

BAB 2

TINJAUAN TEORI

2.1 *Candida albicans*

Candida albicans merupakan salah satu fungi patogen oportunistik yang menyebabkan berbagai penyakit pada manusia. Sebelum berubah menjadi pathogen, *Candida albicans* merupakan flora normal yang ada pada saluran pencernaan, saluran pernafasan atas dan genital pada mamalia. Namun pada populasi koloni yang meningkat, *Candida albicans* dapat menimbulkan masalah dan berubah kearah pathogen (Kusmaningtyas, 2014).

Candida albicans merupakan jamur yang bersifat infeksi oportunistik, dimana pada pasien yang mengalami kekebalan imun yang rendah, jamur yang awalnya merupakan flora normal dalam tubuh menjadi bersifat merugikan. Infeksi yang ditimbulkan biasanya infeksi lokal tergantung dari habitat candida albicans seperti di daerah oral dan vagina. Pada penderita seperti bayi prematur dan penyakit immunodefisiensi seperti AIDS, infeksi candida albicans lebih bersifat fatal. Lebih dari 50% pasien immunocompromise immunodefisiensi meninggal akibat infeksi yang disebabkan oleh candida albicans (Schmid, 2006).

2.1.1 Taksonomi

Kingdom : Fungi

Phylum : Ascomycota

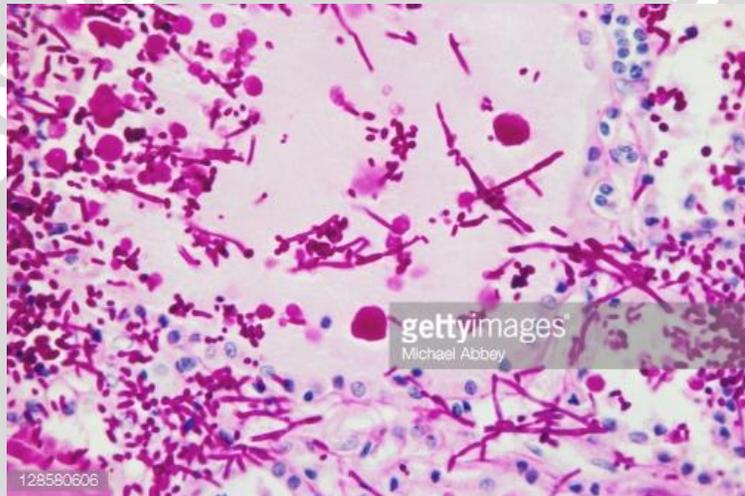
Class : Saccharomycetes

Order : Saccharomycetales

Family : Saccharomycetaceae

Genus : *Candida*

Spesies : *Candida albicans*



Gambar 2.1 *Candida albicans* secara mikroskopis pada perbesaran 140x (Abbey, 2016)

