

## LAMPIRAN

### 1. Jurnal I

Efek antijamur minyak atsiri jahe merah

Indonesian Journal of Dentistry 2007; 14(3): 171-176  
Diterbitkan di Jakarta

Fakultas Kedokteran Gigi  
Universitas Indonesia

ISSN 1693-9697

### EFEK ANTIJAMUR MINYAK ATSIRI JAHE MERAH (ZINGIBER OFFICINALE VAR. RUBRUM) TERHADAP CANDIDA ALBICANS

Hermina Karuna Atmaja\*, Antonia Tanzil\*\*, Lakhsmi A Leepel\*\*

\* Mahasiswa angkatan tahun 2004 Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia

\*\* Departemen Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia

#### Abstract

The prevalence of *Candida albicans* infections is increasing in the society. Therefore, an effective and affordable antifungal drug with minimal side effect is needed. Ginger (*Zingiber officinale*) is a traditional herb which has an antifungal effect in its volatile oil. Objective: to investigate antifungal effect of volatile oil from *Zingiber officinale* var. rubrum against *C. albicans* *in vitro*, to determine the optimum concentration, and finally to determine the correlation between the various concentrations of the oil and the inhibition zone. Material and method: Strain *C. albicans* tested was obtained from the Department of Parasitology, Medical Faculty, University of Indonesia. Volatile oil of *Zingiber officinale* var. rubrum was produced from water and steam distillation of fresh ginger in BALLITRO, Bogor. Concentrations of the volatile oil used were 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.125%, 1.56% and 0.78%. Methods used were colony counting and disk diffusion method (by using 6 mm blank disk). The specimens were divided into two groups, treatment group (*C. albicans* with application of volatile oil) and control group (*C. albicans* without application of volatile oil). Result: There was a significant decrease in the amount of *C. albicans* colonies from 3.125% to 6.25% of concentration. The amount of *C. albicans* colonies at concentration 6.25 % was also significantly lower than in the control group. Moreover, there was strong and positive correlation between the concentration of the volatile oil and the inhibition zone. Conclusion: Volatile oil from *Zingiber officinale* var. rubrum has an antifungal effect against *C. albicans* *in vitro* with optimum concentration at 6.25%. Increasing concentrations of the oil correlates with increasing inhibition zone.

Keywords: volatile oil, *Zingiber officinale* var.*ruberum*, *Candida albicans*, antifungal

#### Pendahuluan

*Candida albicans* merupakan jamur oportunist yang banyak menyebabkan mikosis sistemik, baik pada rongga mulut, saluran pencernaan, maupun pada organ genital, yang dikenal dengan nama kandidiasis.<sup>1</sup> Sampai saat ini, prevalensi kandidiasis dalam rongga mulut makin meningkat di kalangan masyarakat. Meningkatnya

prevalensi kandidiasis dapat di sebabkan oleh berbagai faktor predisposisi, di antaranya adalah rendahnya daya tahan tubuh hospes; pasien dengan terapi antibiotik spektrum luas dalam jangka panjang; iritasi kronik akibat pemakaian protesa yang tidak adekuat; pola makan yang tinggi gula.<sup>2</sup>

Melihat prevalensi kandidiasis yang makin meningkat, kebutuhan terhadap obat-obatan antijamur pun akan makin meningkat.<sup>3</sup> Tetapi,

Alamat Korrespondensi: Departemen Biologi Oral Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia

banyak kendala yang dihadapi dalam terapi dengan obat antijamur yang sudah beredar sekarang ini, di antaranya adalah daya beli masyarakat dan adanya efek samping obat-obatan antijamur yang umum dipakai. Masalah lainnya yaitu timbulnya resistensi jamur terhadap beberapa obat antijamur yang sudah banyak beredar, contohnya adalah terjadinya resistensi terhadap amfoterisin B.<sup>3,4,5</sup>

Berdasarkan kendala-kendala tersebut, saat ini sedang marak dilakukan pencarian bahan-bahan alami sebagai obat tradisional untuk antijamur yang dikenal masyarakat luas dengan harga terjangkau dan efek samping yang rendah. Yang banyak diteliti adalah tanaman herbal. Pemakaian tanaman herbal sebagai obat tradisional sudah dikenal masyarakat luas sejak dulu, terbukti efektif secara klinis, dan dianggap lebih aman untuk dikonsumsi dibandingkan dengan obat konvensional.<sup>6</sup>

Menurut *World Health Organization* (WHO), jahe menduduki urutan tertinggi sebagai obat tradisional yang paling banyak dipakai di dunia.<sup>7</sup> Rimpang jahe mengandung dua kandungan utama, yaitu minyak atsiri sebesar 1–3 % dan oleoresin.<sup>7,8,9</sup> Minyak atsiri jahe terdiri dari senyawa-senyawa monoterpen ( $\beta$ -felandren, (+)-kamfen, limonen, sineol, linalool, sitral, dan borneol); seskuiterpen hidrokarbon (zingiberen,  $\beta$ -bis-abolen, (E,E)- $\alpha$ -farnesen,  $\beta$ -seskuifelandren, sesquithujane, sesquisabinene, dan ar-kurkumen); seskuiterpen alkohol zingiberol, zingiberenol.<sup>7,8,10</sup> Telah diteliti bahwa minyak atsiri jahe memiliki efek antijamur.<sup>6,10,11</sup> Minyak atsiri jahe dapat diperoleh dengan teknik destilasi.<sup>7</sup>

Dikenal tiga jenis jahe, yaitu jahe merah, jahe putih besar, dan jahe putih kecil.<sup>7,12,13</sup> Sebagai bahan obat dan jamu tradisional, jahe merah banyak dipilih karena memberikan rasa pahit dan pedas lebih tinggi dibanding jenis jahe lain. Selain ukurannya lebih kecil dibanding dua jenis jahe lain, warna kulit jahe merah juga berbeda. Kulitnya berwarna merah muda dan dagingnya sedikit cokelat.<sup>14</sup>

Penelitian ini dilakukan untuk membuktikan adanya efek antijamur minyak atsiri jahe merah terhadap *C. albicans* secara *in vitro*; mengetahui konsentrasi optimálnya; mengetahui hubungan antara berbagai konsentrasi minyak atsiri jahe merah dan ukuran zona hambat yang terbentuk terhadap *C. albicans*. Pada penelitian ini dipilih jahe merah karena belum didapatkan data penelitian secara spesifik mengenai efek antijamur jenis jahe ini terhadap *C. albicans*, apalagi jahe merah memiliki kandungan minyak atsiri yang paling tinggi dan sering digunakan sebagai obat tradisional.<sup>7,12</sup>

## Bahan dan Cara Kerja

Alat yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah otoklaf, inkubator, mesin sentrifugasi, *vortex mixer*, *colony counter*, timbangan, tabung reaksi, tabung Eppendorf, labu Erlenmeyer, pipet dan tip Eppendorf, sengkelit, *blank disk* (6 mm), pinset, cawan Petri, spruit 20 ml, *filter unit*, lampu Bunsen, kapas, sarung tangan, masker, dan penggaris. Bahan yang digunakan adalah minyak atsiri jahe merah hasil destilasi kukus jahe merah segar umur 9 bulan dari Balai Penelitian Tanaman Obat dan Aromatik (BALITTRO) sebanyak 15 ml, *C. albicans* dari Departemen Parasitologi Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia dalam agar miring, *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) sebagai media tumbuh padat jamur uji, *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) sebagai media tumbuh cair jamur uji, *Phosphat Buffer Saline* (PBS) sebagai larutan isotonus yang digunakan dalam pembuatan suspensi *C. albicans*, emulsifier sebagai bahan yang digunakan untuk menyatuksan minyak atsiri jahe merah dan SDB dalam pembuatan berbagai konsentrasi minyak atsiri jahe merah, dan akuades steril.

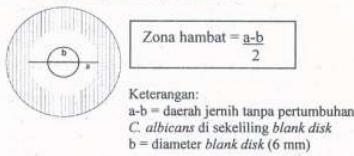
Penelitian ini dilakukan setelah mendapatkan surat lolos etik nomor 23/EtichelClearance/II/FKG/1/2007 yang dikeluaran oleh Komisi Etik Penelitian Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Indonesia. Semua prosedur dalam penelitian ini dilakukan secara aseptik. Awalnya disiapkan media perbenihan yang akan digunakan, yaitu SDA dan SDB siap pakai. Setelah itu, dibuat larutan induk *C. albicans* yang berisi PBS dan *C. albicans* yang sudah dibiotakan selama 72 jam di SDB pada suhu 37°C. Kemudian, dibuat suspensi *C. albicans* hingga pengenceran  $10^{10}$  kali agar dapat dipilih suspensi *C. albicans* dengan pengenceran yang jumlah koloni *C. albicans*-nya dapat dihitung, dengan kriteria tidak terlalu padat dan tidak terlalu sedikit, untuk digunakan sebagai dasar pada pengujian spesimen. Pengenceran suspensi *C. albicans* dibuat dengan cara mengambil 100  $\mu$ l larutan induk *C. albicans* dan dimasukkan ke tabung reaksi yang berisi 900  $\mu$ l PBS sehingga diperoleh pengenceran 10 kali. Kemudian, diambil 100  $\mu$ l larutan dari pengenceran 10 kali dan dimasukkan ke tabung reaksi yang berisi 900  $\mu$ l PBS sehingga diperoleh pengenceran  $10^2$  kali. Demikian seterusnya sehingga diperoleh pengenceran hingga  $10^{10}$  kali. Suspensi *C. albicans* yang digunakan sebagai dasar pengujian spesimen pada penelitian ini adalah suspensi dengan pengenceran  $10^4$  kali.

