

Green Synthesis Nanopartikel Perak (AgNPs) Menggunakan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) untuk Aplikasi Fotoantimikroba Biofilm *Candida albicans*

Green Synthesis of Silver Nanoparticles (AgNPs) using *Moringa oleifera* Leaf Extract for Photoantimicrobial Application of *Candida albicans* Biofilms



**IMELDA
H032221001**



**PROGRAM STUDI MAGISTER FISIKA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

Green Synthesis Nanopartikel Perak (AgNPs) Menggunakan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) untuk Aplikasi Fotoantimikroba Biofilm *Candida albicans*

**IMELDA
H032221001**



**PROGRAM STUDI MAGISTER FISIKA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

Green Synthesis* Nanopartikel Perak (AgNPs) Menggunakan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) untuk Aplikasi Fotoantimikroba Biofilm *Candida albicans

Tesis

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar magister

Program Studi Magister Fisika

Disusun dan diajukan oleh

**IMELDA
H032221001**

pada

**PROGRAM STUDI MAGISTER FISIKA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

TESIS

Green Synthesis Nanopartikel Perak (AgNPs) Menggunakan Ekstrak Daun Kelor (*Moringa oleifera*) untuk Aplikasi Fotoantimikroba Biofilm *Candida albicans*

**IMELDA
H032221001**

telah dipertahankan di hadapan Panitia Ujian Magister pada 06 Agustus 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan

pada
Program Studi Magister Fisika
Departemen Fisika
Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam
Universitas Hasanuddin
Makassar

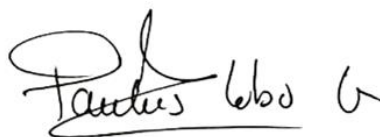
Mengesahkan:

Pembimbing Utama,



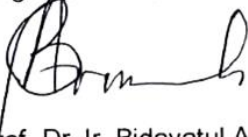
Dr. Sri Dewi Astuty, S.Si., M.Si.
NIP 19750513 199903 2 001

Pembimbing Pendamping,



Prof. Dr. Paulus Lobo Gareso, M.Sc.
NIP 19650305 199103 1 008

Ketua Program Studi
Magister Fisika,



Prof. Dr. Ir. Bidayatul Armynah, M.
NIP 19630830 198903 2 001

Dekan Fakultas Mipa
Universitas Hasanuddin,



Prof. Dr. Amrulloh, M.Si.
NIP 19720515 199702 1 002

PERNYATAAN KEASLIAN TESIS DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, tesis berjudul “*Green Synthesis Nanopartikel Perak (AgNPs) menggunakan ekstrak daun kelor (Moringa oleifera) untuk aplikasi fotoantimikroba biofilm Candida albicans*” adalah benar karya saya dengan arahan dari tim pembimbing (Dr. Sri Dewi Astuty, S.Si., M.Si. sebagai Pembimbing Utama dan Prof. Dr. Paulus Lobo Gareso, M.Sc. sebagai Pembimbing Pendamping). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi mana pun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka tesis ini. Sebagian dari isi tesis ini telah dipublikasikan di Jurnal Trends in Sciences 2024; Volume 21, Number 9, 8032 dan DOI <https://doi.org/10.48048/tis.2024.8032> sebagai artikel dengan judul “*Green Synthesis of Silver Nanoparticles using Moringa oleifera: Implementation to Photoantimicrobial of Candida albicans with LED Light*”. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan tesis ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa tesis ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 06 Agustus 2024



Imelda
NIM H032221001

UCAPAN TERIMA KASIH

Penelitian yang saya lakukan dapat terlaksana dengan sukses dan tesis ini dapat rampung atas bimbingan, diskusi, motivasi dan arahan dari Ibu Dr. Sri Dewi Astuty, S.Si., M.Si. sebagai pembimbing utama dan Bapak Prof. Dr. Paulus Lobo Gareso, M.Sc. sebagai pembimbing pendamping. Ucapan terima kasih juga penulis ucapkan kepada Ibu Prof. Dr. Ir. Bidayatul Armynah, M.T., Bapak Prof. Dr. Tasrief Surungan, M. Sc., dan Bapak Prof. Dr. Syamsir Dewang, M. Eng. Sc., sebagai penguji yang telah memberikan saran dan perbaikan yang berharga dalam proses penelitian dan penulisan tesis ini. Penghargaan yang tinggi juga saya sampaikan kepada Kepala Balai Labkesmas Makassar II beserta seluruh staf atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menggunakan fasilitas dan peralatan di Laboratorium Balai Labkesmas Makassar II. Terima kasih juga saya sampaikan kepada teman-teman di Balai Labkesmas Makassar II yang telah memberi support dan membantu penulis selama melaksanakan pengujian.

Kepada Biro PPSDM Kemenkes RI, saya mengucapkan terima kasih atas beasiswa Tugas Belajar Kesehatan tahun 2022 yang diberikan kepada penulis (SK No. HK.07/F/1953/2022) selama menempuh program pendidikan magister. Ucapan terima kasih juga saya ucapkan kepada pimpinan Universitas Hasanuddin dan Fakultas MIPA Universitas Hasanuddin yang telah memfasilitasi saya menempuh program magister serta para dosen dan rekan-rekan dalam tim penelitian.

Akhirnya, kepada bapak & almh. Ibu saya, saya mengucapkan terima kasih yang berlimpah dan sembah sujud atas segala support berupa doa dan motivasi yang diberikan kepada saya selama menempuh pendidikan. Penghargaan yang besar juga saya sampaikan kepada suami tercinta Arga Bhayangkara, dan kedua putri tercinta (Alisha dan Sofia) atas kasih sayang, dedikasi, support dan bantuannya terhadap penulis. Tak lupa saya ucapkan terima kasih kepada seluruh keluarga dan teman-teman S2 atas motivasi dan dukungan yang tak ternilai.

Penulis,



Imelda

ABSTRAK

IMELDA. **Green synthesis nanopartikel perak (AgNPs) menggunakan ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) untuk aplikasi fotoantimikroba biofilm *Candida albicans*** (dibimbing oleh Dr. Sri Dewi Astuty, S.Si., M.Si. dan Prof. Dr. Paulus Lobo Gareso, M.Sc.).

Latar belakang. Penelitian ini mengembangkan sintesis AgNPs yang direduksi secara bioaktif dengan klorofil ekstrak daun kelor (MO) untuk menjadi fotosensitizer berskala nano. Aplikasi AgNPs-MO dalam mekanisme fotoantimikroba diuji untuk mengetahui seberapa besar potensinya setelah diaktivasi dengan cahaya LED dalam mereduksi biofilm *Candida albicans*. **Tujuan.** Mengidentifikasi karakteristik AgNPs-MO sebagai agen fotosensitizer dan mengkaji potensinya dalam mereduksi biofilm *Candida albicans* dengan sumber cahaya LED biru (450 nm) dan LED merah (620 nm). **Metode.** Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap, yakni: 1) pembuatan dan karakterisasi fotosensitizer AgNPs-MO; 2) perlakuan fotoantimikroba menggunakan cahaya LED dan pewarnaan mikroba hasil perlakuan; dan 3) penentuan efektivitas fotosensitizer AgNPs-MO melalui perhitungan nilai inaktivasi biofilm dan nilai kadar senyawa *Malondialdehyde* menggunakan metode TBARS. **Hasil.** Karakteristik AgNPs-MO berada pada $\lambda_{\max} = 440$ nm dan ekstrak klorofil MO berada pada $\lambda_{\max 1} = 425$ nm dan $\lambda_{\max 2} = 635$ nm. Pada uji FTIR didapatkan puncak gugus fungsi senyawa ikatan protein dari flavonoid MO yang berperan dalam mereduksi Ag^+ menjadi Ag^0 dan menjadi indikator terbentuknya nanopartikel. Fase kristal Ag ditunjukkan pada bidang kisi (110), (111), dan (210) yang relevan sebagai karakteristik AgNPs. Ukuran partikel berkisar antara 5-35 nm dengan bentuk bulat tidak seragam. Uji zona bening memperlihatkan adanya efektivitas antifungi yang terkandung dalam material Ag dan klorofil MO. Potensi inaktivasi optimal terjadi pada kelompok AgNPs-MO kombinasi LED biru maupun LED merah selama paparan lima menit masing-masing 76,80% dan 76,20%. Uji kadar MDA juga sejalan dengan optimal perlakuan fotoantimikroba yang dikombinasikan dengan AgNPs-MO masing-masing sebesar 1,772 nmol/mL dan 1,617 nmol/mL. **Kesimpulan.** AgNPs-MO memiliki karakteristik optis & kimia yang baik sebagai fotosensitizer dan berpotensi efektif dalam menghambat pertumbuhan biofilm *Candida albicans*.