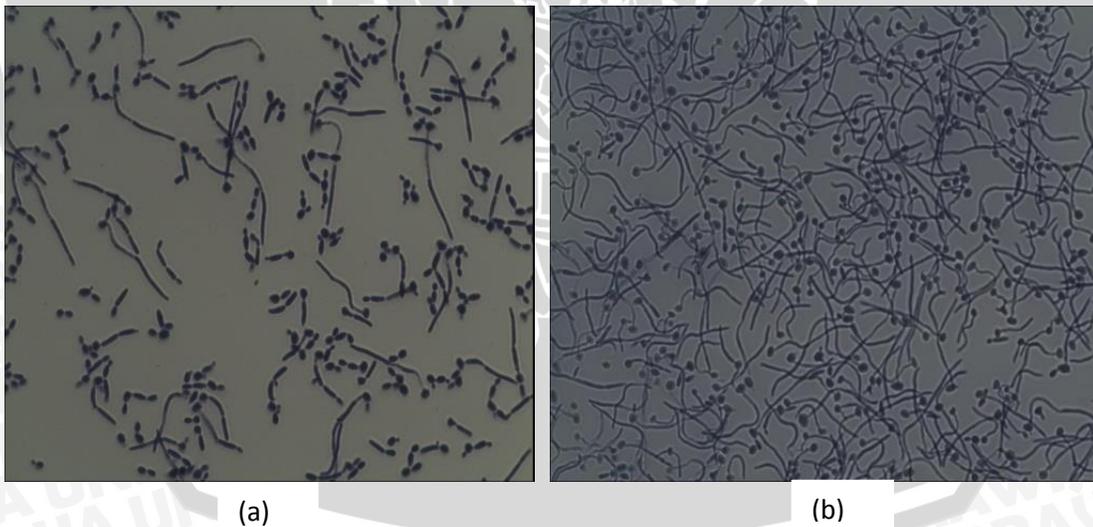
2.1.2 Morfologi *Candida albicans*

Candida albicans merupakan organisme eukariotik, yang tampak seperti ragi lonjong, kecil, berdinding tipis, bertunas, termasuk dalam golongan gram positif, berukuran 2-3 x 4-6 mikrometer yang memanjang menyerupai hifa (pseudohifa). Pseudohifa ini terbentuk ketika tunas-tunas yang terus tumbuh tetapi gagal melepaskan diri sehingga menghasilkan rantai-rantai sel-sel yang memanjang yang terjepit atau tertarik pada septasi-septasi antar sel. Selain membentuk

pseudohifa, *Candida albicans* juga membentuk hifa sejati. Jamur ini berkembang biak dengan cara *budding* (Simatupang, 2009).

Candida albicans dapat tumbuh dengan baik pada media kultur *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) yang diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Pada media ini *Candida albicans* membentuk koloni-koloni halus berwarna krem yang mempunyai bau seperti ragi. Sedangkan jika diinkubasi pada suhu 30°C, *Candida albicans* akan membentuk hifa semu (Suryaningsih, 2015)

Candida albicans memperbanyak diri dengan membentuk tunas yang akan terus memanjang membentuk hifa semu. Pertumbuhan optimum pada *Candida albicans* terjadi pada pH antara 2,5 – 7,5. *Candida albicans* merupakan jamur yang pertumbuhannya cepat yaitu sekitar 48–72 jam (Komariah, 2012).



Gambar 2.2 (a) bentuk pseudohifa *Canidda albicans*, (b) bentuk hifa *Candida albicans* (Biotrans, 2009)



Gambar 2.2 *Candida albicans* pada culture media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) (Oxoid, 2016)

2.1.3 Faktor virulensi

2.1.3.1 Polimorfisme

Candida albicans merupakan jamur polimorfik yang dapat tumbuh pada berbagai bentuk seperti ragi, pseudohifa dan hifa sejati. Untuk bentuk pathogen yang paling penting adalah saat pembentukan ragi dan bentuk hifa sejatinya. Saat berbentuk hifa memicu untuk terjadinya infeksi, sedangkan pada bentuk ragi bertugas untuk menyebarkan jamur *Candida albicans*. Untuk peran bentuk pseudohifa sendiri tidak terlalu signifikan jika dibandingkan dengan bentuk ragi dan hifa sejati. Beberapa faktor yang dapat menyebabkan perubahan dalam morfologi *Candida albicans* antara lain perubahan pH, perubahan suhu, CO₂, dan kadar glukosa (Murciano, 2011).

2.1.3.2 Adhesin

Tahap pertama dalam proses infeksi ke tubuh hewan atau manusia adalah perlekatan (adhesi). Kemampuan melekat pada sel inang merupakan tahap penting

dalam kolonisasi dan penyerangan (invasi) ke sel inang. *Candida albicans* memiliki ikatan glycosylphosphatidylinositol (GPI) dengan permukaan glikoprotein yang melekat pada permukaan mikroorganisme. Glikoprotein ini dikode oleh 8 *agglutinin-like sequence* (ALS) gen, dari ALS1-7 dan ALS 9. Untuk faktor adhesi pada infeksi mulut dan vaginal, yang paling penting adalah faktor ALS 3 (Watchler, 2011).

2.1.3.3 Invasin

Selain berfungsi sebagai faktor adhesi, ALS 3 juga berfungsi sebagai faktor invasin, yang menyebabkan *Candida albicans* menginvasi sel epitel dan endotel host. Faktor invasin yang lain adalah gen *Ssa1*, yang merupakan kode normal untuk *heat-shock* protein. Pada dasarnya protein ini merupakan protein khusus pada permukaan patogen sel yang mengikat ligan, seperti E-cadherin pada sel-sel epitel, N-cadherin pada sel-sel endotel, yang mendorong sel inang untuk mengikat patogen dari jamur. Metode lain untuk invasi adalah penetrasi aktif oleh *Candida albicans* ke dalam sel host oleh mekanisme yang tidak diketahui yang melibatkan hifa (Watchler, 2011).