#### Efek antijamur minyak atsiri jahe merah

Pada penelitian ini akan digunakan dua metode, yaitu metode penghitungan koloni dan metode difusi cakram. Konentrasi minyak atsiri jahe merah yang diuji adalah 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,125 %, 1,56 %, dan 0,78 %. Pada metode penghitungan koloni, awalnya disiapkan suspensi *C. albicans* dengan pengenceran  $10^3$  kali. Digunakan pengenceran  $10^3$  kali karena 100  $\mu\text{l}$  suspensi *C. albicans* ini akan dilarutkan bersama 900  $\mu\text{l}$  minyak atsiri jahe merah dan SDB sehingga suspensi *C. albicans* dengan pengenceran  $10^3$  kali akan diencerkan sekali lagi dan menghasilkan suspensi *C. albicans* dengan pengenceran  $10^4$  kali.

Kemudian, disiapkan minyak atsiri jahe merah dalam berbagai konsentrasi, masing-masing sebanyak 900  $\mu\text{l}$ . Minyak atsiri jahe merah dalam berbagai konsentrasi didapatkan dengan melarutkan minyak atsiri jahe merah dan SDB. Diambil 900  $\mu\text{l}$  minyak atsiri jahe merah 100 % dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 900  $\mu\text{l}$  SDB sehingga diperoleh minyak atsiri jahe merah dengan konsentrasi 50 %. Kemudian, diambil 900  $\mu\text{l}$  minyak atsiri jahe merah 50 % dan dimasukkan ke tabung reaksi berisi 900  $\mu\text{l}$  SDB sehingga diperoleh minyak atsiri jahe merah dengan konsentrasi 25 %. Demikian seterusnya sehingga diperoleh minyak atsiri jahe merah dengan konsentrasi 12,5 % hingga 0,78 %. Setelah itu, ditambahkan 1,8  $\mu\text{l}$  emulsifier ke dalam tabung reaksi berisi minyak atsiri jahe merah dengan konsentrasi 50 % hingga 0,78 %. Lalu dihomogenisasi menggunakan *vortex mixer* dan kemudian disaring dengan menggunakan sifat 2 ml *filter unit*.

Pada metode penghitungan koloni digunakan tiga kontrol, yaitu kontrol negatif berupa 20  $\mu\text{l}$  SDB dan 100  $\mu\text{l}$  suspensi *C. albicans* dengan pengenceran  $10^3$  kali sebagai pembanding untuk melihat pertumbuhan *C. albicans*, kontrol SDB untuk melihat ada tidaknya kontaminasi pada SDB yang digunakan, dan kontrol minyak atsiri jahe merah untuk melihat ada tidaknya kontaminasi pada larutan uji minyak atsiri jahe merah.



Gambar 1. Metode difusi cakram

Pada delapan tabung reaksi yang berisi berbagai konsentrasi minyak atsiri jahe merah yang masing-masing sebanyak 900  $\mu\text{l}$ , ditambahkan 100  $\mu\text{l}$  suspensi *C. albicans* dengan pengenceran  $10^4$  kali. Setelah itu dihomogenisasi dengan menggunakan *vortex mixer* selama 20 detik. Dari setiap konsentrasi minyak atsiri jahe merah dan kontrol diambil 10  $\mu\text{l}$  larutan, dimasukkan ke dalam dua cawan petri berisi 20 ml SDA (penghitungan dilakukan secara duplo dan diambil rata-ratanya) dan diratakan dengan sengketil. Seluruh cawan petri di atas diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati selama 72 jam. Kemudian, dilakukan penghitungan terhadap koloni *C. albicans* yang tumbuh dengan menggunakan *colony counter*.

Pada metode yang kedua, yaitu metode difusi cakram, awalnya disiapkan suspensi *C. albicans* dengan pengenceran  $10^4$  kali. Setelah itu, disiapkan minyak atsiri jahe merah dalam berbagai konsentrasi masing-masing sebanyak 100  $\mu\text{l}$ . Selanjutnya, disiapkan tiga cawan petri yang berisi 20 ml SDA (penghitungan dilakukan secara triplo dan diambil rata-ratanya). Diambil 1 ml suspensi *C. albicans* dan dimasukkan ke dalam cawan petri berisi SDA.

Setelah suspensi *C. albicans* terserap dalam SDA, dimasukkan satu *blank disk* ke dalam cawan menggunakan pinset steril. Minyak atsiri jahe merah dengan konsentrasi 100 % sebanyak 5  $\mu\text{l}$  diteteskan ke *blank disk* dalam cawan petri. Dimasukkan kembali satu *blank disk* dalam cawan dan diteteskan dengan minyak atsiri jahe merah konsentrasi 50 %. Demikian seterusnya dilakukan hal yang sama untuk konsentrasi 25 % hingga 0,78 %. *Blank disk* terakhir yang dimasukkan dilekatkan di tengah cawan untuk kontrol berupa SDB sebanyak 5  $\mu\text{l}$ . Semua cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C dan diamati selama 72 jam. Zona hambat yang terbentuk dari setiap konsentrasi minyak atsiri jahe merah pada setiap cawan petri diukur menggunakan penggaris dan dicatat.

#### Hasil Penelitian

Pengenceran yang dipilih untuk menjadi dasar dalam pengujian spesimen dalam penelitian ini adalah pengenceran  $10^4$  kali karena pada pengenceran tersebut jumlah koloni *C. albicans* memenuhi kriteria, tidak terlalu padat dan tidak terlalu sedikit, yaitu 176 koloni dalam 10  $\mu\text{l}$  (17600 CFU/ml).

**Tabel 1.** Hasil penghitungan jumlah koloni *C. albicans* setelah pemberian minyak atsiri jahe merah

Konsentrasi minyak atsiri jahe merah	Jumlah koloni jamur (CFU/ml)
100 %	0
50 %	0
25 %	0
12,5 %	50
6,25 %	1450
3,125 %	17775
1,56 %	17900
0,78 %	18250
0 % (kontrol negatif)	16800

CFU = Colony Forming Unit

Hasil penelitian dengan menggunakan metode penghitungan koloni pada tabel 1 menunjukkan bahwa tidak terlihat adanya pertumbuhan *C. albicans* pada konsentrasi minyak atsiri jahe merah 25 %, 50 %, dan 100 %.

Terjadi penurunan tajam jumlah koloni *C. albicans* dari konsentrasi minyak atsiri jahe merah 3,125 % ke konsentrasi 6,25 % (Tabel 1). Jumlah koloni *C. albicans* pada konsentrasi 6,25 % lebih rendah dibandingkan dengan kontrol (Tabel 1). Analisis data menggunakan uji Mann Whitney ( $\alpha<0,05$ ) menunjukkan perbedaan bermakna antara jumlah koloni *C. albicans* pada konsentrasi 3,125 % dan 6,25 %; antara jumlah koloni *C. albicans* pada konsentrasi 6,25 % dan kontrol.

**Tabel 2.** Zona hambat yang terbentuk dari minyak atsiri jahe merah dalam berbagai konsentrasi terhadap *C. albicans*

Konsentrasi minyak atsiri jahe merah	Zona hambat (mm)
100 %	5,96
50 %	3,975
25 %	2,4375
12,5 %	0,33
6,25 %	0,1875
3,125 %	0,04
1,56 %	0
0,78 %	0
0 % (kontrol negatif)	0

Zona hambat mulai terbentuk pada konsentrasi minyak atsiri jahe merah 3,125 %. Zona hambat

terbesar terbentuk pada konsentrasi 100 %, sebesar 5,96 mm (Tabel 2).

Hasil penelitian menggunakan metode difusi cakram menunjukkan bahwa makin besar konsentrasi minyak atsiri jahe merah, makin besar zona hambat yang terbentuk terhadap *C. albicans* (Tabel 2). Analisis data menggunakan uji Spearman menunjukkan korelasi yang bermakna ( $\alpha<0,05$ ) antara konsentrasi minyak atsiri jahe merah dan zona hambat yang terbentuk. Uji Spearman memberikan hasil korelasi yang kuat dan positif dengan koefisien korelasi ( $r$ ) sebesar 0,879.

## Pembahasan

Hasil penelitian dengan menggunakan metode penghitungan koloni menunjukkan bahwa konsentrasi minyak atsiri jahe merah 25 % sudah bersifat fungisid, karena pada konsentrasi ini tidak terlihat adanya pertumbuhan *C. albicans* pada SDA. Konsentrasi optimal minyak atsiri jahe merah yang memiliki efek antijamur terhadap *C. albicans* secara *in vitro* terletak pada konsentrasi 6,25 %. Hal ini ditunjukkan dengan adanya penurunan tajam jumlah koloni *C. albicans* dari konsentrasi minyak atsiri jahe merah 3,125 % ke konsentrasi 6,25 %. Selain itu, jumlah koloni *C. albicans* pada konsentrasi minyak atsiri jahe merah 6,25 % lebih rendah dibandingkan dengan jumlah koloni pada kontrol. Analisis data dengan uji Mann Whitney ( $\alpha<0,05$ ) menunjukkan adanya perbedaan bermakna antara jumlah koloni *C. albicans* pada kisaran konsentrasi 3,125–6,25%; antara jumlah koloni *C. albicans* pada konsentrasi 6,25 % dan kontrol.

Metode difusi cakram digunakan untuk mengukur kemampuan minyak atsiri jahe merah dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans*. Zona hambat yang terbentuk ditandai dengan adanya daerah jernih di sekeliling kertas cakram.<sup>15</sup> Dari metode difusi cakram dapat diketahui bahwa makin besar konsentrasi minyak atsiri jahe merah, makin besar zona hambat yang terbentuk terhadap *C. albicans*. Analisis data menggunakan uji Spearman menunjukkan korelasi yang bermakna ( $\alpha<0,05$ ); korelasi yang kuat dan berbanding lurus ( $r = 0,879$ ) antara konsentrasi minyak atsiri jahe merah dan zona hambat yang terbentuk terhadap *C. albicans*.

