

## BAB 2

### TINJAUAN PUSTAKA

#### 2.1 *Candida albicans*

*Candida albicans* (*C. albicans*) merupakan jamur patogen oportunistik yang tidak berbahaya di saluran pencernaan namun dapat menjadi patogen oportunistik untuk pasien *immunocompromised* atau individu yang memiliki imunologi yang lemah. *Candida albicans* berupa suatu ragi lonjong, bertunas, gram positif, berukuran 2-3 x 3-6  $\mu\text{m}$  yang memanjang menyerupai hifa (*pseudohifa*). *Candida albicans* membentuk *pseudohifa* ketika tunas-tunas terus tumbuh tetapi gagal melepaskan diri, menghasilkan rantai sel-sel memanjang yang terjepit atau tertarik pada septasi diantara sel (Samaranayake, 2007).

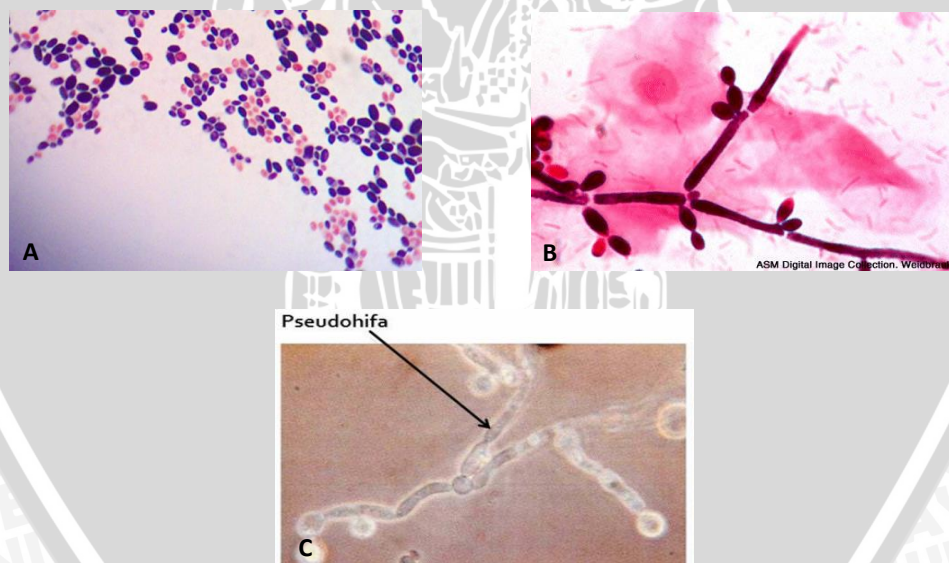
##### 2.1.1 Klasifikasi *Candida albicans*

Taksonomi *Candida albicans* menurut C. P. Robin Berkhout 1923 tampak pada Tabel 2.1 (Annaissie *et al.*, 2009).

**Tabel 2.1 Taksonomi *Candida albicans* (Anaissie *et al.*, 2009)**

Kingdom	Fungi
Filum	<i>Ascomycota</i>
Subfilum	<i>Saccharomycotina</i>
Kelas	<i>Saccharomycetes</i>
Ordo	<i>Saccharomycetales</i>
Familia	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genus	<i>Candida</i>
Spesies	<i>Candida albicans</i>

*Candida albicans* termasuk dalam Kingdom Fungi yaitu organisme eukariotik yang bersel tunggal atau banyak tanpa memiliki klorofil serta memiliki dinding sel yang tersusun atas kitin. *Candida albicans* bersifat dimorfik, yaitu dapat menghasilkan hifa sejati selain ragi dan *pseudohifa*. Sel-sel ragi berbentuk bulat sampai oval dan mudah terpisah dari satu sama lain. Hifa sejati berbentuk panjang dengan sisi paralel dan tidak ada konstriksi yang jelas antar sel. *Pseudohifa* tersusun memanjang, berbentuk elips yang tetap menempel satu sama lain pada bagian septa yang berkonstriksi dan biasanya tumbuh dalam pola bercabang yang berfungsi untuk mengambil nutrisi yang jauh dari sel induk atau koloni (Samaranayake, 2007). Modifikasi bentuk dari *Candida albicans* dapat dilihat pada Gambar 2.1.



