



[JDS]  
**JOURNAL OF SYIAH KUALA  
DENTISTRY SOCIETY**

Journal Homepage : <http://jurnal.unsyiah.ac.id/JDS/>  
E-ISSN : 2502-0412



**POTENSI CIGARETTE SMOKE CONDENSATE TERHADAP PENINGKATAN PEMBENTUKAN BIOFILM *CANDIDA albicans* ISOLAT ATCC 10261**

Basri A. Gani,<sup>1,2</sup> Annisa Qashdina Alghassani,<sup>1</sup> Zaki Mubarak<sup>1</sup> Endang Winiati Bachtiar<sup>2</sup> Boy M. Bachtiar<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Staf pengajar Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Syiah Kuala

<sup>2</sup> Laboratorium Oral Biologi, Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Indonesia, Jakarta

**Abstract**

*Candida albicans* (*C. albicans*) is the main agent in pathogenesis of oral candidiasis, and also the cigarette smoke is one of predisposing factors of *C. Albicans* virulence, mainly in biofilm formation that it the role as the initiator of adhesion on oral mucosal. This research aimed to identify the effect of *Cigarette smoke condensate* (CSC) on biofilm formation of *C. albicans*. *Candida albicans* was sensitized with CSC kretek and non-kretek that shown the increase of biofilm formation ( $p < 0,05$ ) compared control, specifically in 24 hour. It's related with massa of biofilm formation that seem by microscope (400x) and also CSC non kretek better than CSC kretek in biofilm formation of *C. albicans*, mainly in 24 and 48 hours, that provisional, in 12 hours were the most dominant biofilm figuration of *C. albicans* sensitized by CSC kretek, although it intensity is lower than 24 hours. The research was concluded that CSC can be trigger to enhancement of biofilm formation of *C. albicans* in 24 hours and also CSC non kretek better than CSC kretek.

**Keyword:** *Candida albicans*, Cigarette smoke condensate, Biofilm

**PENDAHULUAN**

Rokok memiliki sejumlah komponen aktif yang dapat mengancam kesehatan. Komponen bahan aktif terdiri dari 92% komponen gas dan 8% komponen partikel.<sup>1</sup> Komponen gas asap rokok merupakan campuran kompleks bahan kimia seperti karbon monoksida, hidrogen sianida, dan nitrogen oksid. Sedangkan kompoen partikel rokok terdiri dari tar, nikotin, bezzantracne, benzoferin, fenol, kadmium, indol, karbarzol, dan kresol.

Sementara komponen yang paling berbahaya dalam asap rokok adalah tar, nikotin dan karbonmonoksida.<sup>1</sup> Asap rokok dilaporkan dapat menyebabkan perubahan patologis pada berbagai organ. Pada rongga mulut selain terlibat pada patogenesis karies gigi, juga ancaman infeksi pada mukosa rongga mulut. Dari aspek patogen, asap rokok memicu terjadinya peningkatan aktivitas patogen rongga mulut terhadap host. Salah satunya adalah mempercepat aktivitas pembentukan biofilm, adhesi, invasi, dan infeksi terhadap host. Salah satu patogen yang memiliki pengaruh terhadap asap rokok adalah *Candida albicans*.<sup>2</sup> *C. Albicans* merupakan jamur komensal rongga mulut,

\* Corresponding author

Email address : [basriunoe@gmail.com](mailto:basriunoe@gmail.com)

saluran pencernaan dan vagina.<sup>3-5</sup> Paparan asap rokok dapat mengubah normalitas *C. albicans* menjadi lebih virulen, salah satunya mempercepat pembentukan hypha *C. albicans* dengan melibatkan sistem pertahanan sel epitel pada mukosa, sehingga dapat mengaktifasi sistem imunitas host, hal ini penting untuk mengidentifikasi peran *Candida albicans* dalam melemahkan kerja sistem imunitas mukosa<sup>6</sup>

Moqueem<sup>7</sup> mengemukakan bahwa perokok lebih rentan terhadap infeksi dibandingkan bukan perokok dan mempermudah adesi jamur ke mukosa dan jaringan sebagai fase penting inisiasi infeksi dan kolonisasi pada mukosa host.<sup>8</sup> Cankovic mengemukakan bahwa pada perokok cenderung memicu terjadinya peningkatan *C. albicans* dan Basillus pada permukaan lidah, sehingga dipertimbangkan memiliki efek inflamasi dan memicu kehilangan tulang alveolar jaringan periodontal.<sup>9</sup>