Penelitian yang dilakukan di FMIPA, ITB menunjukkan bahwa pada konsentrasi minyak atsiri jahe 100 % terbentuk zona hambat sebesar 9,5 mm terhadap *C. albicans*.<sup>16</sup> Sedangkan, pada penelitian ini zona hambat yang terbentuk pada konsentrasi

#### Efek antijamur minyak atsiri jahe merah

minyak atsiri jahe merah 100 % adalah sebesar 5,96 mm. Perbedaan besarnya zona hambat yang terbentuk terhadap *C. albicans* ini diasumsikan karena perbedaan jenis jahe yang digunakan, perbedaan volume minyak atsiri jahe yang diteteskan ke kertas cakram, dan perbedaan jumlah *C. albicans* yang ditanam ke media tumbuh padat.

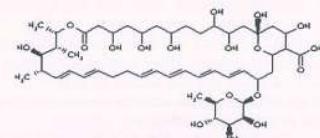
Dari hasil penelitian ini, diperkirakan minyak atsiri jahe yang mengandung seskuiterpen dan monoterpen memiliki senyawa fenol dan alkohol bersifat antijamur terhadap *C. albicans*<sup>17,18,19</sup>. Komponen minyak atsiri jahe yang terdiri dari monoterpen dan seskuiterpen dengan kandungan senyawa fenol dan alkohol (Gambar 2, Gambar 3) tersebut mempunyai gugus -OH yang sama seperti nistatin (Gambar 4) sehingga diduga cara kerjanya sebagai antijamur sama seperti nistatin. Mekanismenya adalah dengan mengikat sterol, khususnya ergosterol pada membran sel jamur.<sup>4,5,20</sup> Pengikatan ini mengubah permeabilitas sel sehingga terjadi kebocoran membran sel. Kebocoran ini menyebabkan kerusakan permanen pada sel yang pada akhirnya menyebabkan kematian sel.<sup>4,5</sup>



Gambar 2. Gugus kimia zingiberenol<sup>21</sup>  
(Sumber:<http://www.ntkii.uni-li.si/etolia/zingiberenol.htm>)



Gambar 3. Gugus kimia linalool<sup>22</sup>  
(Sumber:<http://www.friedli.com/research/MSc/literatu-re.html linalool>)



Gambar 4. Gugus kimia nistatin<sup>23</sup>  
(Sumber:[http://www.seq.es/seq/html/revista\\_seq/0498/rev1.htm](http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0498/rev1.htm))

#### Kesimpulan dan Saran

Dari penelitian ini maka dapat disimpulkan bahwa minyak atsiri jahe merah memiliki efek antijamur terhadap *C. albicans* secara *in vitro* dengan konsentrasi optimal yang terletak pada konsentrasi 6,25 %. Selain itu, terdapat hubungan antara peningkatan konsentrasi minyak atsiri jahe merah dan peningkatan ukuran zona hambat yang terbentuk terhadap *C. albicans*.

Dari penelitian yang telah dilakukan dapat disarankan untuk dilakukan penelitian efek antijamur minyak atsiri jahe merah terhadap *C. albicans* dengan pembanding obat antijamur yang lazim digunakan seperti nistatin atau amfoterisin B untuk melihat perbedaan keefektifannya. Selain itu dapat dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan *C. albicans* oral berbagai strain secara *in vivo*. Untuk mengetahui spektrum kerja aktivitas antijamur minyak atsiri jahe merah, dapat dilakukan penelitian efek antijamur minyak atsiri jahe merah terhadap jenis jamur patogen lainnya.

#### Daftar Acuan

1. Johnson AG, Ziegler R, Fitzgerald TJ, et al. *Mikrobiologi dan Imunologi*. Ed.1 Terj. Julius E S. Jakarta: Binarupa Aksara, 1994:172, 183, 189-191.
2. Lynch MA, Brightman VJ, and Greenberg MS. *Burket's Oral Medicine, Diagnosis and Treatment*, 8<sup>th</sup> ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1984: 221-224.
3. Soerartti W, dkk. *Aktivitas Antifungi Krim Minyak Atsiri Lengkuas (*Alpinia galanga* (L.) Swartz)* Terhadap *Candida albicans*. <http://jurnal.unair.ac.id/login/jurnal/filer/MFA-5-1-03.pdf> 26/06/2007.
4. Clark AM and Walker LA. *Biologically Active Natural Products: Pharmaceuticals*; Cutler SJ, Cutler HG (ed). London: CRC Press. 2000: 97-98.
5. Katzung BG. *Basic and Clinical Pharmacology*. 7<sup>th</sup> ed. London: Prentice Hall International, 1998: 780-781, 786.
6. Polasa K and Nirmala K. *Ginger: Its Role in Xenobiotic Metabolism*. <http://icmr.nic.in/BUJUNE03new.pdf>. 2003. 18/07/2007.

7. Redaksi AgroMedia. *Petunjuk Praktis Bertanam Jahe*: Lukito AM (ed). Jakarta: AgroMedia Pustaka. 2007; 1, 9-11, 47-48, 50.
8. Soesilo S dan Akerele O. *Standard of ASEAN Herbal Medicine* vol.1. Jakarta, Indonesia: ASEAN Countries, 1993: 449-450.
9. Minyak Atsiri Jahe.  
[http://warintek.ristek.go.id/pangan/tanaman%20penghasil%20minyak%20atsiri%20dan%20senyawa%20ekstraktif/minyak\\_atsiri\\_jahe.pdf](http://warintek.ristek.go.id/pangan/tanaman%20penghasil%20minyak%20atsiri%20dan%20senyawa%20ekstraktif/minyak_atsiri_jahe.pdf) 27/06/2007.
10. Evans WC. *Pharmacognosy*. 15<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders, 2002: 278, 280.
11. Research FLICKER and colleagues.  
<http://www.positivehealth.com/research-view.php?researchid=2962> 18/07/2007.
12. Rostriana, Bermawie N, dan Rahardjo M. *Budidaya Tanaman Jahe*.  
<http://www.balitetro.go.id/includes/Jahe.pdf> 2005, 11/07/2007.
13. Jahe (*Zingiber officinale Rosc*).  
<http://warintek.ristek.go.id/pertanian/jahe.pdf> 14/07/2007.
14. Jahe Merah: Supaya Bugar dan Gairah Makantar-kantar.  
<http://kompas.com/kesehatan/news/0407/25/135104.htm> 10/08/2007.
15. Jawetz L, Mehick B, Adelberg S. *Medical Microbiology*. 19<sup>th</sup> ed. California: Appleton and Lange, 1991: 310-597.
16. Sukandar EY, Suganda AG, dan Afrida. Penapisan aktivitas minyak atsiri dari *Zingiber officinale* terhadap bakteri dan jamur. *Simposium Penelitian Bahan Obat Alami VIII*. 1996; 420-423.
17. Comparative Evaluation of 11 Essential Oils of Different Origin as Functional Antioxidants, Antiradicals, and Antimicrobials in Foods. <http://www.kmitl.ac.th/sisc/GC-MS/paper/food%20no1.pdf> 19/07/2007.
18. Heinrich M, Barnes J, Gibbons S, and Williamson EM. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. London: Churchill Livingstone, 2004: 78-82.
19. Tumbuhan Obat sebagai Antijamur. <http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/11InformasiTumbuhanObatsebagaiAntijamur130.pdf> 127/06/2007.
20. Lewis RE. *Antifungal Pharmacology*. [http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif\\_pharm.htm](http://www.doctorfungus.org/thedrugs/antif_pharm.htm) 2007, 20/07/2007.
21. Zingiberenol. <http://www.ntfkii.unij.si/etolja/zingiberenol.htm> 30/11/2007.
22. Literature survey. <http://www.friedli.com/research/MSc/literature.html> 30/11/2007.
23. Alvares ME, Sousa AS, and Baquero F. *A Reevaluation of Nystatin in Prophylaxis and Treatment of Oropharyngeal Candidiasis*. [http://www.seq.es/seq/html/revista\\_seq/0498/rev1.html](http://www.seq.es/seq/html/revista_seq/0498/rev1.html) 09/07/2007.

## **2. Jurnal II**

**AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK ETANOL JAHE  
MERAH (*Zingiber officinale Roscoe var rubrum*) TERHADAP  
*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, DAN *Candida albicans***

**MAKALAH PUBLIKASI**



**OLEH:  
ZAINAL ARIFIN  
K 100 070 064**

**FAKULTAS FARMASI  
UNIVERSITAS MUHAMMADIYAH SURAKARTA  
SURAKARTA  
2012**

**AKTIVITAS ANTIMIKROBA EKSTRAK ETANOL JAHE MERAH**  
*(Zingiber officinale Roscoe var rubrum) TERHADAP *Staphylococcus aureus*,  
*Escherichia coli* DAN *Candida albicans**

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF *Zingiber officinale* Roscoe var *rubrum* AGAINST *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* AND *Candida albicans***

Ika Trisharyanti Dian Kusumowati, Zainal Arifin, dan Rosita Melannisa  
Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta

**ABSTRAK**

Rimpang jahe merah (*Zingiber officinale Roscoe var rubrum*) banyak digunakan pada pengobatan tradisional dan diketahui memiliki berbagai aktivitas biologis. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol rimpang jahe merah terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans* dengan metode dilusi padat.

Ekstrak etanol rimpang jahe merah diuji aktivitas antimikroba menggunakan metode dilusi padat. Seri konsentrasi uji yang digunakan untuk *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans* adalah 2%; 3%; 4%; 5%; dan 6% sedangkan untuk *Escherichia coli* 1%; 2%; 3%; 4%; dan 5%. Analisis kandungan senyawa ekstrak etanol jahe merah dilakukan dengan uji tabung dan Kromatografi Lapis Tipis dengan fase gerak heksan: dietil eter (4:6) v/v dan fase diam Silika gel GF.