**Gambar 2.1** Modifikasi bentuk *Candida albicans* pada media *Yeast Extract Pepton Dextrose* pH 6 suhu 30°C (Sudbery, 2011)

Keterangan: A: Bentukan ragi. B: Bentukan hifa sejati. C: Bentukan *pseudohifa*.

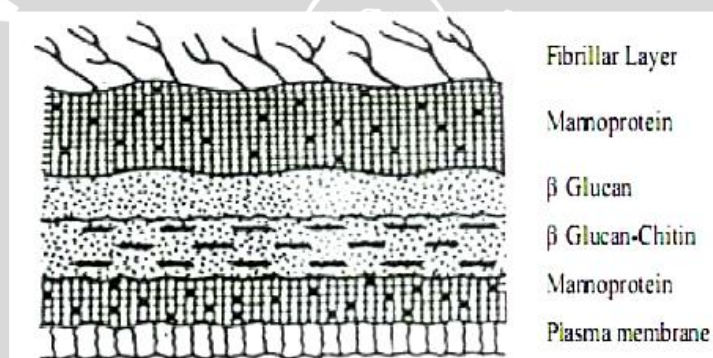
Populasi *Candida albicans* yang diisolasi dari rongga mulut mencapai 45% pada *neonatus*, 45%-65% pada anak-anak yang sehat, 30-45% pada orang dewasa yang sehat, 50-65% pada orang yang



menggunakan gigi tiruan, 65-88% pada orang dengan fasilitas perawatan yang minim, 90% pada pasien leukimia akut, dan 95% pada pasien HIV (Kaur *et al.*, 2014).

### 2.1.2 Morfologi *Candida albicans*

*Candida albicans* mempunyai struktur dinding sel yang kompleks dan dinamis, tebalnya 100-400 nm. Menurut Segal & Bavin (1994), dinding sel *Candida albicans* terdiri dari lima lapisan yang berbeda, yaitu mannoprotein,  $\beta$ -Glucan,  $\beta$ -Glucan-Chitin, mannoprotein, dan membran plasma. Hal ini dapat dilihat pada Gambar 2.2.



Gambar 2.2 Struktur Dinding Sel *Candida albicans* (Segal & Bavin, 1994)

Komposisi primer *Candida albicans* terdiri dari berbagai polisakarida seperti glukana, mannan, dan khitin. Glukan dan mannan berfungsi memberi struktur sel, sedangkan khitin berperan dalam membentuk antigen utama organisme (Segal & Bavin, 1994).

Lapisan luar dinding sel *Candida albicans* terdiri dari mannoprotein terglykosilasi kuat, yang berasal dari permukaan sel. Lapisan ini terlibat dalam pengenalan antar sel (*cell to cell recognition events*), menentukan sifat permukaan sel dan berperan penting dalam interaksi dengan hospes. Mannoprotein ini mewakili 30-40% dari total polisakarida dinding sel dan menentukan sifat permukaan sel. Lapisan dalam terdiri dari glukana dan

khitin. Glukan ini merupakan komponen utama *Candida albicans*, meliputi sekitar 50—60% berat dinding selnya. Meskipun khitin hanya meliputi 1—10% berat dinding selnya, zat ini merupakan konstituen dinding sel *Candida albicans* yang penting. Khitin terdistribusi pada septa atau pembatas antara bagian sel yang terpisah, dan cincin antara sel induk dan tunasnya (blastospora). Kekuatan mekanis dinding sel *Candida albicans* ditentukan oleh lapisan dalam ini. Selain glukan, mannan, dan khitin, dinding sel *Candida albicans* juga terdiri atas protein sekitar 6-25% dan lipid sekitar 1-7% (Gow & Hube, 2012).

