



**EFEK SIMPLISIA DAUN SIRSAK (*ANNONA MURICATA* LINN)
DALAM BENTUK NANOPARTIKEL SEBAGAI ANTIFUNGI
TERHADAP JAMUR *CANDIDA ALBICANS* SECARA *IN VITRO*
DENGAN METODE DILUSI TABUNG**

**SKRIPSI
UNTUK MEMENUHI PERSYARATAN
MEMPEROLEH GELAR SARJANA**

Oleh :

**RAHMAWATI ISNANINGRUM
145070400111005**

**PROGRAM STUDI SARJANA KEDOKTERAN GIGI
FAKULTAS KEDOKTERAN GIGI
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2018**



HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI

EFEK SIMPLISIA DAUN SIRSAK (*ANNONA MURICATA LINN*) DALAM BENTUK NANOPARTIKEL SEBAGAI ANTIFUNGI TERHADAP JAMUR *CANDIDA ALBICANS* SECARA *IN VITRO* DENGAN METODE DILUSI TABUNG



Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc
NIP. 195502011985032001

drg. Miftakhul Cahyati, Sp.PM
NIP.197708032010122001

HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI

EFEK SIMPLISIA DAUN SIRSAK (*ANNONA MURICATA LINN*) DALAM BENTUK NANOPARTIKEL SEBAGAI ANTIFUNGI TERHADAP JAMUR *CANDIDA ALBICANS* SECARA IN VITRO DENGAN METODE DILUSI TABUNG

Oleh :

Rahmawati Isnaningrum
145070400111005

Telah diujikan di depan Majelis Penguji pada
tanggal

Dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana dalam Bidang Kedokteran Gigi

Menyetujui,

Pembimbing I

Pembimbing II

Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc
NIP. 195502011985032001

drg. Miftakhul Cahyati, Sp.PM
NIP.197708032010122001

Mengetahui,
Ketua Program Studi Kedokteran Gigi
Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya

drg. Yuliana Ratna Kumala, Sp. KG
NIP. 198004092008122004

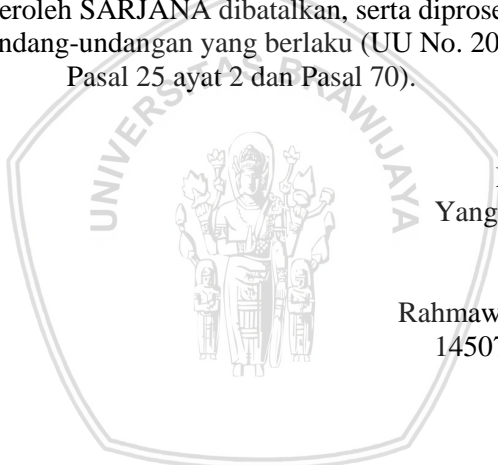
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

Saya menyatakan sebenar-benarnya bahwa sepanjang pengetahuan saya, di dalam naskah skripsi ini tidak terdapat karya ilmiah yang pernah diajukan oleh orang lain untuk memperoleh gelar akademik di suatu perguruan tinggi, dan tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis dikutip dalam naskah ini dan disebutkan dalam sumber kutipan dan daftar pustaka.

Apabila ternyata di dalam naskah skripsi ini dapat dibuktikan terdapat unsur-unsur plagiasi, saya bersedia skripsi ini digugurkan dan gelar akademik yang telah saya peroleh SARJANA dibatalkan, serta diproses sesuai dengan peraturan perundang-undangan yang berlaku (UU No. 20 Tahun 2003, Pasal 25 ayat 2 dan Pasal 70).

Malang,
Yang menyatakan,

Rahmawati Isnaningrum
145070400111005



KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan Skripsi dengan judul “Efek Simplisia Daun Sirsak (*Annona muricata Linn*) dalam Bentuk Nanopartikel sebagai Antifungi Terhadap Jamur *Candida Albicans* Secara *In Vitro* dengan Metode Dilusi Tabung”.

Penulis mengucapkan terima kasih yang tak terhingga sehubungan dengan selesainya Skripsi ini kepada:

1. drg. R. Setyohadi, MS selaku Dekan Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang.
2. drg. Yuliana Ratna Kumala, Sp. KG selaku Ketua Program Studi Sarjana kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya Malang.
3. Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc selaku pembimbing pertama yang dengan sabar membimbing dan senantiasa memberi semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
4. drg. Miftakhul Cahyati, Sp.PM selaku pembimbing kedua yang dengan sabar membimbing dan senantiasa memberi semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
5. Prof. Dr. dr. Sanarto Santoso, DTM & H., Sp.MK(K) selaku penguji yang senantiasa sabar dan memberikan masukan demi kebaikan skripsi ini.
6. Segenap anggota Tim Pengelola Skripsi.
7. Yang tercinta Bapak Pamuji Rochmad dan Ibu Supartini yang selalu memberikan dukungan moral dan spiritual terhadap penulis,
8. Bapak Ali dan segenap karyawan Laboratorium Mikrobiologi yang telah membantu saya dengan sabar dalam mengerjakan penelitian hingga selesai.
9. Sahabat tersayang, Vena, TC squad, PBL F, bidadari FKG serta teman-teman FKG UB 2014 atas semangatnya.
10. Seluruh pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan Skripsi ini yang tidak dapat penulis sebutkan satu per satu.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.

Akhir kata, semoga Skripsi ini dapat bermanfaat bagi umat khususnya untuk pengembangan ilmu pengetahuan di bidang Kedokteran Gigi.

Malang, 25 Juli 2018

Penulis



ABSTRAK

Rahmawati Isnaningrum. 2018. Efek Simplisia Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) dalam Bentuk Nanopartikel sebagai Antifungi terhadap Jamur *Candida albicans* secara *In Vitro* dengan Metode Dilusi Tabung. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc, (2) drg. Miftakhul Cahyati, Sp. PM.

Candida albicans merupakan salah satu penyebab dari kandidiasis oral. Terapi awal yang diberikan berupa pemberian antifungi golongan *azoles*, *polyenes*, dan *echinocandins*. Daun sirsak berpotensi sebagai antifungi karena mengandung zat aktif yang dapat menyebabkan kematian sel jamur. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) simplisia daun sirsak dalam bentuk nanopartikel sebagai antifungi terhadap jamur *Candida albicans* secara *in vitro* dengan metode dilusi tabung. Jenis penelitian ini adalah eksperimental *in vitro* dan rancangan *true experimental design post test control only*. Obyek perlakuan dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan yaitu simplisia daun sirsak dengan konsentrasi 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100%; 0 dan kontrol pembanding dengan klorheksidin glukonat 0,2%. Sampel yang digunakan adalah jamur *Candida albicans*. Sampel dan simplisia daun sirsak dengan berbagai konsentrasi dimasukkan dalam tabung-tabung lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C kemudian hasil inkubasi diambil 1 ose dari SDB dan diinokulasikan pada SDA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Penentuan Kadar Bunuh Minimum (KBM) didapatkan dari penghitungan jumlah koloni jamur. Hasil dari penelitian didapatkan bahwa Kadar Bunuh Minimum (KBM) simplisia daun sirsak tidak dapat ditentukan dan tidak berpotensi sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*.

Kata Kunci : *Candida albicans*, simplisia daun sirsak, nanopartikel, Kadar Bunuh Minimum (KBM).

ABSTRACT

Rahmawati Isnaningrum. 2018. *Effect of Simplicia Soursop Leaves (Annona muricata Linn) in the Form of Nanoparticles as Antifungi on Candida albicans In Vitro with Tube Dilution Method*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Dr. dr. Retty Ratnawati, M.Sc, (2) drg. Miftakhul Cahyati, Sp. PM.

Candida albicans is one of the causes of oral candidiasis. Initial therapy is given in the form of giving antifungi azoles, polyenes, and echinocandins. Soursop leaves have the potential as antifungals because they contain active substances that can cause fungal cell death. This study aims to determine the Minimum Kill Rate (MKR) of soursop leaf simplicia in the form of nanoparticles as an antifungal against fungi *Candida albicans in vitro* by tube dilution method. This type of research was experimental in vitro and the design of true experimental design post test control only. Treatment objects were divided into 8 treatment groups, namely soursop leaf simplicia with a concentration of 3.125%; 6.25%; 12.5%; 25%; 50%; 100%; 0 and control comparison with chlorhexidine gluconate 0.2%. The sample used was *Candida albicans*. Samples and simplicia of soursop leaves with various concentrations were put in tubes and then incubated for 24 hours at 37°C then the incubation results were taken from SDB and inoculated on SDA then incubated for 24 hours at 37°C. Determination of the Minimum Kill Rate (MKR) was obtained from the calculation of the number of fungal colonies. The results of the study found that the Minimum Kill Rate (MKR) of soursop leaf simplicia could not be determined and had no potential as an antifungal against *Candida albicans in vitro*.

Keyword : *Candida albicans*, soursop leaf simplicia, nanoparticles, Minimum Kill Rate (MKR).

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PERSETUJUAN SKRIPSI	ii
HALAMAN PENGESAHAN SKRIPSI	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
ABSTRAK	vii
ABSTRACT	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR GAMBAR.....	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xvii
DAFTAR ISTILAH, SIMBOL, DAN SINGKATAN.....	xviii
BAB 1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	5
1.3 Tujuan Penelitian	
1.3.1 Tujuan Umum.....	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat Penelitian	
1.4.1 Manfaat Akademik	6
1.4.2 Manfaat bagi Masyarakat.....	6
BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Kandidiasis oral	
2.1.1 Definisi.....	7
2.1.2 Gambaran Klinis	
2.1.2.1 Kandidiasis Oral Primer.....	7
2.1.2.2 Kandidiasis Oral Sekunder	12
2.1.3 Etiologi dan Patogenesis	16
2.1.4 Faktor Predisposisi	18

2.1.5	Diagnosis dan Temuan Laboratorium	18
2.1.6	Terapi	19
2.2	<i>Candida albicans</i>	22
2.2.1	Taksonomi	23
2.2.2	Morfologi.....	23
2.2.3	Faktor Virulensi.....	25
2.3	Sirsak (<i>Annona muricata</i> Linn)	
2.3.1	Taksonomi	25
2.3.2	Morfologi dan Persebaran Sirsak.....	25
2.3.3	Manfaat	27
2.3.4	Kandungan Tanaman Sirsak	27
2.3.4.1	Alkaloid	28
2.3.4.2	Tanin	30
2.3.4.3	Flayonoid	31
2.3.4.4	<i>Acetogenin</i>	33
2.4	Nanoteknologi.....	34
2.4.1	Nano Herbal	35
2.4.2	Keuntungan Nano Herbal	35
2.4.3	Teknik <i>High Energy Milling</i>	36

BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

3.1	Kerangka Konsep Penelitian	38
3.2	Penjelasan Konsep Penelitian	39
3.3	Hipotesis Penelitian.....	40

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1	Rancangan Penelitian.....	41
4.2	Tempat dan Waktu Penelitian	41
4.3	Sampel Penelitian.....	41
4.3.1	Pengulangan Sampel.....	42
4.3.2	Variabel Penelitian.....	42
4.4	Definisi Operasional	43
4.5	Alat dan Bahan	
4.5.1	Penyediaan Daun Sirsak	43
4.5.2	Alat dan Bahan Pembuatan Simplisia Daun Sirsak	44
4.5.3	Alat dan Bahan Pembuatan Nano Daun Sirsak.....	44

4.5.4	Alat dan Bahan Kultur, Identifikasi Jamur, dan Uji Efektivitas	44
4.6	Prosedur Penelitian	
4.6.1	Sterilisasi Alat.....	45
4.6.2	Persiapan Bahan.....	45
4.6.3	Pembuatan Simplisia Daun Sirsak	45
4.6.4	Pembuatan Nanopartikel Daun Sirsak	47
4.6.5	Identifikasi <i>Candida albicans</i>	48
4.6.6	Persiapan Suspensi Uji <i>Candida albicans</i>	49
4.6.7	Pembuatan Larutan Nanopartikel Daun Sirsak.....	50
4.6.8	Uji Efektivitas	51
4.7	Analisis Data	53
4.8	Skema Alur Penelitian	54

BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1	Hasil Identifikasi Jamur	
5.1.1	Hasil Pewarnaan Gram	55
5.1.2	Hasil Tes <i>Germinating Tube</i>	55
5.2	Hasil Pengolahan Simplisia Daun Sirsak Menjadi Nanopartikel.....	56
5.3	Uji Pendahuluan	
5.3.1	Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung (Uji Pertama).....	59
5.3.2	Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung (Uji Kedua).....	60
5.3.3	Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung (Uji Ketiga)	61
5.3.4	Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung (Uji Keempat).....	62
5.3.5	Uji Pendahuluan untuk Mencari Konsentrasi Asam Asetat	63
5.3.6	Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung dan Dilusi Agar (Uji Kelima)	65
5.4	Uji Pengulangan dan Hasil dengan Metode Dilusi Tabung	66
5.5	Analisa Data.....	69

5.5.1 Hasil Uji Normalitas dan Uji Homogenitas Varians Terhadap Simplisia Daun Sirsak.....	69
5.5.2 Analisis Hasil Perhitungan Jumlah Koloni Jamur Terhadap Simplisia Daun Sirsak.....	71
BAB 6	
PEMBAHASAN.....	77
BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	86
7.2 Saran	86
DAFTAR PUSTAKA.....	87
LAMPIRAN	96



DAFTAR TABEL

No.	Judul Tabel	Halaman
2.1	Taksonomi <i>Candida albicans</i>	23
2.2	Taksonomi <i>Annona muricata L.</i>	25
2.3	Hasil Pemantauan KLT Ekstrak Etanol Daun Sirsak.	28
5.1	Tabel Pengukuran Rata-Rata Diameter Simplisia Daun Sirsak (Setelah Proses <i>Millng</i> Pertama)	57
5.2	Tabel Pengukuran Rata-Rata Diameter Simplisia Daun Sirsak (Setelah Proses <i>Millng</i> Kedua)	58
5.3	Tabel Hasil Uji Pengulangan dengan Metode Dilusi Tabung	68
5.4	Hasil Uji Normalitas.....	70
5.5	Hasil Uji <i>Levene</i>	71
5.6	Hasil Uji <i>One Way ANOVA</i>	72
5.7	Hasil Uji <i>Post Hoc</i> dengan <i>Tukey HSD</i>	73
5.8	Hasil Uji Korelasi <i>Pearson</i>	74
5.9	Hasil Uji Regresi.....	75

DAFTAR GAMBAR

No.	Judul Gambar	Halaman
2.1	Kandidiasis Pseudomembran.....	7
2.2	Kandidiasis Eritematosa	8
2.3	Kandidiasis Hiperplastik.....	9
2.4	<i>Denture Stomatitis</i>	10
2.5	<i>Median Rhomboid Glossitis</i>	11
2.6	<i>Angular Cheilitis</i>	12
2.7	Kandidiasis Mukokutan Kronis pada Anak dengan Sindrom Imunodefisiensi	13
2.8	Kandidiasis Mukokutan Kronis pada Pasien <i>DiGeorge</i> <i>Syndrome</i>	15
2.9	Kandidiasis Eritematosa pada bagian tengah lidah pada Pasien <i>AIDS</i>	15
2.10	Patogenesis Awal Kandidiasis pada Permukaan Mukosa.....	17
2.11	Morfologi <i>Candida albicans</i>	24
2.12	Daun Sirsak (<i>Annona muricata L</i>).....	26
2.13	Prinsip Kerja <i>High Energy Milling</i>	36

5.1	Hasil Pewarnaan Gram pada <i>Candida albicans</i>	55
5.2	Hasil Tes <i>Germinating Tube</i>	56
5.3	Simplisia Daun Sirsak setelah Proses <i>Milling</i>	56
5.4	Grafik Distribusi Pengukuran Diameter Simplisia Daun Sirsak (setelah Proses <i>milling</i> Pertama)	57
5.5	Grafik Distribusi Pengukuran Diameter Simplisia Daun Sirsak (setelah Proses <i>milling</i> Kedua)	57
5.6	Hasil Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung 1	60
5.7	Hasil Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung 2	61
5.8	Hasil Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung 3	62
5.9	Hasil Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung 4	63
5.10	Hasil Uji Pendahuluan untuk Mencari Konsentrasi Asam Asetat (Uji Pertama)	64
5.11	Hasil Uji Pendahuluan untuk Mencari Konsentrasi Asam Asetat (Uji Kedua)	64
5.12	Hasil Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung 5	65
5.13	Hasil Uji Pengulangan dengan Metode Dilusi Tabung (sebelum Pengenceran)	66

5.14 Hasil Uji Pengulangan dengan Metode Dilusi Tabung (setelah Pengenceran) 67

5.15 Grafik Rerata Jumlah Koloni Jamur 68



DAFTAR LAMPIRAN

No.	Judul Lampiran	Halaman
Lampiran 1	Prosedur Penelitian.....	96
Lampiran 2	Determinasi Tanaman Sirsak.	99
Lampiran 3	Hasil Pengukuran Simplisia Daun Sirsak.....	100
Lampiran 4	Hasil Analisa Data.....	106



DAFTAR ISTILAH, SIMBOL, DAN SINGKATAN

C.	: <i>Candida</i>
KMK	: Kandidiasis Mukokutan Kronis
HIV	: <i>Human Immunodeficiency Virus</i>
AIDS	: <i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
ART	: <i>Antiretroviral Therapy</i>
PAS	: <i>Periodic Acid Schiff</i>
CFU	: <i>Colony-Forming Unit</i>
HEM-3ED	: <i>High Energy Milling-Ellipse 3D Motion</i>
KBM	: Kadar Bunuh Minimum
KHM	: Kadar Hambat Minimum
SDB	: <i>Sabouraud Dextrose Broth</i>
SDA	: <i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
DMSO	: <i>Dimethyl Sulfoxide</i>

EFEK SIMPLISIA DAUN SIRSAK (*Annona muricata Linn*) DALAM BENTUK NANOPARTIKEL SEBAGAI ANTIFUNGI TERHADAP JAMUR *Candida albicans* SECARA *IN VITRO* DENGAN METODE DILUSI TABUNG

Retty Ratnawati*, Miftakhul Cahyati, Rahmawati Isnaningrum*****

*Departemen Fisiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya

**Departemen Penyakit Mulut Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya

***Mahasiswa Program Studi Sarjana Kedokteran Gigi Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Brawijaya

ABSTRAK

Candida albicans merupakan salah satu penyebab dari kandidiasis oral. Terapi awal yang diberikan berupa pemberian antifungi golongan *azoles*, *polyenes*, dan *echinocandins*. Daun sirsak berpotensi sebagai antifungi karena mengandung zat aktif yang dapat menyebabkan kematian sel jamur. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui Kadar Bunuh Minimum (KBM) simplisia daun sirsak dalam bentuk nanopartikel sebagai antifungi terhadap jamur *Candida albicans* secara *in vitro* dengan metode dilusi tabung. Jenis penelitian ini adalah eksperimental *in vitro* dan rancangan *true experimental design post test control only*. Obyek perlakuan dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan yaitu simplisia daun sirsak dengan konsentrasi 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100%; 0 dan kontrol pembanding dengan klorheksidin glukonat 0,2%. Sampel yang digunakan adalah jamur *Candida albicans*. Sampel dan simplisia daun sirsak dengan berbagai konsentrasi dimasukkan dalam tabung-tabung lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C kemudian hasil inkubasi diambil 1 ose dari SDB dan diinokulasikan pada SDA kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Penentuan Kadar Bunuh Minimum (KBM) didapatkan dari penghitungan jumlah koloni jamur. Hasil dari penelitian didapatkan bahwa Kadar Bunuh Minimum (KBM) simplisia daun sirsak tidak dapat ditentukan dan tidak berpotensi sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*.

Kata Kunci : *Candida albicans*, simplisia daun sirsak, nanopartikel, Kadar Bunuh Minimum (KBM).