Kata kunci: Fotoantimikroba, nanopartikel perak, *Moringa oleifera*, biofilm *Candida albicans*, dan LED

ABSTRACT

IMELDA. **Green synthesis of silver nanoparticles (AgNPs) using *Moringa oleifera* leaf extract for photoantimicrobial application of *Candida albicans* biofilms** (supervised by Dr. Sri Dewi Astuty, S.Sc., M.Sc. and Prof. Dr. Paulus Lobo Gareso, M.Sc.).

Background. This research develops the synthesis of AgNPs which are bioactively reduced with chlorophyll from *Moringa* leaf extract (MO) to become a nanoscale photosensitizer. The application of AgNPs-MO in the photoantimicrobial mechanism was tested to determine how much potential it has after being activated with LED light in reducing *Candida albicans* biofilm. **Aim.** Identifying the characteristics of AgNPs-MO as a photosensitizer agent and assessing its potential in reducing *Candida albicans* biofilms with blue LED (450 nm) and red LED (620 nm) light sources. **Method.** This research was divided into three stages, *i.e.*: 1) manufacture and characterization of the AgNPs-MO photosensitizer; 2) photoantimicrobial treatment using LED light and staining of the microbes resulting from the treatment; and 3) determining the effectiveness of the AgNPs-MO photosensitizer by calculating the biofilm inactivation value and the *Malondialdehyde* compound content value using the TBARS method. **Results.** The characteristics of AgNPs-MO are at $\lambda_{\max} = 440$ nm and MO chlorophyll extract are at $\lambda_{\max1} = 425$ nm and $\lambda_{\max2} = 635$ nm. In the FTIR test, peaks were found in the functional groups of protein-bound compounds from MO flavonoids which play a role in reducing Ag^+ to Ag^0 and serve as indicators of nanoparticle formation. The Ag crystal phases are observed in the (110), (111), and (210) lattice planes which are relevant as characteristics of AgNPs. The particle size ranges from 5-35 nm with a non-uniform round shape. The clear zone test confirms the antifungal effectiveness contained in the Ag material and MO chlorophyll. The optimal inactivation potential occurred in the AgNPs-MO group with a combination of blue LED and red LED during five minutes exposure, achieving 76,80% and 76,20% reduction, respectively. The MDA level test was also in line with the optimal photoantimicrobial treatment combined with AgNPs-MO at 1,772 nmol/mL and 1,617 nmol/mL, respectively. **Conclusion.** AgNPs-MO has good optical & chemical characteristics as a photosensitizer and is potentially effective in inhibiting the growth of *Candida albicans* biofilms.

Keywords: Photoantimicrobial, silver nanoparticles, *Moringa oleifera*, *Candida albicans* biofilm, and LED

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGAJUAN.....	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN TESIS.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG	xiii
BAB I PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	5
1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian	6
BAB II METODE PENELITIAN	7
2.1 Tempat dan Waktu.....	7
2.2 Bahan dan Alat.....	7
2.3 Metode Penelitian	7
2.3.1 Pembuatan ekstrak klorofil daun kelor (<i>Moringa oleifera</i>).....	8
2.3.2 Preparasi <i>Green Synthesis</i> AgNPs-MO	8
2.3.3 Karakterisasi AgNPs-MO	9
2.3.4 Penumbuhan Biofilm <i>C. albicans</i>	9
2.3.5 Pengelompokan Sampel Biofilm <i>C. albicans</i>	10
2.3.6 Penentuan Daya dan Lama Penyinaran LED	11
2.3.7 Perlakuan Fotoantimikroba	11
2.3.8 Uji XTT.....	12
2.3.9 Uji Kadar MDA dengan Metode TBARS	12
2.3.10 Analisis Data	13
2.4 Bagan Alir Penelitian	14
BAB III HASIL DAN PEMBAHASAN.....	15

3.1 Stabilitas daya keluaran LED	15
3.2 Proses Green Sintesis AgNPs-MO.....	16
3.3 Puncak serapan AgNPs-MO	16
3.4 Karakterisasi gugus fungsi senyawa AgNPs-MO.....	17
3.5 Fasa Kristal senyawa AgNPs-MO	19
3.6 Struktur morfologi senyawa AgNPs-MO.....	20
3.7 Hasil uji aktivitas Antimikroba AgNPs-MO.....	21
3.8 Hasil uji viabilitas dengan metode pewarnaan XTT assay	22
3.9 Hasil uji kadar senyawa MDA dengan metode TBARS.....	25
BAB IV KESIMPULAN DAN SARAN	29
4.1 Kesimpulan	29
4.2 Saran	29
DAFTAR PUSTAKA.....	30
LAMPIRAN.....	36
CURRICULUM VITAE.....	69

DAFTAR TABEL

Tabel 1. Kelompok perlakuan fotoantimikroba	10
Tabel 2. Densitas energi pada aplikasi fotoantimikroba.....	15
Tabel 3. Daerah Serapan sintesis AgNPs-MO	19
Tabel 4. Diameter zona bening	22

DAFTAR GAMBAR

Gambar 1 Modifikasi Mekanisme Fotoantimikroba	2
Gambar 2. Preparasi klorofil MO	8
Gambar 3. Preparasi <i>Green synthesis</i> AgNPs-MO.....	8
Gambar 4. Karakterisasi AgNPs-MO	9
Gambar 5. Penumbuhan biofilm <i>C. albicans</i>	10
Gambar 6. Perlakuan fotoantimikroba.....	11
Gambar 7. Pengujian sampel menggunakan metode pewarnaan XTT	12
Gambar 8. Pengujian sampel menggunakan metode pewarnaan TBARS.....	13
Gambar 9. Kurva linear standar konsentrasi MDA.....	13
Gambar 10. Bagan Alir Penelitian	14
Gambar 11. Stabilitas daya keluaran LED merah dan biru.....	15
Gambar 12. Visualisasi warna green sintesis AgNPs-MO.....	16
Gambar 13. Puncak serapan optimum bahan fotosensitizer	17
Gambar 14. Spektrum FTIR Ekstrak MO dan AgNPs-MO.....	18
Gambar 15. Pola XRD Klorofil MO dan AgNPs-MO	20
Gambar 16. Struktur morfologi AgNPs-MO.....	21
Gambar 17. Zona bening yang terbentuk dari aktifitas antimikroba	21
Gambar 18. Perbedaan gradasi warna viabilitas sel menggunakan XTT Assay	22
Gambar 19. Kurva penurunan nilai OD biofilm <i>C. albicans</i>	23
Gambar 20. Persentase Inaktivasi Kelompok Perlakuan.....	24
Gambar 21. Perbedaan kadar MDA sampel berdasarkan gradasi warna	25
Gambar 22. Nilai OD _{532nm} hasil pewarnaan TBARS assay	26
Gambar 23. Kadar MDA sampel.	27

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1. Data Stabilitas Uji Kinerja Daya LED 100 mW	36
Lampiran 2. Data Spektrum Uv-Vis AgNPs-MO, MO, dan Control AgNO ₃	42
Lampiran 3. Hasil Pemeriksaan FTIR	43
Lampiran 4. Hasil Perhitungan Ukuran Kristal AgNPs-MO	44
Lampiran 5. Struktur morfologi dan data ukuran partikel pada SEM	45
Lampiran 6. Data nilai OD Pengujian XTT Assay	47
Lampiran 7. Data Inaktivasi Biofilm <i>C. albicans</i>	47
Lampiran 8. Data absorbansi sampel hasil pengujian TBARS assay	47
Lampiran 9. Data MDA Level	47
Lampiran 10. Surat Keterangan Pembimbing	48
Lampiran 11. Surat Keterangan Penguji	49
Lampiran 12. Artikel Ilmiah Terpublikasi	50