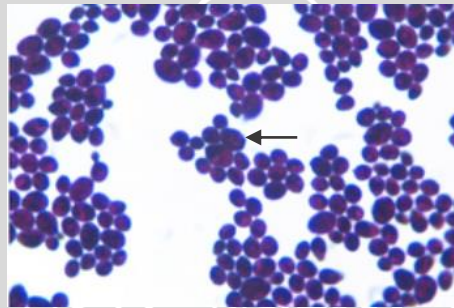
Membran sel *Candida albicans* seperti sel eukariotik lainnya terdiri dari lapisan fosfolipid ganda. Membran protein ini memiliki aktifitas enzim seperti mannan sintase, khitin sintase, glukan sintase, ATPase, dan protein yang mentransport fosfat. Terdapatnya membran sterol pada dinding sel memegang peranan penting sebagai target anti mikotik dan kemungkinan merupakan tempat bekerjanya enzim-enzim yang berperan dalam sintesis dinding sel. Mitokondria pada *Candida albicans* merupakan pembangkit daya sel. Dengan menggunakan energi yang diperoleh dari penggabungan oksigen dengan molekul-molekul makanan, organel ini memproduksi ATP. *Candida albicans* membutuhkan senyawa organik sebagai sumber karbon dan sumber energi untuk pertumbuhan dan proses metabolismenya. Unsur karbon ini dapat diperoleh dari karbohidrat. Vakuola berperan dalam sistem pencernaan sel, sebagai tempat penyimpanan lipid dan granula polifosfat. Mikrotubul dan mikrofilamen berada dalam sitoplasma. Pada *Candida albicans*



mikrofilamen berperan penting dalam terbentuknya perpanjangan hifa (Mayer *et al.*, 2013).

### 2.1.3 Identifikasi *Candida albicans*

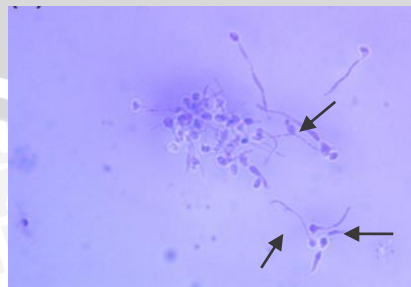
Identifikasi jamur *Candida albicans* dilakukan untuk memastikan kemurnian *Candida albicans*. Identifikasi dilakukan dengan uji pewarnaan gram dan uji *germinating tube*. Jamur *Candida albicans* diidentifikasi dengan pewarnaan gram dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Pada pengamatan didapatkan sel ragi berwarna ungu yang menunjukkan sifat gram positif yang tampak pada Gambar 2.3.



**Gambar 2.3 Pewarnaan Gram *Candida albicans* perbesaran 1000x (Mirzezo, 2015)**

Ket: tanda panah menunjukkan bentuk *budding cell* (sifat gram positif)

Uji *germinating tube* dilakukan untuk membedakan spesies *Candida albicans* dengan spesies *Candida* lainnya. Dengan uji *germinating tube*, didapatkan gambaran pseudohifa memanjang yang hanya didapati pada *Candida albicans* (Santoso dkk., 2010). Hal ini tampak pada Gambar 2.4



**Gambar 2.4 Uji *Germinating Tube* *Candida albicans* perbesaran 400x (Mirzezo, 2015)**

Ket: tanda panah menunjukkan gambaran pseudohifa

#### 2.1.4 Karakteristik *Candida albicans*

*Candida albicans* dapat tumbuh pada variasi pH yang luas, tetapi pertumbuhannya akan lebih baik pada pH antara 4,5-6,5. Jamur ini dapat tumbuh dalam perbenihan pada suhu 28°C-37°C dan merupakan organisme anaerob fakultatif yang mampu melakukan metabolisme sel baik dalam suasana anaerob maupun aerob. Pada kondisi anaerob, *Candida albicans* mempunyai waktu pertumbuhan yang lebih panjang yaitu 248 menit dibandingkan dengan kondisi pertumbuhan aerob yang hanya 98 menit. Walaupun *Candida albicans* tumbuh baik pada media padat tetapi kecepatan pertumbuhan lebih tinggi pada media cair dengan digoyang pada suhu 37°C. Pertumbuhan juga lebih cepat pada kondisi asam dibandingkan dengan pH normal atau alkali (Brooks *et al.*, 2013).