2.1.3.4 Bentuk Biofilm

Candida albicans memiliki kemampuan membentuk biofilm pada permukaan selnya, baik pada permukaan yang aktif maupun yang tidak aktif. Setelah proses perlekatan sel ragi pada permukaan, lalu ada perkembangan dari hifa dibagian atas biofilm. Hal ini mengakibatkan jamur lebih resistan, biofilm yang matang dan penyebaran sel ragi berkontribusi pada virulensi patogen. Dalam proses pembentukan biofilm, *Bcr1*, *Tec1* dan *Efg1* berfungsi penting sebagai faktor

transkripsi. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa biofilm melindungi kolonisasi *C. albicans* dari serangan neutrofil dan mencegah pembentukan spesies oksigen reaktif (Xie, 2012).

2.1.3.5 Sekresi Hidrolase

Candida albicans mensekresikan 3 kelas utama dari *hydrolases*, yaitu *proteases*, *phospholipases* dan *lipases*. *Hydrolases* ini bertujuan untuk memfasilitasi patogen aktif melakukan penetrasi ke dalam sel host dan penyerapan nutrisi ekstraseluler dari lingkungan. Telah diketahui 10 jenis sekresi *aspartate protease* yaitu Sap1-10 yang masih belum diketahui secara jelas mekanismenya. Untuk *phospholipases*, ada 4 kelas utama yang berfungsi merusak permukaan sel inang. Untuk *lipases* terdiri dari 10 jenis yaitu LIP1-10, dan menurut penelitian jika tidak ada lipases maka fungsi virulensi akan menurun (Watchler, 2012).

2.1.3.6 Adaptasi Metabolik

Candida albicans merupakan flora normal pada saluran pencernaan, saluran pernafasan atas dan juga genitalia, pada keadaan ini kandungan nutrisi cukup stabil. Namun jika terjadi perubahan saat infeksi, kadar nutrisinya menjadi berubah. Akibatnya jamur cepat mengalami adaptasi metabolik seperti pada respon glikolisis, gluconeogenesis dan kelaparan (Brock, 2009).

2.2 Kandidiasis

Kandidiasis adalah penyakit jamur yang bersifat akut atau subakut disebabkan spesies *Candida*, biasanya oleh spesies *Candida albicans* dan dapat mengenai mulut, vagina, kulit, kuku, bronki atau paru, kadang-kadang menyebabkan

septikemia, endokarditis atau meningitis. Penyakit ini terdapat di seluruh dunia, dapat menyerang semua umur, baik laki-laki maupun perempuan. Jamur penyebabnya terdapat pada orang sehat sebagai saprofit. Gambaran klinisnya bisa bermacam-macam sehingga tidak diketahui data-data penyebaran secara tepat (Sanjaya, 2014).

2.2.1 Kandidiasis Orofaringeal

Kandidiasis orofaringeal adalah infeksi yang disebabkan oleh *Candida albicans* di daerah mulut dan tenggorokan. Biasanya, hal ini ditandai dengan pembentukan bercak putih seperti susu di atas lidah dan seluruh mulut, yang juga dikenal sebagai "sariawan". Thrush dapat dihilangkan dengan pisau atau kapas-tipped swab, akan tetapi jaringan di bawahnya akan sensitif dan menunjukkan tanda kemerahan. Pada area yang terinfeksi akan menyebabkan nyeri dan kesulitan selama makan (Ong, 2016). Bercak putih tersebut tidak tampak jelas bila pasien adalah seorang perokok. Pertumbuhan *Candida albicans* akan lebih subur bila pasien menerima kortikosteroid, kadar glukosa tinggi dan imunodefisiensi (Situmapang, 2009)

2.2.2 Kandidiasis Vaginalis

Kandidiasis Vulvovaginal adalah infeksi candida albicand di daerah genital, biasanya dinding vagina, perempuan. Hal ini disebabkan karena hilangnya pH asam dari vagina sehingga mengganggu keseimbangan flora normal pada vagina. Infeksi jamur vagina menyebabkan gatal-gatal dan sensasi terbakar pada vagina dan jaringan sekitarnya. Juga, terdapat pengeluaran sekret yang berwarna keknuningan

disertai gumpalan-gumpalan berwarna putih kekuningan, gumpalan tersebut berasal dari massa yang terlepas dari dinding vulva atau vagina yang terdiri dari bahan nekrotik, sel-sel epitel dan jamur yang juga berbau. Kandidiasis genital lebih banyak terjadi pada wanita, tapi pria juga dapat. Meskipun tidak dianggap sebagai STD, pria biasanya terinfeksi setelah berhubungan seks dengan seorang wanita yang mengalami infeksi jamur vagina. Gejala yang terlihat pada pria meliputi ruam, iritasi pada *gland penis* dan sekitarnya (Situmapang, 2009).