DAFTAR SINGKATAN, ISTILAH, DAN LAMBANG

Singkatan/Lambang	Keterangan
AgNO ₃	Silver Nitrat
AgNPs	<i>Silver Nanoparticles</i> (Nanopartikel perak)
AgNPs-MO	Nanopartikel perak direduksi dengan <i>Moringa oleifera</i>
<i>C. albicans</i>	Fungi <i>Candida albicans</i>
ELISA Reader	<i>Enzyme-linked Immune Assay Reader</i>
et al.	<i>et alia</i> (dan kawan-kawan)
FTIR <i>Spectroscopy</i>	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
MDA	<i>Malondialdehyde</i>
MO	<i>Moringa oleifera</i> Lam. (tanaman kelor)
nm	nanometer
OD	<i>Optical Density</i> /Derajat kecerahan
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PS	<i>Photosensitizer</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
SEM	<i>Scanning Electron Microscopy</i>
<i>Spectrophotometer UV-Vis</i>	<i>Spectrophotometer Ultra-violet Visible</i>
θ	<i>Theta</i>
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i>
TBARS	<i>Thiobarbituric Acid Reactive Substances</i>
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
TEP	(1,1,3,3-tetraethoxypropane)
XRD	<i>X-Ray Diffraction</i>
XTT	(2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulphophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide)
λ	Panjang Gelombang (<i>Lambda</i>)
v/v	<i>volume per volume</i>
E ₁ - E ₅	Energi Level 1 – 5 menit
<i>Lattice Plane</i>	Bidang Kisi

BAB I

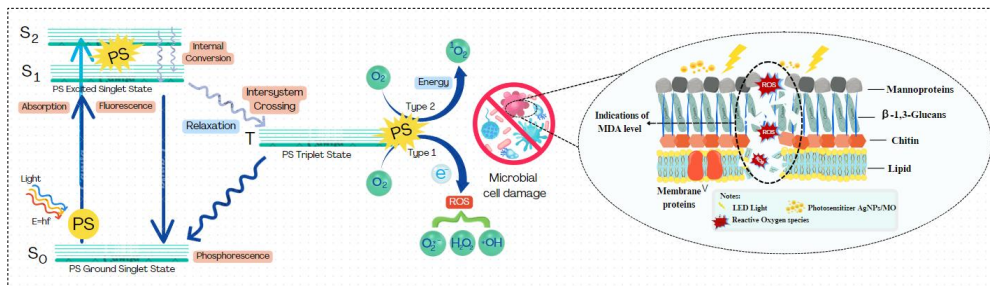
PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi yang dipicu oleh adanya mikroba patogen menimbulkan ancaman serius bagi kesehatan manusia, termasuk jamur *Candida albicans* atau biasa disebut *C. albicans* (Huang et al., 2021). Jamur ini dikenal sebagai patogen paling umum yang menyebabkan infeksi pada mukosa mulut dan vagina yang menyumbang 90% kasus kandidiasis (Fristiyanti et al., 2023; Maia et al., 2018). *C. albicans* memiliki kemampuan untuk membentuk biofilm yang lebih kaku dan tebal, karena adanya β -glukan yang resisten terhadap antimikroba (Henriques & Silva, 2021). Biofilm digambarkan sebagai komunitas sel mikroba yang menempel pada permukaan jaringan/substrat yang ditutupi oleh matriks polimer ekstra seluler (EPS) yang meninggalkan sel yang persisten/kukuh. Sel dari biofilm *C. albicans* dapat terlepas dan menyebar ke seluruh inang dan menyerang tempat infeksi baru (Cabrini Carmello et al., 2019). Pengobatan konvensional jangka panjang dengan antibiotik dapat menimbulkan resiko kegagalan terapi melalui resistensi obat dan mutase fenotip mikroba (Blair et al., 2015). Oleh karena itu, dikembangkan pengobatan berbasis cahaya yang mampu menembus bahan transparan seperti biofilm dan mencegah munculnya resistensi. Biofotonik adalah bidang penelitian yang memanfaatkan cahaya dan teknologi berbasis cahaya untuk memahami proses biologis dan medis. Biofotonik digunakan dalam bentuk terapi fotoantimikroba (Tulp & Einstein, 2023; Wainwright et al., 2017).

Fotoantimikroba merupakan salah satu bentuk terapi yang bertujuan untuk menghambat pertumbuhan mikroba patogen penyebab infeksi pada tubuh manusia. Mekanisme fotoantimikroba berdasarkan interaksi antara foton cahaya dengan molekul sensitizer menghasilkan beberapa jenis *reactive oksigen singlet* (ROS) (Wainwright et al., 2017). ROS merupakan senyawa reaktif yang dihasilkan dari reaksi senyawa radikal substrat triplet sensitizer terhadap molekul oksigen, sedangkan singlet molekul oksigen terbentuk dari reaksi triplet sensitizer terhadap molekul oksigen yang dapat menyebabkan kerusakan sel (Astuty & Baktir, 2017). Fotoantimikroba adalah alternatif yang menjanjikan untuk pengobatan obat dalam terapi antimikroba seperti infeksi jamur *Candida*. Produk sitotoksik ini berinteraksi dengan komponen sel melalui jalur yang berbeda, menyebabkan kerusakan permanen dan nekrosis mikroorganisme secara cepat (Cabrini Carmello et al., 2019). Mekanisme fotoantimikroba didasarkan pada asosiasi tiga komponen: agen fotosensitizer (PS), cahaya tampak dengan panjang gelombang tertentu, dan oksigen. PS tereksitasi oleh cahaya dan dengan adanya oksigen, reaksi ini menghasilkan oksigen singlet dan spesies oksigen reaktif (ROS) yang merupakan penyebab utama kerusakan sel akibat stres oksidatif (Dai et al., 2012). Berdasarkan diagram Jablonski, mekanisme fotoantimikroba melibatkan tiga proses aktivitas yaitu

proses fotofisika, fotokimia, dan fotobiologi yang dapat kita lihat pada **Gambar 1** berikut.



Gambar 1 Modifikasi Mekanisme Fotoantimikroba berdasarkan Diagram Jablonsky menyebabkan kematian sel mikroba akibat senyawa radikal.

Source: (Plaetzer et al., 2003; X. Wang et al., 2021) In *Cancers*. MDPI Ai dan *lasermed*. (<https://doi.org/10.3390/cancers13122992>, <http://www.urbanfischer.de/journals/lasermed>)

Gambar 1 menunjukkan aktivitas fotofisika terdiri dari penyerapan energi cahaya pada panjang gelombang tertentu yang menyebabkan tereksitasinya molekul PS^* dari tingkat energi terendah ke tingkat eksitasi ($S_0 \rightarrow S_1$) atau ($S_0 \rightarrow S_2$). Molekul PS^* dapat kembali ke keadaan dasar (E_0) setelah mengalami relaksasi getaran dan konversi internal hingga ke permukaan dasar singlet ($S_{1,0}$) dan memancarkan fluoresensi. Kemungkinan lainnya, PS^* dapat mengalami konversi ke tingkat energi eksitasi triplet ($S_1 \rightarrow T$) dan melakukan reaksi kimia dengan molekul oksigen membentuk senyawa ROS. Molekul PS yang stabil pada tingkat triplet kembali ke keadaan dasar dengan melepaskan energi dalam bentuk emisi pendar. Pelepasan energi pada tingkat triplet dilakukan oleh molekul PS melalui dua cara, yaitu transfer elektron untuk membentuk senyawa radikal dan transfer energi untuk membentuk oksigen singlet (Astuty & Baktir, 2017; Cabrini Carmello et al., 2019; Yoon et al., 2013). Spesies oksigen singlet yang sangat reaktif menyebabkan kematian langsung sel dalam proses apoptosis atau nekrosis (Kessel & Oleinick, 2010). ROS membuat kerusakan pada komponen sel (protein, lipid membran dan asam nukleat, dll.)