Pada media *Sabaroud Dextrose Agar* atau *glucose-yeast extract-peptone water*, *Candida albicans* berbentuk bulat atau oval yang biasa disebut dengan bentuk khamir dengan ukuran (3,5-6) x (6-10) µm. Koloni berwarna krem, agak mengkilat dan halus. Kemampuan *Candida albicans* untuk tumbuh baik pada suhu 37°C memungkinkannya untuk tumbuh pada sel hewan dan manusia, serta bentuknya yang dapat berubah menjadi bentuk khamir dan filamen sangat berperan dalam proses infeksi ke tubuh inang (Kusumaningtyas, 2013).

#### 2.1.5 Patogenesis *Candida albicans*

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. Bagian pertama dari *Candida albicans* yang berinteraksi



dengan sel inang adalah dinding sel. Dinding sel *Candida albicans* terdiri dari lima lapisan dari luar ke dalam adalah mannoprotein,  $\beta$ -glucan,  $\beta$ -glucan-chitin, mannoprotein, dan membran plasma. Perlekatan lapisan dinding sel dengan sel inang terjadi karena mekanisme kombinasi spesifik (interaksi antara ligand dan reseptor) dan nonspesifik (kutub elektrostatis dan ikatan van der Waals) yang kemudian menyebabkan serangan *Candida albicans* ke berbagai jenis permukaan jaringan (Mayer *et al.*, 2013).

Ada tiga macam interaksi yang mungkin terjadi antara sel *Candida albicans* dengan sel epitel inang yaitu interaksi protein-protein, interaksi *lectin-like*, dan interaksi yang belum diketahui. Interaksi protein-protein terjadi ketika protein pada permukaan *Candida albicans* mengenali ligand protein atau peptida pada sel epitelium atau endothelium. Interaksi *lectin-like* adalah interaksi ketika protein pada permukaan *Candida albicans* mengenali karbohidrat pada sel epitelium atau endothelium dan. Interaksi yang belum diketahui adalah ketika komponen *Candida albicans* menyerang ligand permukaan epitelium atau endothelium tetapi komponen dan mekanismenya belum diketahui dengan pasti (Naglik *et al.*, 2011).

Mekanisme perlekatan sendiri sangat dipengaruhi oleh keadaan sel tempat dinding sel *Candida albicans* melekat, mekanisme invasi ke dalam mukosa dan sel epitelium serta reaksi adhesi tertentu yang mempengaruhi kolonisasi dan patogenitas *Candida albicans*. Perlekatan dan kontak fisik antara *Candida albicans* dan sel inang selanjutnya mengaktifasi *mitogen activated protein kinase* (Map-kinase). Protein

kinase tersebut merupakan bagian dari jalur integritas yang diaktivasi oleh stress pada dinding sel (tempat *Candida albicans* dan sel host melakukan kontak). Map-kinase juga diperlukan untuk pertumbuhan hifa *invasive* dan perkembangan biofilm (Naglik *et al.*, 2011).

Tahap setelah perlekatan adalah invasi. Dengan menggunakan metode sitokimia, hasil menunjukkan bahwa selama 48 jam *Candida albicans* berhasil menginvasi dan pemeriksaan histopatologi menunjukkan adanya ciri patologis akibat invasi. Hifa *Candida albicans* melakukan penetrasi ke dalam permukaan epitelium terutama pada *cell junction* bersamaan dengan internalisasi sel khamir. Studi dengan SEM (*Scanning Elektron Mikroskop*) menunjukkan adanya lubang pada sel epitelium terutama pada tempat hifa menginvasi sel. Invasi yang ditandai dengan kolonisasi dan pembentukan hifa infeksiif tersebut dipercepat dengan keberadaan serum atau saliva dalam lingkungannya (Mayer *et al.*, 2013).