EFFECT OF SIMPLICIA SOURSOP LEAVES (*Annona muricata* Linn) IN THE FORM OF NANOPARTICLES AS ANTIFUNGI ON *Candida albicans* IN VITRO WITH TUBE DILUTION METHOD

ABSTRACT

Candida albicans is one of the causes of oral candidiasis. Initial therapy is given in the form of giving antifungi azoles, polyenes, and echinocandins. Soursop leaves have the potential as antifungals because they contain active substances that can cause fungal cell death. This study aims to determine the Minimum Kill Rate (MKR) of soursop leaf simplicia in the form of nanoparticles as an antifungal against fungi *Candida albicans in vitro* by tube dilution method. This type of research was experimental in vitro and the design of true experimental design post test control only. Treatment objects were divided into 8 treatment groups, namely soursop leaf simplicia with a concentration of 3.125%; 6.25%; 12.5%; 25%; 50%; 100%; 0 and control comparison with chlorhexidine gluconate 0.2%. The sample used was *Candida albicans*. Samples and simplicia of soursop leaves with various concentrations were put in tubes and then incubated for 24 hours at 37°C then the incubation results were taken from SDB and inoculated on SDA then incubated for 24 hours at 37°C. Determination of the Minimum Kill Rate (MKR) was obtained from the calculation of the number of fungal colonies. The results of the study found that the Minimum Kill Rate (MKR) of soursop leaf simplicia could not be determined and had no potential as an antifungal against *Candida albicans in vitro*.

Keywords : *Candida albicans*, soursop leaf simplicia, nanoparticles, Minimum Kill Rate (MKR).

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Penyakit infeksi dapat terjadi pada rongga mulut dengan berbagai macam penyebab salah satunya jamur *Candida*. Terdapat sekitar 30-40% *Candida* pada rongga mulut orang dewasa sehat, 45% pada neonatus, 45-65% pada anak-anak sehat, 50-65% pada pasien dengan gigi tiruan lepasan, 65-88% pada pasien yang mengonsumsi obat antibiotik jangka panjang, 90% pada pasien leukemia akut yang menjalani kemoterapi dan 95% pada pasien HIV/AIDS (Akpan *et al.*, 2002). *Candida* dilaporkan lebih sering ditemukan pada wanita, dan variasi musiman telah diamati dengan peningkatan selama bulan-bulan musim panas. Pasien rawat inap juga memiliki prevalensi *Candida* yang lebih tinggi (Greenberg *et al.*, 2008)

Kandidiasis oral adalah infeksi lokal yang terjadi pada membran mukosa rongga mulut yang disebabkan oleh jamur *Candida albicans* pada sebagian besar kasus, namun dapat pula disebabkan oleh spesies lain seperti *C. glabrata*, *C. tropicalis*, dan *C. krusei* (Pankhurst, 2009). *Candida sp.* merupakan mikroorganisme komensal dan bagian dari flora normal rongga mulut yang populasinya sekitar 30-50%, dan dapat menyebabkan infeksi oportunistik dalam rongga mulut ketika ada faktor predisposisi (Mariappan *et al.*, 2009).

Terapi awal pasien kandidiasis oral berupa pemberian antifungi golongan *azoles*, *polyenes*, dan *echinocandins* (Abad,

2015). Beberapa antifungi sudah tidak efektif lagi digunakan karena faktor resistensi. Penelitian Mohamadi *et al.*, (2015) menunjukkan bahwa 150 isolat *C. albicans* telah resisten terhadap *fluconazole*, *ketoconazole*, *itraconazole*, *clotrimazole*, *posaconazole*, *variconazole*, dan nistatin masing-masing sebanyak 76%, 72%, 62%, 55%, 7%, 6%, dan 1%. Oleh karena itu, diperlukan penelitian lebih lanjut sebagai langkah awal yang nantinya dapat menjadi alternatif antifungi kandidiasis oral yang lebih poten salah satunya berasal dari daun sirsak.

Sirsak (*Annona muricata* Linn), berasal dari keluarga Annonaceae, telah lama digunakan sebagai obat antibakteri, antitumor, antifungi, antikonvulsan, penenang, antiparasit, dan *cardiodepresant* (Taylor, 2002). Daun sirsak mengandung senyawa golongan alkaloid, flavanoid, tanin (Dian *et al.*, 2016), dan acetogenin (Wu *et al.*, 1995). Menurut Chabner *et al* (2001) alkaloid diketahui bekerja secara spesifik pada siklus pembelahan sel dengan menghambat pembelahan mitosis. Tanin mempunyai efek antimikroba dengan cara memprepitasi protein melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan inaktivasi fungsi materi genetik sehingga sel tidak dapat terbentuk. Flavonoid diketahui dapat menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Acetogenin bekerja dengan cara menghambat sintesis ATP (*adenosine triphosphat*) dengan mengganggu komplek I mitokondria dan sebagai inhibitor kuat NADH oksidase (*nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase*) dari membran plasma sel jamur. Sintesis ATP yang

terhambat akan mengakibatkan pertumbuhan *C. albicans* juga terhambat (Dang *et al.*, 2011). Ada lebih dari 50 jenis annonaceous acetogenin terkandung pada tanaman sirsak dan 18 diantaranya ditemukan pada daun sirsak (Puspitasari *et al.*, 2016).

Simplisia adalah bahan alam yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan tidak lebih dari 60°C (BPOM, 2014). Kelebihan sediaan obat dari simplisia adalah penyediaan yang sederhana. Hal ini dapat meminimalisir efek samping yang mungkin ditimbulkan oleh penambahan bahan obat sintetik atau pelarut. Pada sediaan ekstrak, menentukan kandungan sisa pelarut menjadi penting. Tujuannya adalah memberikan jaminan bahwa selama proses hanya meninggalkan sisa pelarut dalam batas tertentu atau pada pelarut berbahaya seperti kloroform harus bernilai negatif (bebas dari sisa pelarut) (Emilan *et al.*, 2011).

Penelitian ini dilakukan berdasarkan dari penelitian-penelitian sebelumnya. Salah satu penelitian tersebut adalah penelitian Rohadi (2016) tentang aktivitas antimikosis ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* Linn). Hasil dari penelitian tersebut didapatkan bahwa ekstrak etanol daun sirsak dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* ATCC 10231 pada konsentrasi 15%, 30%, dan 60% yang ditunjukkan dengan terbentuknya daerah hambat/bening di sekitar sumuran yang berisi ekstrak etanol daun sirsak dengan diameter terbesar pada konsentrasi 60% sebesar 17,07 mm. Namun partikel yang digunakan pada penelitian-penelitian sebelumnya bukan merupakan partikel berskala nanometer. Perilaku

fisis dan kimiawi partikel berukuran nano berbeda dengan partikel mikroskopis. Perubahan ukuran partikel dapat menyebabkan strukturnya berubah, sehingga sifat fisika, kimia, dan bahkan biologi partikel tersebut juga berubah drastis bahkan berkebalikan. Selain itu, sifat magnetik, listrik, dan optis material menjadi unik dan tidak dapat diprediksi (Wipsar, 2012). Pemanfaatan partikel berskala nanometer sebagai *nanomedicine* dipercaya akan menjadi terobosan untuk mengatasi banyaknya kebutuhan klinis yang tidak terpenuhi saat ini dan masa depan (Tomellini *et al.*, 2006). Nanopartikel merupakan partikel koloid yang memiliki ukuran kurang dari 1 mikrometer. Nanopartikel memiliki beberapa keuntungan yaitu dapat memodifikasi karakteristik permukaan dan ukuran partikel sehingga obat dapat ditargetkan secara spesifik dengan selektivitas, efektivitas, dan keamanan yang tinggi. Selain itu pelepasan senyawa aktif dapat dikontrol sehingga meminimalisir efek samping dan obat dengan ukuran nanopartikel dapat diberikan dalam konsentrasi tinggi dikarenakan ukuran yang kecil dan kapasitas pemuatan yang tinggi (Dewandari *et al.*, 2013). Obat dalam bentuk nanopartikel direkomendasikan karena berbagai alasan seperti adanya efek samping pada formula yang dipasarkan saat ini, terdapat faktor ketidakpatuhan pasien karena pada formulasi yang tersedia dosis besar dan kurang efektif, formulasi yang ada tidak memiliki spesifitas target untuk berbagai penyakit kronis (Ansari *et al.*, 2012) dengan ukuran nanopartikel bioavailabilitas dan absorpsi bahan aktif dapat meningkat karena adanya peningkatan luas permukaan partikel dan kelarutan, selain itu partikel memiliki waktu tinggal yang lebih

lama karena diserap oleh mukosa usus (Dewandari *et al.*, 2013). Hal ini didukung oleh penelitian Dewandari *et al* (2013) yakni tentang peningkatan stabilitas penyimpanan enkapsulasi nanopartikel daun sirih merah (*Piper crocatum*). Selain itu, penelitian yang dilakukan oleh Rangkuti *et al* (2018) tentang uji efektivitas nanopartikel daun sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai penurun kadar kolesterol serum darah marmot (*Cavia cobaya*) menunjukkan bahwa pemberian nanopartikel daun sirih merah dapat memberikan efek penurunan kadar kolesterol yang tidak berbeda nyata dengan pemberian simvastatin.

Berdasarkan beberapa penjelasan di atas, maka diperlukan penelitian lebih lanjut tentang efek simplisia daun sirih (*Annona muricata L.*) dalam bentuk nanopartikel sebagai antifungi terhadap jamur *Candida albicans* secara *in vitro* dengan metode dilusi tabung, sehingga hasil penelitian tersebut diharapkan menjadi langkah awal yang nantinya dapat dimanfaatkan sebagai alternatif antifungi yang aman dan efektif bagi pasien kandidiasis oral.

1.2. Rumusan Masalah

Apakah simplisia daun sirih (*Annona muricata L.*) dalam bentuk nanopartikel memiliki efek sebagai antifungi terhadap jamur *Candida albicans* secara *in vitro* dengan metode dilusi tabung ?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui efek simplisia daun sirsak (*Annona muricata* L.) dalam bentuk nanopartikel sebagai antifungi terhadap jamur *Candida albicans* secara *in vitro* dengan metode dilusi tabung.

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui kadar bunuh minimum (KBM) simplisia daun sirsak (*Annona muricata*) dalam bentuk nanopartikel sebagai antifungi terhadap jamur *Candida albicans* secara *in vitro* dengan metode dilusi tabung.

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

Dapat dijadikan sebagai dasar teori untuk pengembangan penelitian selanjutnya di bidang kedokteran gigi, khususnya bidang mikrobiologi dan penyakit mulut mengenai antifungi terhadap *Candida albicans* yang lebih efektif dan aman.

1.4.2 Manfaat bagi Masyarakat

Apabila penelitian ini telah terbukti, akan dilakukan 6 tahapan riset sehingga setelah terbukti semua, diharapkan untuk bisa menjadi terapi komplementer infeksi *Candida albicans*.

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kandidiasis oral

2.1.1 Definisi

Candida albicans merupakan bagian dari flora normal komensal rongga mulut yang dapat menyebabkan infeksi mukosa oral. Patogenesisnya belum sepenuhnya diketahui, namun adanya faktor predisposisi dapat mengubah *Candida* dari flora normal komensal (*saprophytic stage*) menjadi organisme patogen (*parasitic stage*). *C. albicans* biasanya merupakan patogen yang lemah, namun demikian *Candida* dapat berpengaruh pada seseorang yang sangat muda, sangat tua, dan sangat sakit (Greenberg *et al.*, 2008).

2.1.2 Gambaran Klinis

2.1.2.1 Kandidiasis Oral Primer

1. Kandidiasis pseudomembran



Gambar 2.1 Kandidiasis pseudomembran pada area arcus palatoglossus dan uvula palatina (Greenberg *et al.*, 2008)

Penyakit ini merupakan manifestasi yang paling umum pada individu immunokompromis seperti bayi,

lansia, pasien dengan terapi kortikosteroid atau terapi antibiotik spektrum luas jangka panjang, pasien dengan kondisi parah seperti diabetes melitus yang kurang terkontrol, leukemia, dan infeksi HIV / AIDS. Hal ini ditandai dengan adanya plak seperti krim berwarna putih yang menyerupai dadih susu di lidah, palatum dan mukosa bukal (Neville *et al.*, 2002). Lesi dapat dikerok namun akan meninggalkan permukaan mukosa yang berwarna kemerahan bahkan dapat terjadi perdarahan yang ringan. Plak mengandung jaringan nekrotik, sel epitel yang deskuamasi, fibrin, sel ragi dan hifa, debris, dan bakteri (Greenberg *et al.*, 2008).

2. Kandidiasis eritematosa



Gambar 2.2 Kandidiasis eritematosa pada palatum durum (Greenberg *et al.*, 2008)

Kandidiasis eritematosa terkait dengan penggunaan antibiotik spektrum luas jangka panjang. Antibiotik spektrum luas menurunkan populasi bakteri rongga mulut yang selanjutnya memfasilitasi pertumbuhan berlebih dari *C. albicans* dengan

mengurangi tekanan daya saing. Secara klinis, kandidiasis eritematosa ditandai dengan adanya daerah eritematosa lokal biasanya di dorsum lidah dan palatum, dan kurang umum pada mukosa bukal (Neville *et al.*, 2002). Kandidiasis eritematosa merupakan satu-satunya bentuk kandidiasis oral yang terasa sakit secara konsisten. Tipe ini kadang disebut sebagai "atrophic candidiasis". Penggunaan istilah "atrophic" menggambarkan area merah tidak cukup komprehensif. Karena kemerahan mungkin tidak hanya disebabkan pengurangan ketebalan epitel (atrofi) tapi juga peningkatan vaskularisasi. Oleh karena itu penggunaan istilah "eritematosa" yang berarti merah / kemerahan sebaiknya diutamakan (Reichart *et al.*, 2000).

3. Kandidiasis hiperplastik



Gambar 2.3 Kandidiasis hiperplastik pada area retrokomisural kiri (Greenberg *et al.*, 2008)

Kandidiasis hiperplastik kronis, kadang disebut sebagai "candidal leukoplakia", batas tampak jelas,

sedikit lebih tinggi dari permukaan sekitarnya, plak berwarna putih bernodul yang tidak dapat dikerok (Neville *et al.*, 2002). Area yang paling umum adalah komisura mukosa bukal, dan lebih jarang pada dorsum lidah. Hampir semua pasien dengan kandidiasis hiperplastik adalah perokok. Mengenali lesi ini menjadi penting karena kondisi dikaitkan dengan berbagai tingkat displasia dan keganasan (Muzyka, 2005).

4. *Denture stomatitis* (kandidiasis eritematosa terkait penggunaan gigi tiruan)



Gambar 2.4 *Denture stomatitis* tipe III pada palatum (Greenberg *et al.*, 2008)

Denture stomatitis adalah peradangan kronis pada mukosa yang menjadi bantalan gigi tiruan. Umumnya lesi tersebut muncul sebagai eritema terbatas hanya pada daerah penyokong gigi tiruan (Neville *et al.*, 2002). Kondisinya biasanya asimtomatik. Namun, pasien mungkin mengeluh sedikit rasa sakit atau sensasi terbakar (Arendorf *et al.*, 1984). *Denture stomatitis* terbagi menjadi tiga tipe. Tipe I hanya terbatas pada sisi-sisi

eritematosa yang terkena trauma dari gigi tiruan. Tipe II mengenai sebagian besar bagian mukosa yang tertutup gigi tiruan. Tipe III merupakan modifikasi dari tipe II dimana terdapat mukosa bergranula pada bagian tengah dari palatum (Greenberg *et al.*, 2008).

5. *Median rhomboid glossitis*

Median rhomboid glossitis ditandai dengan adanya eritema, area seperti elips atau jajaran genjang yang menggambarkan adanya atrofi papila filiformis yang terletak pada garis tengah dorsum lidah anterior hingga papilla sirkumvalata (Reichart *et al.*, 2000).



Gambar 2.5 *Median rhomboid glossitis* pada dorsum lidah (Greenberg *et al.*, 2008)

6. Angular cheilitis



Gambar 2.6 Angular Cheilitis pada komisura bibir
(Greenberg *et al.*, 2008)

Secara klinis, angular cheilitis tampak seperti eritema, lesi berbentuk retakan-retakan yang mengenai bagian sudut mulut (Neville *et al.*, 2002). Lipatan kulit wajah dan kerutan di sepanjang komisura bibir dan lipatan nasolabial, terutama pada orang tua, dapat menyebabkan akumulasi saliva dan lingkungan yang lembab cenderung menyebabkan angular cheilitis. Hal ini biasa terjadi pada pasien pengguna gigi tiruan dengan dimensi vertikal oklusal rendah. Sementara faktor gizi, seperti zat besi atau vitamin B12, semua terlibat dalam perkembangan lesi ini dan sebagian besar disebabkan oleh spesies *Candida* dan/atau *Staphylococci* dan *Streptococci* (Akpan dan Morgan, 2002).

2.1.2.2 Kandidiasis Oral Sekunder

1. Kandidiasis Mukokutan Kronis

Kandidiasis mukokutan kronis (KMK) ditandai dengan persistensi atau rekurensi kandidiasis pada kulit,

kuku, dan membran mukosa (De Almeida dan Scully, 2002). Massa bergranula dapat dijumpai pada kulit kepala dan wajah. Kandidiasis oral ditemukan pada sekitar 90% pasien KMK. Bagian rongga mulut yang terlibat biasanya lidah dengan klinis berupa lesi putih hiperplastik (Greenberg *et al.*, 2008).

KMK dapat terjadi sebagai bagian dari gangguan endokrin hiperparatiroidisme dan penyakit Addison. Gangguan fungsi fagositik dari granula neutrofil dan makrofag yang disebabkan oleh kekurangan myeloperoksidase terkait dengan KMK (Greenberg *et al.*, 2008). KMK dikaitkan dengan cacat pada sel yang dimediasi oleh sistem imun yang mungkin terbatas pada antigen *Candida* atau menjadi kelainan sistem imun yang lebih umum (Williams *et al.*, 2011).



Gambar 2.7 Kandidiasis mukokutan kronis pada anak dengan sindrom imunodefisiensi seluler (Kayser, 2005)

2. Kombinasi Imunodefisiensi Berat

Anak yang lahir dengan kombinasi imunodefisiensi berat tanpa perawatan, kebanyakan meninggal karena infeksi sebelum usia 1 tahun. Anak-anak ini hanya memiliki sedikit atau bahkan tidak memiliki sel B dan sel T di dalam sirkulasi, sehingga membuat mereka rentan terkena infeksi bakteri, virus, dan jamur. Komplikasi oral yang ditemukan pada anak-anak dengan kombinasi imunodefisiensi berat meliputi ulkus seperti *aphthous*, kandidiasis, dan infeksi herpetik. Sindrom kombinasi imunodefisiensi berat dicirikan oleh cacat dalam fungsi sel yang dimediasi sistem kekebalan. Penderita gangguan ini sering terinfeksi *Candida* yang menyebar (Greenberg *et al.*, 2008).

3. *DiGeorge Syndrome (Velocardiofacial Syndrome)*

Anak-anak dengan *DiGeorge Syndrome* gagal untuk mengembangkan timus sekunder secara lengkap sehingga ada perkembangan abnormal jaringan puncak wajah dan saraf yang akhirnya mengarah pada perkembangan menyimpang dari timus, kelenjar paratiroid, pembuluh darah besar jantung, dan kompleks kraniofasial. Sindrom *DiGeorge* adalah prototipikal ketidakaturan dari sel T. Tidak adanya sel T yang beredar (baik CD4 dan CD8) menciptakan imunodefisiensi yang ditandai dengan meningkatnya kerentanan terhadap infeksi virus dan jamur. Tingkat

keparahan kekurangan sel T adalah tergantung pada derajat hipoplasia timus. Gambaran kraniofasial penderita *DiGeorge Syndrome* diantaranya sumbing langit-langit (sampai 11%), bivid uvula, kandidiasis oral, celah palpebra pendek, mulut kecil, dahi menonjol, dan hipoplasia enamel (Greenberg *et al.*, 2008).