2.2.3 Kandidemia

Kandidiasis invasif atau biasa disebut dengan kandidemia adalah adanya infeksi *Candida albicans* ke dalam aliran darah. Hal ini menyebabkan invasi pada organ seluruh tubuh, seperti ginjal, hati, otak, dan lain-lain. Pasien mulai menderita demam, menggigil, kelelahan, sakit otot dan sakit perut. Biasanya, resiko terjadinya kandidemia terjadi pada pasien dengan sistem kekebalan tubuh yang sangat rendah (*uncompromaised*), sementara pada orang-orang yang sehat rentan terhadap kandidiasis oral kelamin. Sistem kekebalan sangat rendah (*uncompromaised*) dapat disebabkan oleh kemoterapi, transplantasi, antibiotik spektrum luas, dan banyak lagi (Ong, 2016).

2.2.4 Terapi

Obat topikal yang digunakan biasanya Ketokenazol 2% yang dioleskan pada bagian lesi di labia minora. Ketokenazol cream ini digunakan untuk infeksi jamur di kulit tidak berambut, dengan dosis dan lamanya pengobatan tergantung dari kondisi biasanya diberikan selama 2-4 minggu dan dioleskan 1-

2 kali sehari. Obat sistemik yang digunakan adalah flukonazol 1x150 mg (single dose). Flukonazol ini digunakan karena secara invitro flukonazol memperlihatkan aktivitas fungistatik terhadap *Candida albicans* (Sanjaya, 2014). Pada terapi kandidemia diperlukan dosis dari flukonazol yang lebih tinggi dan diberikan secara IV. Dapat juga diberikan amphotericin B dosis tinggi (Pappas, 2009).

Tindakan pencegahan sangat disarankan untuk menjaga agar daerah kewanitaan tetap dalam keadaan bersih dan tidak lembab dengan menggunakan pakaian dalam yang menyerap keringat atau terbuat dari jenis kain katun. Penggunaan cairan pembasuh vagina harus dilakukan secara bijaksana, karena lingkungan vagina bersifat asam yang juga merupakan lingkungan normal bagi flora normal di vagina. Adanya perubahan lingkungan normal, misalnya dengan penggunaan cairan pembilas vagina yang bersifat basa/alkali (mengandung sabun) dapat memicu pertumbuhan kuman secara abnormal yang salah satu akibatnya adalah keputihan. Pengobatan-nya pun tidak boleh sembarangan, biasanya diobati dengan dua alan, yaitu obat jamur yang di-minum.

2.3 Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Phleria macrocarpa lebih dikenal dengan sebutan buah mahkota dewa, buah ini berasal dari Papua, Indonesia yang dapat tumbuh di iklim tropis. Pohon mahkota dewa dapat tumbuh dengan tinggi mencapai 1-6 m dengan komponen pohon yang terdiri dari batang, daun, bunga dan buah. Pada buah berbentuk bulat lonjong dengan diameter berkisar antara 3 cm. warna buah hijau saat belum matang, dan

berubah menjadi merah saat matang. Pada penelitian sebelumnya yang dilakukan oleh Arini, dkk (2003) didapatkan bahwa kandungan flavonoid pada buah mahkota dewa lebih banyak daripada senyawa lain seperti saponin, tannin dan alkaloid (Hendra, 2011).

2.3.1 Taksonomi

- Kingdom : Plantae
- Divisi : Spermatophyta
- Sub divisi : Dicotyledon
- Kelas : Thymelaeales
- Famili : Thymelaeaceae
- Marga : Phaleria
- Spesies : *Phaleria macrocarpa*



Gambar 2.3 Buah Mahkota dewa (Harmanto, 2004)

2.3.2 Morfologi Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Tanaman mahkota dewa merupakan tanaman yang dapat hidup di daerah beriklim tropis. Pohon mahkota dewa dapat tumbuh dengan tinggi 1-6 meter dengan ciri-ciri batang berkayu, pendek dan memiliki banyak percabangan. Pada daunnya tunggal berbentuk bulan panjang dan bertangkai pendek dengan pertulangan menyirip dan berwarna hijau tua. Buah mahkota dewa berbentuk bulat, permukaannya licin serta beralur, saat masih muda berwarna hijau dan bila sudah masak berwarna merah dengan daging buah berwarna putih (Harmanto, 2004).