Asap rokok dalam bentuk kondensasi atau pengembunan dari hasil pembakaran asap rokok disebut juga dengan CSC mengandung tar, nikotin, dan karbon monoksida yang merupakan bahan kimia yang paling berbahaya dalam asap rokok. CSC dilaporkan dapat memicu pembentukan biofilm mikroba dan dapat mengganggu perlekatan, pertumbuhan, dan pembentukan biofilm pada *Candida albicans*. Selain itu, mengaktifkan beberapa gen virulen *C. albicans*.<sup>10</sup> Penelitian sebelumnya telah menunjukkan bahwa merokok menyebabkan penurunan imunitas sehingga memfasilitasi jamur ini untuk dapat membentuk biofilm, menginvasi, dan berkolonisasi pada mukosa host.<sup>5</sup>

Tembakau dan asap rokok merupakan faktor predisposisi penting pada patogenesis kandidiasis oral, sekalipun efek rokok belum bisa dijelaskan secara tepat, namun pengujian secara laboratorium memperlihatkan bahwa, asap rokok dapat menyebabkan keratinisasi pada lapisan epitel mukosa yang dapat berkontribusi terjadinya kolonisasi jamur dan meningkatkan virulensi *C. albicans* pada patogenesis oral kandidiasis.<sup>2</sup>

Hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa asap rokok dalam bentuk CSC memiliki peran penting terhadap peningkatan biofilm *C. albicans*, dimana biofilm

merupakan salah satu produk virulensi *C. albicans* untuk melakukan adhesi dan penetrasi ke jaringan, sehingga dapat dimungkinkan bahwa CSC dilaporkan sebagai faktor predisposisi penting pada patogenesis kandidiasis oral, khususnya pada perokok. Penelitian ini bertujuan untuk melihat efek pengaruh CSC kretek dan non kretek terhadap aktivitas pembentukan biofilm *C. albicans*.

## METODE PENELITIAN

Penelitian ini menggunakan *C. albicans* ATCC 10261 yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Syiah Kuala, Banda Aceh dan CSC yang diembunkan dari asap rokok kretek dan non-kretek. Intensitas pembentukan biofilm *C. albicans* yang dipengaruhi oleh CSC kretek dan non-kretek selanjutnya dilakukan dengan beberapa pendekatan.

**Inokulasi *Candida albicans*, *C. albicans*** ATCC 10261 dikultur pada medium spesifik CHROM-agar (CAC- Kat. no. CA220, Paris-France) selama 48 jam. Satu koloni diinokulasikan dalam 5 ml medium pepton dan diinkubasikan kembali selama 48 jam. Suspensi medium pepton bersama *C. albicans* selanjutnya disetarakan dengan *McFarland* 0,5 setara  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml. Konfirmasi *C. albicans* juga dilakukan pewarnaan Gram dengan melihat morfologi sel *C. albicans*.

**Preparasi *Cigarette Smoke Condensate***, Pembuatan *cigarette smoke condensate* (CSC) dimulai dengan meletakkan rokok pada salah satu ujung dari pipa silikon yang berhubungan dengan labu enlemeyer yang di dalamnya berisi 200 ml 0,09% *sodium chloride*. Pada ujung lainnya dari kedua pipa silikon dihubungkan dengan *vacuum*. Rokok diekstrak dengan menggunakan *vacuum*, asap rokok terhisap langsung ke cairan *sodium chloride* 0,09%. Proses ini diulangi sampai mencapai 10 batang rokok dalam 200 ml *sodium chloride*. Cairan CSC yang telah dihasilkan kemudian disaring dengan menggunakan whatman paper 0,22  $\mu$ m dan disimpan pada suhu 4°C sampai digunakan.