Ekstrak etanol rimpang jahe merah mempunyai aktivitas antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans* dengan KBM sebesar 5% dan terhadap *Escherichia coli* KBM sebesar 3%. Ekstrak mengandung senyawa saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri.

**Kata kunci:** *Zingiber officinale Roscoe var rubrum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, antimikroba

**ABSTRACT**

The rhizome of *Zingiber officinale* Roscoe var *rubrum* has been used in traditional medicine and known to have some biological activities. The study was aimed to determine the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the ethanolic extract of *Zingiber officinale* Roscoe var *rubrum*'s rhizome against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, and *Candida albicans* by solid dilution method.

The ethanolic extract was tested for antimicrobial activity by solid dilution method. The extract concentrations used were 2%; 3%; 4%; 5% and 6% against *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* while 1%; 2%; 3%; 4%; and 5% extract concentration were used against *Escherichia coli*. Phytochemical screening was done by tube test method and Thin Layer Chromatography (TLC) with hexane: dietil eter (4:6) v/v as mobile phase and silica gel GF254 as stationary phase.

*This extract has antimicrobial activity towards *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* (*MBC* = 5%) and *Escherichia coli* (*MBC* = 3%). The ethanolic extract of *Zingiber officinale* Roscoe var *ruberum*'s rhizome contains saponin, flavonoid, polyphenol, and essential oil.*

**Key words:** *Zingiber officinale* Roscoe var *ruberum*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *antimicrobial*

## PENDAHULUAN

Infeksi merupakan penyakit yang dapat ditularkan dari satu orang ke orang lain atau dari hewan ke manusia. Sebagian besar infeksi disebabkan oleh bakteri, jamur, virus, dan parasit. Bakteri yang merupakan bagian flora normal manusia namun dapat menyebabkan infeksi yaitu *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* (Brooks *et al.*, 2007). Sedangkan kasus infeksi jamur, terutama oleh spesies *Candida albicans* mengalami peningkatan secara signifikan di Indonesia pada sepuluh tahun terakhir (Tjay dan Rahardja, 2003).

Akhir-akhir ini banyak ditemukan berbagai macam antimikroba dari bahan alam seperti pada tanaman, rempah-rempah atau dari mikroorganisme selain antimikroba yang diperoleh dari bahan-bahan sintetik (Gobel *et al.*, 2008). Salah satu tanaman yang telah lama dikenal dan dimanfaatkan oleh masyarakat sebagai antimikroba adalah jahe merah. Penelitian terdahulu telah membuktikan bahwa kandungan minyak atsiri dalam rimpang jahe merah dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* (Lestari, 2007). Rimpang jahe merah mengandung [*6*]-gingerol yang memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antiinflamasi, antikarsinogenik, antimutagenik, antitumor (Kim *et al.*, 2005).

*Staphylococcus aureus* mudah tumbuh pada kebanyakan pembentahan bakteriologik dalam keadaan aerobik atau mikroaerobik, tumbuh paling cepat pada suhu kamar 37°C, paling baik membentuk pigmen pada suhu kamar (20°C) dan pada media dengan pH 7,2-7,4. Koloni pada pembentahan padat berbentuk bulat, halus menonjol, dan berkilau-kilau membentuk pigmen (Jawetz *et al.*, 2001). *Staphylococcus aureus* berbentuk coccus, termasuk dalam bakteri gram positif, formasi staphylae, mengeluarkan endotoksin, tidak bergerak, tidak mampu

membentuk spora, fakultatif aerob, sangat tahan terhadap pengeringan, mati pada suhu 60°C setelah 60 menit, merupakan flora normal yang terdapat pada kulit dan saluran pernafasan bagian atas. Bakteri ini dapat memimbulkan infeksi bermanah dan abses. Infeksi akan lebih berat jika menyerang anak-anak, usia lanjut dan orang yang daya tahan tubuhnya menurun, seperti penderita diabetes, luka bakar dan AIDS (Entjang, 2003).

*Escherichia coli* berbentuk batang, gram negatif, fakultatif aerob, tumbuh baik pada media sederhana dan dapat melakukan fermentasi laktosa serta menghasilkan gas. *Escherichia coli* merupakan flora normal yang hidup komensal didalam kolon manusia dan diduga membantu pembuatan vitamin K yang penting untuk pembekuan darah. Bakteri ini akan menimbulkan penyakit jika masuk ke organ atau jaringan lain (Entjang, 2003). *Escherichia coli* adalah penyebab infeksi saluran kemih yang paling sering pada sekitar 90% wanita muda. Gejala dan tanda-tandanya antara lain sering berkemih, disuria, hematuria, dan piuria (Brooks et al., 2007).

*Candida albicans* tumbuh sebagai sel ragi tunas berbentuk oval (berukuran 3-6 $\mu$ m). Beberapa spesies ragi genus *Candida* mampu menyebabkan kandidiasis (Brooks et al., 2007). Candidiasis adalah mikosis yang menyerang kulit atau jaringan yang lebih dalam lagi. Jamur ini sering kali terdapat pada mukosa mulut, oropharing, dan traktus gastrointestinal orang sehat (flora normal). Candidiasis dapat mengenai kulit, kuku, atau organ tubuh, seperti ginjal, jantung dan paru-paru (Entjang, 2003).

Berdasarkan uraian tersebut maka penelitian ini dimaksudkan untuk menguji aktivitas antimikroba ekstrak etanol jahe merah (*Zingiber officinale Roscoe var rubrum*) terhadap bakteri *S. aureus*, *E. coli* dan jamur *C. albicans* sehingga dapat dijadikan sebagai acuan pengobatan herbal untuk pengobatan penyakit yang disebabkan oleh mikroorganisme.

## METODE

Mikroba yang digunakan pada penelitian ini adalah *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans*. Uji antibakteri terhadap *S. aureus* dan *E. coli* menggunakan media Mueller Hinton (MH) sedangkan untuk *C. albicans* menggunakan media *Saboroud Dextrose Agar* (SDA).

Identifikasi bakteri *Eschericia coli* dilakukan dengan : Bakteri ditusukkan pada media miring KIA, LIA, dan MIO, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus*, dilakukan dengan : Bakteri ditusukkan pada media agar garam manitol (*Manitol Salt Agar* = MSA) dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

### Metode Dilusi Padat

Larutan stok yang digunakan 40%. Seri konsentrasi ekstrak yang digunakan untuk uji antibakteri terhadap *S. aureus* dan *C. albicans* adalah 2%; 3%; 4%; 5%; dan 6% dan konsentrasi untuk *E. coli* adalah 1%; 2%; 3%; 4% dan 5%.

Masing-masing seri konsentrasi ekstrak dilarutkan dengan suspending agent sesuai dengan perhitungan hingga 2 ml dan ditambah 3 ml media MH atau SDA hingga volumenya 5 ml kemudian dipadatkan pada posisi miring. Sebanyak 25 µL suspensi mikroba setara dengan  $10^6$  CFU/mL ditanamkan pada masing-masing tabung kemudian diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C untuk bakteri dan selama 24-28 jam pada suhu 28°C untuk jamur.

### Kadar Bunuh Minimal

Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol jahe merah dibandingkan dengan kontrol dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan mikroba pada masing-masing tabung. Konsentrasi minimum ekstrak yang dapat membunuh bakteri disebut Kadar Bunuh Minimal (KBM).

Kontrol yang digunakan untuk uji aktivitas antimikroba ekstrak Jahe merah terhadap mikroba:

- 1) *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* terdiri dari:

Kontrol media : media MH

Kontrol bakteri : media MH + suspensi bakteri

Kontrol suspending agent : CMC Na 1% + media MH + suspensi bakteri

2) *Candida albicans* terdiri dari:

Kontrol media : media SDA

Kontrol jamur : media SDA + suspensi jamur

Kontrol suspending agent : CMC Na 1% + media SDA + suspensi jamur

**Skrining Fitokimia**

Uji untuk mengetahui adanya kandungan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, polifenol, dan tanin menggunakan uji tabung yang terdapat pada Materia Medika Indonesia (1999) dan Harborne (1973).

**Uji alkaloid**

Ekstrak etanol Jahe merah 180 mg, ditambah 1 mL HCl 2N dan 9 mL akuades, dipanaskan diatas penangas air selama 2 menit, didinginkan, dan disaring. Masing-masing filtrat ditambahkan 2 tetes Dragendorff dan Mayer LP. Jika dengan Mayer LP terbentuk endapan berwarna putih atau kuning yang larut dalam metanol P dan dengan Dragendorff terbentuk endapan berwarna coklat sampai hitam, maka ada kemungkinan terdapat alkaloid.

**Uji saponin**

Sebanyak 180 mg ekstrak dimasukkan dalam tabung reaksi, ditambah 10 mL air panas, didinginkan, dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik terbentuk buih yang mantap selama tidak kurang dari 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCl 2N, apabila buih tidak hilang maka senyawa tersebut mengandung saponin.

**Uji Flavonoid**

Sebanyak 180 mg ekstrak dipanaskan dengan 10 mL metanol selama 10 menit ditangas air. Larutan disaring selagi panas, filtrat diencerkan dengan 10 mL air. Setelah dingin filtrat ditambahkan 5 mL *wash benzen*, dikocok secara hati-hati, dan didiamkan. Lapisan metanol (lapisan bawah) diambil, diuapkan pada suhu 40°C. Sisa larutan dilarutkan dalam 5 mL etil asetat P, kemudian disaring. Selanjutnya 1 mL larutan percobaan tersebut diuapkan sampai kering, hasilnya dibasahkan dengan aseton P, serbuk asam borat P dan serbuk asam oksalat P ditambahkan sedikit, dipanaskan hati-hati diatas tangas air dan hindari pemanasan

yang berlebihan. Sisa yang diperoleh dicampur dengan 10 mL eter lalu diamati dengan sinar UV 366 nm, larutan berfluoresensi kuning intensif, menunjukkan adanya flavonoid (Anonim, 1989).