2.3.3 Kandungan Mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Tumbuhan mahkota dewa merupakan dari salah satu famili Thymelaeaceae dan spesies *Phaleria macrocarpa* (Gotama, 1999). Pada penelitian sebelumnya didapatkan kandungan seperti tannin, saponin, alkaloid, dan flavonoid. Kandungan-kandungan tersebut dapat yang berfungsi sebagai antioksidan, anti-inflamasi, anti mikroba (Sher, 2009).

a. Tanin

Tanin memiliki fungsi sebagai antimikroba dengan cara mengkerutkan dinding sel atau membrane sel sehingga mengganggu pereabilitas sel, sehingga pertumbuhan sel dapat terhambat bahkan mati

b. Saponin

Saponin dikenal sebagai deterjen alam yang dapat larut dalam air tetapi tidak larut dalam eter dan larutan ini dapat berbuih sehingga diklasifikasikan sebagai struktur aglykon kompleks ke dalam terpenoid dan steroid saponin. Senyawa

saponin ini dapat berfungsi sebagai antiinflamasi, analgesik, dan sitotoksik. Senyawa saponin ini juga dapat berfungsi sebagai antimikroba, anti fungi dan anti virus dengan cara meningkatkan permeabilitas membrane sehingga menyebabkan membrane sel menjadi lisis dan mikroba menjadi mati (Soetan, 2006)

c. Alkaloid

Alkaloid merupakan senyawa organik yang berfungsi sebagai detoksifikasi, menetralkan racun didalam tubuh. Dalam mekanisme antimikroba dihindarkan dengan kemampuan alkaloid mengikat DNA sel sehingga mengganggu fungsi sel mikroba tersebut diikuti dengan pecahnya sel dan diakhiri dengan kematian mikroba (Lisdawati, 2002)

d. Flavonoid

Pada mahkota dewa terdapat berbagai jenis kandungan flavonoid, senyawa flavonoid mampu membentuk kompleks dengan protein sel mikroba melalui ikatan hydrogen sehingga struktur dinding sel dan membrane sitoplasma yang mengandung protein menjadi terganggu dan tidak dapat berfungsi sehingga terjadi denaturasi protein. Denaturasi tersebut menyebabkan koagulasi protein dan mengganggu integritas membrane dan fungsi fisiologis mikroba. Metabolisme yang terganggu akan menyebabkan rusaknya sel secara permanen karena tidak terpenuhinya kebutuhan energi (Hendra, 2011).

Dengan metode *High Performance Liquid Chromatografi* (HPLC) didapatkan beberapa kandungan flavonoid dalam mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) yang meliputi kaempferol, myricetin, naringin dan rutin pada bagian pericarp buah.

Naringin dan quercetin pada bagian mesocarp buah. Sedangkan pada bagian biji hanya mengandung quercetin (Hendra, 2011).

2.3.4 Manfaat Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*)

Sebagian masyarakat sudah mengetahui bahwa mahkota dewa merupakan tanaman obat. Secara tradisional, mahkota dewa digunakan sebagai terapi kanker, kelainan ginjal, impotensi, hemorrhoids, diabetes mellitus, penyakit jantung dan hati, stroke, migraine, alergi, jerawat dan penyakit kulit lainnya (Zhang, 2006).

Pada bagian kulit dan daging mahkota dewa dapat digunakan untuk mengobati penyakit flu, rematik, sampai kanker rahim stadium akhir. Pada mahkota dewa terdapat kandungan flavonoid yang tinggi pada mahkota dewa dapat dimanfaatkan sebagai obat untuk penyakit kulit yang disebabkan oleh mikroba (Harmanto, 2004)

2.4 Antimikroba

Antimikroba merupakan senyawa kimia yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroba. Bahan antiseptic yang baik adalah bahan yang dapat membunuh mikroba secara efektif tetapi tidak mengiritasi jaringan sekitarnya. Faktor-faktor yang berpengaruh pada aktivitas zat antimikroba adalah pH, suhu, stabilitas senyawa, jumlah mikroba yang ada, alam inkubasi dan aktivitas metabolisme mikroba. Aktivitas antimikroba dibedakan menjadi 2 macam yaitu aktivitas mikrobaostatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh mikroba

pathogen) dan bakterisidal (dapat membunuh mikroba pathogen) (Bakhriansyah, 2008).

Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba disebut sebagai kadar hambat minimal (KHM) sedangkan kadar minimal yang diperlukan untuk membunuh mikroba dikenal sebagai kadar bunuh minimal (KBM). Antimikroba tertentu dapat meningkatkan efektivitasnya bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM (Setiabudy, 2009).