Gambar 2.8 Kandidiasis mukokutan kronis pada pasien *DiGeorge Syndrome* (Greenberg *et al.*, 2008)

4. Kandidiasis Oral Terkait dengan HIV



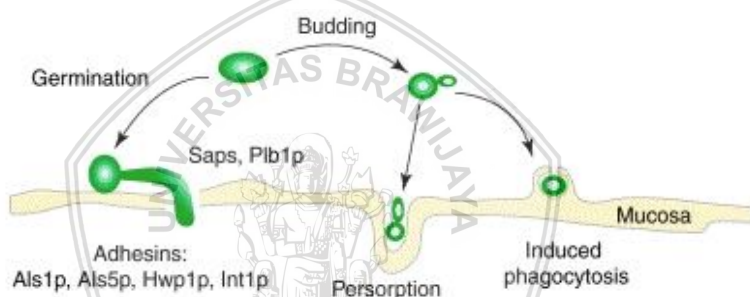
Gambar 2.9 Kandidiasis eritematosa pada bagian tengah lidah pada pasien AIDS (Greenberg *et al.*, 2008)

Lebih dari 90% pasien sindrom defisiensi imun (*acquired immune deficiency syndrome / AIDS*) telah mengalami kandidiasis oral selama masa infeksi HIV mereka, dan infeksi tersebut dianggap sebagai tanda adanya perkembangan AIDS. Jenis kandidiasis oral paling umum yang terkait dengan HIV adalah kandidiasis pseudomembran, kandidiasis eritematosa, *angular cheilitis*, dan kandidiasis hiperplastik kronis. Sebagai hasil dari terapi antiretroviral (ART), prevalensi kandidiasis oral telah menurun secara substansial (Greenberg *et al.*, 2008).

2.1.3 Etiologi dan Patogenesis

C. albicans, *C. tropicalis*, dan *C. glabrata* mencapai 80% dari spesies yang terisolasi dari infeksi *Candida* pada manusia. Untuk menginvasi lapisan mukosa, mikroorganisme harus melekat pada permukaan epitel. Oleh karena itu, strain dari *Candida* dengan potensi adhesi yang lebih baik lebih patogen daripada strain dengan adhesi yang lebih rendah. Penetrasi ragi ke sel epitel difasilitasi oleh produksi lipase, dan agar ragi tetap berada di dalam epitel, mereka harus mendeskamuasi secara terus-menerus permukaan sel epitel. Ada hubungan yang jelas antara kandidiasis oral dan pengaruh faktor predisposisi lokal dan umum. Faktor predisposisi lokal dapat memicu pertumbuhan *Candida* atau mempengaruhi respon imun mukosa mulut. Faktor predisposisi umum sering dikaitkan status kekebalan dan endokrin pasien (Greenberg *et al.*, 2008).

Status kekebalan tubuh dapat dipengaruhi oleh obat-obatan dan juga penyakit yang akan menekan sistem kekebalan adaptif atau bawaan. Kandidiasis pseudomembran juga terkait dengan infeksi jamur pada anak kecil yang memiliki sistem kekebalan tubuh namun tidak sepenuhnya berkembang. Denture stomatitis, angular cheilitis, dan median rhomboid glossitis disebut sebagai infeksi terkait *Candida*, selain *Candida* dapat pula disebabkan oleh bakteri (Greenberg *et al.*, 2008).



Gambar 2.10 Patogenesis awal kandidiasis pada permukaan mukosa (Calderone dan Fonzi, 2001)

Sel ragi menempel pada permukaan sel inang dengan adhesi. Kontak ke sel inang memicu transisi ragi menjadi hifa dan mengarahkan pertumbuhan melalui tigotropisme. Invasi memediasi penyerapan jamur oleh sel inang melalui induksi endositosis. Adhesi merupakan kekuatan fisik dan sekresi hidrolase jamur bermaksud untuk memudahkan mekanisme invasi kedua, yaitu penetrasi aktif jamur ke sel inang dengan cara merusak penghalang. Perlekatan sel ragi pada permukaan sel inang dapat memediasi pembentukan biofilm dengan sel ragi

di bagian bawah dan sel hifa di bagian atas dari biofilm (François *et al.*, 2013).

2.1.4 Faktor Predisposisi

Faktor predisposisi menurut Greenberg *et al* (2008) terdiri dari faktor predisposisi lokal dan umum. Faktor predisposisi lokal meliputi penggunaan gigi tiruan, merokok, pembawaan tubuh atopik, steroid inhalasi, steroid topikal, hiperkeratosis, ketidakseimbangan mikroflora rongga mulut, dan kualitas serta kuantitas saliva. Faktor predisposisi umum meliputi penyakit immunosupresif, gangguan status kesehatan, obat-obatan immunosupresif, kemoterapi, kelainan endokrin, dan kekurangan hematinik.

2.1.5 Diagnosis dan Temuan Laboratorium

Kehadiran *Candida* sebagai anggota flora komensal menyebabkan pembedaan keadaan normal dari infeksi menjadi semakin sulit. Sangat penting bahwa baik temuan klinis dan laboratorium data seimbang agar dapat sampai pada diagnosa yang benar. Terkadang obat antifungi harus diberikan untuk membantu dalam proses diagnostik. Smear dari daerah yang terinfeksi, yang terdiri dari sel epitel menciptakan peluang untuk mendeteksi ragi. Bahan yang diperoleh difiksasi di dalam isopropil alkohol dan dikeringkan dengan udara sebelum dilakukan pewarnaan dengan asam periodik-Schiff (PAS). Ragi yang terdeteksi dianggap sebagai tanda infeksi. Teknik ini sangat berguna apabila pasien dicurigai terkena pseudomembran oral kandidiasis dan *angular cheilitis*. Untuk

meningkatkan sensitivitas, goresan kedua dapat dikultur pada agar Sabouraud. Untuk membedakan antara spesies *Candida* yang berbeda, dapat dilakukan pemeriksaan tambahan pada agar Pagano-Levin. Teknik jejak kultur juga dapat digunakan dimana bantalan busa plastik steril (2,5x2,5 cm) direndam dalam kaldu Sabouraud dan ditempatkan pada permukaan yang terinfeksi selama 60 detik. Pad tersebut ditekan dengan kuat ke Sabouraud agar, yang akan dikultur pada suhu 37°C. Hasilnya dinyatakan sebagai unit pembentuk koloni per milimeter kubik (CFU / mm²). Metode ini sangat penting untuk ditambahkan dalam proses diagnostik kandidiasis eritematosa dan *denture stomatitis* karena infeksi ini terdiri dari lesi eritematosa yang cukup homogen. Teknik kultur saliva digunakan secara paralel dengan metode diagnostik lainnya untuk mendapatkan kuantifikasi *Candida* yang adekuat. Pasien dengan tanda klinis kandidiasis oral biasanya terdapat lebih dari 400 CFU / mL. Pada kandidiasis hiperplastik, teknik kultur harus dilengkapi dengan pemeriksaan histopatologis. Pemeriksaan ini dilakukan terutama untuk mengidentifikasi kemungkinan adanya epitel displasia dan untuk mengidentifikasi *Candida* yang menginvasi dengan pewarnaan PAS (Greenberg *et al.*, 2008).

2.1.6 Terapi

Obat antifungi yang paling umum digunakan termasuk kedalam golongan poliena seperti nistatin dan amfoterisin B atau azol. Poliena bekerja dengan bantuan dari efek negatif pada

produksi ergosterol, yang penting untuk integritas membran sel *Candida*. Poliena juga dapat mempengaruhi perlekatan jamur. Penghilangan jamur dari gigi tiruan secara permanen merupakan pengobatan yang efektif untuk *denture stomatitis*. Hal ini juga terkait dengan peningkatan kebersihan gigi tiruan dan rekomendasi untuk tidak menggunakan gigi tiruan saat tidur. (Greenberg *et al.*, 2008).

Terapi untuk mengobati infeksi *C. albicans* adalah dengan menghilangkan faktor predisposisi, lokal dan sistemik. Kebersihan mulut dapat dijaga dengan menyikat gigi maupun menyikat daerah bukal dan lidah dengan sikat lembut pada pasien yang memakai gigi tiruan. Kebersihan gigi tiruan penting untuk membersihkan nutrisi, termasuk sel epitel deskuamasi, yang mungkin berfungsi sebagai sumber nitrogen. Pembersihan gigi tiruan juga mengganggu kematangan lingkungan mikroba di bawah gigi tiruan. Gigi tiruan harus direndam dalam larutan antimikroba, hal ini lebih efektif dibanding dengan hanya menyikat gigi tiruan, karena permukaan gigi tiruan yang tidak rata dan porus dapat menyebabkan *C. albicans* mudah melekat dan akan menyembunyikan mikroorganisme sehingga tidak bisa dibersihkan secara fisik. Larutan yang disarankan diantaranya peroksida alkalin, hipoklorit alkali, asam, desinfektan, dan enzim. Klorheksidin diketahui paling efektif melawan *Candida* namun menyebabkan warna gigi tiruan berubah dan melawan efek nistatin (Akpan and Morgan, 2002).

Selain menjaga kebersihan rongga mulut dan memberi obat-obatan antifungi pada pasien, faktor predisposisi juga harus ditanggulangi. Penanggulangan faktor predisposisi meliputi mengurangi rokok dan konsumsi karbohidrat, mengunyah permen karet bebas gula untuk merangsang sekresi saliva, menunda pemberian antibiotik dan kortikosteroid, menangani penyakit yang dapat memicu kemunculan kandidiasis seperti penanggulangan penyakit diabetes, HIV, dan leukemia (Akpan and Morgan, 2002).

Mekanisme kerja antifungi menurut Siswandono dan Soekardjo (2000) adalah sebagai berikut :

1. Gangguan pada membran sel

Gangguan ini terjadi karena adanya ergosterol dalam sel jamur. Ergosterol merupakan komponen sterol yang sangat penting dan sangat mudah diserang oleh antifungi turunan poliena. Kompleks poliena-ergosterol yang terjadi dapat membentuk suatu lubang kecil dan melalui lubang kecil tersebut unsur esensial sel jamur seperti ion K, fosfat anorganik, asam karboksilat, asam amino dan ester fosfat bocor keluar hingga menyebabkan kematian sel jamur. Contoh : nistatin, amfoterisin B dan kandisidin.

2. Penghambatan biosintesis ergosterol dalam sel jamur

Mekanisme penghambatan biosintesis ergosterol dalam sel jamur disebabkan oleh senyawa turunan imidazole. Senyawa ini mampu menyebabkan ketidakteraturan membran sitoplasma

jamur dengan cara mengubah permeabilitas dan fungsi membran dalam proses pengangkutan senyawa-senyawa esensial. Sehingga pada akhirnya akan menyebabkan ketidakseimbangan metabolik dan menghambat biosintesis ergosterol dalam sel jamur. Contoh : ketokonazol, mikonazol dan bifonazol.

3. Penghambatan sintesis protein jamur

Mekanisme ini disebabkan oleh senyawa turunan pirimidin. Efek antifungi terjadi karena senyawa turunan pirimidin mampu mengalami metabolisme dalam sel jamur menjadi suatu metabolit yang dapat mempengaruhi sintesis protein pada jamur.

4. Penghambatan mitosis jamur

Efek antifungi ini terjadi karena adanya senyawa antifungi griseofulvin yang mampu mengikat protein mikrotubuli dalam sel dan mengganggu fungsi mitosis gelendong menimbulkan penghambatan mitosis jamur.

2.2 *Candida albicans*

Candida albicans merupakan bagian dari flora normal komensal rongga mulut yang dapat menyebabkan infeksi mukosa oral. Patogenesisnya belum sepenuhnya diketahui, namun adanya faktor predisposisi dapat mengubah *Candida* dari flora normal komensal (*saprophytic stage*) menjadi organisme patogen (*parasitic stage*). *C. albicans* biasanya merupakan patogen yang lemah, namun demikian *Candida* dapat berpengaruh pada seseorang yang sangat muda, sangat tua, dan sangat sakit (Greenberg *et al.*, 2008).

Pada sediaan apus eksudat, *Candida* tampak sebagai ragi berbentuk bulat telur, kecil, gram positif, bertunas, memiliki dinding yang tipis, berukuran 2-3 x 4-6 μm , yang memanjang menyerupai hifa (*pseudohifa*). *Candida* membentuk *pseudohifa* ketika tunas-tunas terus tumbuh tetapi gagal memisahkan diri, menghasilkan rantai sel-sel memanjang yang terjepit atau tertarik pada septasi-septasi diantara sel. *Candida* berkembangbiak dengan budding (Brooks *et al*, 2007).

2.2.1 Taksonomi

Taksonomi *Candida albicans* menurut C. P. Robin Berkhout (1923) tampak pada tabel 2.1 berikut.

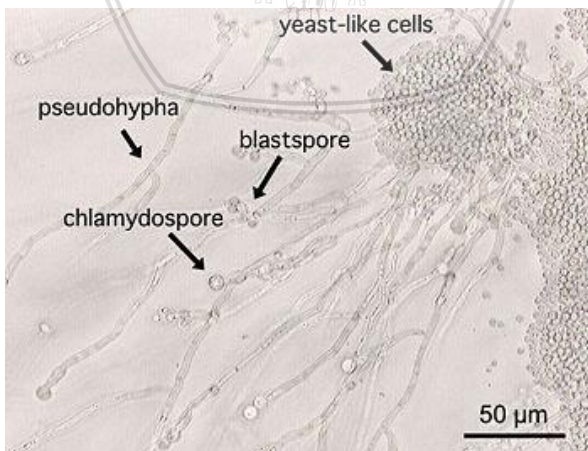
Tabel 2.1 Taksonomi *Candida albicans* (Annaissie *et al.*, 2009)

Domain	Fungi
Phylum	<i>Ascomycota</i>
Class	<i>Saccharomycetes</i>
Order	<i>Saccharomycetales</i>
Family	<i>Saccharomycetaceae</i>
Genus	<i>Candida</i>
Species	<i>Candida albicans</i>

2.2.2 Morfologi

Candida albicans merupakan salah satu spesies jamur yang memiliki dua wujud dan bentuk secara simultan sesuai kondisi lingkungannya /*dimorphic organism*. Pertama adalah *yeast-like state* (non-invasif dan *sugar fermenting organism*). Kedua adalah *fungal*

form memproduksi *root-like structure*/struktur seperti akar yang sangat panjang/*rhizoids* dan dapat memasuki mukosa (invasif). Dinding sel *C. albicans* bersifat dinamis dengan struktur berlapis, terdiri dari beberapa jenis karbohidrat berbeda (80-90%): (i) *Mannan* (*polymers of mannose*) berpasangan dengan protein membentuk glikoprotein (mannoprotein); (ii) α -*glucans* yang bercabang menjadi polimer glukosa yang mengandung α -1,3 dan α -1,6 yang saling berkaitan, dan (iii) *chitin*, yaitu homopolimer *N-acetyl-D-glucosamine* (Glc-NAc) yang mengandung ikatan α -1,4. Unsur pokok yang lain adalah protein (6-25%) dan lemak (1-7%). *Yeast cells* dan *germ tubes* memiliki komposisi dinding sel yang serupa, meskipun jumlah α -*glucans*, *chitin*, dan *mannan* relatif bervariasi karena faktor morfologinya. Jumlah *glucans* jauh lebih banyak dibanding *mannan* pada *C. albicans* yang secara imunologis memiliki keaktifan yang rendah (Vandepitte *et al.*, 2003).



Gambar 2.11 Morfologi *Candida albicans* (Calderone dan Fonzi, 2001)

2.2.3 Faktor Virulensi

Kemampuan *Candida albicans* untuk menginfeksi host diperkuat dengan adanya beberapa faktor virulensi. Faktor virulensi tersebut diantaranya perubahan morfologi (dimorfisme antara bentuk ragi dan hifa), adhesi dan invasi di permukaan sel, tigmotropisme, pembentukan biofilm, peralihan fenotipik dan sekresi hidrolitik enzim. Selain itu juga dipengaruhi oleh kemampuan dalam beradaptasi terhadap pH lingkungan secara cepat, sistem metabolik yang fleksibel, sistem akuisi nutrisi yang kuat dan dilengkapi dengan sistem respon terhadap tekanan yang tangguh (Nicholls *et al.*, 2011).

2.3 Sirsak (*Annona muricata L.*)

2.3.1 Taksonomi

Tabel 2.2 Taksonomi *Annona muricata L.* (Sunarjono, 2005)

Domain	<i>Plantae</i>
Phylum	<i>Spermatophyta</i>
Class	<i>Dicotyledonae</i>
Order	<i>Polycarpiceae</i>
Family	<i>Annonaceae</i>
Genus	<i>Annona</i>
Species	<i>Annona muricata L.</i>

2.3.2 Morfologi dan Persebaran Sirsak

Annonaceae adalah keluarga tumbuhan berbunga yang terdiri dari pohon, semak belukar, dan sedikit tumbuhan merambat. Keluarga ini terdiri atas 2300 hingga 2500 spesies dan lebih dari 130

marga, genus *Annona* termasuk di dalamnya dan keluarga ini terkonsentrasi di daerah tropis, dengan beberapa spesies ditemukan di daerah beriklim sedang. Sekitar 900 spesies Neotropis, 450 adalah Afrotropikal, dan spesies lainnya Indomalayan. Tumbuhan sirsak mudah beradaptasi pada iklim tropis dan saat ini buahnya dibudidayakan di sebagian besar negara Asia Tenggara seperti Indonesia, Malaysia, dan Filipina (Tai dan Ayesha, 2014).

Annona muricata L. memiliki pohon yang ramping dan hijau, dapat tumbuh dewasa mencapai tinggi 5-10 m dan diameter 15 cm, batang lurus kemudian cabangnya menyebar, kulit kayu halus, berwarna abu-abu kusam atau abu-abu kecoklatan, kasar dan bercelah-celah seiring bertambahnya usia. Daunnya berbentuk elips memanjang atau bulat menyempit dengan bagian ujung meruncing. Daun ini memiliki panjang 7,6-15,2 cm dan lebar 2,5-7,6 cm. Permukaan daunnya halus, mengkilat dan berwarna hijau yang lebih tua di bagian atas dan lebih kusam di bagian bawah (Orwa *et al.*, 2009).



Gambar 2.12 Daun sirsak (*Annona muricata* L.)

2.3.3 Manfaat

Di daerah tropis, seluruh bagian tumbuhan *Annona muricata L.* dapat dimanfaatkan sebagai obat-obatan alami, termasuk daun, buah, biji, kulit kayu, dan akar. Setiap bagian pohon memiliki kandungan dan manfaat yang berbeda-beda. Organ bunga dimanfaatkan sebagai obat bronchitis dan batuk; buah untuk mengobati diare, disentri dan demam; biji untuk mengatasi berbagai parasit kulit; kulit kayu untuk obat batuk, asma, dan hipertensi; akar untuk mengobati diabetes; serta daun untuk mengobati penyakit kulit, disentri, malaria, tumor, dan hipertensi (Noller, 2003).

Masyarakat lebih banyak memanfaatkan daun sirsak (*Annona muricata L.*) untuk mengatasi berbagai macam penyakit sebagai obat alternatif. Daun sirsak (*Annona muricata L.*) juga dimanfaatkan sebagai antibakteri, antitumor, antifungi, antikonvulsan, penenang, antiparasit, dan *cardiodepresant* (Taylor, 2002).

2.3.4 Kandungan Tanaman Sirsak

Daun sirsak mengandung alkaloid (retikulin, coreksimin, koklarin dan anomurin) dan senyawa acetogenin (De Sousa *et al.*, 2010). Kandungan aktif lainnya yakni flavonoid (seperti : kuarsetin katekin, epikatekin, asam klorogenat, dan kaempferol) (Nawwar *et al.*, 2012) dan tanin (Vijayameena *et al.*, 2013). Pada pemantauan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) didapatkan nilai *Retention Factor* (Rf) sebagai berikut :

Tabel 2.3 Hasil Pemantauan KLT Ekstrak Etanol Daun
Sirsak (Wullur *et al.*, 2016; Febriani *et al.*, 2015)

Senyawa yang dideteksi	Eluen	Penampak bercak	λ Sinar UV (nm)	Warna bercak	Nilai Rf
Alkaloid	Etil asetat:metanol:air 16:1:2	dragendorff	254	jingga	0,76
Flavonoid	n-heksana:etil asetat 7:3	sitoborat	366	kuning	0,2
Polifenol (fenol, asam fenol, tanin, lignin, dan flavonoid)	n-heksana:etil asetat 7:3	FeCl ₃	366	hijau	0,4

2.3.4.1 Alkaloid

Alkaloid adalah kelompok metabolit sekunder yang mengandung nitrogen, berjumlah lebih dari 15.000 dan dijumpai di sekitar 20% spesies tumbuhan berpembuluh. Atom nitrogen biasanya bagian dari cincin heterosiklik, cincin yang mengandung atom nitrogen dan karbon. Sebagaimana namanya, alkaloid adalah alkalin.

Pada nilai pH yang umum dijumpai di sitosol (pH 7,2) atau vakuola (pH 5-6) atom nitrogen bersifat proton, alkaloid bermuatan positif dan umumnya larut dalam air. Alkaloid disintesis dari asam amino, khususnya lisin, tirosin dan triptofan (Retno, 2016).