#### Uji Polifenol

Sebanyak 180 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL air lalu dipanaskan selama 10 menit. Larutan dinginkan, kemudian setelah dingin larutan disaring. Filtrat yang diperoleh ditetes menggunakan  $\text{FeCl}_3$  sebanyak 3 tetes, kemudian diamati perubahan warna larutan. Hasil positif adanya senyawa polifenol adalah terbentuknya larutan berwarna ungu sampai biru (Anonim, 1989).

#### Uji Tanin

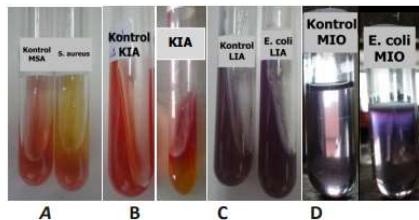
Sebanyak 180 mg ekstrak dilarutkan dalam 10 mL air lalu dipanaskan selama 10 menit, disaring. Filtrat ditambah dengan 1 mL larutan  $\text{NaCl}$  2% jika terjadi endapan, larutan disaring. Filtrat ditambahkan dengan larutan gelatin 1% sebanyak 5 mL. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan.

Analisis kandungan senyawa dengan KLT menggunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak heksan: dietil eter (4:6) v/v. Hasil elusi dilihat di bawah sinar UV 254 dan 366 nm dan dideteksi dengan menggunakan beberapa pereaksi semprot seperti Dragendorff untuk mengetahui adanya alkaloid, anisaldehid-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> untuk minyak atsiri, uap amonia-sitroborat untuk flavonoid, dan  $\text{FeCl}_3$  untuk polifenol (Wagner dan Bladt, 1996).

#### HASIL DAN PEMBAHASAN

Uji biokimia dilakukan dengan media MSA, KIA, LIA, dan MIO. Identifikasi bakteri *Staphylococcus aureus* dilakukan pada media *Mannitol Salt Agar* (MSA). Bakteri yang ditanam pada media MSA menyebabkan perubahan warna media MSA dari merah menjadi kuning oranye. Hal ini sesuai dengan sifat *Staphylococcus aureus* yang dapat memfermentasikan manitol dalam keadaan anaerob (Gambar 1).

*Eschericia coli* diuji dengan media KIA, LIA, dan MIO. Media KIA digunakan untuk mempelajari reaksi bakteri terhadap komponen penyusun media dan untuk melihat produksi asam yang ditandai dengan perubahan warna merah menjadi kuning baik pada daerah yang miring (*slant*) maupun pada tusukan (*butt*). Hasil uji pada media KIA menunjukkan *Eschericia coli* mampu memfermentasi dan menghasilkan asam sehingga media menjadi asam dan warna menjadi kuning oranye. Selain itu *Eschericia coli* menghasilkan gas pada media KIA. Media LIA digunakan untuk kelakuan bakteri terhadap lisin dan kemampuan membentuk H<sub>2</sub>S. Hasil uji pada media LIA adalah tidak terjadi perubahan pH media dan tidak dihasilkan asam sulfida disebabkan bakteri tidak dapat memecah lisin dan tidak membentuk asam sulfida. Media MIO digunakan untuk mempelajari pergerakan bakteri, kemampuan menghasilkan indol, dan reaksi pemecahan ornithin. Hasil uji pada media MIO menunjukkan adanya pergerakan bakteri dengan ditandai adanya kabut putih dalam media. Hasil ketiga uji diatas menunjukkan bakteri tersebut adalah *Eschericia coli* karena menunjukkan sifat-sifat *Eschericia coli* (Gambar 1).



Gambar 1. Uji biokimia bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli* ( A: hasil tes manitol terhadap *Staphylococcus aureus*, [hasil uji bakteri *Eschericia coli* pada media KIA (B), LIA (C), dan MIO (D)]

#### Hasil Uji Aktivitas Antimikroba

Uji aktivitas antimikroba bertujuan untuk mengetahui aktivitas ekstrak etanol jahe merah terhadap bakteri *S. aureus* sebagai Gram positif, *E. coli* sebagai Gram negatif, dan jamur *C. albicans*. Hasil uji aktivitas antimikroba menunjukkan bahwa ekstrak etanol jahe merah memiliki aktivitas antimikroba terhadap *S. aureus*, *C. albicans* dan *E. coli* (Tabel 1).

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antimikroba ekstrak etanol jahe merah (*Zingiber officinale Roscoe var rubrum*) terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Candida albicans*

Konsentrasi (%)	<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Candida albicans</i>	
	R1	R2	R1	R2	R1	R2
1			+	+		
2	+	+	+	+	+	+
3	+	+	-	-	+	+
4	+	+	-	-	+	+
5	-	-	-	-	-	-
6	-	-			-	-
K1	-	-	-	-	-	-
K2	+	+	+	+	+	+
K3	+	+	+	+	+	+

Keterangan

- (+) : terdapat pertumbuhan mikroba
- (-) : tidak terdapat pertumbuhan mikroba
- K1 : kontrol media
- K2 : kontrol pertumbuhan
- K3 : kontrol suspending agent CMC Na 1%

#### Analisis Kualitatif Kandungan Kimia

Skrining fitokimia dilakukan menggunakan metode tabung. Uji ini dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya golongan senyawa alkaloid, saponin, flavonoid, polifenol dan tanin dalam ekstrak etanol jahe merah. Hasil percobaan didapatkan bahwa ekstrak mengandung saponin, flavonoid, dan polifenol, tetapi tidak mengandung tanin dan alkaloid (Tabel 2).

Tabel 2. Hasil Skrining Fitokimia Ekstrak Etanol jahe merah

Ekstrak Etanol Jahe merah	Alkaloid		Saponin	Flavonoid	Polifenol	Tanin
	Mayer Lp	Dragendorff LP				
-	-	-	+	+	+	-

Keterangan :

- (+) = positif terdapat kandungan senyawa yang diteliti
- (-) = negatif atau tidak terdapat kandungan senyawa yang diteliti

Hasil skrining menunjukkan bahwa ekstrak etanol jahe merah tidak mengandung alkaloid meskipun hasil uji menghasilkan warna yang keruh. Hal tersebut diperkuat dengan hasil uji KLT. Warna keruh tersebut dimungkinkan berasal dari warna larutan ekstrak. Saponin ditunjukkan dengan terbentuknya buih

yang stabil, flavonoid ditunjukkan dengan fluoresensi kuning intensif dibawah sinar UV 366 nm, polifenol dengan terbentuknya larutan berwarna hijau sampai biru setelah ditetesi reagen  $\text{FeCl}_3$  yang disebabkan adanya reaksi kompleks antara polifenol dengan  $\text{FeCl}_3$ , sedangkan untuk tanin tidak terbentuk endapan setelah ditambahkan gelatin 1% sehingga hasilnya negatif.

Hasil skrining fitokimia diperkuat dengan identifikasi golongan menggunakan kromatografi lapis tipis. Identifikasi golongan menggunakan KLT digunakan fase diam silika gel GF<sub>254</sub> dan fase gerak heksan: dietil eter (4:6) v/v. Deteksi yang dilakukan terhadap hasil elusi dilakukan dengan pengamatan secara visual, sinar UV 254 nm dan 366 nm serta menggunakan beberapa pereaksi semprot. Hasil KLT menunjukkan positif flavonoid ditunjukkan dengan spot berwarna birukehitaman setelah disemprot dengan  $\text{FeCl}_3$  dan berfluoresensi ketika dilihat di bawah UV 366 nm. Minyak atsiri ditunjukkan dengan spot berwarna biru dan berfluoresensi pada UV 366 nm. Polifenol dan flavonoid ditunjukkan dengan spot berwarna biru kehijauan. Saponin ditunjukkan dengan spot berwarna ungu (Tabel 3).

Tabel 3. Hasil analisis Kromatografi Lapis Tipis Ekstrak Etanol Jahe Merah

spot	Rf	UV 254 nm	Sitro 366nm	anisaldehid- $\text{H}_2\text{SO}_4$	Dragen	$\text{FeCl}_3$ 366nm	Secara visual	LB	Perkiraan Senyawa
1	0,18	Pmd	Flor biru	Flor biru	-	-	-	-	Minyak atsiri
2	0,25	Pmd	Flor biru	Flor biru	-	-	-	-	Minyak atsiri
3	0,54	Pmd	-	Flor biru	-	-	-	-	Polifenol Minyak atsiri
4	0,7	Pmd	Flor biru	-	-	biru	Biru kehitaman	ungu	Flavonoid Polifenol saponin
5	0,8	Pmd	Flor biru	-	-	biru	-	-	Polifenol

Keterangan: Flor (Fluoresensi), Pmd (Pemadaman), Sitro (sitroborat), Dragen (Dragendorff), LB (Liebermann-Burchard), MA (Minyakatsiri)

Hasil uji KLT menunjukkan bahwa ekstrak etanol jahe merah positif mengandung flavonoid, minyak atsiri, polifenol, dan saponin. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa senyawa flavonoid pada jahe seperti katekin dan asam kafeat merupakan senyawa fenolik (Wresdiyati dkk, 2003). Aktivitas antimikroba terhadap *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* dan *Candida albicans* dapat disebabkan oleh adanya kandungan senyawa minyak atsiri, saponin, polifenol, dan flavonoid dalam ekstrak yang diketahui memiliki aktivitas antimikroba. Mekanisme kerja minyak atsiri sebagai antimikroba adalah menghambat atau mematikan pertumbuhan mikroba dengan mengganggu proses terbentuknya dinding sel, sehingga dinding sel tersebut tidak terbentuk atau terbentuk tetapi tidak sempurna (Ajizah, 2004). Saponin merupakan senyawa aktif permukaan yang kuat sehingga dapat menurunkan tegangan permukaan sel yang akan mengakibatkan kerusakan dengan naiknya permeabilitas atau kebocoran dinding sel. Flavonoid yang merupakan turunan fenol berinteraksi dengan sel mikroba sehingga terbentuk kompleks fenolprotein, diikuti penetrasi fenol ke dalam sel dan menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis (Hertiani *et al.*, 2003).