2.4.1 Mekanisme Kerja Antimikroba

Mekanisme kerja antimikroba dalam menghambat dan membunuh mikroba terdiri dari 5 kelompok yaitu :

a. Menghambat metabolisme sel mikroba

Mikroba membutuhkan asam folat untuk kelangsungan hidupnya. Mikroba mensintesis asam folat sendiri melalui asam amino benzoate (PABA) untuk memenuhi kelangsungan hidup mikroba. Analog asam folat yang non fungsional dapat terbentuk ketika suatu agen mikroba dapat membentuk asam folat yang biasanya dibentuk oleh PABA, akibatnya kehidupan mikroba tersebut menjadi terganggu (Setiabudy, 2009).

b. Menghambat sintesis dinding sel mikroba

Dinding sel mikroba terdiri dari peptidoglikan yaitu suatu kompleks polimer mukopeptida (glikopeptida). Antimikroba dapat menghambat sintesa dinding sel mikroba dengan cara menghambat pembentukan glikopeptida tersebut. Ketika aktivitas antimikroba menyebabkan tekanan osmotik yaitu

tekanan dalam sel lebih tinggi daripada luar sel maka terjadilah kerusakan dinding sel yang akhirnya menyebabkan lisis pada mikroba (Setiabudy, 2009).

c. Mengganggu keutuhan membrane mikroba

Senyawa antimikroba dapat menyerang membrane sitoplasma dan mempengaruhi integritasnya. Kerusakan pada membrane sitoplasma mengakibatkan peningkatan permeabilitas dan terjadi kebocoran sel yang diikuti dengan keluarnya materi intraseluler seperti protein, asam nukleat, nukleotida, dan lain-lain (Setiabudy, 2009).

d. Menghambat sintesis protein sel mikroba

Sel mikroba memerlukan sintesis berbagai macam protein untuk kelangsungan hidupnya, sintesis ini berlangsung di ribosom dengan bantuan mRNA dan tRNA. Pada mikroba ribosom terdiri dari dua sub unit yang berdasarkan konstanta sedimentasi dinyatakan sebagai ribosom 30S dan 50S. Kedua komponen ini berdatu pada pangkal rantai mRNA menjadi ribosom 30S agar dapat berfungsi pada sintesis protein. Senyawa antimikroba mampu menghambat sintesis protein mikroba yaitu senyawa tersebut berikatan dengan komponen sel ribosom 30S yang menyebabkan kode pada mRNA salah dibaca oleh tRNA pada saat sintesis protein, sehingga akan terbentuk protein yang salah dan nonfungsional bagi mikroba (Setiabudy, 2009).

e. Menghambat sintesis asam nukleat mikroba

Senyawa antimikroba ini akan berikatan dengan enzim polymerase-RNA sehingga menghambat sintesis RNA dan DNA oleh enzim tersebut. Senyawa antimikroba ini juga menghambat enzim DNA girase yang fungsinya menata kromosom yang sangat panjang menjadi bentuk spiral hingga bisa muat dalam sel mikroba (Setiabudy, 2009)

2.5 Metode Ekstraksi

Ekstraksi merupakan cara pemisahan kandungan aktif sari simplisa menggunakan cara penyaring yang cocok, simplisa adalah bahan alami yang digunakan sebagai obat yang belum mengalami perubahan, biasanya bahan yang dikeringkan (Wientarsih dan Prasetyo, 2006). Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut.

2.5.1 Jenis-Jenis Ekstraksi

Jenis-jenis ekstraksi yang dapat digunakan adalah sebagai berikut :

a. Maserasi

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri. Metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu,

pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar. Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil (Agoes,2007).

b. Perlokasi

Pada metode perkolasi, serbuk sampel dibasahi secara perlahan dalam sebuah perkolator (wadah silinder yang dilengkapi dengan kran pada bagian bawahnya). Pelarut ditambahkan pada bagian atas serbuk sampel dan dibiarkan menetes perlahan pada bagian bawah. Kelebihan dari metode ini adalah sampel senantiasa dialiri oleh pelarut baru. Sedangkan kerugiannya adalah jika sampel dalam perkolator tidak homogen maka pelarut akan sulit menjangkau seluruh area. Selain itu, metode ini juga membutuhkan banyak pelarut dan memakan banyak waktu (Agoes,2007).

c. Soxhlet

Metode ini dilakukan dengan menempatkan serbuk sampel dalam sarung selulosa (dapat digunakan kertas saring) dalam klonsong yang ditempatkan di atas labu dan di bawah kondensor. Pelarut yang sesuai dimasukkan ke dalam labu dan suhu penangas diatur di bawah suhu reflux. Keuntungan dari metode ini adalah proses ekstraksi yang kontinyu, sampel terekstraksi oleh pelarut murni hasil kondensasi sehingga tidak membutuhkan banyak pelarut dan tidak memakan banyak waktu. Kerugiannya adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi

karena ekstrak yang diperoleh terus-menerus berada pada titik didih (Agoes,2007).