Golongan utama alkaloid meliputi alkaloid turunan ornitin, alkaloid turunan lisin, alkaloid turunan asam nikotinat, alkaloid turunan tirosin, alkaloid triptopan dan asam antranilat, alkaloid turunan histidin, dan alkaloid karena reaksi aminasi. Alkaloid berpotensi sebagai sumber obat yang berlimpah dan berefek farmakologis beragam. Sifat fisiko-kimia alkaloid semipolar dan mampu berinteraksi dengan membran sel. Kontribusi atom N di dalam struktur memberikan efektifitas interaksi kimiawi dengan reseptor. Obat-obatan seringkali dibuat dengan memodifikasi alkaloid endogen. Terdistribusi luas pada tumbuhan, jamur, bakteri hingga mamalia. Neurotransmitter kebanyakan merupakan alkaloid: adrenalin, atropin, asetilkolin, glutamat, adenosin, dll (Saifudin, 2014). Alkaloid yang ditemukan pada daun sirih merupakan kelompok alkaloid turunan isokuinolina yakni aporfina (Mella, 2014). Kegunaan senyawa alkaloid dalam bidang farmakologi adalah untuk memacu sistem syaraf, menaikkan tekanan darah, dan melawan infeksi mikrobial (Pasaribu, 2009). Selain itu, menurut Chabner *et al* (2001) alkaloid diketahui bekerja secara spesifik pada siklus pembelahan sel dengan menghambat pembelahan mitosis. Alkaloid mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan menghambat atau

memblokade polimerasi protein kedalam mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran (disolusi) dari mikrotubulus menjadi kristal-kristal kecil dimana setiap 1 mol tubulin terikat oleh 1 mol alkaloid. Hal ini menyebabkan gangguan fungsi mikrotubulus yang berperan dalam proses mitosis dan penghentian pembelahan sel pada stadium metafase. Tidak terbentuknya benang-benang mitosis (*mitotic spindle*) yang utuh menyebabkan kromosom masuk dalam sitoplasma sehingga menjadi bergerombol (*clump*) seperti bola atau bintang yang disebut dengan *explode mitotic*. Mikrotubulus berfungsi membentuk benang-benang mitosis dan berperan untuk pergerakan sel, fagositosis, transportasi makanan dan hasil metabolisme dalam sel.

2.3.4.2 Tanin

Tanin merupakan senyawa umum yang terdapat dalam tumbuhan berpembuluh, memiliki gugus fenol, memiliki rasa sepat, dan mampu menyamak kulit karena kemampuannya menyambung silang protein. Jika bereaksi dengan protein membentuk kopolimer mantap yang tidak larut dalam air (Yunita *et al*, 2009). Tanin secara kimia dikelompokkan menjadi dua golongan yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Tanin terkondensasi yaitu senyawa yang dibentuk melalui polimerisasi unit flavonoid, banyak terdapat pada tumbuhan berkayu. Karena tanin terkondensasi seringkali dapat dihidrolisis menjadi antosianidin dengan perlakuan asam kuat maka seringkali disebut pro-antosianidin. Tanin terhidrolisis yaitu polimer heterogen yang mengandung asam fenolik, khususnya asam galat dan gula sederhana, lebih kecil dari tanin

terkondensasi sehingga lebih mudah dihidrolisis. Tanin merupakan toksin yang mereduksi pertumbuhan dan ketahanan herbivora. Buah muda seringkali mengandung tanin dalam jumlah banyak yang terkonsentrasi di lapisan sel sebelah luar (Retno, 2016).

Mekanisme kerja antimikroba tanin yaitu dengan cara memprepitasi protein melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan inaktivasi fungsi materi genetik. Mekanisme kerja tanin adalah menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel tidak dapat terbentuk. Tanin memiliki efek yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktivkan adhesin sel mikroba, menginaktivkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati.

2.3.4.3 Flavonoid

Flavonoid merupakan golongan terbesar pada senyawa fenolik tumbuhan yang terdiri dari C6-C3-C6 dan sering ditemukan di berbagai macam tumbuhan dalam bentuk glikosida atau gugusan gula bersenyawa pada satu atau lebih grup hidroksil fenolik. Flavonoid merupakan golongan metabolit sekunder yang disintesis dari asam piruvat melalui metabolisme asam amino (Bhat *et al.*, 2009). Flavonoid adalah senyawa fenol, sehingga warnanya berubah apabila ditambah basa atau amoniak (Yunita *et al.*, 2009). Flavonoid

dibagi menjadi empat kelompok utama, yaitu: a) anthosianin, b) flavon, c) flavonol dan d) isoflavon. Dua kelompok utama flavonoid yang dijumpai pada daun semua tumbuhan hijau adalah flavon dan flavonol (Retno, 2016).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba dapat dibagi menjadi 3 yaitu menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Mekanisme antibakteri flavonoid menghambat sintesis asam nukleat adalah cincin A dan B yang memegang peran penting dalam proses interkelasi atau ikatan hidrogen dengan menumpuk basa asam nukleat yang menghambat pembentukan DNA dan RNA. Flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri.

Mekanisme kerja flavonoid menghambat fungsi membran sel adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria *et al.*, 2009). Penelitian lain menyatakan mekanisme flavonoid menghambat fungsi membran sel dengan cara mengganggu permeabilitas membran sel dan menghambat ikatan enzim seperti ATPase dan phospholipase (Li *et al.*, 2013).

Flavonoid dapat menghambat metabolisme energi dengan cara menghambat penggunaan oksigen oleh bakteri. Flavonoid menghambat pada sitokrom C reduktase sehingga proses metabolisme terhambat. Sehingga energi yang dibutuhkan bakteri

untuk biosintesis makromolekul tidak mencukupi (Ngajow *et al.*, 2013).

Flavonoid diduga memberikan kontribusi dalam aktivitas antimikroba. Hal ini bisa dijelaskan bahwa secara umum flavonoid merupakan senyawa polifenol. Senyawa fenol bersifat dapat merusak membran sel sehingga terjadi perubahan permeabilitas sel yang dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel. Senyawa fenol juga dapat mendenaturasi protein sel dan mengerutkan dinding sel sehingga dapat melisis dinding sel jamur. Selain itu, senyawa fenol melalui gugus hidroksi yang akan berikatan dengan gugus sulfhidril dari protein fungi sehingga mampu mengubah konformasi protein membran sel target (Sulistiyani dan Kumala, 2011)

2.3.4.4 Acetogenin

Acetogenin merupakan kelompok dari produk alami poliketida yang diisolasi dari tanaman *family Annonaceae*. Sifat umum dari molekul ini adalah berupa rantai asam lemak sepanjang 35 atau 37 karbon yang diakhiri oleh sebuah γ -lakton. Secara biogenetik, *acetogenin* diturunkan dari asam lemak dengan 32 atau 24 karbon yang kemudian ditambahkan dua unit 2-propanol untuk membentuk lakton pada ujung molekul (Zeng *et al*, 1996). *Acetogenin* yang terdapat pada daun sirsak diantaranya annomuricin-A, annomuricin-B, annomuricin-C, annomuricin-E, annomutacin, annonacin, annohexocin, muricapentocin, muricatocin-A, muricatocin-B, gigantetronenin, annopentocin-A, annopentocin-B,

annopentocin-C, murihexocin-A, murihexocin-B, murihexocin-C, muricoreacin, cis-Annomuricinone-D, trans-Annomuricinone-D (Bermejo *et al.*, 2005). Aktivitas biologi dari *acetogenin* adalah sifatnya yang menghambat kompleks I mitokondria sehingga proses metabolisme sel terganggu. *Acetogenin* merupakan inhibitor NADH pada enzim *uniquinone reduktase*. Enzim ini merupakan enzim esensial dalam sistem transpor elektron yang mengarahkan ke proses selanjutnya yaitu fosforilasi oksidatif di dalam mitokondria (Wijaya, 2012).

Bagian *acetogenin* yang hidrofilik bertindak sebagai jangkar pada bagian gliserol dari *phosphatidylcholine* pada membran. Sedangkan cincin lakton bercabang alkil berdifusi pada anterior membran dan berinteraksi dengan *binding site* dari enzim. Inhibisi kompleks I membuat sel kekurangan ATP, menghambat pertumbuhan sel dan mengganggu kinerja sel sehingga akhirnya sel mengalami apoptosis (Villo, 2008).

2.4. Nanoteknologi

Nanoteknologi merupakan studi mengenai fenomena dan manipulasi material pada tingkat skala atom, molekuler, dan makromolekuler dimana sifat material tersebut berbeda secara signifikan dengan material yang berukuran lebih besar Académie des Sciences & Académie des Technologies, 2004). Satu nanometer setara dengan 10^{-9} meter, yang meliputi sistem dengan ukuran di atas dimensi molekuler tetapi di bawah ukuran makroskopik (secara umum >1 nm dan <100 nm) (Ranjit dan Baquee, 2013). Pada skala nano (10^{-9} meter), sifat-sifat mekanis, optis, biologis serta sifat kimia

dari material tersebut dapat mengalami perbedaan signifikan dengan sifat-sifat dari material berukuran micrometer atau yang lebih besar (Bell, 2006). Hal ini terjadi seiring dengan adanya peningkatan sifat-sifat dan performa material yang direkayasa (Nuryadi, 2009).

2.4.1 Nano Herbal

Sebagian besar komponen aktif pada ekstrak seperti flavonoid, tanin, dan terpenoid memiliki sifat kelarutan dalam air yang rendah. Hal tersebut disebabkan karena ketidakmampuan melewati membran lipid, ukuran molekul yang besar, dan tingkat absorpsi yang rendah sehingga mengurangi bioavailabilitas dan efektivitas (Bonifacio *et al.*, 2014). Nanoteknologi dapat digunakan untuk meningkatkan penghantaran obat yang memiliki sifat kelarutan dalam air rendah, karena dengan teknologi nano dapat menargetkan pada sel atau jaringan, juga dapat melewati hambatan epitel dan endotel yang sempit, serta melepaskan herbal dengan ukuran molekul yang besar (Gopi *et al.*, 2016).

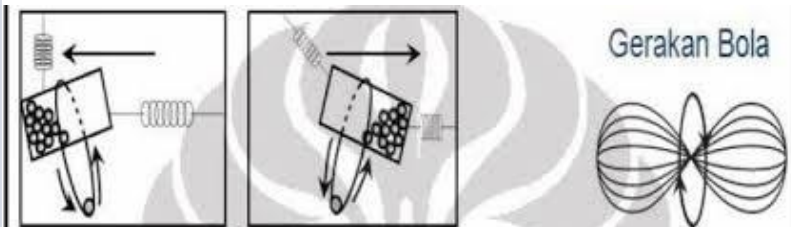
2.4.2 Keuntungan Nano Herbal

Berdasarkan Dewandari *et al* (2013), aplikasi teknologi nano melalui sintesis partikel nano sebagai sistem penghantaran senyawa aktif memiliki keuntungan diantaranya ukuran dan karakteristik permukaan partikel dapat dengan mudah dimodifikasi sesuai kebutuhan, partikel nano dapat mengontrol dan mempertahankan pelepasan senyawa aktif selama transportasi sehingga mengurangi efek samping, dan pelepasan senyawa aktif terkontrol dan karakteristik partikel dapat terdegradasi. Kandungan

senyawa aktif dapat dimasukkan dimasukkan ke dalam sistem tanpa reaksi kimia, dimana merupakan faktor yang penting untuk menjaga aktivitas senyawa.

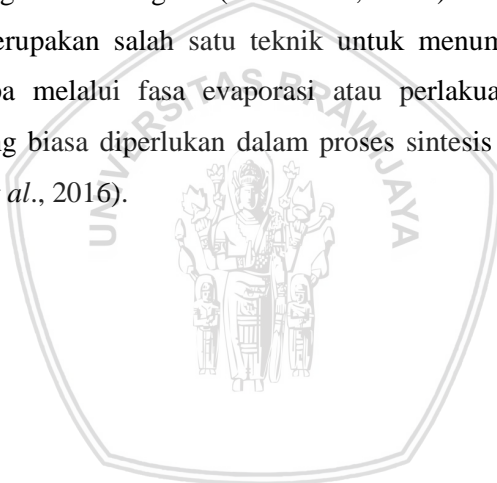
2.4.3 Teknik *High Energy Milling*

Penggilingan (*milling*) adalah salah satu metode sintesis nanopartikel secara *top-down*, yaitu penggerusan dengan menghancurkan material berukuran besar menjadi ukuran nanometer (Muhriz *et al.*, 2011). *High Energy Milling* (HEM) merupakan metode pembuatan bubuk magnetik berukuran nanometer dengan ukuran partikel dan morfologi yang terkontrol (Leontsev *et al.*, 2013). Proses penggilingan HEM bekerja dengan cara menghancurkan campuran serbuk melalui mekanisme pembenturan bola-bola giling yang bergerak mengikuti pola gerakan wadahnya yang berbentuk elips tiga dimensi inilah yang memungkinkan pembentukan partikel-partikel serbuk berskala nanometer akibat tingginya frekuensi tumbukan. Tingginya frekuensi tumbukan yang terjadi antara serbuk dengan bola-bola giling disebabkan karena wadah yang berputar dengan kecepatan tinggi, yaitu mencapai 500 rpm dan bentuk gerakan bola yang berbentuk elips tiga dimensi (Sarimai *et al.*, 2016).



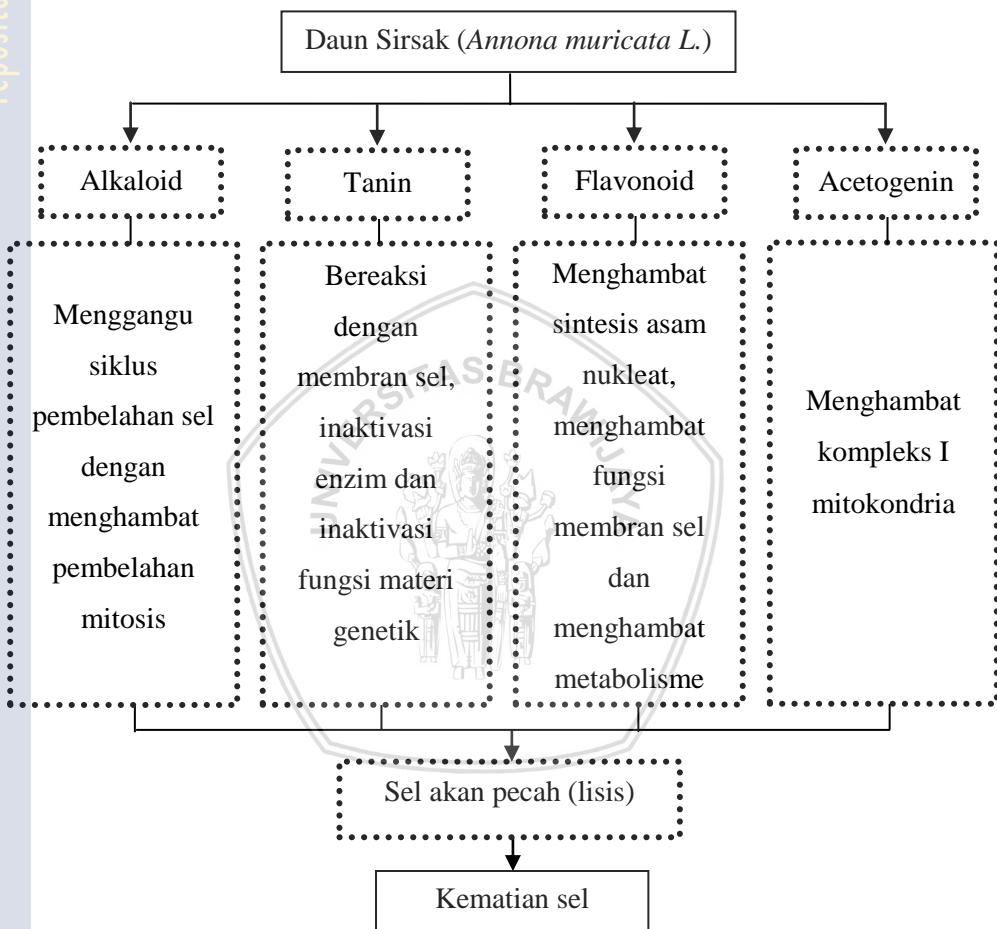
Gambar 2.13 Prinsip kerja *High Energy Milling* (Kumar *et al.*, 2005)

Keunggulan teknik HEM yaitu metode pembuatan nanopartikel yang sederhana dan relatif tidak mahal, serta dapat diterapkan pada berbagai macam material. Pada teknik ini, bubuk partikel mengalami deformasi plastis karena beban kompresif berulang yang timbul dari dampak antara bola dan bubuk tersebut (Paul *et al.*, 2007). Keunggulan *high energy milling* adalah dapat membuat nanopartikel dalam jumlah yang relatif banyak dalam waktu yang relatif singkat (Krisnawan, 2009). Selain itu, teknik milling merupakan salah satu teknik untuk menumbuhkan Kristal padat tanpa melalui fasa evaporasi atau perlakuan reaksi kimia seperti yang biasa diperlukan dalam proses sintesis pada umumnya (Sarimai *et al.*, 2016).



BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN

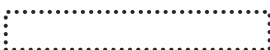
3.1 Kerangka Konsep Penelitian



Keterangan :



Variabel yang diteliti



Variabel yang tidak diteliti

3.2 Penjelasan Konsep Penelitian

Daun sirsak mengandung senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, dan *acetogenin*. Aktivitas alkaloid diketahui bekerja secara spesifik pada siklus pembelahan sel dengan menghambat pembelahan mitosis. Alkaloid mempunyai kemampuan mengikat tubulin yaitu suatu protein yang menyusun mikrotubulus dengan memblokir polimerisasi protein ke dalam mikrotubulus sehingga terjadi penghancuran (disolusi) dari mikrotubulus menjadi kristal-kristal kecil. Hal ini menyebabkan gangguan fungsi mikrotubulus yang berperan dalam proses mitosis dan penghentian pembelahan sel pada stadium metafase.

Mekanisme kerja antimikroba tanin yaitu dengan cara memprepitasi protein. Efek antimikroba tanin melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim dan inaktivasi fungsi materi genetik. Tanin akan menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel tidak dapat terbentuk. Tanin memiliki efek yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktifkan adhesin sel mikroba, menginaktifkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel. Tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel jamur lisis karena tekanan osmotik maupun fisik.

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antimikroba yaitu dengan menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sel dan menghambat metabolisme energi. Flavonoid

menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel jamur, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA jamur. Flavonoid menghambat fungsi membran sel dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel jamur dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Flavonoid menghambat metabolisme energi dengan cara menghambat sitokrom C reduktase yang menyebabkan jamur kekurangan oksigen sehingga metabolismenya terhambat (Mercy *et al.*, 2013).

Aktivitas biologi dari *acetogenin* adalah sifatnya yang menghambat kompleks I mitokondria sehingga proses metabolisme sel terganggu. *Acetogenin* merupakan inhibitor NADH pada enzim *uniquinone reduktase*. Enzim ini merupakan enzim esensial dalam sistem transpor elektron yang mengarahkan ke proses selanjutnya yaitu fosforilasi oksidatif di dalam mitokondria (Wijaya, 2012). Inhibisi kompleks I mitokondria menyebabkan sel kekurangan ATP, menghambat pertumbuhan sel dan mengganggu kinerja sel sehingga akhirnya sel mengalami apoptosis (Villo, 2008). Hasil dari proses ini adalah kematian sel jamur *Candida albicans*. Melalui penjelasan diatas, maka daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dalam bentuk nanopartikel memungkinkan dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* sehingga memiliki efek sebagai antifungi.

3.2 Hipotesis Penelitian

Simplisia daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dalam bentuk nanopartikel memiliki efek sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro* dengan metode dilusi tabung.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah *true experimental design post test control only* untuk mengetahui efek simplisia daun sirsak terhadap pertumbuhan *Candida albicans* dengan rumus pengulangan Rancangan Acak Lengkap (RAL), karena pengaruh faktor luar dapat dikontrol dengan dilakukan di laboratorium dan kondisinya relatif homogen. Metode penelitian ini yaitu dengan dilusi tabung untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) simplisia daun sirsak sebagai antifungi terhadap jamur *Candida albicans*.