Penelitian terkait fotoantimikroba memanfaatkan nanoteknologi mulai banyak dilakukan. Peningkatan sifat material melalui ukuran skala nano memberikan fungsi yang lebih baik terhadap antimikroba (Nel et al., 2009). Nanopartikel adalah partikel dalam bentuk dan dimensi yang berada pada kisaran 1-100 nm (Azarbanani & Shiravand, 2020). Nanopartikel terutama yang berbasis logam banyak digunakan dalam teknologi canggih karena sifatnya yang unik, fitur permukaan, bentuk, dan karakteristik yang menarik (Pal et al., 2023). Logam yang digunakan untuk nanopartikel diantaranya adalah tembaga (Cu), perak (Ag), emas (Au), besi (Fe), platina (Pt), Silikon (Si) dan nikel (Ni). Namun dalam mensintesis nanopartikel, perak merupakan logam yang paling umum digunakan. Perak memiliki nama latin *Argentum* (Ag), nomor atom 47, massa atom 107,8682, nomor massa 108, dan kepadatan $10,49 \text{ gr/cm}^3$ merupakan logam transisi yang tidak bersifat radioaktif dan sangat potensial karena memiliki sifat optik yang baik (Siddiqui et al., 2023). Perak

dalam jumlah kecil tidak beracun bagi manusia dan dapat aktif pada konsentrasi rendah sehingga biasa dimanfaatkan pada berbagai aplikasi terutama di bidang antimikroba dan terapi, diagnostik dan deteksi bimolekuler sensitivitas tinggi serta katalisis dan mikro-elektronik (Karu et al., 2020). Diantara material logam lainnya, perak memiliki sifat kimia, biologis, dan fisik yang sangat baik, dapat ditingkatkan stabilitasnya, dan banyak dimanfaatkan sebagai agen antimikroba, antijamur, antivirus, dan antikanker. Ag dipandang sangat menjanjikan sebagai terapi yang ditargetkan terhadap beberapa komponen mikroba patogen seperti virus, bakteri, dan jamur (Arshad et al., 2023). Penelitian Astuti et al. (2019) menggunakan nanopartikel perak (AgNPs) sebagai agen antijamur yang diaktifkan oleh sumber cahaya laser diode berhasil menghambat pertumbuhan biofilm *C. albicans* sebesar $64,48 \pm 0,07\%$. Quiroz et al. (2019) meneliti tentang optimasi sintesis AgNPs dengan metode reduksi kimia menggunakan *trisodium citrate* sangat efektif meningkatkan aktivitas antimikroba (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans* berturut-turut sebanyak 19,89, 9,94, 9,94, 2,08 $\mu\text{g/mL}$). (Astuti et al., 2019; Quintero-Quiroz et al., 2019).

Secara konvensional, nanopartikel perak disintesis menggunakan metode kimia dengan menggunakan bahan kimia sebagai zat pereduksi, memiliki berbagai risiko biologis karena faktor toksisitasnya (Ahmed et al., 2016). Biaya yang mahal dan polusi yang dihasilkan dari metode sintesis tradisional ini menyebabkan perlunya metode sintesis yang lebih ramah lingkungan. Ketika dampak perubahan iklim semakin besar, komunitas ilmiah terus mencari solusi untuk memerangi kehancuran yang disebabkan oleh metode produksi beracun (Huston et al., 2021), (Rajoriya et al., 2017). Hal ini menimbulkan perhatian serius untuk mengembangkan proses sintesis yang lebih ramah lingkungan.

Beberapa metode sintesis nanopartikel yaitu melalui pendekatan top-down (metode fisik dan kimia) dan bottom-up yaitu melalui sintesis hijau atau disebut juga "green synthesis" atau jalur hijau. Metode sintesis ini menggunakan bahan alam ekstrak daun tanaman sebagai reduktornya. Bahan alam ini sangat mudah ditemukan sehingga lebih ekonomis (Zhang et al., 2016). Metode green synthesis menghasilkan nanopartikel dengan stabilitas yang baik. *Green synthesis* atau sintesis hijau merupakan salah satu metode alternatif yang efektif dalam mensintesis bahan nanopartikel. Green sintesis ini memanfaatkan bahan dari alam sebagai reduktornya seperti daun, buah, bunga, dan akar dari berbagai jenis tanaman obat (Arshad et al., 2023). Proses ini disebut sebagai sintesis hijau karena dilakukan melalui tanaman obat yang menawarkan keunggulan dibandingkan bahan kimia dan metode fisik yang hemat biaya, ramah lingkungan, dan tersedia di alam (Alharbi et al., 2022). Berbagai penelitian terkait green sintesis AgNPs menggunakan bagian dari tanaman sebagai reduktor telah banyak dilakukan dan terbukti sangat efektif sebagai fotosensitizer alami sebagai agen antimikroba. (Ali et al., 2016; Bakhshi et al., 2022; Joshi, 2018; Mohammadlou et al., 2017; Patel & Patel, 2023).

Salah satu tanaman obat yang banyak dimanfaatkan adalah daun kelor yang dikenal dengan species *Moringa oleifera* (MO). Daun ini memiliki potensi sebagai agen antimikroba (Mehwish et al., 2021; Neupane et al., 2022; Priyandoko et al.,

2022; Sathyavathi et al., 2011). Daun kelor yang termasuk dalam famili *Moringaceae* dan genus *Moringa* mengandung komponen bioaktif seperti flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, dan fenolik yang memiliki kemampuan membatasi dan mereduksi nanopartikel logam sehingga menjadi lebih stabil (Tesfaye et al., 2023). Daun ini juga banyak dimanfaatkan dalam bidang medis karena memiliki kandungan senyawa yang berfungsi sebagai antitumor, antiepilepsi, anti-inflamasi, antihipertensi, penurunan kolesterol, antidiabetes, antioksidan, agen antibakteri dan antijamur (Bindhu et al., 2020). Senyawa polifenol seperti alkaloid, flavonoid, tannin dan steroid dalam kelor juga memiliki khasiat efek penghambatan terhadap sel mikroba seperti jamur dengan mendenaturasi protein atau menghambat perkecambahan spora melalui cincin steroid yang dikandungnya (Moodley et al., 2018).

Aktif komponen seperti flavonoid, saponin, alkaloid, tanin, fenolik, terpen, glikosida steroid, dan triterpenoid yang dapat diekstraksi dari tanaman ini memiliki kemampuan membatasi dan mereduksi nanopartikel. Zat aktif tersebut meningkatkan laju reduksi logam menjadi formasi nanopartikel yang stabil. Karena mudah didapat, biayanya yang rendah, dampak lingkungan yang minimal, dan stabilitas yang cukup baik, sintesis hijau dari nanopartikel yang dibuat dengan tanaman banyak menjadi perhatian para peneliti (Tesfaye et al., 2023). Tanaman ini memiliki kandungan senyawa yang mampu mereduksi Ag yang bermuatan Ag⁺ menjadi nanopartikel Ag⁰. Proses reduksi pada pembentukan nanopartikel AgNPs disebabkan adanya senyawa metabolit sekunder pada tanaman yaitu senyawa fenolik seperti flavonoid. Ion Ag yang memiliki satu muatan positif mengalami reaksi reduksi dimana ion Ag⁺ berperan sebagai reaktan dan senyawa polifenol (flavonoid) sebagai reduktor.

AgNPs dapat berperan sebagai agen antimikroba dengan cara menembus berbagai mekanisme mikroba sehingga menyebabkan kerusakan langsung pada dinding atau membran sel (Wang et al., 2019). Nanopartikel ini berinteraksi dengan membran sel sehingga mengganggu rantai transpor elektron, permeabilitas dan fungsi pernafasan sel, menghancurkan DNA dan protein mikroba dengan pelepasan ion logam dan pembentukan spesies oksigen reaktif (ROS) yang dapat menyebabkan kematian pada mikroba (Abo-zeid & Williams, 2020; Dakal et al., 2016; Moodley et al., 2018; Stankic et al., 2016).