d. Reflux dan Destilasi uap

Pada metode reflux, sampel dimasukkan bersama pelarut ke dalam labu yang dihubungkan dengan kondensor. Pelarut dipanaskan hingga mencapai titik didih. Uap terkondensasi dan kembali ke dalam labu. Destilasi uap memiliki proses yang sama dan biasanya digunakan untuk mengekstraksi minyak esensial (campuran berbagai senyawa menguap). Selama pemanasan, uap terkondensasi dan destilat (terpisah sebagai 2 bagian yang tidak saling bercampur) ditampung dalam wadah yang terhubung dengan kondensor. Kerugian dari kedua metode ini adalah senyawa yang bersifat termolabil dapat terdegradasi (Seidel V 2006).

2.6 Pemisahan Senyawa (Kromatografi)

Untuk pemisahan senyawa flavonoid dilakukan secara bertahap menggunakan metode partisi dan sentrifugasi

2.6.1 Partisi cair-cair

Partisi cair-cair merupakan proses pemisahan satu atau lebih zat terlarut dari larutannya dengan menggunakan pelarut lainnya. Pada saat pencampuran terjadi perpindahan massa, yaitu ekstrak meninggalkan pelarut yang pertama (media pembawa) dan masuk ke dalam pelarut kedua (media ekstraksi). Kelebihan proses ekstraksi ini adalah proses lebih mudah dengan durasi waktu yang lebih cepat. (Marhamdi, 2011)

2.6.2 Sentrifugasi

Sentrifugasi merupakan salah satu metode pemisahan campuran senyawa dengan prinsip utama yaitu dengan memisahkan substansi berdasarkan berat jenis molekul. Pada proses ini dilakukan dengan cara memberikan gaya sentrifugal sehingga substansi yang lebih berat berada di dasar sedangkan substansi yang lebih ringan berada di atas. Teknik sentrifugasi sendiri dilakukan menggunakan alat yang dinamakan sentrifugator dengan kecepatan putaran yang bervariasi. (Fatih, 2009)

2.7 Uji Kepekaan terhadap antifungisecara In Vitro

Penentuan kepekaan fungi patogen terhadap antimikrobia dapat dilakukan dengan salah satu dari dua metode pokok yakni dilusi atau difusi (Jawetz dkk., 2007)

2.7.1 Metode Dilusi

Metode Dilusi merupakan suatu metode uji antimikroba untuk menentukan Kadar Hambat Minimal (KHM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM). Terdapat dua cara yaitu kadar metode dilusi tabung dan dilusi agar.

2.7.1.1. Dilusi Tabung

Metode ini dilakukan dengan tabung reaksi, dengan cara diisi media cair dan beberapa sel mikroba dengan jumlah tertentu yang akan diuji. Selanjutnya obat yang sudah diencerkan dengan konsentrasi tertentu dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Setelah itu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan selanjutnya diamati kekeruhan yang terjadi pada masing-masing tabung. Yang dimaksud Kadar Hambat Minimal (KHM) adalah konsentrasi terendah obat yang menunjukkan bahwa hasil biakan yang muli terlihat jernih, yang berarti tidak ada pertumbuhan mikroba. Setelah biakan dari seluruh tabung yang jernih diinokulasi

dengan media agar yang padat kemudian dilakukan inkubasi kembali. Pada keesokan harinya dilakukan pengamatan untuk mengetahui adakah koloni mikroba yang tumbuh. Konsentrasi mikroorganismme pada uji ini adalah 10^6 CFU/ml. untuk Kadar Bunuh Minimal (KBM) adalah konsentrasi minimal obat pada biakan media aga pada yang menunjukkan bahwa tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba (Tille, 2013).

2.7.1.2. Dilusi Agar

Metode ini dilakukan dengan metode dlusi agar (agar dilution test). Larutan antimikroba yang sudah diencerkan secara serial dicampurkan kedalam medium agar yang masih cair (tetapi tidak terlalu panas) kemudian agar dibiarkan memadat, selanjutnya diinokulasi dengan mikroba. Untuk metode ini, larutan antimikrona dibuat dengan kadar menurun dengan menggunakan teknik pengenceran secara seri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Setelah selesai diinkubasi yang perlu dilaukan adalah mengamati dan menghitung pertumbuhan mikroba yang terdapat pada cawan (Tille, 2013).