4.2 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli-September 2018.

4.3 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah jamur *Candida albicans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, Malang. Sampel daun sirsak (*Annona muricata* Linn) didapatkan dari UPT. Matera Medika Batu. Keaslian spesies sampel daun sirsak dapat dibuktikan dengan adanya sertifikat kepastian spesies.

4.3.1 Pengulangan Sampel

Sampel penelitian akan dilakukan pengulangan bagi tiap kelompok untuk mencegah terjadinya bias pada hasil penelitian. Banyaknya pengulangan yang diperlukan dalam penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus Rancangan Acak Lengkap (RAL) sebagai berikut (Solimun, 2001) :

$$\begin{aligned} p(n-1) &\geq 15 \\ 8(n-1) &\geq 15 \\ 8n-8 &\geq 15 \\ 8n &\geq 23 \\ n &\geq 2,875 \approx 3 \end{aligned}$$

Keterangan :

<p>p = jumlah perlakuan n = jumlah pengulangan 15 = derajat bebas untuk RAL</p>

Berdasarkan perhitungan di atas, maka pengulangan yang dilakukan untuk mendapatkan jumlah sampel yang dapat dipercaya paling sedikit sebanyak empat kali pengulangan.

4.3.2 Variabel Penelitian

Variabel bebas : konsentrasi larutan nanopartikel daun sirsak (3,125%, 6,25%, 12,5%, 25%, 50 dan 100%).

Variabel terikat : pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang ditandai dengan terbentuknya koloni jamur pada media agar.

4.4 Definisi Operasional

1. Simplisia daun sirsak (*Annona muricata*) adalah daun sirsak yang telah dikeringkan yang digunakan untuk pengobatan dan belum mengalami pengolahan, kecuali dinyatakan lain suhu pengeringan tidak lebih dari 60°C (BPOM, 2014), diperoleh dari UPT Materia Medika, Batu.
2. Nanopartikel daun sirsak (*Annona muricata* Linn) merupakan modifikasi dari makropartikel simplisia daun sirsak menjadi berukuran nanopartikel yaitu < 100 nm dengan metode *high energy milling*. Proses modifikasi ukuran tersebut dilakukan oleh PT. Nanotech Herbal Indonesia, Serpong.
3. Isolat *Candida albicans* adalah stok kultur murni Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang tidak bercampur dengan jenis mikroba atau fungi lainnya dan telah diidentifikasi di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

4.5 Alat dan Bahan

4.5.1 Penyediaan Daun Sirsak

Bahan yang digunakan adalah daun sirsak yang diperoleh dari UPT. Materia Medika Batu, Malang yang telah diidentifikasi dengan adanya sertifikat untuk membuktikan keaslian daun.

4.5.2 Alat dan Bahan Pembuatan Simplisia Daun Sirsak

Alat yang digunakan untuk proses pembuatan simplisia daun sirsak adalah alat perajang daun sirsak, oven listrik digital Hellmet, oven lampu listrik 30 watt sehingga temperatur 45°C , timbangan ukur, dan gelas ukur. Bahan yang digunakan adalah daun sirsak segar yang diperoleh dari UPT. Matera Medika Batu yang telah disortir.

4.5.3 Alat dan Bahan Pembuatan Nanopartikel Daun Sirsak

Alat yang digunakan untuk pembuatan nanopartikel daun sirsak menggunakan teknik high energy ball milling pada penelitian ini adalah bola penghancur (*ball*) dan wadah (*jar*). Bahan yang digunakan adalah simplisia daun sirsak dan etanol.

4.5.4 Alat dan Bahan Kultur, Identifikasi Jamur, dan Uji Efektivitas

Alat untuk melakukan kultur, identifikasi jamur, dan uji efektivitas antara lain ose lurus, ose lengkung, mikropipet, kertas penghisap, minyak emersi, *petridisc*, tabung reaksi, bunsen, korek, mikroskop, *centrifuge*, *autoclave*, dan inkubator. Bahan-bahan yang digunakan yaitu isolat *Candida albicans* pewarnaan gram (kristal violet, lugol, alkohol 96%, safranin), *Saboraud Dextrose Broth* (SDB), *Saboraud Dextrose Agar* (SDA), aquades, *Dimethyl Sulfoxide* (DMSO) dan simplisia daun sirsak dalam bentuk nanopartikel.

4.6 Prosedur Penelitian

4.6.1 Sterilisasi Alat

Semua alat yang digunakan dalam penelitian sebelumnya disterilkan dalam *autoclave* dengan suhu 121⁰C selama 15 menit (Nurdina *et al.*, 2012).

4.6.2 Persiapan Bahan

1. Daun sirsak dicuci hingga bersih kemudian dikeringkan selama 10 hari pada suhu ruangan namun tidak terkena cahaya matahari langsung hingga daun mengering (Pradana *et al.*, 2015).
2. Isolat *Candida albicans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya ditanam pada media SDA steril kemudian diinkubasi pada suhu 35⁰C selama 24-48 jam (Hasanah, 2012).
3. Aquades dan SDA disterilkan kemudian dimasukkan ke dalam lemari es (Hasanah, 2012).

4.6.3 Pembuatan Simplisia Daun Sirsak

1. Pemanenan Daun Sirsak (*Annona muricata Linn*)

Sampel yang digunakan adalah bagian daunnya saja. Pengambilan sampel dilakukan pada saat daun tumbuhan telah berwarna hijau sempurna, dimana pada saat itu kadar senyawa aktif paling tinggi sehingga diperoleh mutu yang baik (Rivai *et al.*, 2014).

2. Identifikasi Sampel Daun Sirsak (*Annona muricata Linn*)

Identifikasi tumbuhan dilakukan di UPT. Materia Medika Batu.

3. Sortasi Basah

Daun yang telah dipetik dipisahkan dari zat pengotor yang menempel pada daun dan membuang bagian-bagian yang tidak perlu sebelum pengeringan, sehingga didapat daun yang memiliki kualitas yang bagus untuk digunakan, hal ini dilakukan dengan cara manual (Rivai *et al.*, 2014).

4. Pencucian Simplisia

Pencucian simplisia dilakukan untuk menghilangkan pengotor yang masih melekat pada simplisia setelah pelaksanaan sortilisasi basah. Pencucian dilakukan dengan air mengalir dan waktu yang sesingkat mungkin bertujuan untuk menghilangkan mikroba dan pengotor, namun tidak menghilangkan zat khasiat simplisia tersebut (Rivai *et al.*, 2014).

5. Pengeringan Simplisia

Pengeringan simplisia dilakukan dengan cara dioven pada suhu 45°C selama 2 hari (Rivai *et al.*, 2014).

6. Perajangan

Proses perajangan ini bertujuan untuk memperkecil ukuran dan memperluas permukaan simplisia agar proses ekstraksi lebih mudah dilakukan. Menurut (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008) Serbuk simplisia dibuat dari simplisia utuh atau potongan-potongan simplisia yang telah dikeringkan. Proses pembuatan serbuk dengan suatu alat tanpa

menyebabkan kerusakan atau kehilangan kandungan kimia yang dibutuhkan dan diayak hingga diperoleh serbuk dengan derajat kehalusan tertentu. Derajat kehalusan serbuk simplisia terdiri dari serbuk sangat kasar, kasar, agak kasar, halus dan sangat halus (Rivai *et al.*, 2014).

4.6.4 Pembuatan Nanopartikel Daun Sirsak

1. Pengayakan serbuk simplisia daun sirsak untuk mendapatkan ukuran serbuk yang homogen.
2. Serbuk beserta bola-bola penghancur (*ball*) dimasukkan dalam wadah (*jar*) HEM-E3D yang sebelumnya telah dicuci dengan etanol.
3. Saat dua bola bertumbukan, terdapat serbuk dalam jumlah kecil yang terjebak diantara kedua bola tersebut. Akibat benturan dari bola-bola penghancur menyebabkan partikel serbuk mengalami gaya tekan. Gaya tekan yang tinggi menyebabkan luas permukaan partikel serbuk menjadi lebih besar.
4. Beban yang diberikan oleh bola tersebut akan membuat serbuk terdeformasi dan akhirnya hancur. Partikel tersebut mengalami tumbukan secara berulang, begitu seterusnya hingga mencapai ukuran nanopartikel (Sarimai *et al.*, 2016).

4.6.5 Identifikasi *Candida albicans*

Untuk membuktikan bahwa koloni yang tumbuh adalah *Candida albicans* maka dilakukan tes konfirmasi. Tes yang dilakukan antara lain :

1. Pewarnaan Gram

- 1.1. Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api dan dibiarkan dingin.
- 1.2. Satu ose aquades steril diteteskan pada gelas objek ditambah sedikit biakan jamur yang diambil menggunakan ose, selanjutnya disuspensikan dengan aquades pada gelas objek dan diratakan. Untuk sediaan cair tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
- 1.3. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
- 1.4. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan Kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
- 1.5. Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
- 1.6. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai cat warna luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.
- 1.7. Sediaan ditetesi safranin selama 30 detik. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
- 1.8. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.

- 1.9. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x dengan diberi minyak emersi, perbesaran tersebut dianggap cukup untuk untuk mengamati jamur *Candida albicans*.
- 1.10. Hasil positif : *Candida albicans* tercat ungu (gram positif) (Harwanti, 2012).

2. Tes *Germinating Tube*

- 2.1. Isolat jamur diambil dari pembenihan menggunakan ose yang sudah disterilisasi dengan cara pembakaran.
- 2.2. Dimasukkan ke dalam tabung yang berisi serum mamalia 0,5 mL.
- 2.3. Diinkubasi selama 3 jam pada suhu 37°C.
- 2.4. Kultur di dalam serum diambil dengan ose dan digoreskan pada *object glass* dan ditutup dengan gelas penutup.
- 2.5. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 400x.
- 2.6. Bila (+) maka didapatkan bentukan *pseudohifa* memanjang khas *Candida albicans* (Harwanti, 2012).

4.6.6 Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans*

1. Satu ose *Candida albicans* diambil dan dimasukkan kedalam tabung yang berisi 1 ml *Sabouraud Dextrose Broth* (SDB) kemudian diinkubasi selama 1 x 24 jam pada suhu 37°C.

2. Suspensi jamur diambil 100 μL kemudian diberi larutan NaCl fisiologis sampai kekeruhannya sama dengan standar Mc Farland (konsentrasi jamur 10^8 CFU/mL) (Murray *et al.*, 2007).
3. Setelah itu suspensi diencerkan sehingga konsentrasinya menjadi 10^4 CFU/mL.

4.6.7 Pembuatan Larutan Nanopartikel Daun Sirsak

1. Proses ini menggunakan nanopartikel daun sirsak dan *dimethyl sulfoxide* 1 %.
2. *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) diambil seberat 0,1 mL dilarutkan dengan aquades steril sebanyak 10 mL untuk memperoleh *dimethyl sulfoxide* (DMSO) dengan konsentrasi 1%.
3. Hasil pengenceran di-*vortex*.
4. Mencampurkan nanopartikel daun sirsak dan larutan DMSO 1% dengan perbandingan 1:2.
5. *Vortex* hingga nanopartikel daun sirsak dan DMSO tercampur merata maka akan didapatkan larutan nanopartikel daun sirsak dengan konsentrasi 100%.

4.6.8 Uji Efektivitas Antifungi Simplisia Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn) dalam Bentuk Nanopartikel terhadap *Candida albicans* dengan Metode Dilusi Tabung

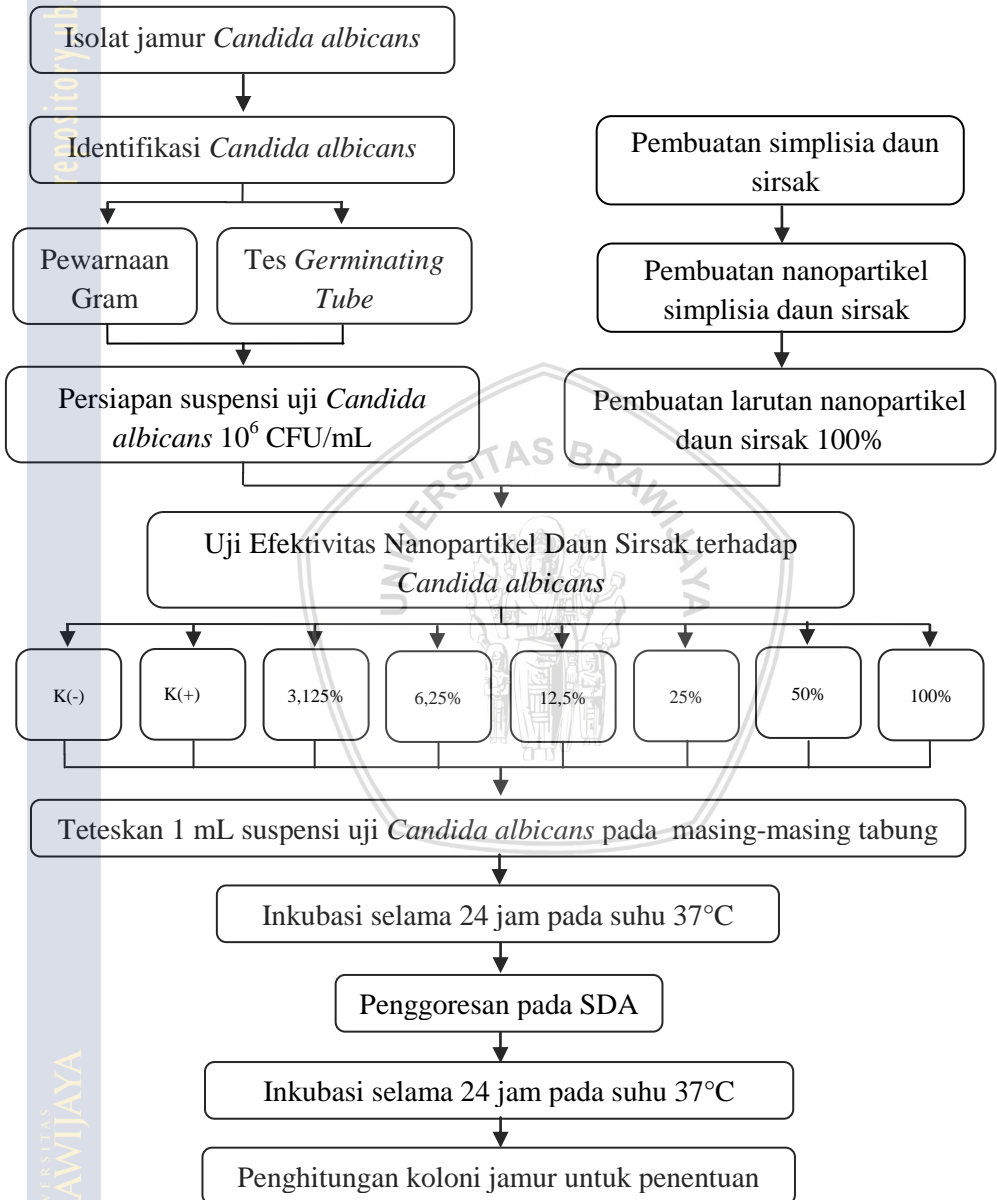
1. Disediakan 8 tabung steril, 6 tabung sebagai uji antifungi, 1 tabung sebagai kontrol negatif, dan 1 tabung kontrol positif.
2. Pembuatan konsentrasi nanopartikel simplisia daun sirsak didapatkan dari hasil pengenceran serial, yaitu dengan cara membandingkan massa larutan nanopartikel daun sirsak dengan aquades.
3. Pembuatan konsentrasi larutan nanopartikel daun sirsak:
 - a. Tabung 1 (kontrol positif) : 1 mL klorheksidin.
 - b. Tabung 2 (kontrol negatif) : 1 mL suspensi *Candida albicans*
 - c. Tabung 3 (konsentrasi 3,125%) : 0,03125 mL larutan nanopartikel daun sirsak 100% + 0,96875 mL aquades.
 - d. Tabung 4 (konsentrasi 6,25%) : 0,0625 mL larutan nanopartikel daun sirsak 100% + 0,9375 mL aquades.
 - e. Tabung 5 (konsentrasi 12,5%) : 0,125 mL larutan nanopartikel daun sirsak 100% + 0,875 mL aquades.

- f. Tabung 6 (konsentrasi 25%) : 0,25 mL larutan nanopartikel daun sirsak 100% + 0,75 mL aquades.
 - g. Tabung 7 (konsentrasi 50%) : 0,5 mL larutan nanopartikel daun sirsak 100% + 0,5 mL aquades.
 - h. Tabung 8 (konsentrasi 100%): 1 mL larutan nanopartikel daun sirsak 100%
4. Masukkan suspensi jamur 10^4 CFU/ml *Candida albicans* sebanyak 1 mL pada tiap-tiap tabung uji yang berisi 1 mL larutan uji dalam berbagai konsentrasi.
 5. Seluruh tabung di-vortex dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C
 6. Cairan kultur hasil inkubasi digoreskan pada media agar SDA menggunakan ose lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
 7. Pada hari ketiga, Kadar Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dengan cara menghitung jumlah koloni jamur menggunakan *colony counter*. Kadar Bunuh Minimum (KBM) ditentukan dari tidak adanya koloni yang tumbuh pada SDA dan dibandingkan dengan kontrol untuk menentukan konsentrasi terendah larutan nanopartikel daun sirsak yang dapat membunuh jamur.

4.7 Analisis Data

Data yang didapat dari hasil penelitian, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas varian. Uji ini menggunakan uji *Shapiro-Wilk dan Levene*. Bila data normal dan homogen, maka akan menggunakan uji *one way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Kemudian dilanjutkan dengan uji *post-hoc* dilakukan dengan menggunakan *Tukey HSD*. Uji korelasi digunakan untuk melihat ada atau tidaknya korelasi antar variabel dan melihat bentuk korelasinya. Uji korelasi yang digunakan adalah korelasi *Pearson*. Uji korelasi *Pearson* dilakukan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi daun sirsak dalam bentuk nanopartikel terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Uji regresi linier dilakukan untuk melihat seberapa besar kontribusi variabel bebas dalam menyebabkan perubahan di variabel terikat. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution*) versi 16.0 untuk Windows.

4.8 Skema Alur Penelitian



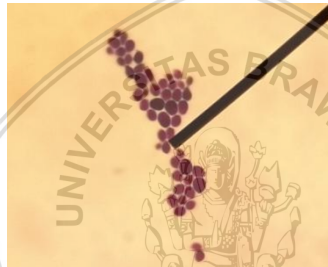
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Identifikasi Jamur

5.1.1 Hasil Pewarnaan Gram

Hasil pewarnaan *Gram* menunjukkan adanya sel ragi berbentuk oval dan *budding cell* yang berwarna keunguan yang menunjukkan sifat gram positif (Gambar 5.1). Hasil pewarnaan ini sesuai dengan jamur *Candida albicans* yang merupakan jamur gram positif (Kayser *et al.*, 2005).



Gambar 5.1 Hasil Pewarnaan Gram pada *Candida albicans*

5.1.2 Hasil Tes *Germinating Tube*

Tes *Germinating Tube* merupakan bagian penting dalam identifikasi *Candida albicans* yang berfungsi untuk membedakan strain *Candida albicans* dengan strain *Candida* yang lain. Tes ini dilakukan dengan memasukkan isolat jamur *Candida albicans* ke dalam tabung berisi serum mamalia. Hasil tes *Germinating Tube* menunjukkan adanya bentukan pseudohifa memanjang khas *Candida albicans*. Hasil tes *Germinating Tube* dapat diamati pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Hasil Tes *Germinating Tube*

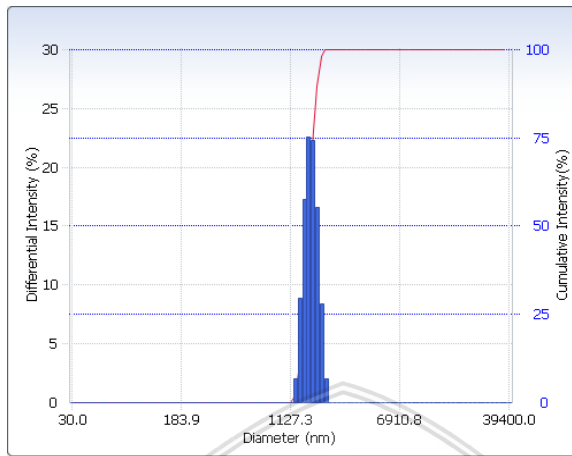
5.2 Hasil Pengolahan Simplisia Daun Sirsak Menjadi Nanopartikel

Simplisia daun sirsak didapat dari pengeringan daun sirsak yang dirajang hingga menjadi serbuk. Untuk memperoleh bubuk daun dalam bentuk nanopartikel dilakukan proses *milling* dengan menggunakan alat *High Energy Milling*. Hasil dari proses *milling* didapatkan bubuk halus daun sirsak berwarna hijau. Simplisia daun sirsak setelah proses *milling* dapat diamati pada gambar 5.3.