Penelitian sebelumnya (Kim *et al.*, 2005) menunjukkan bahwa kandungan minyak atsiri ([6] gingerol) dalam jahe merah memiliki aktivitas antibakteri. Penelitian sebelumnya menyebutkan bahwa ekstrak etanol *Zingiber officinale Rosc.* mempunyai nilai KBM 2,5% b/v terhadap *S. aureus* dan nilai KBM 2% b/v terhadap *E. coli* (Yanotama, 2009). Ekstrak jahe (*Zingiber officinale Roxb*) dapat menghambat pertumbuhan koloni bakteri *Escherichia coli* mulai dari konsentrasi 6,0% dengan luas daerah hambat 9,5 mm<sup>2</sup> (Nursal dkk, 2006). Kadar Bunuh Minimum (KBM) ekstrak etanol jahe merah terhadap *Candida albicans* adalah 4,75% b/v (Mariyani, 2010). Perbedaan hasil ini dimungkinkan karena perbedaan tempat tumbuh tanaman, lingkungan tempat tumbuh tanaman, dan konsentrasi komponen senyawa aktif yang terkandung di dalam ekstrak.

### KESIMPULAN

1. Ekstrak etanol jahe merah mempunyai aktivitas antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Candida albicans* dengan Kadar Bunuh Minimum (KBM) masing-masing sebesar 5%, 3%, dan 5%.
2. Hasil skrining fitokimia menunjukkan ekstrak etanol jahe merah mengandung senyawa saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri.

### SARAN

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut terhadap aktivitas yang lain untuk mengetahui potensi jahe merah dalam pengobatan.

### DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah, A., 2004, Sensitivitas *Salmonella typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun *Psidium guajava* L., *Journal Bioscientiae*, Volume 1, No 1, hal 31-38
- Andini, R. D., 2008, Efek Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* Roscoe.) Secara *In Vitro* terhadap Relaksasi Jaringan Otot Polos Trakhea Terpisah Marmut (*Cavia porcellus*) yang Diinduksi oleh Histamin, *Skripsi*, Universitas Muhammadiyah Malang.
- Anonim, 1989, *MateriaMedika Indonesia*, jilid V, Depkes RI, Jakarta.
- Brooks, G.F., Butel, J.S. & Morse, S.A., 2007, *Mikrobiologi Kedokteran*, Edisi 23, Diterjemahkan oleh Hartanto, H., Rachman, C., Dimarti, A., Diani, A., Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Entjang, I., 2003, *Mikrobiologi dan Parasitologi untuk Akademi Keperawatan dan Sekolah Tenaga Kesehatan yang Sederajat*, PT Citra Aditya Bakti, Bandung.
- Gobel, B. R., Saraswati, D., & As'adi , A., 2008. *Mikrobiologi Umum Dalam Praktek*, Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Hertiani, T., Palupi, I. S., Sanlieranti & Nurwindasari, H. D., 2003, Uji Potensi Antimikroba terhadap *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, dan *C. albicans* dari Beberapa Tanaman Obat Tradisional untuk Penyakit Infeksi, *Pharmacon*, vol. 4 no.2, UMS, Surakarta.

- Jawetz, E., Melnick, L. L. & Adelberg's, E. A., 2001, *Medical Microbiology*, diterjemahkan oleh Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, Salemba Medika, Jakarta.
- Kim, E. C., M., Min, J. K., Kim, T. Y., Lee, S. J., Yang, H. O., Han, S., Kim, Y. M., & Kwon, Y. G., 2005, [6]-Gingerol, a pungent ingredient of ginger, inhibits angiogenesis *in vitro* and *in vivo*, *Biochem Biophys Res Commun*, 335(2): 300-8
- Lestari, A.H., 2007, *Efek Antifungi Rebusan Rimpang Jahe Merah (Zingiber officinale) Terhadap Pertumbuhan Candida albicans*, Gray Literature, Fakultas Kedokteran.
- Mariyani, 2010, Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Jahe Merah (*Zingiber officinale* Roxb. var Rubra) Terhadap *Candida albicans* Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya, Skripsi, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
- Maryati, 2007, Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri daun Kemangi (*Ocimum basilicum L.*) Terhadap *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli*. *Jurnal Penelitian Sains & Teknologi*, Vol. 8, No. 1, 2007: 30 - 38
- Nursal, Sri, W. & Juwita, W. S. , 2006, Bioaktivitas Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale* Roxb) Dalam Menghambat Pertumbuhan koloni Bakteri *Escherichia coli* Dan *Bacillus Subtilis*, *Jurnal Biogenesis* Vol. 2 (2) : 54-66, 2006
- Tjay, T. H. & Rahardja, K., 2003, *Obat-Obat Penting Khasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya*, Gramedia, Jakarta.
- Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. M., 1984, *Plant Drug Analysis- A Thin Layer Chromatography Atlas*, second edition, Springer, German.
- Wresdiyati, T., Astawan, M. & Adnyane, I.K.M., 2003, Aktivitas Anti inflamasi Oleorisin Jahe (*Zingiber officinale*) Pada Ginjal Tikus yang Mengalami Perlakuan Stress, *Jurnal. Teknologi dan Industri Pangan*, Vol. XIV, No. 2 Th. 2003
- Yanotama, H. D., 2009, Analisis Komponen Antibakteri ekstrak Etanol Rimpang Jahe (*Zingiber officinale* Rosch.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Dan *Escherichia coli* Serta Bioautografinya, Fakultas Farmasi, Skripsi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Surakarta.

### 3. Jurnal III



## NPC Natural Product Communications

2018  
Vol. 13  
No. 12  
1587 - 1590

### Chemical Analysis of Red Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe var *ruberum*) Essential Oil and Its Anti-biofilm Activity against *Candida albicans*

Tristia Rinanda<sup>a,\*</sup>, Rizki Puji Isnanda<sup>a</sup> and Zulfiftri<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Syiah Kuala University, Aceh, Indonesia 23111

<sup>b</sup>Department of Biology, Faculty of Medicine, Syiah Kuala University, Aceh, Indonesia 23111

tristia.rinanda@unsyiah.ac.id

Received: July 9<sup>th</sup>, 2018; Accepted: November 16<sup>th</sup>, 2018

Biofilm formation is one of the virulence factors of *Candida albicans*, contributing to the development of resistance to various antifungal drugs. In order to combat resistant microbes such as *C. albicans*, the discovery and development of antifungal substances must explore the anti-biofilm activity of substances, which are extracted from traditional medicinal plants widely available in tropical countries such as Indonesia. One of the natural ingredients that can be developed is red ginger. This plant has been used empirically in the treatment of various infectious diseases, including fungal infections. The aim of this study is to determine the composition of chemical compounds in the essential oil of the red ginger rhizomes planted in Aceh, Indonesia and the anti-biofilm activity of the essential oil against *C. albicans*, isolated from a clinical sample. The chemical analysis of the essential oil was performed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Anti-biofilm activity was observed through biofilm inhibition and degradation activities, determined by Crystal Violet assay. Data were analyzed using ANOVA test and Duncan's post hoc test with 99% CI. The GC-MS results showed that the essential oil used in this study contained high monoterpenes (60.55%) which is dominated by *E*-citrinal/geranial (11.97%) and 1,8 - cineole (15.10%). The highest sesquiterpenes derivative was ar-curcumene (16.86%). The significant inhibition of *C. albicans* biofilm formation was obtained at a concentration of 0.5% and the biofilm degradation was obtained at a concentration of 0.125%. The data indicates that the high monoterpenoids-red ginger essential oil used in this study has performed significant anti-biofilm activity against *C. albicans*.

**Keywords:** Red ginger, Essential oil, Biofilm, *Candida albicans*, Monoterpenoids, Crystal violet assay.

*Candida albicans* (*C. albicans*) is a flora commonly found on the skin, urinary tract and gastrointestinal mucosa. In healthy people, the growth of these fungi is inhibited by the immune system and other microorganisms. However, if their immune system is compromised or weakened, *C. albicans* will be pathogenic, therefore leading to systemic infections [1]. A resistance mechanism of *C. albicans* to antifungal agents is biofilm formation [2]. Biofilm is a group of microorganisms attached to a surface which surrounds itself with a formed extracellular matrix. This formation enables the fungi that forms biofilms to withstand antibiotics, disinfectant, and even the host's immune system [3]. *Candida* biofilms may grow on the surface of the oral and vaginal mucosa or implants attached to the patient's body. These are such as joint prostheses, heart valves, and urinary catheters. Also outside the patient's body such as contact lenses and dentures [4].

Red ginger (*Zingiber officinale* Roscoe var *ruberum*) has been cultivated due to its wide range of curative effects. It is known as an essential composition of Indonesian folk medicine called *jamu* [5a,5b]. Red ginger contains the highest essential oil among other variants of ginger planted in Indonesia such as *Zingiber officinale* Roscoe (common ginger) and *Zingiber officinale* var. *amarum* (white small ginger) [6]. There are two major compounds that can be isolated from the essential oil: sesquiterpenes and monoterpenes [7a,7b]. These plant-derived terpenoid compounds is known for their antimicrobial and anti-biofilm activity [8].The essential oil of common ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) is known for its antimicrobial and anti-biofilm activity against bacteria [9a, 9b, 9c, 9d] and fungi, especially *C. albicans* [9c, 9d, 10a, 10b, 10c]. The antimicrobial activity of red ginger essential oil against bacteria has also been reported in a previous study [5a].To our knowledge, the

anti-biofilm activity of red ginger essential oil against *C. albicans* has never been reported.