2.7.2 Metode Difusi

Metode yang paling sering digunakan adalah metode difusi agar. Cakram kertas saring berisi sejumlah tertentu obat ditempatkan pada medium padat yang sebelumnya telah diinokulasi mikroba uji pada permukaannya. Setelah diinkubasi, diameter zona hambat sekitar cakram dipergunakan untuk mengukur kekuatan hambatan obat terhadap organisme uji (Jawetz dkk., 2007). Metode ini dipengaruhi beberapa faktor fisik dan kimia, selain faktor antara obat dan organisme (misalnya sifat medium dan kemampuan difusi, ukuran molekular dan

stabilitas obat). Meskipun demikian, standardisasi faktor-faktor tersebut memungkinkan melakukan uji kepekaan dengan baik (Jawetz dkk., 2007). Penggunaan cakram tunggal pada setiap antibiotik dengan standardisasi yang baik, bisa menentukan apakah mikroba peka atau resisten dengan cara membandingkan zona hambatan standar bagi obat yang sama. Daerah hambatan sekitar cakram yang berisi sejumlah tertentu antimikrobia tidak mencerminkan kepekaan pada obat dengan konsentrasi yang sama per millimeter medium, darah atau urin (Jawetz dkk., 2007)

Menurut Jawetz dkk. (2007), ada beberapa cara pada metode difusi ini, yaitu:

1. Kirby-Bauer

Cara Kirby-Bauer merupakan suatu metode uji sensitivitas mikroba yang dilakukan dengan membuat suspensi mikroba pada medium Brain Heart Infusion (BHI) cair dari koloni pertumbuhan kuman 24 jam, selanjutnya disuspensikan dalam 0,5 ml BHI cair (diinkubasi 4-8 jam pada suhu 37°C). Hasil inkubasi mikroba diencerkan sampai sesuai dengan standar konsentrasi kuman. Suspensi mikroba diuji sensitivitas dengan meratakan suspensi mikroba tersebut pada permukaan medium agar. Piringan antibiotik diletakkan di atas medium tersebut dan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 19-24 jam (Jawetz dkk., 2007).

2. Cara sumuran

Suspensi mikroba diratakan pada medium agar, kemudian agar tersebut dibuat sumuran dengan garis tengah tertentu menurut kebutuhan. Larutan

antibiotik yang digunakan diteteskan ke dalam sumuran. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Dibaca hasilnya, seperti pada cara Kirby-Bauer (Jawetz dkk., 2007).

3. Cara Pour Plate

Setelah dibuat suspensi kuman dengan larutan BHI sampai konsentrasi standar, lalu diambil satu mata ose dan dimasukkan ke dalam 4 ml agar base 1,5% dengan suhu 50°C. Suspensi kuman tersebut dibuat homogen dan dituang pada medium agar Mueller Hinton. Setelah beku, kemudian dipasang disk antibiotik (diinkubasi 15-20 jam pada suhu 37°C) dibaca dan disesuaikan dengan standar masing-masing antibiotik (Jawetz dkk., 2007).

Berdasarkan sifat selektif toksisitasnya, terdapat antimikroba yang bersifat menghambat dan membunuh mikroba. Kadar minimal yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroba atau membunuhnya, masing-masing dikenal sebagai kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimum (KBM). Antimikroba tertentu aktivitasnya dapat meningkat dari mikrobaostatik menjadi mikrobasidal bila kadar antimikrobanya ditingkatkan melebihi KHM (Ganiswarna, 2003).

Davis Stout dalam Ardiansyah (2005) mengemukakan bahwa ketentuan kekuatan antimikroba adalah sebagai berikut: diameter hambatan 20 mm atau lebih berarti sangat kuat, diameter hambatan 10-20 mm berarti kuat, 5-10 mm berarti sedang dan diameter hambatan 5 mm atau kurang berarti lemah. Menurut Greenwood (1995), beberapa faktor yang dapat memengaruhi ukuran zona penghambatan dan harus dikontrol adalah:

- a. Konsentrasi mikrobia pada permukaan medium yaitu semakin tinggi konsentrasi mikrobia maka zona penghambatan akan semakin kecil.
- b. Kedalaman medium pada cawan petri yaitu semakin tebal medium pada cawan petri maka zona penghambatan akan semakin kecil.
- c. Nilai pH dari medium karena beberapa antibiotika bekerja dengan baik pada kondisi asam dan beberapa basa kondisi alkali atau basa.
- d. Kondisi aerob atau anaerob karena beberapa antimikroba kerja terbaiknya pada kondisi aerob dan yang lainnya pada kondisi anaerob.