Gambar 5.3 Simplisia daun sirsak setelah proses *milling*

Ukuran partikel dari daun sirsak diukur dengan menggunakan *Particle Size Analyzer* (PSA). Hasil dari analisis ukuran daun sirsak setelah proses *milling* pertama dan kedua dapat dilihat pada grafik dan tabel di bawah ini.



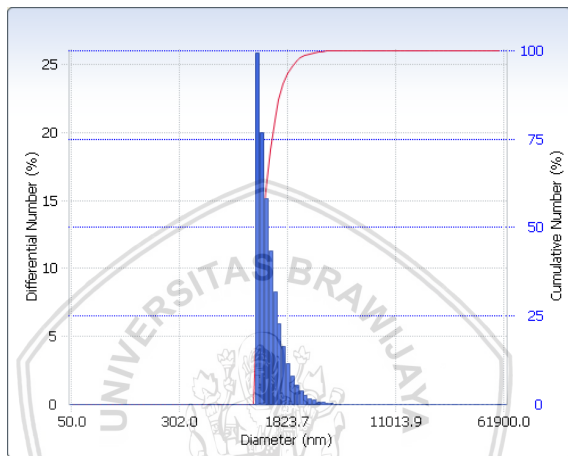
Gambar 5.4 Grafik distribusi pengukuran diameter simplisia daun sirsak (setelah proses *milling* pertama)

Tabel 5.1 Tabel pengukuran rata-rata diameter simplisia daun sirsak (setelah proses *miling* pertama)

Hasil Distribusi (Contin)		
Puncak	Diameter (nm)	Std. Dev
1	1.569,4	178,5
2	0,0	0,0
3	0,0	0,0
4	0,0	0,0
5	0,0	0,0
Rerata	1.569,4	178,5

Berdasarkan keterangan pada gambar 5.4 dan tabel 5.1 mengenai hasil pengukuran diameter simplisia daun sirsak, diperoleh nilai rata-rata ukuran sebesar 1.569,4 nm. Ukuran tersebut tidak memenuhi kriteria ukuran nanopartikel simplisia daun sirsak yang

dibutuhkan pada penelitian ini, yaitu simplisia daun sirsak yang memiliki ukuran <100 nm, maka dilakukan pemrosesan ulang dengan menggunakan *High Energy Ball Milling* untuk kedua kalinya.



Gambar 5.5 Grafik distribusi pengukuran diameter simplisia daun sirsak (setelah proses *miliing* kedua)

Tabel 5.2 Tabel pengukuran rata-rata diameter simplisia daun sirsak (setelah proses *miliing* kedua)

Hasil Distribusi (Contin)		
Puncak	Diameter (nm)	Std. Dev
1	1.357,2	333,4
2	0,0	0,0
3	0,0	0,0
4	0,0	0,0
5	0,0	0,0
Rerata	1.357,2	333,4

Berdasarkan keterangan pada gambar 5.5 dan tabel 5.2 mengenai hasil pengukuran diameter simplisia daun sirsak setelah proses *milling* kedua, diperoleh nilai rata-rata ukuran sebesar 1.357,2 nm. Ukuran tersebut masih tetap tidak memenuhi kriteria ukuran nanopartikel simplisia daun sirsak yang dibutuhkan pada penelitian ini, yaitu simplisia daun sirsak yang memiliki ukuran <100 nm, maka penelitian ini tetap dilaksanakan dengan menggunakan bahan tersebut. Perhitungan rata-rata diameter simplisia daun sirsak secara rinci dapat dilihat pada lampiran 3.

5.3 Uji Pendahuluan

5.3.1 Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung (Uji Pertama)

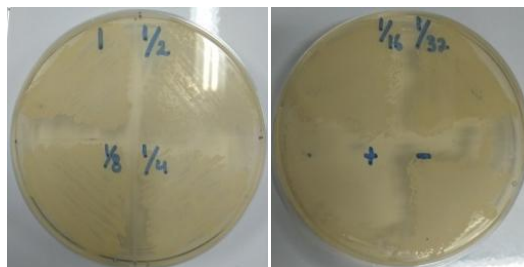
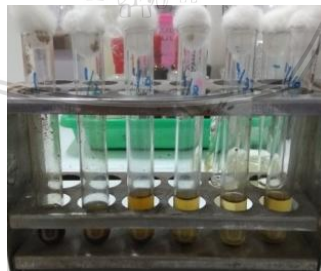
Metode yang dicoba untuk uji pendahuluan adalah metode dilusi tabung. Metode ini menggunakan simplisia daun sirsak dan CMC dengan perbandingan 1:2. Konsentrasi yang digunakan 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 100%. Hasil inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan bahwa terdapat kontaminasi pada keenam tabung sehingga hasil tidak dapat digunakan (Gambar 5.6).



Gambar 5.6 Hasil Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung 1

5.3.2 Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung (Uji Kedua)

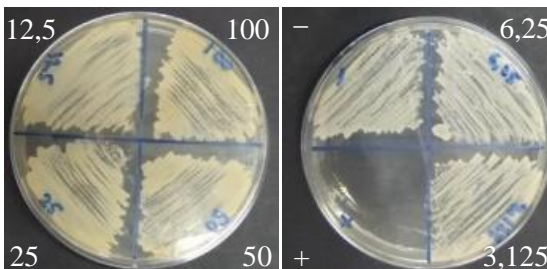
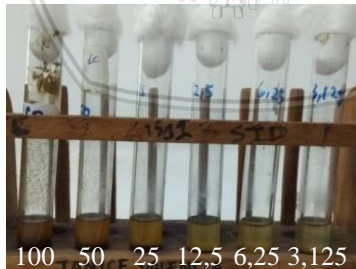
Metode selanjutnya yang digunakan untuk uji pendahuluan masih tetap metode dilusi tabung. Metode ini menggunakan simplisia daun sirsak dilarutkan dengan CMC dan akuades dengan perbandingan 1:2. Konsentrasi yang digunakan 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 100%. Kendala yang dihadapi adalah simplisia daun sirsak sangat mudah mengendap dan kurang dapat tercampur dengan baik. Setelah diinkubasi pada medium cair selama 24 jam dengan suhu 37°C, diambil satu ose dari tabung dan diinokulasikan ke medium agar. Hasil inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan bahwa tampak adanya koloni jamur pada semua konsentrasi (Gambar 5.7).



Gambar 5.7 Hasil Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung dan Dilusi Agar 2

5.3.3 Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung (Uji Ketiga)

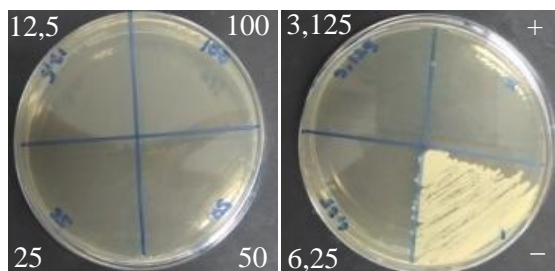
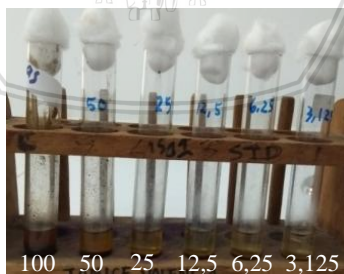
Metode selanjutnya yang digunakan untuk uji pendahuluan masih tetap metode dilusi tabung namun dengan mengganti pelarut yang digunakan. Metode ini menggunakan simplisia daun sirsak dilarutkan dengan DMSO 1% dengan perbandingan 1:2. Konsentrasi yang digunakan 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 100%. Kesulitan lain yang dihadapi adalah mengeluarkan zat aktif yang ada di dalam simplisia daun sirsak. Setelah diinkubasi pada medium cair selama 24 jam dengan suhu 37°C, diambil satu ose dari tabung dan diinokulasikan ke medium agar. Hasil inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan bahwa tampak adanya koloni jamur pada semua konsentrasi (Gambar 5.8).



Gambar 5.8 Hasil Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung dan Dilusi Agar 3

5.3.4 Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung (Uji Keempat)

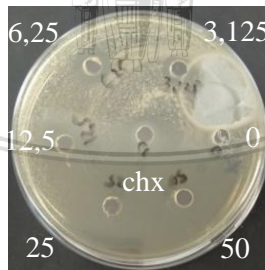
Metode selanjutnya yang digunakan untuk uji pendahuluan masih tetap metode dilusi tabung namun dengan mengganti pelarut yang digunakan. Metode ini menggunakan simplisia daun sirsak dilarutkan dengan asam asetat 100% dengan perbandingan 1:2. Konsentrasi yang digunakan 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 100%. Setelah diinkubasi pada medium cair selama 24 jam dengan suhu 37°C, diambil satu ose dari tabung dan diinokulasikan ke medium agar. Hasil inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C menunjukkan bahwa tidak tampak adanya koloni jamur pada semua konsentrasi (Gambar 5.9). Hal ini dikarenakan konsentrasi asam asetat yang terlalu tinggi.



Gambar 5.9 Hasil Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung dan Dilusi Agar 4

5.3.5 Uji Pendahuluan untuk Mencari Konsentrasi Asam Asetat

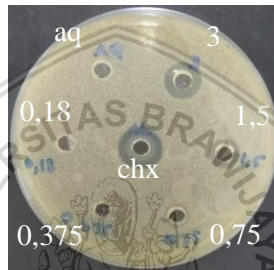
Uji pendahuluan dilakukan dengan metode sumuran dengan asam asetat konsentrasi 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; akuades dan klorheksidin glukonat. Tujuan dari perbandingan ini adalah untuk menemukan konsentrasi asam asetat yang tepat agar tidak menimbulkan efek antifungi pada *Candida albicans*. Setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C teramati bahwa terdapat zona bening di sekitar sumur yang ditetesi dengan asam asetat. Hal ini menandakan bahwa asam asetat pada konsentrasi 3,125% masih memiliki aktivitas antimikroba terhadap jamur (Gambar 5.10).



Gambar 5.10 Hasil Uji Pendahuluan untuk Mencari Konsentrasi Asam Asetat (Uji Pertama)

Uji pendahuluan menggunakan metode difusi sumuran dilakukan kembali dengan konsentrasi asam asetat yang lebih kecil. Konsentrasi asam asetat yang digunakan yaitu 3%; 1,5%; 0,75%; 0,375%; dan 0,1875%. Setelah dilakukan inkubasi selama 24 jam

pada suhu 37°C teramati bahwa terdapat zona bening di sekitar sumur yang ditetesi dengan asam asetat dengan konsentrasi 3%; 1,5%; dan 0,75%. Uji pendahuluan ini menunjukkan bahwa konsentrasi asam asetat yang dapat digunakan sebagai pelarut simplisia daun sirsak adalah 0,375% karena tidak terdapat zona bening yang menandakan konsentrasi tersebut tidak memiliki aktivitas antimikroba terhadap jamur (Gambar 5.11).

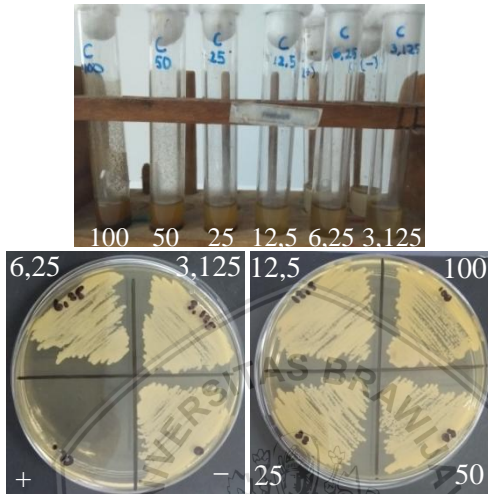


Gambar 5.11 Hasil Uji Pendahuluan untuk Mencari Konsentrasi Asam Asetat (Uji Kedua)

5.3.6 Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung (Uji Kelima)

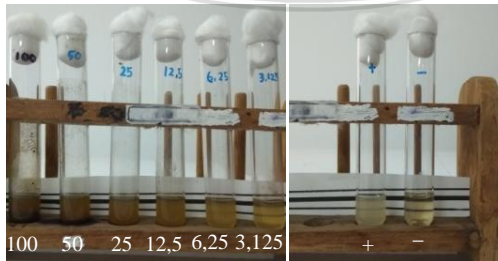
Metode selanjutnya yang digunakan untuk uji pendahuluan masih tetap metode dilusi tabung dengan mengganti konsentrasi pelarut yang digunakan. Metode ini menggunakan simplisia daun sirsak dilarutkan dengan asam asetat 0,375% dengan perbandingan 1:2. Konsentrasi yang digunakan 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; dan 100%. Setelah diinkubasi pada medium cair selama 24 jam dengan suhu 37°C, diambil satu ose dari tabung dan diinokulasikan ke medium agar. Hasil inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C

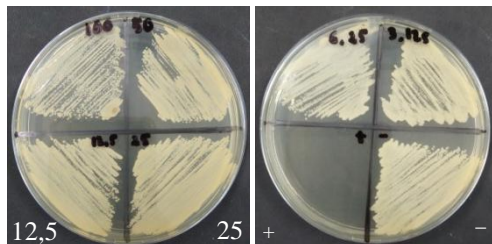
menunjukkan bahwa tampak adanya koloni jamur pada semua konsentrasi (Gambar 5.12).



Gambar 5.12 Hasil Uji Pendahuluan dengan Metode Dilusi Tabung 5

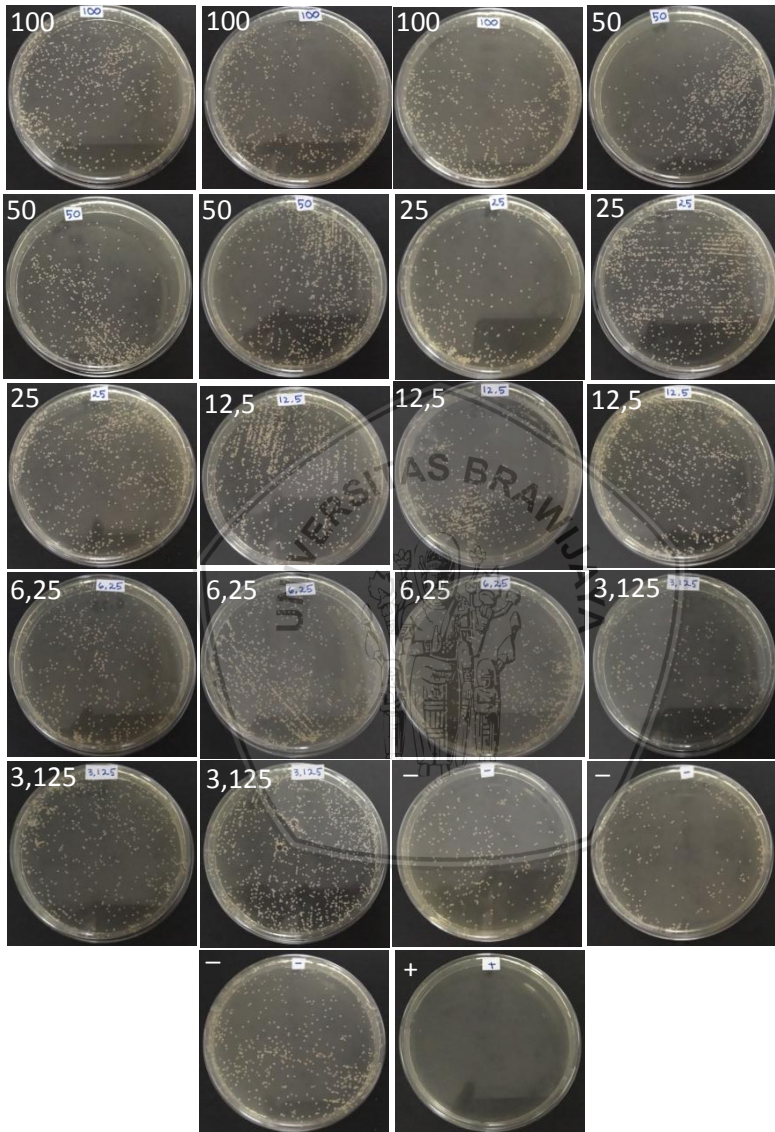
5.4 Uji Pengulangan dan Hasil dengan Metode Dilusi Tabung





Gambar 5.13 Hasil Uji Pengulangan dengan Metode Dilusi Tabung (sebelum pengenceran)

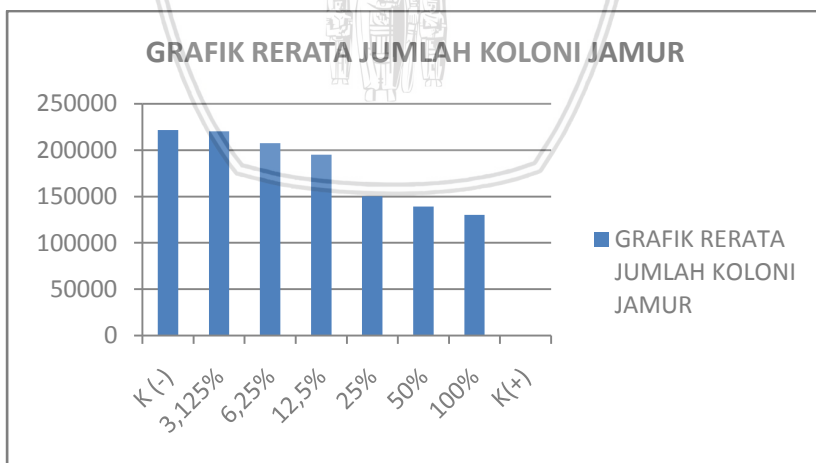
Uji pengulangan dilakukan dengan metode dilusi tabung pada konsentrasi 3,125%; 6,25%; 12,5%; 25%; 50%; 100%; 0 sebagai kontrol negatif dan klorheksidin sebagai kontrol positif. Simplisia daun sirsak yang digunakan dilarutkan dengan DMSO 1% dengan perbandingan 1:2. Setelah diinkubasi pada medium cair selama 24 jam dengan suhu 37°C, diambil satu ose dari tabung dan diinokulasikan ke medium agar. Hasil inkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C didapatkan hasil seperti pada Gambar 5.13. Bentuk koloni jamur hasil dari inokulasi pada medium agar tidak dapat diinterpretasi karena masih terlalu tebal sehingga harus dilakukan pengenceran agar koloni jamur dapat dihitung. Hasil pengulangan setelah pengenceran tampak pada Gambar 5.14 dan Tabel 5.3.



Gambar 5.14 Hasil Uji Pengulangan dengan Metode Dilusi Tabung (setelah Pengenceran)

Tabel 5.3 Hasil Uji Pengulangan dengan Metode Dilusi Tabung

Konsentrasi	Jumlah Koloni			Total	Total x Pengenceran	Rerata
	I	II	III			
k(+)	0	0	0	0	0	0
k(-)	512	404	415	1.331	665.500	221.833,3
3,125%	984	451	768	2.203	660.900	220.300
6.25%	650	873	553	2.076	622.800	207.600
12.50%	1009	728	1187	2.924	584.800	194.933,3
25%	307	823	1123	2.253	450.600	150.200
50%	654	894	538	2.086	417.200	139.066,7
100%	674	757	522	1.953	390.600	130.200



Gambar 5.15 Grafik Rerata Jumlah Koloni Jamur

Berdasarkan tabel dan grafik hasil uji pengulangan tersebut didapatkan adanya perbedaan jumlah koloni pada masing-

masing perlakuan. Kontrol negatif menunjukkan jumlah koloni terbanyak, kemudian jumlahnya menurun seiring dengan semakin besarnya konsentrasi simplisia daun sirsak. Kelompok kontrol positif mampu membunuh semua koloni jamur sehingga jumlah koloni jamur 0. Hal ini menunjukkan bahwa sebagai kontrol positif klorheksidin memiliki daya antifungi yang besar terhadap *Candida albicans*.