**Uji Biofilm dengan Kristal Violet.** *Polystyrene cell wells 96* (corning glass work, New York) dilapisi dengan saliva perokok masing-masing 100 µl selama 10 menit dan dibilas dengan Phosfat Buffer Saline (PBS) 2 kali selama 1 menit sambil digoyang pada 200 rpm. Selanjutnya ke dalam masing-masing *cell well plate* diinkubasikan larutan CSC masing-masing 100 µl selama 10 menit dan dibuang. Kemudian *plate* tersebut ditutup selama 10 menit dan ditambahkan 100 µl *C. albicans* Mc Farland 0,5 ( $1,5 \times 10^8$  CFU/mL) dalam pepton, kemudian diinkubasi berdasarkan waktu 12 jam, 24 jam, dan 48 jam. Selanjutnya pepton yang berisi *C. albicans* tersebut di sedot dan dibuang, Aktivitas pembentukan biofilm *C. albicans* selanjutnya diukur dengan menggunakan larutan kristal violet 1% yang dimasukkan 150 µl ke dalam masing-masing *cell well plate* dan didiamkan selama 15 menit dan dicuci dengan PBS 2 kali masing-masing didiamkan selama 5 menit. Selanjutnya *plate* yang teridentifikasi biofilm *C. albicans* dicuci dengan etanol 98% dan 96% masing-masing sebanyak 200 µL untuk setiap 15 menit pada 300 rpm. *Optical Density* (OD) aktivitas

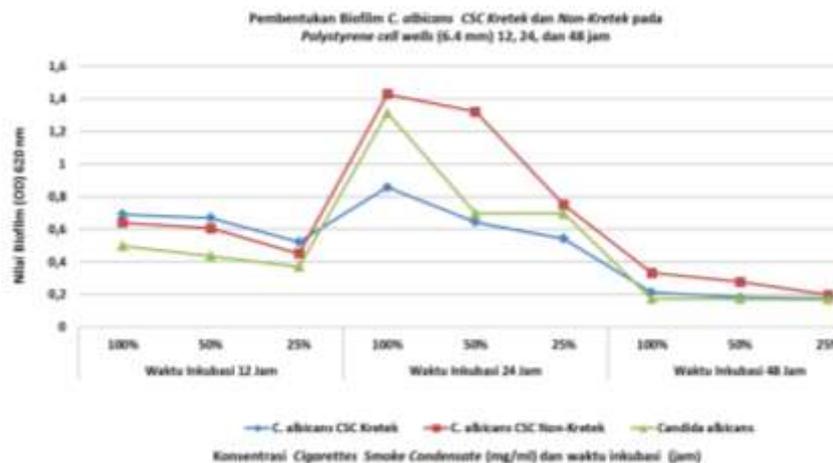
pembentukan biofilm *C. albicans* diukur menggunakan ELISA reader (Bio-Radd Laboratories, Hercules, CA) pada panjang gelombang 590 nm.

**Visualisasi Massa Biofilm.** Massa biofilm *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC kretek dan non kretek yang terbentuk pada setiap dasar *cell well plate* (6,4 mm) dipreparasi dengan 100 µl gliserol selama 24 jam guna menjaga kelembaban biofilm. Visualisasi massa biofilm dengan menambahkan minyak emersil pada setiap *cell well plate* 10 µl dan selanjutnya diamati dibawah mikroskop pada pembesaran 400x.

**Analisis Statistik.** Data yang tersaji dari hasil penelitian dianalisis dengan one way Anova yang dilanjutkan dengan analisis chi-square. Nilai korelasi perlakuan dianalisis dengan Pearson.

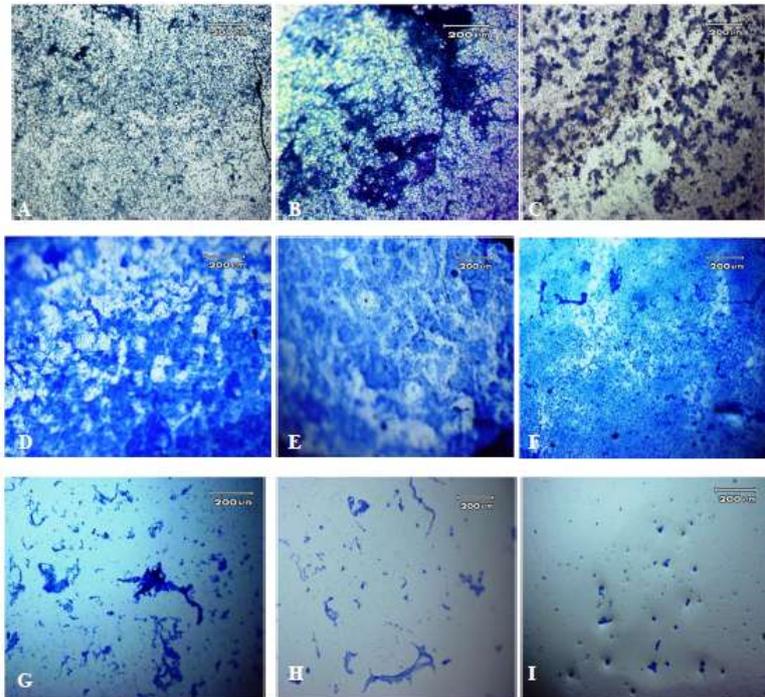
## HASIL

### I. Pembentukan biofilm *C. albicans* berdasarkan waktu inkubasi setelah disensitisasi dengan CSC kretek dan non kretek



