Environment to Infectious Diseases, *Nat Rev Microbiol*, **2**, 95-108.
- Kardinan, A., 2003, *Selasih : Tanaman Keramat Multimanfaat*, 1-3, 26, PT Agro Media Pustaka, Depok.
- Kidd, E. A. M., 2004, How 'Clean' Must a Cavity be Before Restoration?, *Caries Res*, **38**, 305-313.
- Knight, G. M., McIntyre, J. M., Craig, G. G., Mulyani, Zilm, P. S., dan Gully, N. J., 2007, Differences Between Normal and Demineralized Dentine Pretreated with Silver Fluoride and Potassium Iodide After an In Vitro Challenge by *Streptococcus Mutans*, *Aust Dent J*, **52**, 16-21.
- Lee, S., Umamo, K., Shibamoto, T., dan Lee, K., 2005, Identification of Volatile Components in Basil (*Ocimum basilicum* L.) and Thyme Leaves (*Thymus vulgaris* L.) and Their Antioxidant Properties, *Food Chemistry*, **91(1)**, 131-137.
- Maryati, Fauzia, R. S., dan Rahayu, T., 2007, Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*, *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, **8(1)**, 30-38.
- Niu, C. dan Gilbert, E. S., 2004, Colorimetric Method for Identifying Plant Essential Oil Components That Affect Biofilm Formation and Structure, *Applied Dan Environmental Microbiology*, **70(12)**, 6951-6956.
- Paes, A. F., Koo, H., Bellato, C. M., Bedi, G., dan Cury, J. A., 2006, The Role of Sucrose in Cariogenic Dental Biofilm Formation-New Insight, *J Dent Res*, **85**, 878-887.
- Quave, C. L., Plano, L. R. W., Pantuso, T., dan Bennet, B. C., 2008, Effects of Extracts from Italian Medicinal Plants on Planktonic Growth, Biofilm Formation and Adherence of Methicilin-Resistant *Staphylococcus aureus*, *Journal of Ethnopharmacol*, **118(3)**, 418-428.
- Rowe, R. C., Sheskey, P. J., dan Owen, S. C., 2006, *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 5th Edition, 301-303, 580-584, 1750-1752, Pharmaceutical Press, London.
- Simon, J. E., Morales, M. R., Phippen, W. B., Vieira, R. F., dan Hao, Z., 1999, *A Source of Aroma Compounds and a Popular Culinary and Ornamental Herb*, 499-505, ASHA press, Alexandria.
- Sinko, P. J., 2005, *Martin's Physical Pharmacy dan Pharmaceutical Science*, 5th Edition, 569-571, Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., dan Bigger, S. W., 2003, Antimicrobial Properties of Basil and Its Possible Application in Food

- Packaging, *Journal of Agricultural dan Food Chemistry*, **51(11)**, 3197-3207.
- Wulanjati, M. P., Yosephine, A. D., Sari, Y. A. K., dan Widhaningtyas, A., 2011, Formulasi Sediaan *Mouthwash* Antibakteri dari Minyak Atsiri Daun Kemangi (*Ocimum basilicum* L.), *Laporan Penelitian PKM*, Fakultas farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Wulanjati, M. P., 2012, Uji Antibakteri dan Antibiofilm Minyak Atsiri Kemangi (*Ocimum basilicum* L.) terhadap *Streptococcus mutans* Secara In Vitro, *Skripsi*, Fakultas farmasi Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.
- Zheljazkov, V. D., Callahan, A., dan Cantrell, C. L., 2008, Yield and Oil Composition of 38 Basil (*Ocimum basilicum* L.) Accessions Grown in Mississippi, *J. Agric. Food Chem.*, **56**, 241-245