Biofilm plays an important role in the conversion of *C. albicans* as commensal microbes into the virulent pathogen. The biofilm forming cells are more difficult to treat and less sensitive to antibiotics treatment than the planktonic cells [4, 11]. The formation of biofilm leads to resistance to all antifungal classes, resulting in the only treatment being surgery, to remove the infected implants. This is done with a combination with high doses of antifungal drugs. Removal of implants such as artificial heart valves may increase the risk in the patient's condition and is not economical. Furthermore, the use of high-dose antifungal drugs can lead to liver and kidney damage [12]. To solve these problems, we need to explore potential plant-derived natural resources containing anti-bio film substances. Today, a number of essential oils have been recognized as alternative antimicrobial and anti-biofilm agent due to their virtues, such as the simplicity in extraction, selective mode of action and nontoxicity to tissue culture, rapid degradation in water and positive health impacts [11]. In this paper, we presented our work on red ginger essential oil.

In this study, to determine the compositions, we performed a chemical analysis of the essential oil obtained from red ginger rhizomes, through steam distillation method. It is planted in Aceh, Indonesia, using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS).We defined 18 bioactive substances from the essential oil, as shown in Table 1.

The essential oil from the rhizomes of this variety obtained high percentages of monoterpenoids (60.6%) covering mainly

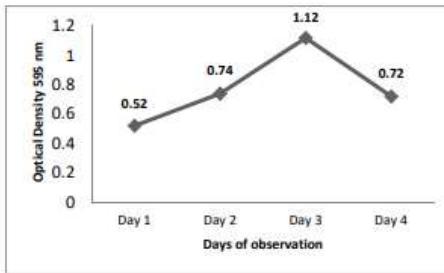
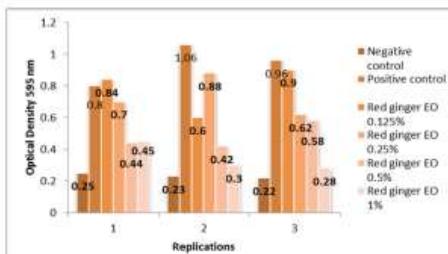
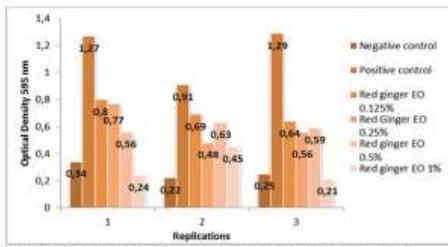
**Table 1:** The Bioactive constituents in red ginger essential oil

Constituents	% Area
β-Pinen	0.9
Myrcene	4.0
Limonene	4.1
1,8-cineole	15.1
6-Hepten-3-one	3.2
Linalool	2.0
trans-Caryophyllene	2.2
Neral/Z-citral	7.1
Borneol	6.8
Naphthalene	1.4
Zingiberene	2.3
β-Bisabolene	6.4
Geranial/e-citral	12.0
o-Farnesene	3.6
Neryl acetate	1.6
β-Sesquiphellandrene	6.8
α-Curcumene	16.9
Geraniol	3.9
	100%

1,8-cineole (15.1%), geranial (12%), neral (7.1%) and borneol (6.8%). Sesquiterpenes constituents were lower than monoterpenes, dominated by α-curcumene (16.9%), β-sesquiphellandrene (6.8%) and β-bisabolene (6.4%).

The previous study of red ginger rhizome essential oil from Malaysia also revealed the high content of monoterpenes (81.9%). However, the research found a lower percentage of 1,8-cineole (5.0%), α-curcumene (1.0%), limonene (2.5%), borneol (2.9%) and the absence of naphthalene and β-bisabolene. On the other hand, the study revealed higher percentage of geranial (14.3%) and geraniol (7.3%) [5a]. The study of chemical composition of ginger essential oil from India discovered the large amounts of monoterpenes with lower percentage of 1,8-cineole (10.9%) and higher percentage of geraniol (14.5%) [13]. Another study of ginger essential oil from Ecuador similarly revealed the high percentage of monoterpenes such as citral in contrast to the chemical compound commonly contained in the essential oil of ginger [14]. The composition of bioactive constituents in ginger essential oil may vary and can be determined by intrinsic factors such as soil type, climate, species or variant, maturity and harvest time. The extrinsic factors consist of methods of extraction and environment [7a, 7b].

Our study also revealed the anti-biofilm activity of red ginger essential oil. The optimum biofilm formation was determined by incubating the *C. albicans* isolated into liquid medium in flat-bottom polystyrene 96 wells microtiter flat wells (Figure 1). Then the crystal violet assay was used to determine the biofilm inhibition and degradation activity [15, 16]. The results regarding the anti-biofilm activity is shown in Figure 2 and 3.

**Figure 1:** Biofilm production by *C. albicans*. The optimized biofilm formation was reached in day 3.**Figure 2:** Inhibition of biofilm formation by each concentration of red ginger essential oil.**Figure 3:** Biofilm degradation by each concentration of red ginger essential oil.

It was discovered in this study that the optimal growth of biofilm of *C. albicans* occurred after a three-day incubation period (Figure 1). This period was divided into 3 stages: the initial stage ( $\approx 0\text{--}11$  hours), advanced stage ( $\approx 12\text{--}30$  hours) and maturation stage ( $\approx 30\text{--}72$  hours). Each of them where characterized by an increase in Optical Density (OD) value. Optical Density showed the specific growth rate of microbes within the wells, escalated along with the biofilm maturation process [17, 18]. The decline of OD values on the fourth day exhibited the final stage of biofilm formation. This is the dispersion or release of planktonic cells to adhere to another surface [12]. Therefore, the number of colonies attached to the well wall were reduced and wasted in the washing process.

Inhibition and degradation assay of biofilm was also evaluated by using OD value. The OD value represents the indirect measurement of biofilm production through the absorption of crystal violet bound to the *candida* cells on the biofilm layer in the destaining solution (ethanol) [19]. It is hypothetically assumed that the lowest OD value indicates the strongest activity of essential oil concentration in inhibiting and degrading the biofilm. As shown in Figure 2, the inhibition of biofilm formation by the essential oil of red ginger started from the concentration of 0.5% and continued to increase as its concentration increased (this was also indicated by a decrease in the OD value). Figure 3 shows that the biofilm degradation activity started to exhibit at the lowest concentration of essential oil (0.125%) and also increased along with the increase in concentration. Analysis of Variance (ANOVA) shows that the red ginger essential oil performed a statistically significant activity of inhibition and degradation of *Candida albicans* biofilm. Duncan's post hoc test results showed that the inhibition of *Candida albicans* bio film was obtained at concentration of 0.5% ( $p<0.01$ ) and *Candida albicans* biofilm degradation was obtained at concentration of 0.125% ( $p<0.01$ ).

The anti-biofilm effect of the essential oil of red ginger was supposed to be derived from the secondary metabolite compound i.e. terpenoids. The activity due to; geraniol, 1,8- cineole, limonol, and farnesol prevented the attenuation of *C. albicans* yeast cells by modifying the permeability of the cell wall, thus affecting the ability of yeast cell to adhere to a surface [20]. The adhesion stage of *C. albicans* will be followed by the colonization process and biofilm formation which will cause resistance to antifungals [1,19]. Therefore, the adhesion prevention would inhibit the growth of biofilm. In addition, these compounds interfere with the hyphae formation by inhibiting the formation of germ tube fungal cells and by interfering it with Ras-camP signal path. The morphological changes of yeast cells into hyphae were an important stage in the biofilm growth process because hyphae acts as a support for the biofilm structure. Prevention of the conversion process would disrupt the biofilm structure [21]. The highest sesquiterpenes, ar-curcumene, exhibited the antimicrobial activity against *C. albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. The mechanism of action is not completely understood but due to its hydrophobicity, this compound is able to distort the microbial cells membrane and cause leakage which leads to lysis of the cells [21].

#### Experimental

**Plant material and essential oil preparation:** A red ginger *Zingiber officinale* Roscoe var *rubrum*) rhizomes were collected from local farmers in Pulo Kiton village, Bireun, Aceh, Indonesia ( $40^{\circ} 54' - 50^{\circ} 21'$  N and  $96^{\circ} 20' - 97^{\circ} 21'$  E). The plant was identified and authenticated by Dr. Saida Rasnovi and then deposited in Herbarium Laboratory, Department of Biology, Faculty of Mathematics and Science, Syiah Kuala University. A total of 20 kg of fresh red ginger rhizomes aged 10-12 months were sun-dried and grinded into powder before it proceeded to be distilled. Separation of essential oil was done by steam distillation method. The essential oil was prepared in four different concentrations: 0.125%, 0.25%, 0.1%, and 1% (v/v). We used Dimethyl Sulfoxide (Merck) to dissolve the essential oil in water. The differed concentrations were based on Minimum Inhibitory Concentration of red ginger essential oil obtained in the previous unpublished study by Nadir et al (2015).

**GC-MS analysis:** The constituents of red ginger essential oil were analyzed using Shimadzu GCMS QP 2010 Plus. We used capillary column (Rtx-5 column) with the size  $30\text{ m} \times 0.25\text{ mm}$ , film thickness  $0.25\text{ }\mu\text{m}$ . The carrier gas was Helium, at a flow rate of  $1.61\text{ mL min}^{-1}$ . The injection temperature was  $200^{\circ}\text{C}$ ; split ratio 100. The detector temperature was  $220^{\circ}\text{C}$ ; operating condition as follows:  $60^{\circ}\text{C}$  for 5 min and then increased to  $110^{\circ}\text{C}$  at the rate of  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , then up to  $170^{\circ}\text{C}$  at the rate of  $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , again up to  $220^{\circ}\text{C}$  at the rate of  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , at which the column was maintained for 3 min. The ionization energy was  $70\text{ eV}$ . The constituents were identified by comparing the measured spectra to reference spectra recorded in mass spectral library namely NIST 27, NIST 147 and Wiley 7.