5.5 Analisa Data

Analisis data dilakukan berdasarkan jumlah koloni jamur pada agar yang telah di-*streaking* dari tabung berisi simplisia daun sirsak dan jamur yang sebelumnya sudah diinkubasi. Data yang didapat dari hasil penelitian terlebih dahulu dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas varian. Uji ini menggunakan uji *Shapiro-Wilk* dan uji *Levene*. Data yang didapat ternyata normal dan homogen, maka digunakan uji komparasi *One Way ANOVA* dengan derajat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$). Kemudian dengan uji *Post-Hoc* dengan *Tukey HSD*, uji korelasi *Pearson* dan uji regresi linear.

5.5.1 Hasil Pengujian Normalitas dan Uji Homogenitas Varians Terhadap Simplisia Daun Sirsak

Data hasil penelitian terlebih dahulu dilakukan uji normalitas untuk menentukan apakah bisa dilakukan uji *One Way ANOVA*. Untuk itu dilakukan uji normalitas menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* dan *Shapiro Wilk*. Jumlah data hasil penelitian ialah 24 data, sehingga uji *Shapiro-Wilk* lebih tepat digunakan untuk data yang berjumlah kurang dari 50. Berdasarkan Tabel 5.4 didapatkan bahwa signifikansi jumlah koloni jamur sebesar 0,192

($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa rerata jumlah koloni jamur berdistribusi normal.

Tabel 5.4 Hasil Uji Normalitas

Kelompok	Rerata Jumlah Koloni Jamur	Uji <i>Shapiro- Wilk</i>
		Angka Signifikansi
Kontrol Positif	0	0,192
Kontrol Negatif	221.833,3	
3,125%	220.300	
6,25%	207.600	
12,5%	194.933,3	
25%	150.200	
50%	139.066,7	
100%	130.200	
Kelompok	Rerata Jumlah Koloni Jamur	
		Angka Signifikansi
Kontrol Positif	0	0,200
Kontrol Negatif	221.833,3	
3,125%	220.300	
6,25%	207.600	
12,5%	194.933,3	
25%	150.200	
50%	139.066,7	
100%	130.200	

Setelah dilakukan uji normalitas, maka dilakukan uji homogenitas varian data menggunakan uji *Levene* untuk menguji apakah data homogen atau tidak. Hasil uji didapatkan signifikansi data sebesar 0,120 ($p > 0,05$) sehingga dapat disimpulkan bahwa data memiliki ragam varian yang sama (homogen) (Tabel 5.5).

Tabel 5.5 Hasil Uji *Levene*

Kelompok	Rerata Jumlah Koloni Jamur	Uji <i>Levene</i>
		Angka Signifikansi
Kontrol Positif	0	0,120
Kontrol Negatif	221.833,3	
3,125%	220.300	
6,25%	207.600	
12,5%	194.933,3	
25%	150.200	
50%	139.066,7	
100%	130.200	

5.5.2 Analisis Hasil Perhitungan Jumlah Koloni Jamur Terhadap *Simplisia Daun Sirsak*

Data yang telah diuji normalitas dan homogenitas selanjutnya dianalisis menggunakan uji *One Way ANOVA*, untuk

mengetahui adanya perbedaan berbagai konsentrasi simplisia daun sirsak terhadap rerata jumlah koloni jamur.

Tabel 5.6 Hasil Uji *One Way ANOVA*

Kelompok	Rerata Jumlah Koloni Jamur	Uji <i>One Way ANOVA</i>
		Angka Signifikansi
Kontrol Positif	0	0,001
Kontrol Negatif	221.833,3	
3,125%	220.300	
6,25%	207.600	
12,5%	194.933,3	
25%	150.200	
50%	139.066,7	
100%	130.200	

Hasil uji *One Way ANOVA* menunjukkan bahwa nilai signifikansi sebesar 0,001 ($p < 0,05$). Hal tersebut menunjukkan bahwa paling tidak terdapat dua kelompok perlakuan dari kedelapan kelompok perlakuan yang mempunyai perbedaan rerata jumlah koloni jamur yang bermakna. Setelah dilakukan uji *One Way ANOVA* maka untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara bermakna harus dilakukan uji *Post-Hoc* dengan *Tukey HSD*

yang dapat dilihat pada Tabel 5.7. Selanjutnya dilakukan uji korelasi *Pearson* yang dapat dilihat pada Tabel 5.8.

Tabel 5.7 Hasil Uji *Post Hoc* dengan *Tukey HSD*

	K(+)	K(-)	3,125%	6,25%	12,5%	25%	50%	100%
K(+)		0,001*	0,001*	0,003*	0,005*	0,037*	0,061	0,090
K(-)	0,001*		1,000	1,000	0,997	0,671	0,513	0,395
3,125%	0,001*	1,000		1,000	0,998	0,693	0,534	0,414
6,25%	0,003*	1,000	1,000		1,000	0,851	0,714	0,589
12,5%	0,005*	0,997	0,998	1,000		0,952	0,867	0,765
25%	0,037*	0,671	0,693	0,851	0,952		1,000	1,000
50%	0,061	0,513	0,534	0,714	0,867	1,000		1,000
100%	0,090	0,395	0,414	0,589	0,765	1,000	1,000	

Keterangan:

*) Berbeda secara signifikan

Tabel 5.8 Hasil Uji Korelasi *Pearson*

Kelompok	Rerata Jumlah Koloni Jamur	Uji Korelasi <i>Pearson</i>	
		Angka Signifikansi	Hubungan Korelasi
Kontrol Positif	0	0,010	-0,551
Kontrol Negatif	221.833,3		
3,125%	220.300		
6,25%	207.600		
12,5%	194.933,3		
25%	150.200		
50%	139.066,7		
100%	130.200		

Berdasarkan uji korelasi *Pearson* didapatkan bahwa terdapat korelasi yang bermakna antara perlakuan pemberian simplisia daun sirsak terhadap rerata jumlah koloni jamur *Candida albicans* dengan nilai signifikansi sebesar 0,010 ($p < 0,05$). Kekuatan korelasi bernilai sebesar -0,551 menunjukkan kekuatan korelasinya termasuk kategori sedang dengan arah korelasi negatif (berlawanan arah). Hal ini berarti bahwa semakin besar konsentrasi simplisia daun sirsak yang diberikan, maka rerata jumlah koloni jamur *Candida albicans* akan semakin menurun. Setelah uji korelasi *Pearson* dilakukan dilanjutkan dengan uji regresi untuk melihat seberapa besar kontribusi variabel independen dalam menyebabkan perubahan di variabel dependen (Tabel 5.9).

Tabel 5.9 Hasil Uji Regresi

Kelompok	Rerata Jumlah Koloni Jamur	Uji Regresi
		Angka R Square
Kontrol Positif	0	0,304
Kontrol Negatif	221.833,3	
3,125%	220.300	
6,25%	207.600	
12,5%	194.933,3	
25%	150.200	
50%	139.066,7	
100%	130.200	

Uji regresi berfungsi untuk mengetahui bentuk hubungan antara konsentrasi daun sirsak dan jumlah koloni serta besarnya pengaruh peningkatan konsentrasi daun sirsak terhadap jumlah koloni jamur. Koefisien determinasi *R square* (*R*) sebesar 0,304 berarti pengaruh pemberian simplisia daun sirsak dengan berbagai konsentrasi terhadap penurunan rerata jumlah koloni jamur *Candida albicans* sebesar 30,4%. Sedangkan sebesar 69,6% merupakan faktor-faktor lain yang tidak diteliti dimana juga ikut mempengaruhi dalam pemberian simplisia daun sirsak dengan berbagai konsentrasi

terhadap penurunan rerata jumlah koloni jamur. Faktor-faktor lain tersebut bisa merupakan substrat atau nutrisi, kelembapan, suhu, dan derajat keasaman (pH). Hubungan antara pemberian simplisia dengan jumlah koloni jamur dapat dinyatakan dengan rumus berikut:

$$Y = a + bX$$

$$Y = 207.307,4 + (-949,935X)$$

Simbol Y merupakan jumlah koloni yang terbentuk dari pemberian simplisia daun sirsak terhadap jamur *Candida albicans* dan X merupakan besarnya konsentrasi. Hasil dari perhitungan Y lalu dibandingkan dalam range pada tabel *One Way ANOVA* pada kolom *95% Confidence Interval For Mean*, jika lebih rendah dari *Lower Bound* pada kontrol negatif (0%) maka simplisia daun sirsak sudah memiliki perbedaan cukup signifikan dan bisa dikatakan cukup efektif.

BAB 6 PEMBAHASAN

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek simplisia daun sirsak dalam bentuk nanopartikel sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*. Simplisia tersebut lalu diproses menjadi nanopartikel menggunakan alat *High Energy Milling-Ellipse 3D Motion* (HEM-E3D). Penggilingan (*milling*) merupakan salah satu metode *top-down* sintesis nanopartikel. Penggunaan HEM-E3D sebagai alat *milling* bertujuan untuk memperoleh serbuk simplisia yang lebih kecil. *High Energy Milling* merupakan cara penggilingan baru yang mempunyai beberapa keunggulan bila dibandingkan dengan alat *milling* konvensional. *High Energy Milling* mampu menghasilkan partikel yang lebih kecil dalam waktu yang lebih singkat (Rochman, 2009).

Serbuk simplisia beserta bola-bola penghancur dimasukkan dalam wadah (*jar*) HEM-E3D yang sebelumnya telah dicuci dengan etanol. Etanol digunakan karena dapat meminimalkan kontaminasi yang mungkin terjadi selama proses *milling* dan bersifat volatil (mudah menguap). Senyawa lain yang juga dapat digunakan sebagai pencuci adalah metanol dan aseton.

Simplisia daun sirsak hasil *milling* pertama mempunyai ukuran 1.390,9 - 1.747,9 nm (rata-rata ukuran partikel 1.569,4 nm). *Milling* kedua menghasilkan simplisia daun sirsak dengan ukuran 1.023,8 - 1.690,6 (rata-rata ukuran partikel 1.357,2 nm). Homogenitas ukuran yang diperoleh masih kurang baik dan ukuran tersebut tidak memenuhi syarat untuk dapat dikategorikan sebagai

nanopartikel karena lebih dari 100 nm. Hal ini dapat disebabkan oleh beberapa hal, antara lain :

1. Material bahan

Proses *milling* ini menggunakan simplisia daun sirsak sebagai bahan. Tulang daun merupakan salah satu anatomi/jaringan pada daun yang terdiri dari jaringan xilem dan floem. Salah satu penyusun xilem dan floem adalah sklerenkim. Sklerenkim merupakan jaringan penguat tumbuhan yang terdiri dari sel-sel yang mengalami penebalan dinding secara merata. Sklerenkim dibedakan ke dalam serat dan sel batu (sklereid) (Kimball, 2001). Struktur ini menyebabkan daun lebih sulit untuk diproses dengan HEM-E3D.

2. Ukuran bola penghancur

Ukuran bola penghancur juga mempengaruhi efisiensi dari proses *milling*. Ukuran yang besar dan *density* yang tinggi pada suatu bola akan menghasilkan energy *impact* yang besar begitu pun sebaliknya (Suryanarayana, 2003). Kaloshkin *et al* (1997) mengungkapkan bahwa untuk memaksimalkan proses *milling* salah satunya dengan menggunakan ukuran bola yang berbeda-beda. Tetapi ada batasan dalam mengkombinasi bola tersebut, jika perbedaan (bola besar dan bola kecil) terlalu besar maka dikhawatirkan bola yang besar akan menghancurkan bola yang kecil.

3. Pengaruh bentuk jar

Desain pinggir bawah *jar* HEM-3ED yang berbentuk kurva dapat menyebabkan berkurangnya intensitas *milling* karena bola

tidak menumbuk dinding , tetapi hanya berputar saja. Hal ini menyebabkan terbentuknya *dead zone* yang merupakan daerah dimana serbuk tidak tergiling karena media penggiling (bola) tidak dapat mencapainya saat *milling* berlangsung (Kuswanto, 2008). Hal ini tampak pada hasil pengukuran dengan *Particle Size Analyzer* (PSA) yang menunjukkan partikel simplisia daun sirsak setelah *milling* masih kurang homogen.

4. Proses aglomerasi

Aglomerasi (gumpalan) merupakan proses bergabungnya partikel-partikel kecil menjadi struktur yang lebih besar melalui pengikatan fisis. Adanya aglomerasi ini diduga dapat menyebabkan terjadinya kesalahan interpretasi terhadap luas permukaan spesifik suatu material karena yang dianalisa bukan merupakan partikel tunggal namun aglomerat (Muhriz *et al.*, 2011).

Jamur *Candida albicans* didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Univeritas Brawijaya, Malang. Hasil dari penelitian ini diperoleh dengan mengamati Kadar Bunuh Minimum (KBM) dengan menghitung jumlah koloni jamur pada agar yang telah distriking dari tabung berisi simplisia daun sirsak dan jamur.

Jamur *Candida albicans* sebelumnya diuji terlebih dahulu untuk menentukan apakah jamur tersebut benar merupakan bakteri jamur *Candida albicans*. Hasil pewarnaan Gram menunjukkan jamur bersifat gram positif dengan adanya sel ragi berbentuk oval dan *budding cell* yang berwarna keunguan, dimana *Candida albicans*

memang bersifat gram positif karena berwarna keunguan dan berbentuk oval (Kayser *et al.*, 2005). Hasil tes *Germinating Tube* juga menunjukkan hasil bahwa jamur yang diidentifikasi benar *Candida albicans*. Hal ini dapat terjadi karena pada medium yang mengandung protein, misalnya serum, yang ditambah dengan isolat jamur *Candida albicans* pada suhu 37°C selama 1-2 jam terjadi pembentukan pseudohifa memanjang khas *Candida albicans* (Tjampakasari, 2006).

Telah dilakukan uji pendahuluan sebelum penelitian utama dilakukan dengan menggunakan metode dilusi. Metode dilusi tabung menggunakan medium cair dan medium padat. Kadar bunuh minimum (KBM) tidak dapat dievaluasi karena masih terdapat pertumbuhan koloni jamur di semua konsentrasi dari inokulasi medium cair hasil inkubasi ke dalam medium padat. Berdasarkan seluruh penelitian pendahuluan yang telah dilakukan maka disimpulkan bahwa penelitian utama dilakukan untuk menguji apakah simplisia daun sirsak memiliki efek terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dengan metode dilusi agar. Pelarut yang digunakan adalah DMSO 1% dengan rasio 1:2. Walaupun asam asetat telah terbukti tidak memberikan efek antifungi terhadap *Candida albicans* pada konsentrasi 0,375%, DMSO 1% yang merupakan pelarut polar dan non polar diharapkan lebih mampu mengeluarkan zat aktif dalam daun sirsak. Konsentrasi yang digunakan untuk pengulangan pada penelitian utama adalah 100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%; 3,125%.

Uji pengulangan yang dilakukan adalah sebanyak tiga kali pada setiap konsentrasi. Pengamatan yang dilakukan menunjukkan bahwa simplisia daun sirsak (*Annona muricata L.*) tidak memiliki efek antifungi terhadap *Candida albicans*. Rata-rata jumlah koloni jamur pada konsentrasi 3,125% sebanyak 220.300, pada konsentrasi 6,25% sebanyak 207.600, pada konsentrasi 12,5% sebanyak 194.933,3 pada konsentrasi 25% sebanyak 150.200, pada konsentrasi 50% sebanyak 139.066,7, pada konsentasi 100% sebanyak 130.200 koloni. Kontrol positif klorheksidin menunjukkan rata-rata jumlah koloni sebanyak 0 sedangkan kontrol negatif menunjukkan rata-rata jumlah koloni sebanyak 201.833,3. Semakin besar konsentrasi simplisia daun sirsak yang diberikan, semakin sedikit jumlah koloni jamur *Candida albicans* yang terbentuk. Ada kecenderungan penurunan rata-rata jumlah koloni jamur dengan semakin bertambahnya konsentrasi simplisia daun sirsak yang diberikan, namun penurunan tersebut tidak berbeda nyata dengan kondisi kontrol negatif. Sehingga berdasarkan hasil penelitian, dapat disimpulkan bahwa pemberian simplisia daun sirsak tidak memberikan efek sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*. Kadar Bunuh Minimum (KBM) juga tidak dapat ditentukan karena pemberian simplisia daun sirsak hingga konsentrasi tertinggi masih menunjukkan pertumbuhan koloni jamur.

Uji *One Way ANOVA* menunjukkan paling tidak terdapat dua kelompok perlakuan dari kedelapan kelompok perlakuan yang mempunyai perbedaan rerata jumlah koloni jamur yang bermakna karena nilai p sebesar 0,001 ($p < 0,05$). Hasil uji korelasi *Pearson*

menunjukkan kekuatan korelasi bernilai sebesar -0,551 menunjukkan kekuatan korelasinya termasuk kategori sedang dengan arah korelasi negatif (berlawanan arah). Hal ini berarti bahwa semakin besar konsentrasi simplisia daun sirsak yang diberikan, maka akan semakin menurunkan rerata jumlah koloni jamur *Candida albicans*. Uji regresi menunjukkan bahwa pengaruh pemberian simplisia daun sirsak dengan berbagai konsentrasi terhadap penurunan jumlah koloni jamur *Candida albicans* adalah sebesar 30,4%. Sisanya 69,6% merupakan faktor lain yang tidak diteliti juga mempengaruhi hasil penelitian.

Penurunan jumlah koloni disebabkan karena adanya perbedaan konsentrasi yang diberikan. Semakin besar konsentrasi simplisia daun sirsak yang diberikan, maka rerata jumlah koloni jamur *Candida albicans* akan semakin menurun. Kandungan zat aktif seperti alkaloid, tanin, flavonoid, dan *annonaceous acetogenins* diketahui memiliki efek yang dapat menyebabkan kematian sel mikroba. Namun, ukuran serbuk simplisia yang terlalu halus menyebabkan dinding sel daun pecah. Dinding sel daun merupakan perlindungan untuk menjaga segala sesuatu yang seharusnya berada di dalam sel tetap berada di dalam sel (Adib, 2014). Jika dinding sel daun pecah sebelum proses penyarian maka zat aktif akan keluar dan menyebabkan kadar zat aktif yang terkandung dalam daun sirsak menjadi berkurang sehingga berakibat pada berkurangnya daya hambat. Selain itu, ukuran partikel simplisia daun sirsak yang digunakan tidak sesuai dengan yang diharapkan. Ukuran partikel simplisia daun sirsak yang digunakan pada penelitian ini tidak

mencapai ukuran nanopartikel. Ukuran simplisia daun sirsak masih cukup besar menyebabkan partikel tersebut tidak dapat masuk ke dinding sel jamur dan berinteraksi dengan membran sel.

Selain konsentrasi, ada faktor-faktor lain yang tidak diteliti dimana juga ikut mempengaruhi kemampuan kerja zat aktif yang terdapat pada simplisia daun sirsak sehingga berakibat pada penurunan rerata jumlah koloni jamur. Faktor lain yang pertama yaitu waktu. Pada saat jamur dipapar oleh bahan fungisida spesifik, tidak semua jamur dapat dibunuh pada waktu yang sama. Faktor kedua adalah pH. Konsentrasi ion hidrogen mempengaruhi peranan fungisida, dengan cara mempengaruhi organisme dan bahan kimia dalam fungisida tersebut. Pada saat dicampurkan dalam suatu media pertumbuhan dengan pH 7, jamur akan bermuatan negatif. Suatu peningkatan pH akan meningkatkan muatan dan dapat merubah konsentrasi efektif bahan kimia pada permukaan sel. pH juga menentukan derajat ionisasi senyawa kimia. Temperatur merupakan faktor ketiga. Pembunuhan jamur oleh bahan kimia akan meningkat dengan suatu peningkatan temperatur. Faktor keempat yakni sifat organisme. Kemampuan suatu bahan tertentu bergantung pada komponen organisme yang diuji dengan bahan tersebut. Hal terpenting terkait sifat organisme diantaranya spesies mikroorganisme, fase pertumbuhan kultur, adanya struktur khusus, seperti spora atau kapsul, sejarah kultur sebelumnya, dan jumlah organisme dalam sistem uji. Faktor kelima yaitu usia mikroorganisme. Tingkat kerentanan mikroorganisme sangat ditentukan oleh umur biakan mikroorganisme. Pada prinsipnya

kerentanan mikroorganismenya yang tinggi yaitu pada fase pertumbuhan eksponensial. Sedangkan pada fase stasioner dianggap kurang efektif karena metabolisme sel mikroba tidak terlalu aktif.