Untuk menghindari dari sistem kekebalan sel inang, *Candida albicans* membentuk biofilm untuk membentuk komunitasnya dan untuk melindungi dirinya. Berkembangnya biofilm biasanya seiring dengan bertambahnya infeksi klinis pada sel inang sehingga biofilm ini dapat menjadi salah satu faktor virulensi dan resistensi. Pembentukan biofilm dapat dipacu dengan keberadaan serum dan saliva dalam lingkungannya. Faktor lain yang mempengaruhi pembentukan biofilm *Candida albicans* diantaranya adalah ketersediaan udara. Ketersediaan udara akan mendukung pembentukan biofilm. Pada kondisi anaerob, *Candida albicans* dapat membentuk hifa tetapi tidak mampu membentuk biofilm (Hendriques, 2007).



Pembentukan biofilm *Candida albicans* dimulai dengan perlekatan sel *Candida albicans* pada sel inang yang berlangsung antara 0-2 jam. Proses tersebut diikuti dengan germinasi dan pembentukan mikrokoloni (2-4 jam), kemudian diteruskan dengan pembentukan hifa (4-6 jam). Benang-benang hifa tersebut membentuk monolayer (6-8 jam) yang akan berproliferasi (8-24 jam) dan mengalami maturasi (24-48 jam) (Kusumaningtyas, 2013).

## 2.2 Srikaya (*Annona squamosa*)

### 2.2.1 Klasifikasi Tumbuhan

Taksonomi tanaman srikaya dalam sistematika tumbuhan menurut Sambamurty (2010) tampak pada Tabel 2.2.

**Tabel 2.2 Taksonomi Srikaya (*Annona squamosa*) (Sambamurty, 2010)**

Kingdom	Plantae
Divisi	<i>Spermatophyta</i>
Subdivisi	<i>Angiospermae</i>
Kelas	<i>Dicotyledoneae</i>
Ordo	<i>Ranales</i>
Familia	<i>Annonaceae</i>
Genus	<i>Annona</i>
Spesies	<i>Annona squamosa L.</i>

Tanaman srikaya termasuk dalam Kingdom Plantae yaitu organisme eukariotik multiseluler yang mempunyai dinding sel dan klorofil. Tanaman srikaya berbentuk semak sampai pohon yang tingginya dapat mencapai 6 meter dengan umur hingga 20 tahun. Hal ini tampak

pada Gambar 2.5. Tanaman srikaya sangat tahan terhadap kekeringan namun perlu cukup air untuk perkembangan buahnya (Sunarjono, 2012).



**Gambar 2.5 Tanaman Srikaya (*Annona squamosa*) (Rebin & Karsinah, 2015)**

Batang srikaya berukuran kecil dengan jumlah percabangan sedikit sehingga tidak sesuai untuk tanaman pelindung. Bentuk daun srikaya mirip panah dengan panjang 2-3 kali lebarnya, sekitar 2,5-7,5 cm. Ujung daun sangat runcing, berwarna hijau tua, urat daun menonjol jelas, dan umumnya terletak agak melengkung ke bawah. Bau daun srikaya spesifik tetapi tidak menyengat seperti daun sirsak. Akar srikaya agak dalam, dapat mencapai 1-2 meter dan jumlah percabangan akarnya tidak banyak. Bunga srikaya berbentuk bulat berujung runcing, berukuran kecil, serta terletak tunggal atau berkelompok berhadapan dengan letak daun.

Daun mahkota panjang bagian luar berjumlah tiga helai, berukuran 2-2,5 cm, dan berwarna hijau. Sementara warna pangkal daun mahkota berwarna ungu. Mahkota bagian dalam sangat pendek sehingga hampir tidak jelas. Bakal buah srikaya berbentuk bulat telur seperti ginjal. Buah tersebut terdiri dari beberapa segmen yang bersatu (agregat) yang membentuk buah semu (*pseudocarp*). Permukaan kulit buah benjol-benjol (tuberkulat) dengan warna kuning kehijauan yang bertepung putih.