Beberapa penelitian terkait riset penerapan fotoantimikroba yaitu Astuty et al. (2017) meneliti tentang efektivitas induksi dioda laser menggunakan ekstrak klorofil *Carica Papaya* L. sebagai penghasil ROS berhasil menginaktivasi biofilm dan planktonik *C. albicans* berturut-turut 63,8µM and 31.9µM. Santos et al. (2020) menerapkan metodologi permukaan respons untuk mengevaluasi fotoantimikroba yang diradiasi oleh Eosin Y dan LED 530 nm berhasil mereduksi bakteri *Staphylococcus aureus* sebanyak 5,78±0.04 CFU/mL. Huang et al. (2021) juga menerapkan fotoantimikroba pada luka yang terinfeksi oleh bakteri menggunakan radiasi LED graphene polimer yang didoping halogen/nitrogen. Ia berhasil mereduksi sebanyak ~92% koloni bakteri (Astuty & Baktir, 2017; Huang et al., 2021; Santos et al., 2020)

Light Emitting Diode (LED) merupakan perangkat semikonduktor yang memancarkan cahaya ketika arus mengalir melaluinya. Elektron pada tipe P akan berpindah ke wilayah yang memiliki kelebihan hole (wilayah bermuatan positif) dalam semikonduktor dan melepaskan energi dalam bentuk foton yang menghasilkan warna cahaya monokromatik. Warna cahaya yang dipancarkan berasal dari energi yang dibutuhkan elektron untuk melintasi celah pita semikonduktor (Rizaludin, 2020; Singh & Chandra Singh, 2009). Penggunaan LED bersifat non-ablatif dan non-thermal, tidak ada efek samping umum yang merugikan seperti bengkak, nyeri, dan pengelupasan sehingga tidak merusak kulit dan jaringan (Sorbellini et al., 2018).

Beberapa penelitian melaporkan efektivitas dan keamanan terapi menggunakan LED menunjukkan adanya efek antimikroba dari cahaya biru. Efek antimikroba ini merupakan reaksi fotokimia non-termal yang melibatkan kehadiran cahaya tampak, oksigen, dan fotosensitizer secara simultan. Setelah fotosensitisasi diaktifkan oleh sumber cahaya yang tepat, reaksi kimia dipicu yang mengarah pada produksi berbagai ROS (Dai, 2017). Quishida et al. (2016) meneliti tentang fotodinamik inaktivasi terhadap multispesies biofilm menggunakan Temulawak dan sinar LED terbukti berhasil mereduksi biofilm *Candida* spp. sebanyak 64,1%. Ballester et al. (2017) menginvestigasi apakah cahaya LED biru menyebabkan perubahan dalam produksi senyawa fenolik dan etilena pada jeruk manis, Huang et al. (2021) juga telah mengungkapkan penggunaan LED halogen/nitrogen yang didoping menggunakan grafin polimer dalam menginaktivasi sekitar 92% bakteri pada luka yang terinfeksi. Baru-baru ini, Takeuchi et al. (2023) melakukan study terkait aplikasi sinar LED pada terapi antimikroba fotodinamik untuk pengobatan penyakit gigi menghasilkan penurunan bakteri pada saliva dimana LED memberikan potensi yang sangat efektif dengan metode yang minim invasif dalam mengatasi infeksi bakteri penyakit periodontal (Ballester & Lafuente, 2017; Huang et al., 2021; Quishida et al., 2016; Takeuchi et al., 2023).

Berdasarkan latar belakang tersebut, maka penelitian ini mencoba berfokus pada diperolehnya sintesis hijau nanopartikel perak dengan reduktor *Moringa Oleifera* (AgNPs-MO) untuk diaplikasikan sebagai fotosensitizer pada fotoantimikroba sel biofilm *Candida albicans* menggunakan sumber cahaya *Light Emitting Diode* (LED).

1.2 Perumusan Masalah

Rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

1. Bagaimana mendapatkan AgNPs-MO yang disintesis secara bioaktif menggunakan klorofil MO dengan karakteristik yang sesuai dengan kebutuhan aplikasi fotodinamik terapi?
2. Bagaimana potensi molekul AgNPs-MO sebagai penghasil senyawa ROS yang efektif menghambat pertumbuhan biofilm *C. albicans*?

1.3 Tujuan dan Manfaat Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

1. Mengidentifikasi karakteristik optis dan kimia dalam pembentukan nanopartikel terhadap green sintesis AgNPs-MO.
2. Menemukanali efektivitas aktivasi AgNPs-MO dalam mekanisme fotoantimikroba menggunakan cahaya LED untuk menghasilkan senyawa ROS yang berperan dalam penghambatan sel biofilm *C. albicans*.

Manfaat dari penelitian ini adalah mendapatkan bahan fotosensitizer alternatif baru berukuran nano yang menggunakan bahan dasar perak dengan pereduktor alami daun kelor yang ditingkatkan efektivitasnya melalui paparan sinar LED sebagai fotoantimikroba biofilm *C. albicans*.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan pada bulan Mei – Desember 2023 bertempat di Laboratorium Kimia Universitas Hasanuddin dan Laboratorium Mikrobiologi, Kimia dan Fisika pada Balai Laboratorium Kesehatan Masyarakat (Labkesmas) Makassar.

2.2 Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian adalah kultur sel *C. albicans* yang berasal dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muslim Indonesia, Perak Nitrat (AgNO_3) dari Merck, klorofil ekstrak daun kelor, LED 450 dan 620 nm berbasis mikrokontroler.

- Alat analisis sampel dan karakterisasi: UV-Vis Spectrophotometer UV Mini 1240 Shimadzu, Elisa Reader (*Thermo Scientific Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer* seri A51119600C), Spektroskopi Fourier Transform Infra-Red (FTIR) Shimadzu IR Prestige-21, *Scanning Electron Microscopy* (SEM), dan *X-Ray Diffraction* (XRD).
- Alat pendukung: Mikropipet, Microplate 96 well, filter paper (Whatman), thermometer, tube Eppendorf flat bottom 2 ml, vakum filter, evaporator, vortex, hotplate, magnetic stirrer, pengaduk, Erlenmeyer, gelas kimia, tabung reaksi, labu ukur, incubator Memmert 37 °C, Waterbath Memmert 95 °C, Sentrifuge Eppendorf, Neraca Analitik (Mettler Toledo), Refrigerator.
- Bahan kimia: *metanol-nheksan-aseton-dietyl eter*, *petroleum eter*, *etanol*, reagen XTT 1 mg/mL (*2,3-Bis-(2-Methoxy-4-Nitro-5-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium-5-Carboxanilide*), Menadion 10 mg/mL (MP Biomedical), Brain Heart Infusion Broth (BHI-B), Glukosa, reagen *trichloroacetic acid*, *thiobarbituric acid*, Oksigen (O_2), dan *Aquades*.

Media dan larutan yang dibuat:

- Media BHI-B 8% glukosa: 3.6 gr bubuk BHI-B ditambah 8 gr glukosa kemudian dilarutkan dalam 100 mL aquabides.
- PBS Steril: 8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,4 gr Na_2HPO_4 , 0,24 gr KH_2PO_4 dilarutkan dalam 800 mL aquabides. pH standar larutan ini adalah 7.4, bila larutan memiliki pH lebih dari 7.4 ditambahkan HCl 0.1 N dan bila kurang ditambahkan NaOH 1 N.

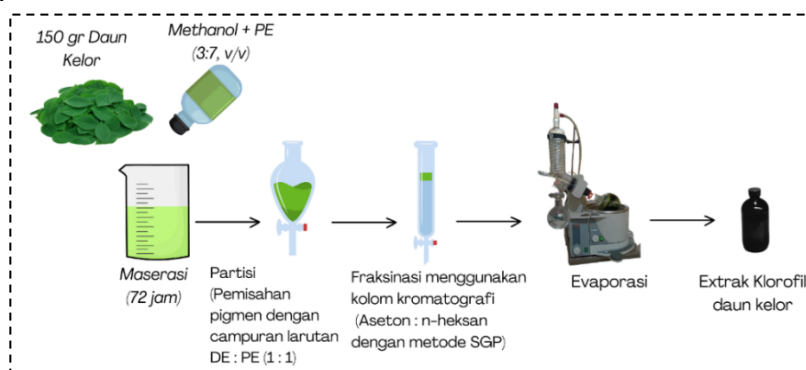
2.3 Metode Penelitian

Prosedur penelitian dimulai dari pembuatan ekstrak daun kelor, pembuatan green sintesis AgNPs-MO, karakterisasi AgNPs-MO melalui uji spektrum UV-Vis (optis), uji FTIR (kimia), uji SEM, dan uji XRD. Preparasi kultur biofilm *C. albicans*, uji toksisitas dengan metode zona bening, pemberian photosensitizer AgNPs-MO pada sampel,

perlakuan penyinaran terhadap sampel menggunakan *Light Emitting Diode* (LED) Merah dan Biru dengan waktu yang berbeda, Uji XTT untuk mengetahui inaktivitas sel setelah diberikan perlakuan, dan Uji MDA dilakukan untuk mengetahui banyaknya jumlah senyawa radikal yang terbentuk.