#### Anti-biofilm activity

**Inoculum preparation:** *Candida albicans* were obtained from the vaginal swab of a vaginal candidiasis patient and stored at the

Microbiology Laboratory of the Faculty of Medicine Syiah Kuala University, Banda Aceh. The isolate was stored in Soboroud Dextrose Agar and Trypticase Soy Broth media at  $4^{\circ}\text{C}$ . Further identification was based on the macroscopic examination of the colony on the surface of Soboroud Dextrose Agar, followed by a series of microscopic evaluation through Potassium Hydroxide examination, Gram staining dan germ tube test. The inoculum was prepared as described in previous study [22].

**Biofilm production assay:** Biofilm formation was performed using the modified microplate biofilm production assay [23]. A total of  $50\text{ }\mu\text{L}$  of fungal suspension and  $50\text{ }\mu\text{L}$  of Trypticase Soy Broth (TSB) medium were combined into 6 wells of flat-bottom polystyrene 96 wells microtiter flat wells (Greiner). The microplates were closed and incubated at  $37^{\circ}\text{C}$  for 24, 48, 72 and 96 hours. After incubation, the contents were removed and washed three times, using PBS solution. The wells were dripped with  $200\text{ }\mu\text{L}$  of 1% crystal violet solution and incubated for 15 minutes at room temperature. The wells were then re-washed with PBS solution three times and dried at room temperature. A total of  $200\text{ }\mu\text{L}$ , 96% of ethanol (Merck) were added to each well. All wells were then incubated for 15 minutes at room temperature and measured using iMark absorbance reader (BioRad) at  $595\text{ nm}$  wavelength. The biofilm production assay results provided information on the optimum growth of *C. albicans*, used to precisely determine the time to add the essential oil in degradation assay.

**Biofilm formation inhibitory assay:** This test was performed using a modified crystal violet assay [15, 24]. A total of  $50\text{ }\mu\text{L}$  of fungal suspension and  $50\text{ }\mu\text{L}$  of TSB medium were combined into a flat-bottom polystyrene 96 wells microtiter plate, then  $100\text{ }\mu\text{L}$  of each essential oil concentration were added into the test group microplate wells. The negative control was sterile broth (TSB media) and positive control was fungal suspension in TSB media without the addition of essential oil. The microplate was sealed using parafilm and then incubated for 24 hours at  $37^{\circ}\text{C}$ . After incubation, the suspension was removed and washed using  $200\text{ }\mu\text{L}$  of PBS solution three times. The wells were dripped with  $200\text{ }\mu\text{L}$  of 1% of crystal violet solution, incubated for 15 minutes at room temperature, then re-washed using PBS solution three times and dried at room temperature. A total of  $200\text{ }\mu\text{L}$ , 96% of ethanol was added to each well and incubated for 15 minutes at room temperature. The Optical Density (OD) measurement was then performed using microplate spectrophotometer at  $595\text{ nm}$  wavelength. This assay was carried out in triplicate. The average and standard deviation were calculated for all replicates.

**Biofilm degradation assay:** This test was performed using the same method as the inhibitory assay above. The difference is the addition of red ginger essential oil on the third day of biofilm formation.

**Statistical analysis:** The data obtained in this study were analyzed, using Analysis of Variance (ANOVA) test and Duncan test with Confidence Interval (CI) 99%.

**Supplementary data:** Result of chemical analysis, using GC-MS.

#### References

- [1] Mathé L, Van Dijck P. (2013) Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Current Genetics*, **59**, 251-264.
- [2] Perlin DS, Shor E, Zhao Y. (2015) Update on antifungal drug resistance. *Current Clinical Microbiology Reports*, **2**, 84-95.
- [3] Kumar A, Alam A, Rani M, Ehtesham NZ, Hasnain SE. (2017) Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, **8**, 481-489.
- [4] Khan MSA, Ahmad I, Aqil F, Owais M, Shahid M, Musarrat J. (2010) Virulence and pathogenicity of fungal pathogens with special reference to *Candida albicans* (In: *Combating Fungal Infections: Problems and Remedy*). Springer, Heidelberg, 31.

- [5] (a) Sivasothy Y, Chong WK, Hamid A, Eldeen IM, Sulaiman SF, Awang K. (2011) Essential oils of *Zingiber officinale* var. *rubrum* theilade and their antibacterial activities. *Food Chemistry*, **124**, 514–517; (b) Directorate General of National Export Development. (2016) Ginger: Superior, hot export commodity for your health. Ministry of Trade of The Republic of Indonesia, Jakarta, 1–9.
- [6] Cahyono B, Satriadi H, Munfarida S. (2018) Antioxidant activity and total phenolic content in Red Ginger (*Zingiber officinale*) based drinks. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, **102**, 1–9.
- [7] (a) Dhifi W, Bellil S, Jaziz S, Bahlou N, Mnif W, Nahar L. (2016) Essential oils' chemical characterization and investigation of some biological activities: a critical review. *Medicines*, **3**, 2–16; (b) Sharifi-Rad M, Varoni EM, Salehi B, Sharifi-Rad J, Matthews KR, Ayatollah SA. (2017) Plants of the genus *Zingiber* as a source of bioactive phytochemicals: From tradition to pharmacy. *Molecules*, **22**, 1–19.
- [8] Raut JS, Shinde RB, Chaudhary NM, Karuppayil SM. (2013) Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling*, **29**, 87–96.
- [9] (a) Ali BH, Blunden G, Tamra MO, Nemmar A. (2008) Some phytochemical, pharmacological and toxicological properties of ginger (*Zingiber officinale Roscoe*): A review of recent research. *Food Chemical Toxicology*, **46**, 409–420; (b) Chouhan S, Sharma K, Gulera S. (2017) Antimicrobial activity of some essential oils—present status and future perspectives. *Medicines*, **4**, 2–21; (c) Kumar Sharma P, Singh V, Ali M. (2016) Chemical composition and antimicrobial activity of fresh rhizome essential oil of *Zingiber officinale Roscoe*. *Pharmacognosy Journal*, **8**, 185–190; (d) Hassan A, Abutalib A, Almagboul A, Kabashia A. (2017) Antimicrobial activity of the rhizome essential oil of *Zingiber officinale Roscoe*. *Advancement in Medicinal Plant Research*, **5**, 5–10.
- [10] (a) Agarwal V, Lal P, Pruthi V. (2008) Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia*, **65**, 13–19; (b) Aghazadeh M, Bialvaei AZ, Aghazadeh M, Kabiri F, Saliani N, Yousefi M. (2016) Survey of the antibiotic and antimicrobial effects of *Zingiber officinale* (In vitro study). *Jandishapur Journal of Microbiology*, **9**, 1–6; (c) Takahashi M, Enouye S, Abe S. (2011) Anti-*Candida* and radical scavenging activities of essential oils and oleoresins of *Zingiber officinale Roscoe* and essential oils of other plants belonging to the family Zingiberaceae. *Drug Discoveries & Therapeutics*, **5**, 238–245.
- [11] Algburi A, Comte N, Kashtanov D, Dicks LMT, Chikindas ML. (2017) Control of biofilm formation: Antibiotics and beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, **83**, 1–16.
- [12] Gulan M, Nobile CJ. (2016) *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes and Infections*, **18**, 310–321.
- [13] Gupta S, Panditra P, Ram G, Anand R, Gupta AP, Husain K, Bedi YS, Mallavarapu GR. (2011) Composition of a monoterpenoid-rich essential oil from the rhizome of *Zingiber officinale* from North Western Himalayas. *Natural Product Communications*, **6**, 93–96.
- [14] Höferl M, Stoilova I, Wamer J, Schmidt E, Jirovecz L, Trifonova D, Stanchev V, Krastanov A. (2015) Composition and comprehensive antioxidant activity of ginger (*Zingiber officinale*) essential oil from Ecuador. *Natural Product Communications*, **10**, 1085–1090.
- [15] Xu Z, Liang Y, Lin S, Chen D, Li B, Li L. (2016) Crystal violet and TT assays on *Staphylococcus aureus* biofilm quantification. *Current Microbiology*, **74**, 474–482.
- [16] Stegnarović S, Vuković D, Hola V, Di Bonaventura G, Djukić S, Čirković IRF. (2007) Quantification of biofilm in microtiter plates: Overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by *Staphylococci*. *Acta pathologica, microbiologica, et Immunologica Scandinavica (APMIS)*, **115**, 891–899.
- [17] Welch K, Cai Y, Stromme M. (2012) A Method for Quantitative Determination of Biofilm Viability. *Journal of Functional Biomaterials*, **3**, 418–31.
- [18] Dalleau S, Cateau E, Bergès T, Berjeaud JM, Imbert C. (2008) In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **31**, 572–576.
- [19] Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. (2001) Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance. *Journal of Bacteriology*, **183**, 5385–5394.
- [20] Santos da Silva GN, Pozzatti P, Rigatti F, Horner R, Hartz Alves S, Mallmann CA. (2015) Antimicrobial evaluation of sesquiterpene alpha-curcumene and its synergism with imipenem. *Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences*, **4**, 434–436.
- [21] Errria M, Genta G, Tuveri E, Orr G, Barbato G, Levi R. (2012) Microtiter spectrophotometric biofilm production assay analyzed with metrological methods and uncertainty evaluation. *Measurement*, **45**, 1083–1088.
- [22] Clinical Laboratory Standards Institute. (2002) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts—approved standard. Clinical Laboratory Standards Institute, **22**, 6.
- [23] Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Jr FLW, Ramage G, Lopez-ribot JL. (2009) A Simple and reproducible 96 well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal. *Nature Protocols*, **3**, 1494–1500.
- [24] Djordjevic D. (2002) Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 2950–2958.