Jumlah bijinya sangat banyak serta berwarna hitam kecoklatan (Sunarjono, 2012).

Buah dapat dipanen saat berumur 3,5-4 bulan setelah bunga mekar (anthesis). Di dataran tinggi, buah matang lebih lambat, yaitu 4-5 bulan setelah bunga mekar. Adapun ciri buah matang diantaranya benjolan meregang, tepung menebal, warna agak kekuningan, dan aroma harum telah muncul (Baurekso, 2011).

## 2.2.2 Kandungan Kimia Srikaya

Daun srikaya mengandung senyawa *alkaloid* (*Annonain*, *Retikulin*), mirisil alkohol senyawa *polifenol*, *flavonoid*, *leukosianidin*, asam kafeat, asam fumarat, tannin (pada daun buah muda), serta acetogenins (*Annonacin-A*, *Skuamosten-A*, *Neoannonin*, *Squamocin-I*, *Squamocin-K*, *Squamocin-N*, *Squamocin-E*, *Squamocin*, *Annonin-III* (metrilin), *Squamocin-B*, *Squamocin-D*, *Squamocin-F*, *Squamostatine-A*, *Squamostatine-D*, *Squamostatine-E*). Buah srikaya mengandung protein, kalsium, fosfor, gula, vitamin A, vitamin C, asam amino. Biji srikaya mengandung selulosa, amilum, lemak, protein, gula, resin, minyak lemak, bahan beracun, dan *acetogenins*. Akar dan kulit batang srikaya mengandung senyawa borneol, kamper, terpen, alkaloid annonain, *acetogenins* (M. Gowdhami *et al.*, 2014).

### 2.2.2.1 Acetogenins

*Acetogenins* merupakan senyawa aktif dalam tanaman srikaya (*Annona squamosa*) dan paling banyak terdapat dalam daun srikaya.

Senyawa ini berperan penting sebagai anti oksidan dan anti inflamasi terhadap sel-sel abnormal pada tubuh. *Acetogenins* adalah senyawa

*polyketides* dengan struktur 30–32 rantai karbon tidak bercabang yang terikat pada gugus *5-methyl-2-furanone* (Luciana, 2010).

*Acetogenins* adalah salah satu kandungan dari daun srikaya yang bersifat inhibitor kompleks *nikotinamida adenosine dinukleotida hidrogen* (NADH)–*ubiquinone oxidoreductase* (kompleks I) pada sistem transpor elektron mamalia dan serangga. Apabila senyawa ini kontak atau masuk ke dalam tubuh maka akan menghalangi ikatan enzim NADH dengan sitokrom *c-reduktase* dan sitokrom kompleks sub unit I yang berada di dalam mitokondria. Hal ini akan menonaktifkan kemampuan sel untuk menghasilkan *adeno trifosfat* (ATP) melalui jalur oksidatif dan akhirnya memaksa sel ke apoptosis atau nekrosis (Qayed *et al.*, 2015).

Senyawa ini dengan cara selektif menyerang sel yg tumbuh abnormal dan yang membutuhkan banyak energi (ATP). Sel-sel normal yg perlu energi relatif rendah dalam pertumbuhannya tidak menjadi target dari senyawa *acetogenins*. Selain memiliki manfaat anti oksidan dan anti inflamasi, senyawa *acetogenins* juga memiliki manfaat sebagai anti diabetes, anti bakteri, serta anti fungi. Kandungan dari senyawa *acetogenins* yang memiliki manfaat anti fungi adalah *Squamocin*, *Squamocin G*, dan *squamostatin-A* (Dang *et al.*, 2011).