2.3.1 Pembuatan ekstrak klorofil daun kelor (*Moringa oleifera*)

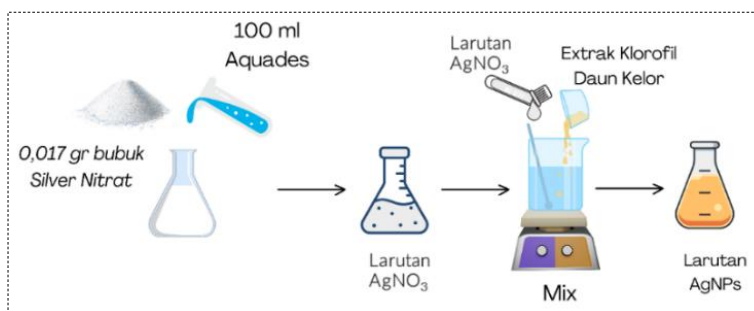
Sebanyak 150 gr daun kelor dibersihkan dan dikeringkan guna mengurangi jumlah kadar air daun namun tetap menjaga struktur pigmen daun tersebut. Kemudian dilakukan maserasi dengan merendam daun kelor menggunakan pelarut 225 ml methanol dan 525 ml photreleum Ether. Kemudian disimpan dalam keadaan gelap (dilapisi aluminium foil) selama 2 x 24 jam. Kemudian dipartisi menggunakan pelarut dietil eter-PE lalu dievaporasi guna menguapkan sisa pelarut sehingga dihasilkan ekstrak klorofil daun kelor. Proses preparasi daun kelor dapat dilihat pada **gambar 2** berikut.



Gambar 2. Preparasi klorofil MO

2.3.2 Preparasi *Green Synthesis* AgNPs-MO

Sebanyak 0,017 gr Silver Nitrate (AgNO_3) dilarutkan kedalam 100 ml aquades untuk membuat larutan AgNO_3 1mM. Sebanyak 10 ml klorofil daun kelor ditambahkan ke dalam 90 ml larutan AgNO_3 untuk membuat larutan *green synthesis* AgNPs-MO. Preparasi *green synthesis* AgNPs-MO dapat dilihat pada **gambar 3** berikut.



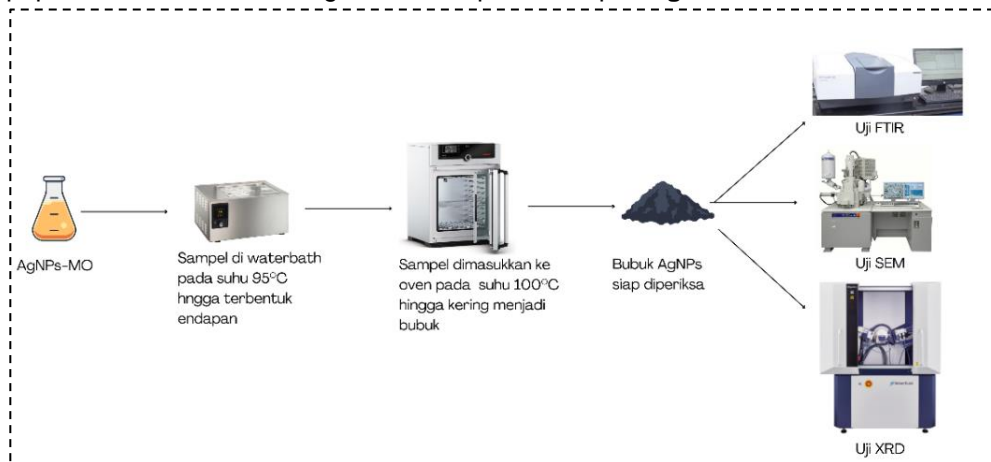
Gambar 3. Preparasi *Green synthesis* AgNPs-MO

2.3.3 Karakterisasi AgNPs-MO

Uji spektrum menggunakan spectrophotometer UV-Vis dilakukan dengan tujuan untuk mendapatkan karakterisasi optis spektrum hasil *green synthesis* AgNPs-MO pada rentang panjang gelombang 200-800 nm. Penampakan spektrum bertujuan untuk memberikan gambaran absorbansi maksimum AgNPs-MO pada rentang panjang gelombang tersebut. Nilai absorbansi inilah yang digunakan untuk menentukan persentasi intensitas yang mampu diserap oleh AgNPs-MO.

Karakterisasi secara kimia *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FTIR) menggunakan Shimadzu IR Prestige-21 diukur pada rentang bilangan gelombang 4000-400 cm^{-1} . FTIR ini bertujuan untuk mengidentifikasi gugus fungsi senyawa AgNPs-MO. Uji *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dilakukan untuk melihat morfologi dan topografi dari AgNPs-MO. Uji *X-Ray Diffraction* (XRD) bertujuan untuk mengidentifikasi struktur fasa kristal AgNPs-MO.

Uji toksisitas dilakukan dengan metode cakram dengan merendam 4 paper disk berturut-turut dengan larutan AgNO_3 , AgNPs-MO, Ekstrak klorofil MO, dan Aquadest. Lalu paper disk diletakkan pada cawan petri berisi media nutrient agar yang telah dioleskan biofilm *C. albicans* kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan pengamatan dan pengukuran diameter zona bening yang muncul disekitar paper disk. Karakterisasi AgNPs-MO dapat dilihat pada **gambar 4** berikut.

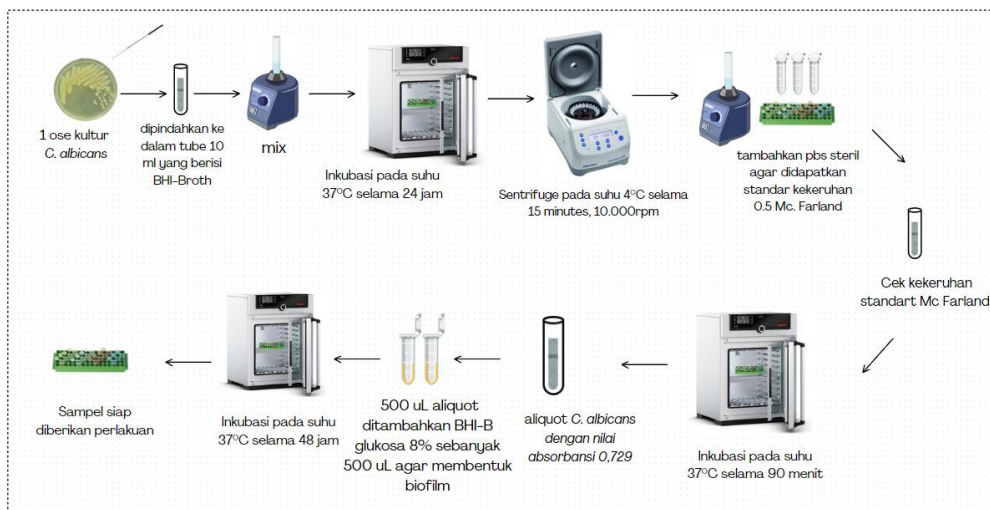


Gambar 4. Karakterisasi AgNPs-MO

2.3.4 Penumbuhan Biofilm *C. albicans*

Pembentukan sel biofilm *C. albicans* dilakukan dengan meremajakan kultur dalam media agar kemudian diinkubasi selama 24 jam. Setelah itu, dilakukan pembuatan biofilm dengan mengambil 1 ose kultur sel *C. albicans* lalu dicampur dengan 10 ml media BHI-B menggunakan vortex kemudian diinkubasi dalam inkubator selama 24 jam hingga terbentuk inokula kemudian disentrifus pada suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 15 menit hingga terbentuk biofilm. Setelah itu, sampel dicuci dengan PBS steril hingga mencapai nilai OD sebesar 0,5 sesuai standard McFarland dengan menggunakan alat densitometer. Atau bila diukur absorbansinya pada

$\lambda = 600 \text{ nm}$, nilai absorbansinya yaitu 0,7. Selanjutnya 500 μL aliquot ditanam dalam tube Eppendorf flat bottom lalu diinkubasi selama 90 menit kemudian dicuci dengan PBS steril untuk menghilangkan sel yang tidak menempel pada sumuran/dinding tube. Berikutnya sampel ditambahkan media BHI-B 8% glukosa sebanyak 500 μL kemudian diinkubasi selama 2x24 jam untuk mendapatkan biofilm yang optimum sebelum dilakukan pengujian. Proses penumbuhan biofilm dapat dilihat pada **gambar 5** berikut.