Gambar 1. Hubungan pembentukan Biofilm *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC kretek dan Non Kretek selama 12 jam, 24 jam dan 48 jam pada konsentrasi CSC 100%, 50%, dan 25%. *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC non-kretek memiliki intensitas pembentukan biofilm paling tinggi khususnya pada waktu 24 jam dan menurun pada waktu 48 jam. Sementara pada waktu 12 jam *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC kretek yang menunjukkan paling tinggi intensitas pembentukan biofilm dan menurun pada waktu 24 jam dibandingkan dengan *C. albicans* ATCC 10261 dan yang disensitisasi dengan CSC non kretek. Secara grafik, konsentrasi CSC mempengaruhi intensitas pembentukan biofilm *C. albicans* mulai dari 12, jam, 24 jam, dan 48 jam.

## II. Profil massa biofilm *C. albicans* setelah disensitisasi dengan CSC kretek dan non kretek



Gambar 2. Profil massa biofilm *C. albicans* pada *polystyrene cell wells* (6.4 mm) yang dideteksi dengan kristal violet dan dibaca dengan mikroskop pada pembesaran 400x. *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC kretek dan Non-kretek. Berdasarkan waktu (gambar horizontal) 12 jam (gambar A, B, C), 24 jam (gambar D, E, F) dan 48 jam (gambar G, H, I). Sementara jalur vertikal gambar A, D, dan G (*C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC kretek), jalur B, E, dan H (*C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC Non-kretek) dan jalur C, F, dan I (*C. albicans* ATCC 10261).

## III. Analisis Statistik

Secara umum pembentukan biofilm oleh *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC kretek dan non kretek memiliki nilai probabilitas  $p < 0,05$  dibandingkan *C. albicans* ATCC 10261. Sementara berdasarkan waktu inkubasi memiliki probabilitas bermakna ( $p < 0,05$ ). Pada uji korelasi potensi pembentukan biofilm *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC kretek memiliki korelasi dengan *C. albicans* ATCC 10261 ( $p < 0,01$ ). Sebaliknya tidak memiliki korelasi dengan *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC non kretek ( $p > 0,001$ ).

## PEMBAHASAN

*Candida albicans* merupakan flora normal rongga mulut yang dapat bersifat patogen apabila terjadi perubahan biologi rongga mulut, baik perubahan suhu maupun

pH. Kedua indikator tersebut menjadi penentu ketidakseimbangan patogen rongga mulut.

Asap rokok dilaporkan sebagai salah satu pemicu ekspresi sifat virulensi patogen rongga mulut yang dapat merubah suhu dan pH rongga mulut,<sup>11</sup> sehingga dapat menguntungkan perkembangan patogen rongga mulut, salah satunya adalah *C. albicans* yang merupakan agen utama penyebab infeksi kandidiasis oral dan biofilm *C. albicans* merupakan salah satu faktor virulen mempertahankan perkembangannya dengan melakukan kolonisasi dan adesi pada dinding sel host.<sup>12</sup>

Penelitian sebelumnya melaporkan bahwa merokok dapat menyebabkan penurunan imunitas, yang dapat mendukung perkembangan *C. albicans* untuk dapat membentuk biofilm, menginvasi, dan berkolonisasi pada sel host yang merupakan fase awal *candida* berpenetrasi pada sel inang.<sup>4,5</sup>

Hasil penelitian (Gambar 1) memperlihatkan bahwa asap rokok dalam bentuk CSC menjadi pemicu peningkatan aktivitas biofilm *C. albicans*. Secara umum konsentrasi CSC mempengaruhi intensitas pembentukan biofilm, artinya konsentrasi memiliki pengaruh yang kuat terhadap pembentukan biofilm ( $p < 0,05$ ).