Keterbatasan pertama dari penelitian ini adalah ukuran partikel simplisia daun sirsak yang digunakan. Ukuran partikel simplisia daun sirsak yang digunakan pada penelitian ini tidak mencapai ukuran nanopartikel. Ukuran simplisia daun sirsak masih cukup besar menyebabkan partikel tersebut tidak dapat masuk ke dinding sel jamur dan berinteraksi dengan membran sel. Keterbatasan yang kedua adalah tidak dilakukannya evaluasi tentang apakah masa simpan dari simplisia daun sirsak berpengaruh dengan efektivitas antifunginya. Keterbatasan ketiga adalah konsentrasi maksimum dari simplisia daun sirsak yang digunakan pada penelitian ini hanya 100%. Apabila konsentrasi maksimum ditingkatkan, besar kemungkinan rerata jumlah koloni jamur juga akan menurun. Keterbatasan keempat adalah dalam penelitian ini tidak diketahui zat aktif apa yang paling berperan terhadap penurunan rerata jumlah koloni jamur. Hal ini dikarenakan tidak adanya pemisahan/spesifikasi zat aktif tertentu yang digunakan untuk penelitian ini.

Penelitian ini menunjukkan bahwa pemrosesan simplisia daun sirsak (*Annona muricata* Linn) dengan alat *High Energy Milling-Ellipse 3D Motion* mengalami kegagalan preparasi. Sehingga pada penelitian berikutnya tidak disarankan untuk melakukan preparasi nanopartikel dari simplisia dengan alat ini. Penelitian selanjutnya disarankan untuk menggunakan nanokristal yang berasal

dari zat aktif atau pemanfaatan *nanocarrier* (*nanotube*, *Solid Lipid Nanopartikel* (SLN), liposom, Polimerik Misel (PM) dan dendrimer). Sedangkan metode preparasi nanopartikel yang disarankan yaitu metode tekanan tinggi homogenisasi, milling, spray-drying, koaservasi kompleks, ko-presipitasi, *salting out*, nanopresipitasi, dan difusi-emulsifikasi pelarut, cairan superkritik, *self assembly*, dan dialisis. Pemilihan metode preparasi disesuaikan dengan bahan dan tujuan preparasi. Penelitian ini diharapkan bermanfaat sebagai referensi untuk penelitian lebih lanjut dalam bidang mikrobiologi dan penyakit mulut mengenai antifungi terhadap *Candida albicans* yang lebih efektif dan aman. Penelitian ini masih memerlukan penelitian lebih lanjut agar dapat menjadi terapi komplementer infeksi *Candida albicans*.

BAB 7 KESIMPULAN DAN SARAN

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa :

1. Simplisia daun sirsak tidak memiliki efek sebagai antifungi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*.
2. Kadar Bunuh Minimum (KBM) simplisia daun sirsak (*Annona muricata Linn*) terhadap *Candida albicans* secara *in vitro* tidak bisa ditentukan.

7.2 Saran

1. Tidak disarankan untuk melakukan preparasi nanopartikel dari simplisia daun sirsak menggunakan alat *High Energy Milling-Ellipse 3D Motion*.
2. Penelitian menggunakan nanokristal dan *nanocarrier* sangat dianjurkan.
3. Pemilihan metode preparasi disesuaikan dengan bahan dan tujuan preparasi.
4. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai lama simpan simplisia daun sirsak (*Annona muricata Linn*) dengan efektivitasnya sebagai antifungi terhadap *Candida albicans*.
5. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pengaruh penggunaan pelarut lain untuk simplisia daun sirsak (*Annona muricata Linn*) terhadap efektivitasnya sebagai antifungi terhadap *Candida albicans*.

DAFTAR PUSTAKA

- Abad H.S.E., Zaini F., Kordbacheh P., Mahmoudi M., Safara M., Mortezaee V. 2015. In Vitro Activity of Caspofungin Against Fluconazole-Resistant *Candida* Species Isolated From Clinical Samples in Iran, *Jundishapur Journal Microbiol*, 8(6):1-4.
- Académie des Sciences & Académie des technologies. 2004. Nanoscience, Nanotechnologies, *RST* No. 18.
- Adib. 2014. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Infundasi Terhadap Kadar Asetogenin Hasil Isolasi Daun Sirsak (*Annona muricata* L.). Yogyakarta. Universitas Gajah Mada.
- Akpan A. dan Morgan R. 2002. Oral candidiasis. *Postgrad Med J*. 78: 455-459.
- Anaissie E.J., McGinnis M.R., Pfaller M.A. 2009. *Clinical Mycology 2nd Edition*. London. *Churcill Livingstone*.
- Ansari S.H., Islam F., Sameem M. 2012. Influence of Nanotechnology on Herbal Drugs: A Review. *J Adv Pharm Tech Res*. Vol 8(3) : 142-146.
- Arendorf T.M. dan Walker D.M. 1984. Tobacco smoking and denture wearing as local aetiological factors in median rhomboid glossitis. *Int J Oral Surg*.13: 411-415.
- Bell T.E. 2006. Understanding Risk Assessment of Nanotechnology. *Artikel, National Nanotechnology Coordination Office*, Amerika Serikat.
- Bermejo A., Figadere B., Zafra-Polo M.C., Barrachina L, Estomell E., Cortes D. 2005. Acetogenin from *Annonaceae* : Recent Progress in Isolation, Synthesis, and Mechanism of Action. *Nat. Prod. Rep.*, 22, 269-303.

- Bhat S. V., Nagasampagi B. A., Meenakshi S. 2009. Natural Products : Chemistry and Application. *Narosa Publishing House*, New Delhi. India.
- Bonifacio B.V., da Silva P.B., Ramos M.A., Dos S., Negri K.M.S., Bauab T.M., *et al.* 2014. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems and Herbal Medicines: A Review. *International Journal of Nanomedicines*, 9:1-15.
- Brooks G.F., Carrol K.C., Butel J.S., Morse S.A. 2007. *Medical Microbiology*. 24thed, *Mc Graw Hill*, 642-5.
- Calderone R.A. dan Fonzi W.A. 2001. Virulence Factors of *Candida albicans*. *Trends in Microbiology*.
- Chabner B.A., Rian D.P., Paz-Arez L., Carbonero R.G., Calabresi P. 2001. *Antineoplastic Agents In Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics 10th. Edition. McGraw-Hill. Medical Publishing Division*. P.1417-1421.
- Dang Q.L., Kim W.K., Nguyen C.M., Choi Y.H., Choi G.J., Jang K.S., *et al.* 2011. Nematicidal and Antifungal Activities of Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa* Against Various Plant Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(20): 11160-7.
- De Almeida O.P. dan Scully C. 2002. Fungal infections of the mouth. *Braz J Oral Sci*.1: 19-26.
- De Sousa O.V., Vieira G., de Pinho J., Yamamoto C.H., Alves M.S. 2010. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona Muricata* L. Leaves in Animal Models. *International Journal of Molecular Sciences* no. 11: 2067–2078.
- Departemen Kesehatan Republik Indonesia. 2008. *Farmakope Herbal Indonesia*. (Edisi I). Jakarta: Departemen Kesehatan Republik Indonesia.

- Dewardari K.T., Yuliani S., Yasni S. 2013. Ekstraksi dan Karakterisasi Nanopartikel Ekstrak Sirih Merah (*Piper crocatum*). *Jurnal Pascapanen*, 10(2): 58-65.
- Dian R.N., Zufahair, Kartika D. 2016. Identifikasi Senyawa Metabolit Sekunder Serta Uji Aktivitas Ekstrak Daun Sirsak Sebagai Antibakteri. Purwokerto. Universitas Jendral Soedirman.
- Emilan T., Kurnia A., Utami B., Diyani L.N., Maulana A. 2011. Konsep Herbal Indonesia : Pamastian Mutu Produk Herbal. Depok. FMIPA Universitas Indonesia.
- Febriani D., Mulyanti D., Rismawati E. 2015. Karakterisasi Simplisia dan Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn). *Prosiding Penelitian SPeSIA Universitas Islam Bandung*.
- François L.M., Wilson D., Hube B. 2013. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence*. 4:2, 119-128, DOI: 10.4161/viru.22913.
- Gopi S., Amalraj A., Haponiuk J.T., Thomas S. 2016. Introduction of Nanotechnology in Herbal drugs and Neutraceutical: A Review. *Journal of Nanomedicine & Biotherapeutic Discovery*, 6(2):1-8.
- Greenberg, Glick, Ship. 2008. *Burket's Oral Medicine*. 11thed. Hamilton. *BC Decker INC*:4:79-82.
- Harwanti A.Y. 2012. Uji Efek Antifungi Ekstrak Etanol Buah Lada Hitam (*Piper nigrum* Linn.) Terhadap Pertumbuhan *Candida albicans* Penyebab Kandidiasis Oral Secara In Vitro. Skripsi. Tidak diterbitkan. Malang. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Hasanah K.U. 2012. Uji Daya Antifungi Propolis Terhadap *Candida albicans* dan *Pityrosporum ovale*. Skripsi. Tidak diterbitkan. Surakarta. Universitas Muhammadiyah Surakarta.

- Kaloshkin S.D., Tomlin I.A., Andrianov G.A, Baldokhin U.V, Shelekhov E.V. 1997. Phase Transformation and Hyperfine Interactions in Mechanically Alloyed Fe-Cu Solid Solution. *Mater Science Forum*. 235-238, 565-570.
- Kayser F.H., Bienz K.A., Eckert J., Zinkernagel R.M. 2005. *Fungi as Human Pathogens : Medical Microbiology*. New York, Thieme Stuttgart,362-4.
- Kimbal J.W. 2001. Biologi. Jakarta. Erlangga
- Krisnawan A. 2009. Karakterisasi Sampel Paduan Magnesium Jenis AZ91D Dengan Berbagai Variasi Waktu Milling Oleh X-Ray Fluorescence (XRF) dan XRD. Skripsi. UINSH. Jakarta.
- Kumar C.S.S.R., Hormes J., Leuschner C. 2005. *Nanofabrication Towards Biomedical Applications*. Wile-vchverlaggbmh & co.kga, weinheim. Jerman.
- Kuswanto E. 2008. Pengaruh Pelapisan pada Pemaduan Mekanik Fe dan Al. Skripsi. Fakultas Teknik Universitas Indonesia. Jakarta
- Leontsev S., Lucas M., Shen Y., Sheets A., Horwarth J., Karapetrova E., *et al.* 2013. Surfactant Removal Study for Nano-Scale SmCo₅ Powder Prepared by High Energy Ball Milling. *IEEE Transactions on Magnetism*, 49(7): 3341-3344.
- Li H., Wang Z., Liu Y. 2003. Review in the studies on tannins activity of cancer prevention and anticancer. *Zhong-Yao-Cai*. 26(6): 444-448.
- Mariappan P., Fathi A., Ahmad A. 2011. Treatment of oral candidiasis (thrush) by *Saccharomyces cerevisiae*, *Int.J.Med.Med.Sci*, 3(3), 83-86.
- Mella Y. 2014. Isolasi dan Identifikasi Senyawa Alkaloid dalam Ekstrak Daun Sirsak Hutan (*Annona glabra*). Bogor. Institut Pertanian Bogor.

- Mohamadi J., Havasian M.R., Panahi J., Pakzad I. 2015. Antifungal drug resistance pattern of *Candida. spp* isolated from vaginitis in Ilam-Iran during 2013-2014. *Bioinformation* 11(4): 203-206.
- Muhriz M., Subagio A., Pardoyo. 2011. Pembuatan Zeolit Nanopartikel dengan Metode High Energy Milling (Zeolite Nanoparticle Fabrication Using High Energy Milling Method). Semarang. *Jurnal Sains dan Matematika UNDIP*.
- Murray P.R., Ellen J.B., Marie L.L., Micheal A.P. 2007. *Manual of Clinical Microbiology 9th edition*.
- Muzyka B.C. 2005. *Oral fungal infections. Dent Clin North Am.*49:49-65.
- Nawwar M., Ayoub N., Hussein S., Hashim A., El-Sharawy R., Wende K., *et al.* 2012. Flavonol Triglycoside and Investigation of the Antioxidant and Cell Stimulating Activities of *Annona Muricata* Linn. *Archives of Pharmacal Research* 35, no. 5: 761-767.
- Neville B.W., Damm D.D., Allen C.M., Bouquot J.E. 2002. *Fungal and protozoal diseases. Oral & Maxillofacial Pathology. 2nd ed. Philadelphia:Saunders*; p.189-197.
- Ngajow M., Abidjulu J., Kamu V.S. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* secara *In vitro*. Universitas Sam Ratulangi Manado.
- Nicholls S., MacCallum D.M., Kaffarnik F.A, Selway L., Peck S.C., Brown A.J. 2011. Activation of the heat shock transcription factor Hsf1 is essential for the full virulence of the fungal pathogen *Candida albicans*. *Fungal Genet Biol.*48:297-305; PMID:20817114; [http:// dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.010](http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.010).
- Noller B. 2003. *Technical Data Report for Graviola (Annona muricata)*. Texas. Sage Press.

- Nurdina Y.A., Praharani D., Ermawati T. 2012. Daya Hambat Ekstrak Daun Pare (*Momordica charantia*) Terhadap *Lactobacillus acidophilus*. *Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa*.
- Nuria M.C., Faizaitun A., Sumantri. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha Curcas L*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Atcc 25923, *Escherichia Coli* Atcc 25922, dan *Salmonella Typhi* Atcc 1408. *Mediagro*. 5(2):26–37.
- Nuryadi R. 2009. Nanoteknologi Untuk Solusi Krisis Energi. *Artikel Seminar Nanoteknologi*. Semarang.
- Orwa C., Mutua A., Kindt R., Jamnadass R., Simons A. 2009. Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0. (Serial Online) <http://www.worldagroforestry.org/af/treedb/> .
- Pankhurst C.L. 2009. Candidiasis (oropharyngeal). *Clin Evid (Online)*. Epub 2009 Mar 18.
- Pasaribu S. 2009. Uji Bioaktivitas Metabolit Sekunder Dari Daun Tumbuhan Bandotan. *Jurnal Kimia Mulawarman*.
- Paul K.T., Satpathy S.K., Manna I. 2007. Preparation and Characterization of Nanostructured Materials from Fly Ash: A Waste from Thermal Power Stations, by High Energy Ball Milling. *Nanoscale Res Lett*, 2: 397-404.
- Pradana P.Y., Suratmo, Retnowati, R. 2015. Isolasi dan Karakterisasi Senyawa Turunan Acetogenin dari Daun Srikaya (*Annona squamosa*) serta Uji Toksisitas. *Kimia Student Journal*, 1(1): 798-804.
- Puspitasari M.L., Wulansari T.V., Widyaningsih T.D., Maligan J.M., Nugrahini N.I., 2016. Aktivitas Antioksidan Suplemen Herbal Daun Sirsak (*Annona muricata L.*) dan Kulit Manggis (*Garcinia mangostana L.*): Kajian Pustaka. Malang. FTP Universitas Brawijaya.

- Rangkuti S.N., Lubis L.S., Karsono. 2018. Uji Efektivitas Nanopartikel Daun Sirih Merah (*Piper crocatum*) Sebagai Penurun Kadar Kolesterol Serum Darah Marmot (*Cavia cobaya*). Jurnal FARMAGAZINE. Fakultas Farmasi Universitas Sumatra Utara.
- Ranjit K. dan Baquee A.A. 2013. Nanoparticle : An Overview of Preparation, Characterization and Application. *International Research Journal of Pharmacy*, 4(4): 47-57.
- Reichart P.A., Samaranayake L.P., Philipsen H.P. 2000. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: A review. *Oral Dis*.6: 85-91.
- Retno M. 2016. Fisiologi Tumbuhan Metabolit Sekunder dan Pertahan Tumbuhan. Malang. Universitas Brawijaya.
- Rivai H., Nanda P.E., Fadhilah H. 2014. Pembuatan Dan Karakterisasi Ekstrak Kering Daun Sirih Hijau (*Piper betle* L.). Padang. *Jurnal Farmasi Higea*, Vol. 6, no. 2.
- Rochman N.T. 2009. Alat Pembuat Nanopartikel Made in Indonesia. Artikel. Jakarta.
- Rohadi D. 2016. Aktivitas Antimikosis Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn). Cirebon. *Pharmaciana*, Vol. 6, No. 1: 101-106
- Saifudin A. 2014. Senyawa Alam Metabolit Sekunder Teori, Konsep dan, Teknik Pemurnian. Sleman. *deepublish CV Budi Utama*.
- Sarimai, Ratnawulan, Ramli, Fauzi A. 2016. Pengaruh Waktu Milling Terhadap Ukuran Butir Forsterite (Mg_2SiO_4) Mineral dari Kabupaten Solok Selatan. Padang. *Pillar of Phisics Universitas Negeri Padang*, 8:65-72.
- Siswandono dan Soekardjo B. 2000. *Kimia Medisinal Edisi 2*. 228-232, 234, 239. Surabaya. *Airlangga University Press*.

- Solimun. 2001. Diktat Metodologi Penelitian LKIP dan PKM Kelompok Agrokompleks. Malang. Universitas Brawijaya.
- Sunarjono H. 2005. Sirsak dan Srikaya : Budi Daya untuk Menghasilkan Buah Prima. *Penebar Swadaya*. Depok
- Sulistiyani N. dan Kumala E. 2011. Aktivitas Antifungi Ekstrak Etanol Batang Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steen.) Terhadap *Candida albicans* Serta Skrining Fitokimia. Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta.
- Suryanarayana C. 2003. Mechanical Alloying and Milling. Colorado School of Mine Golden. Colorado. CO 80401-1887, USA
- Tai S. Kedari dan Ayesha A. Khan. 2014. Guyabano (*Annona Muricata*): A review of its traditional uses phytochemistry and pharmacology. *American Journal of Research Communication*. 2(10): 247-268
www.usa-journals.com, ISSN: 2325-4076.
- Taylor L. 2002. Technical Data Report for Graviola. *Sage Press Inc.* Austin. 1-18.
- Tjampakasari R.C. 2006. Karakteristik *Candida albicans*. *Cermin Dunia Kedok.* 151: 33-6
- Tomellini R., Faure U., Oliver P.. Nanomedicine Nanotechnology for Health, Belgia. *European Technology Platform*. hal. 2.
- Vandepitte J., Verhaegen J., Engbaek K. 2003. *2nd ed. World Health Organization*. Geneva.61, 76, 144-150
- Vijayameena C., Subhashini G., Loganayagi M., Ramesh B. 2013. Phytochemical Screening and Assessment of Antibacterial Activity for the Bioactive Compounds in *Annona Muricata*. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 2, no. 1: 1-8.

- Villo P., Vares L., Toom L. 2008. Synthesis of Acetogenin Analogues. Master Thesis in Organic Chemistry, *University of Tartu*.
- Wijaya M. 2012. Ekstraksi Annonaceous Acetogenin dari Daun Sirsak, *Annona muricata*, sebagai Senyawa Bioaktif Antikanker. Depok. Universitas Indonesia.
- Williams D.W., Kuriyama T., Silva S., Malic S., Lewis M.A. 2011. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol.* 55: 250-265.
- Wipasar. 2012. Aplikasi Nanosains dalam Berbagai Bidang Kehidupan : Nanoteknologi. Yogyakarta. Universitas Negeri Yogyakarta.
- Wu F.E., Gu Z.M., Zeng L., Zhao G.X., Zhang Y., McLaughlin J.L., *et al.* 1995. Two New Cytotoxic Monotetrahydrofuran Annonaceous Acetogenins, Annomuricins A and B, from the Leaves of *Annona muricata* L. *Journal of Natural Products.* 58: 830-836.
- Wullur A.C., Schaduw J., Wardhani A.N.K. 2016. Identifikasi Alkaloid pada Daun Sirsak (*Annona muricata* L.). Jurusan Farmasi Politeknik Kesehatan Kemenkes Manado.
- Zeng L., Ye Q., Oberlies N.H., Gu Z.M, McLaughlin, Jerry L., *et al.* 1996. Recent Advances in Annonaceous Acetogenins. *Natural Product Report*, 275-306.