### 2.3 Kelainan yang ditimbulkan *Candida albicans*

Salah satu kelainan di rongga mulut yang ditimbulkan oleh jamur



*Candida albicans* adalah *oral candidiasis*. *Oral candidiasis* merupakan infeksi oportunistik berupa lesi merah dan lesi putih di dalam rongga mulut yang disebabkan oleh pertumbuhan yang berlebihan atau infeksi rongga mulut dari jamur *Candida*. Keadaan ini dapat menandakan adanya penyakit sistemik, seperti diabetes melitus dan keadaan *immunocompromised*. *Oral candidiasis* pertama kali dikenalkan oleh Hipocrates pada tahun 377 SM, yang melaporkan adanya lesi *oral* yang kemungkinan disebabkan oleh genus *Candida*. Beberapa spesies genus *Candida* penyebab *oral candidiasis*, yaitu *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, *Candida parapsilosis*, *Candida dubliniensis*, *Candida stellatoidea*, dan *Candida lusitanae*. Dari sembilan spesies *Candida* tersebut, 80% spesies yang ditemukan dari hasil isolasi *oral candidiasis* adalah *Candida albicans*, *Candida glabrata*, dan *Candida tropicalis* (Lewis & Jordan, 2012).

Pertumbuhan yang berlebihan dari jamur *Candida* dapat menyebabkan ketidaknyamanan pada rongga mulut, perubahan sensasi rasa, pertumbuhan esofagus yang berlebih sehingga mengakibatkan kurangnya nutrisi, serta masa pemulihan yang lama. Pada pasien yang *immunocompromised*, infeksi dapat menyebar melalui pembuluh darah atau saluran pencernaan bagian atas yang dapat menyebabkan infeksi berat dengan angka kematian yang signifikan. *Candidiasis* yang menyebar secara sistemik dapat menyebabkan kematian hingga 71%-79% (Williams & Lewis, 2011).

*Oral candidiasis* dapat menyerang semua usia dan jenis kelamin, baik pria maupun wanita. Selain disebabkan oleh pertumbuhan berlebih maupun infeksi dari *Candida albicans*, terdapat faktor predisposisi dari *oral candidiasis*, yaitu hilangnya integritas dari mukosa rongga mulut; ulserasi epitel rongga mulut yang dihasilkan dari gigi tiruan yang tidak pas; setelah kemoterapi anti kanker atau radioterapi kepala dan leher yang memungkinkan *Candida* untuk menempel pada sel epitel yang kemudian berpenetrasi ke mukosa dan menyebabkan infeksi; merokok berat sehingga menyebabkan mukosa rongga mulut rentan terhadap perkembangan infeksi *Candida*; xerostomia yang menyebabkan penurunan komponen anti fungi di saliva dan penurunan jumlah saliva sehingga meningkatkan perkembangan *Candida*; kortikosteroid lokal melalui *immunosuppression* lokal; HIV/AIDS; antibiotik spektrum luas dapat meningkatkan perkembangan *oral candidiasis* dengan cara mengganggu lingkungan dalam rongga mulut; faktor diet seperti kurangnya nutrisi, zat besi, kekurangan vitamin, dapat berpengaruh pada mukosa rongga mulut serta mendukung perkembangan *oral candidiasis*; kelainan endokrin, seperti diabetes melitus, penyakit maligna, dan sebagainya (Lewis & Jordan, 2012).

## 2.4 Uji Kepekaan Jamur Terhadap Anti Fungi secara *in vitro*

### 2.4.1 Metode Dilusi

Metode dilusi digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) secara *in vitro*. Pada tes Kadar Hambat Minimum (KHM), sebuah rangkaian dilusi (*series of*



*dilution*) dari agen antifungi disiapkan di tabung dan di inokulasi dengan ukuran standard inoculum dari uji organisme. Setelah 24 jam diinkubasi dengan temperatur 37°C, dilusi tertinggi dimana tidak tampak pertumbuhan fungi disebut Kadar Hambat Minimum (KHM). Tes Kadar Hambat Minimum (KHM) dapat digunakan untuk menentukan konsentrasi Kadar Bunuh Minimum (KBM), dimana konsentrasi terendah yang dapat membunuh fungi. Terdapat dua macam uji dilusi, yaitu:

#### **2.4.1.1. Dilusi Tabung**

Cara ini digunakan untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM) dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari obat anti mikroba. Prinsip dari metode dilusi ini adalah memasukkan sejumlah zat anti mikroba ke dalam medium sel mikroba yang akan diuji. Medium akhirnya diinokulasi dengan mikroba yang diuji dan diinkubasi pada suhu 36<sup>0</sup>-37<sup>0</sup>C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah anti mikroba pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM dari anti mikroba. Konsentrasi terendah anti mikroba pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dari anti mikroba (Brooks *et al.*, 2013).

#### **2.4.1.2 Dilusi Agar**

Metode dilusi agar memiliki prinsip yang sama dengan dilusi tabung, namun yang membedakan adalah pada dilusi agar menggunakan medium padat. Anti mikroba dicampurkan ke

dalam cawan petri berisi agar, kemudian agar dibiarkan mengeras dan disimpan pada *refrigerator* pada suhu 5°C hingga siap untuk digunakan. Kemudian inokulum mikroba diteteskan pada agar sebanyak 0,001 ml menggunakan pipet. Inkubasi cawan petri pada suhu 35°C selama 16-18 jam dan kemudian dapat dilihat hasilnya terdapat pertumbuhan mikroba atau tidak (Forbers *et al.*, 2007).

Kelebihan dari pengujian dengan metode dilusi agar adalah pengujian metode ini dapat digunakan sebagai referensi untuk mengevaluasi secara akurat dibandingkan dengan metode pengujian lainnya. Disamping itu, pengujian yang berkelanjutan dari sejumlah isolat yang hanya menggunakan sedikit obat lebih efisien dan lebih mudah mendeteksi jika terjadi kontaminasi (Cavalieri *et al.*, 2006).

#### 2.4.2 Metode Difusi

Metode yang paling luas digunakan adalah uji difusi cakram. Cakram kertas filter yang mengandung sejumlah tertentu anti mikroba ditempatkan di atas permukaan medium padat yang telah diinokulasi organisme uji. Setelah inkubasi, diameter zona jernih inhibisi di sekitar cakram diukur sebagai ukuran kekuatan inhibisi anti mikroba melawan organisme uji (Brooks *et al.*, 2013).

#### 2.5 Metode Ekstraksi

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan zat aktif dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Salah satu



metode ekstraksi yang banyak dipakai adalah ekstraksi maserasi. Ekstraksi secara maserasi merupakan proses perendaman sampel dengan pelarut organik yang digunakan pada suhu ruangan. Proses ini sangat menguntungkan karena dengan perendaman sampel tumbuhan akan terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan di dalam dan di luar sel sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur waktu perendamannya. Pemilihan pelarut untuk proses maserasi akan memberikan efektivitas yang tinggi dengan memperhatikan kelarutan senyawa bahan alam pelarut tersebut (Mukhriani, 2014).

Metode ekstraksi maserasi dilakukan dengan cara memasukkan sampel yang sudah dihaluskan dengan suhu ruangan ke dalam bejana, kemudian dicampur dengan pelarut organik, ditutup terlindung dari cahaya untuk mencegah reaksi perubahan warna sambil diaduk setiap hari. Kemudian diperas dan ampasnya dimaserasi kembali dengan cairan pelarut. Ekstraksi diakhiri setelah pelarut tidak berwarna lagi, lalu dipindahkan ke dalam bejana tertutup, dibiarkan pada tempat yang tidak mendapat cahaya, setelah dua hari endapan dapat dipisahkan. Kerugian dari metode maserasi antara lain waktu yang diperlukan untuk mendapatkan hasil ekstrak sampel cukup lama, cairan pelarut yang digunakan lebih banyak, serta tidak dapat digunakan untuk bahan-bahan yang mempunyai tekstur keras seperti benzoin dan lilin (Agoes, 2007).