Semlai (2014) melaporkan bahwa konsentrasi CSC menjadi penentu tingkat pembentukan biofilm *C. albicans*, artinya semakin tinggi konsentrasi CSC dan semakin signifikan intensitas pembentukan biofilm ( $p < 0,05$ ).

Sementara menggunakan waktu 12 jam, 24 jam dan 48 jam sebagai referensi dari penelitian ini untuk dinilai efektivitas pembentukan biofilm. Sekalipun demikian, hasil penelitian ini yang diperlihatkan gambar 1 bahwa, aktivitas pembentukan biofilm terjadi peningkatan pada waktu 24 jam dan menurun drastis pada waktu 48 jam.

Sebaliknya, Semlali (2014) menyebutkan bahwa intensitas paling tinggi pembentukan biofilm *C. albicans* setelah dikultur dalam CSC terjadi pada waktu 48 jam.<sup>13</sup> Perbedaan ini dimungkinkan oleh faktor perlakuan, pada penelitian ini *C. albicans* yang menjadi subjek hanya disensitisasi (dirangsang) dengan CSC sedangkan penelitian Semlali (2014) jamur tersebut dikultur bersamaan dengan larutan CSC, sehingga memberikan kesan bahwa metode sensitisasi dapat mempercepat intensitas pembentukan biofilm dibandingkan dengan metode kultur bersama dengan CSC. Berdasarkan analisis statistik pembentukan biofilm oleh *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC kretek dan non kretek memiliki nilai probabilitas  $p < 0,05$ .

Secara teori, waktu inkubasi *C. albicans* memiliki hubungan dengan intensitas aktivitas pembentukan biofilm selama 24-72 jam.<sup>14</sup> Berdasarkan hasil penelitian ini memperlihatkan bahwa waktu inkubasi 12 jam, 24 jam, dan 48 jam terhadap pembentukan biofilm memiliki probabilitas yang bermakna ( $p < 0,05$ ).

Secara umum, pembentukan biofilm *Candida* dalam rongga mulut terjadi melalui tiga fase, yaitu fase awal (0-11 jam),

intermedia (12-30 jam) dan matur (38-72 jam).<sup>4</sup>

Percobaan secara in-vitro menunjukkan bahwa pembentukan biofilm *C. albicans* melalui serangkaian langkah yang berurutan, yaitu tahap adhesi, inisiasi, maturasi dan penyebaran.<sup>15</sup> Analisa SEM dan uji kristal violet dapat membantu untuk melihat perubahan pembentukan formasi biofilm.<sup>16</sup>

Hasil penelitian (gambar 2) secara visual memperlihatkan profil massa biofilm *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC kretek dan non kretek. Kepadatan massa biofilm terjadi pada waktu 24 jam dan massa biofilm semakin berkurang pada waktu 48 jam. sementara massa biofilm *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC non kretek lebih padat dibandingkan yang disensitisasi dengan CSC kretek dan *C. albicans* tanpa disensitisasi dengan asap rokok, hal ini sejalan dengan analisis korelasi yang memperlihatkan bahwa pembentukan biofilm *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC kretek *C. albicans* ATCC 10261 ( $p < 0,01$ ).

Sebaliknya, *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC non kretek tidak memiliki korelasi dengan *C. albicans* ATCC 10261 ( $p > 0,001$ ). Artinya aktivitas pembentukan biofilm *C. albicans* yang disensitisasi dengan CSC non kretek lebih tinggi kepadatan massa biofilm dibandingkan yang lain. Hal ini, ada kaitan dengan kandungan komponen aktif yang dimiliki oleh kedua citarasa rokok tersebut, dimana rokok kretek memiliki kandungan tambahan eugenol yang dapat menghambat pembentukan biofilm *C. albicans*.<sup>17, 18</sup>

Mekanisme eugenol sebagai antijamur yaitu dengan mengganggu fungsi membran sel, menghambat sintesis kitin, sintesis asam nukleat dan protein serta menghambat produksi energi oleh ATP.<sup>19</sup>

Kandungan senyawa asetaldehida, benzena, dan isoprena dalam asap rokok dapat memicu terjadinya mutagenik dan memberikan efek peningkatan pertumbuhan dan adesi *Candida albicans*.<sup>17</sup> Selain itu, tembakau rokok juga dapat menjadi sumber gizi untuk mendukung pertumbuhan *Candida albicans*.<sup>10, 20</sup>

## KESIMPULAN

Kesimpulan penelitian ini adalah CSC kretek dan non-kretek dapat meningkatkan pembentukan biofilm *C. albicans*, sekaligus mempercepat maturasi biofilm pada waktu 24 jam, namun demikian CSC non kretek memiliki potensi yang lebih baik dibandingkan CSC kretek dalam memicu pembentukan biofilm oleh *C. albicans*.