Gambar 5. Penumbuhan biofilm *C. albicans*

2.3.5 Pengelompokan Sampel Biofilm *C. albicans*

Perlakuan fotoantimikroba dibagi berdasarkan kelompok berikut.

Tabel 1. Kelompok perlakuan fotoantimikroba

No.	Group Treatment	Description
1	C(-)	Kontrol Negatif (Biofilm)
2	C(+) _{AgNO₃}	Kontrol Positif (Biofilm + AgNO ₃)
3	C(+) _{MO}	Kontrol Positif (Biofilm + Extract Klorofil MO)
4	C(+) _{AgNPs-MO}	Kontrol Positif (Biofilm + AgNPs-MO)
5	L _{1M} - L _{5M}	Perlakuan fotoantimikroba tanpa PS (Biofilm + LED merah) dengan variasi waktu 1,2,3,4 and 5 menit
6	PL _{1M} - PL _{5M}	Perlakuan fotoantimikroba dengan PS (Biofilm + AgNPs-MO + LED Merah) dengan variasi waktu 1,2,3,4 and 5 menit
7	L _{1B} - L _{5B}	Perlakuan fotoantimikroba tanpa PS (Biofilm + LED biru) dengan variasi waktu 1,2,3,4 and 5 menit
8	PL _{1B} - PL _{5B}	Perlakuan fotoantimikroba dengan PS (Biofilm + AgNPs-MO + LED Biru) dengan variasi waktu 1,2,3,4 and 5 menit

2.3.6 Penentuan Daya dan Lama Penyinaran LED

Light Emitting Diode (LED) yang digunakan adalah LED Merah dan Biru berbasis mikrokontroler dengan variasi daya 100 mW dengan lama paparan berturut-turut masing-masing 1, 2, 3, 4, dan 5 menit. Proses penyinaran menggunakan LED menghasilkan energi yang dapat diserap oleh fotosensitizer menghasilkan senyawa radikal yang dapat menyebabkan kerusakan sel. Energi yang diserap dari LED dihitung dengan menggunakan persamaan:

$$I_{LED} = \frac{P}{A} \quad (2)$$

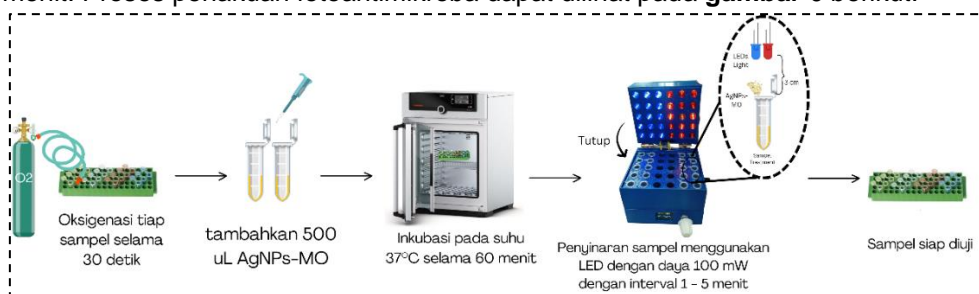
$$I_{serapan} = \%(\text{Absorbance}) \times I_{LED} \quad (3)$$

$$E = I_{serapan} \times t \quad (4)$$

Dengan “%Absorbance” merupakan persentase foton serapan AgNPs-MO pada panjang gelombang 450 nm dan 620 nm sesuai spesifikasi lampu LED yang digunakan dalam penelitian ini. “ $I_{serapan}$ ” adalah Intensitas LED yang diserap oleh AgNPs-MO (satuan:W/cm²) sesuai dengan panjang gelombang masing-masing. “ I_{LED} ” adalah Intensitas setiap LED yang diukur menggunakan luxmeter (satuan: W/cm²). Simbol lainnya: “ P ” adalah daya keluaran sumber cahaya (satuan:W), “ t ” adalah Waktu Iradiasi (satuan: s). “ A ” adalah luas pancaran sumber cahaya (satuan: cm²), dan “ E ” adalah Energi cahaya (Joule/cm²) (Dewi Astuty et al., 2023; Mileto & Azambuja, 2017; Zain et al., 2023).

2.3.7 Perlakuan Fotoantimikroba

Biofilm yang telah ditumbuhkan selama kurun waktu 24 jam pada tube Eppendorf kemudian dibuang kemudian dioksigenasi selama 30 detik/sampel lalu dидiamkan selama 15 menit dalam keadaan tertutup dengan tujuan mengantisipasi keterbatasan zona oksigenasi dalam biofilm yang dapat mempengaruhi efektivitas fotoantimikroba. Setelah itu, diberikan fotosensitizer (500 μ L AgNPs/MO) kemudian diinkubasi selama 1 jam pada suhu 37°C. Lalu diberikan disinari menggunakan LED pada interval 1-5 menit. Proses perlakuan fotoantimikroba dapat dilihat pada **gambar 6** berikut.

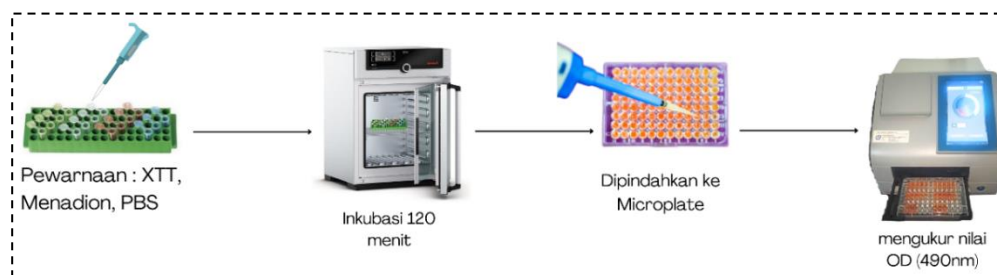


Gambar 6. Perlakuan fotoantimikroba

2.3.8 Uji XTT

Pengujian dengan metode pewarnaan XTT bertujuan untuk mengetahui viabilitas sel tau jumlah sel yang masih hidup. Proses pewarnaan XTT seperti yang tertera pada **gambar 7** dilakukan dengan menambahkan 100 μL XTT 1 mg/mL, 5 μL menadione 10 mg/mL dan 395 μL PBS steril pH 7,4 lalu diinkubasi gelap pada suhu 37°C selama 2 jam. Kemudian sebanyak 100 μL aliquot hasil pewarnaan dipindahkan ke dalam microplate 96 well untuk dianalisis pada panjang gelombang $\lambda = 490 \text{ nm}$ menggunakan ELISA reader melalui pembacaan nilai optical density (OD) atau nilai absorbansi. Nilai OD ini berfungsi sebagai indikator viabilitas sel dengan warna gradasi kuning muda sampai oranye. Semakin pekat warnanya maka semakin banyak sel yang masih aktif bermetabolisme dan bereaksi terhadap XTT. Berdasarkan OD kelompok sampel diatas, dapat ditentukan nilai inaktivasinya yaitu dengan menggunakan rumus:

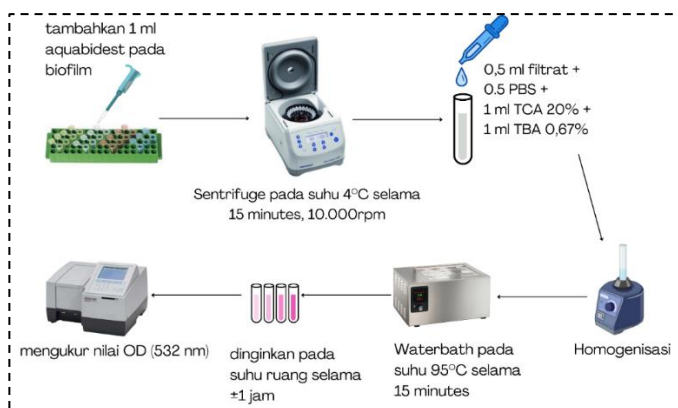
$$\% \text{ inaktivasi} = \left| \frac{OD_{\text{control}} - OD_{\text{treatment}}}{OD_{\text{control}}} \right| \times 100 \quad (5)$$



Gambar 7. Pengujian sampel menggunakan metode pewarnaan XTT

2.3.9 Uji Kadar MDA dengan Metode TBARS

Proses pengujian kadar MDA seperti yang tertera pada **gambar 8** yaitu biofilm yang telah melalui proses fotoantimikroba dibersihkan dengan PBS steril lalu dipindahkan ke dalam tabung 2 ml kemudian ditambahkan aquadest sebanyak 1 ml lalu dihomogenkan dengan menggunakan vortex. Setelah itu dimasukkan ke dalam sentrifuge pada suhu 4°C pada kecepatan putaran 10.000 rpm selama 15 menit. Selanjutnya filtrat sebanyak 0,5 ml dipindahkan ke dalam tabung reaksi berukuran 10 ml, lalu ditambahkan 0.5 ml PBS steril, 1 ml TCA 20%, 1 ml TBA 0.67% kemudian dihomogenkan menggunakan vortex. Setelah itu, dipanaskan menggunakan waterbath pada suhu 95°C selama 15 menit lalu didiamkan pada suhu kamar selama 1 jam. Kemudian dibaca nilai ODnya pada $\lambda = 532 \text{ nm}$ menggunakan spectrophotometer UV-Vis (Zain et al., 2023).



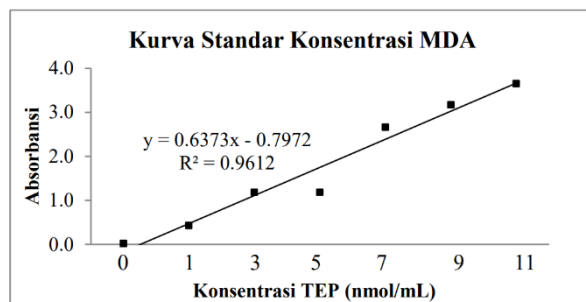
Gambar 8. Pengujian sampel menggunakan metode pewarnaan TBARS

Berikutnya nilai OD dikonversi menggunakan kurva linearitas standar TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane) seperti yang dapat dilihat pada **gambar 9** yang merupakan senyawa standar MDA untuk menghitung nilai kadar MDA berdasarkan persamaan berikut:

$$y = ax + b \quad (6)$$

$$\text{Kadar MDA} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right) = \frac{y-b}{a} \quad (7)$$

Indikator dari pengujian ini yaitu semakin banyak senyawa radikalnya, maka larutan akan semakin berwarna merah muda.



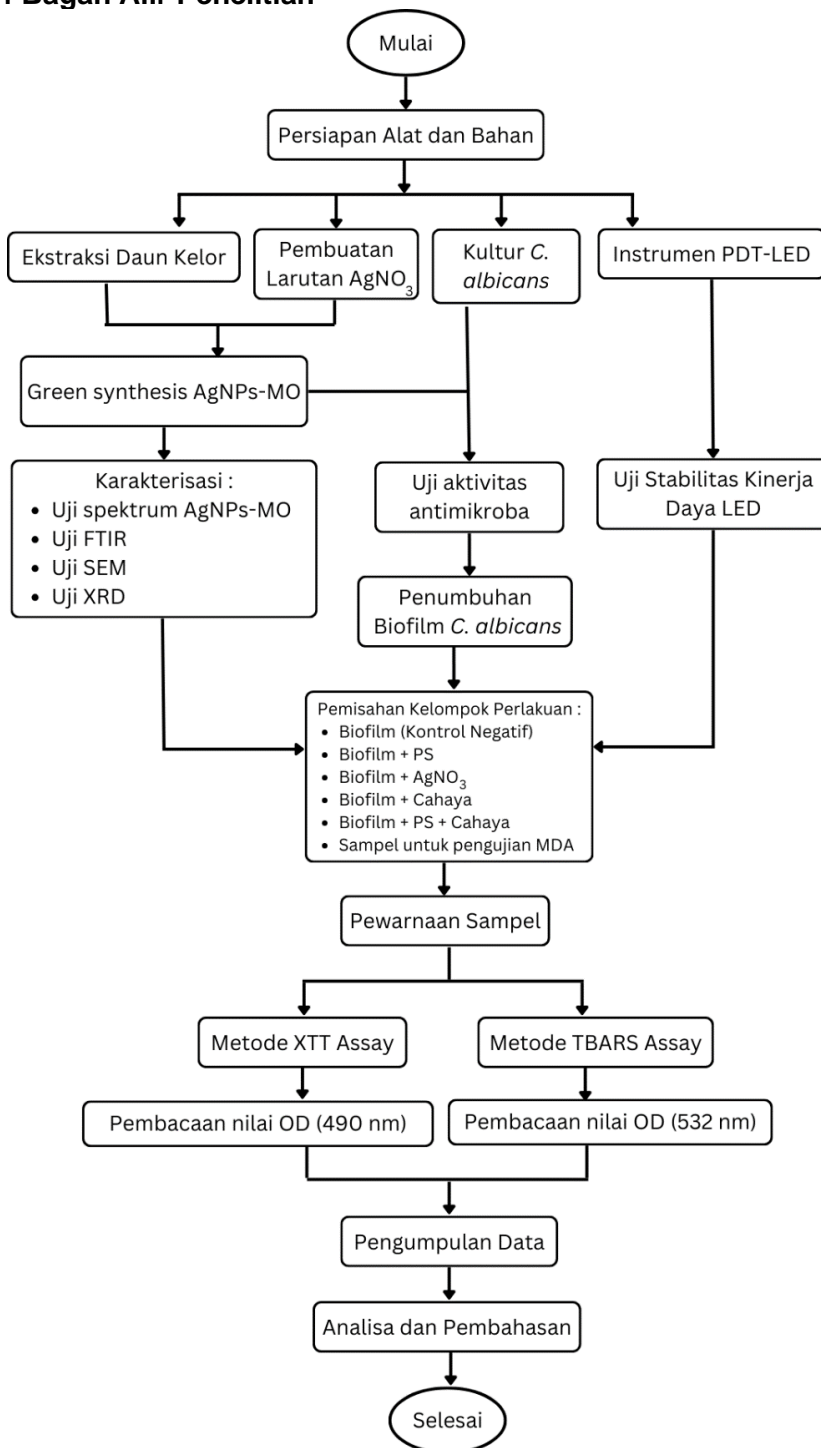
Gambar 9. Kurva linear standar konsentrasi MDA

Gambar 9 menunjukkan konsentrasi kadar MDA dengan reagen standar 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) berbagai konsentrasi. Persamaan garis dari kurva standar digunakan untuk menentukan kadar MDA yang terakumulasi dalam sel biofilm *C. albicans* setelah melalui perlakuan fotoantimikroba.

2.3.10 Analisis Data

Nilai Standar Deviasi (SD) yang muncul dikarenakan pembacaan data dilakukan sebanyak tiga kali pengulangan dengan dua replika untuk memastikan keabsahan data.

2.4 Bagan Alir Penelitian



Gambar 10. Bagan Alir Penelitian