## UCAPAN TERIMA KASIH

Terima kasih Kepada Laboratorium Oral Biologi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia dan Laboratorium Riset Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Syiah Kuala.

## DAFTAR PUSTAKA

1. Kusuma ARP. Pengaruh merokok terhadap kesehatan gigi dan rongga mulut. *Majalah Ilmiah Sultan Agung* 2011;49(124):12-19.
2. Soysa N, Ellepola A. The impact of cigarette/tobacco smoking on oral candidosis: an overview. *Oral diseases* 2005;11(5):268-73.
3. Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans*: a model organism for studying fungal pathogens. *ISRN microbiology* 2012;2012.
4. Komariah SR, UI DPF. Kolonisasi *Candida* dalam rongga mulut. *Majalah kedokteran FKUI*;28(1):39-47.
5. Gani BA. Keragaman virulensi faktor *Candida albicans* sebagai penentu infeksi. *Cakradonya Dent J* 2011;3(1):7.
6. Farah C, Lynch N, McCullough M. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. *Australian dental journal* 2010;55(s1):48-54.
7. Mokeem SA, Vellappally S, Preethanath RS, et al. Influence of smoking on clinical parameters and gingival crevicular fluid volume in patients with chronic periodontitis. *Oral Health Dent Manag* 2014;13(2):469-73.
8. Whibley N, Gaffen SL. Brothers in arms: Th17 and Treg responses in *Candida albicans* immunity. *PLoS Pathog* 2014;10(12):e1004456.
9. Cankovic M, Bokor-Bratic M, Cankovic D. Oral fungal and bacterial infection in smokers. *HealthMed* 2011;5(6):1695-700.
10. Semlali A, Killer K, Alanazi H. Cigarette smoke condensate increases *C. albicans* adhesion, growth, biofilm formation, and *EAP1*, *HWP1* and *SAP2* gene expression. *BMC Microbiology* 2014;14(61):2-8.
11. Darwazeh A, Al-Dwairi Z, Al-Zwairi A. The relationship between tobacco smoking and oral colonization with *Candida* species. *J Contemp Dent Pract* 2010;11(3):017-24.
12. Ronsani MM, Rymovicz AUM, Meira TM, et al. Virulence modulation of *Candida albicans* biofilms by metal ions commonly released from orthodontic devices. *Microbial pathogenesis* 2011;51(6):421-25.
13. Semlali A, Killer K, Alanazi H, Chmielewski W, Rouabhia M. Cigarette smoke condensate increases *C. albicans* adhesion, growth, biofilm formation, and *EAP1*, *HWP1* and *SAP2* gene expression. *BMC Microbiology* 2014;14:61-61.
14. Serrano-Fujarte I, López-Romero E, Reyna-López GE, et al. Influence of culture media on biofilm formation by *Candida* species and response of sessile cells to antifungals and oxidative stress. *BioMed research international* 2015;2015.
15. Ganguly S, Mitchell AP. Mucosal biofilms of *Candida albicans*. *Current opinion in microbiology* 2011;14(4):380-85.
16. Pesti M, Sipiczki M, Pinter Y. Scanning electron microscopy characterisation of colonies of *Candida albicans* morphological mutants. *Journal of medical microbiology* 1999;48(2):167-72.
17. Alanazi H. Effect of Cigarette Smoke on " *Candida Albicans*" Growth and Its Interaction with Human Gingival Fibroblasts [Université Laval; 2015.
18. He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 2007;163(3):137-43.
19. Palmeira-de-Oliveira A, Salgueiro L, Palmeira-de-Oliveira R, et al. Anti-

- Candida activity of essential oils. Mini reviews in medicinal chemistry 2009;9(11):1292-305.
20. Alanazi H, Semlali A, Perraud L, et al. Cigarette smoke-exposed *Candida albicans* increased chitin production and modulated human fibroblast cell responses. *BioMed research international* 2014;2014.