

**UJI EKSTRAK ETANOL KULIT PISANG AMBON (*Musa paradisiaca*
var. *sapientum* (L.) Kunt.) SEBAGAI ANTIFUNGI TERHADAP
Candida albicans SECARA IN VITRO**

TUGAS AKHIR

**Untuk Memenuhi Persyaratan
Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran**



Oleh :

Laksamana Pranata

NIM : 165070101111023

PROGRAM STUDI S1 PENDIDIKAN DOKTER

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2019

HALAMAN PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI EKSTRAK ETANOL KULIT PISANG AMBON (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) SEBAGAI ANTIFUNGI TERHADAP *Candida albicans* SECARA IN VITRO

Oleh :

Laksamana Pranata

NIM. 165070101111023

Telah diuji pada

Hari : Kamis

Tanggal : 17 Oktober 2019

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I



dr. Arif Widiatmoko, Sp. KK.

NIP. 197804282009121005

Pembimbing I/Penguji II,



Prof. Dr. dr. Noorhamdani A.S. DMM Sp. MK (K)

NIP. 195011101980021001

Pembimbing II/Penguji III,

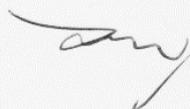


dr. Catur Ari Setianto, Sp. S

NIP. 2016098101291001

Mengetahui,

Kepala Program Studi Pendidikan Dokter



dr. Triwahju Astuti, M.Kes., Sp. P (K)

NIP. 196310221996012001

	DAFTAR ISI
Halaman Judul	i
Halaman Pengesahan	ii
Kata Pengantar	iii
Abstrak	v
Abstract	vi
Daftar Isi	vii
Daftar Gambar	x
Daftar Tabel	xi
Daftar Lampiran	xii
Daftar Singkatan	xiii

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penulisan	3
1.3.1 Tujuan Umum	3
1.3.2 Tujuan Khusus	4
1.4 Manfaat Penelitian	4
1.4.1 Manfaat Akademis	4
1.4.2 Manfaat Praktis	4

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 <i>Candida albicans</i>	5
2.1.1 Morfologi dan Identifikasi	5
2.1.2 Struktur Antigen	7
2.1.3 Patogenesis dan Patologi	7
2.1.4 Faktor Predisposisi	8
2.1.5 Resistensi	10
2.1.6 Manifestasi Klinis	11
2.2 Pisang Ambon	14
2.2.1 Determinasi dan Deskripsi Morfologi	14



2.2.2 Kandungan Kimia	17
2.2.2.1 Tanin	17
2.2.2.2 Flavonoid	18
2.2.2.3 Quinon	19
2.3 Aktivitas Antifungi	20
2.4 Maserasi	22
2.5 Uji Aktivitas Antimikroba	23
2.5.1 Metode Dilusi	23
2.5.2 Metode Difusi	24
BAB 3 KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS PENELITIAN	
3.1 Kerangka Konsep	26
3.2 Deskripsi Kerangka Konsep	27
3.3 Hipotesis Penelitian	27
BAB 4 METODE PENELITIAN	
4.1 Desain Penelitian	28
4.2 Sampel Penelitian	28
4.3 Pengulangan	28
4.4 Variabel Penelitian	29
4.4.1 Variabel Bebas	29
4.4.2 Variabel Tergantung	29
4.5 Tempat dan Waktu Penelitian	30
4.6 Alat dan Bahan	30
4.6.1 Alat	30
4.6.2 Bahan	31
4.7 Definisi Operasional	31
4.8 Prosedur Penelitian	34
4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Pisang Ambon	34
4.8.2 Identifikasi <i>Candida albicans</i>	35
4.8.2.1 Pewarnaan Gram	35
4.8.2.2 Uji <i>Germinating Tube</i>	36
4.8.3 Persiapan Suspensi Uji <i>Candida albicans</i>	36





4.8.4 Uji Antifungi Ekstrak Kulit Pisang Ambon	37
4.9 Analisis Data	41
BAB 5 HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA	
5.1 Hasil Identifikasi Fungi	42
5.2 Gambaran Ekstrak Kulit Pisang Ambon	44
5.3 Hasil Pengamatan Kekeruhan dan Analisis terhadap KHM	44
5.4 Hasil Penentuan KBM dan Analisis terhadap KBM	45
5.5 Analisis Data	47
5.5.1 Uji Normalitas	48
5.5.2 Uji Homogenitas	48
5.5.3 Uji <i>One-Way ANOVA</i>	48
5.5.4 Uji <i>Post Hoc Tukey</i>	48
5.5.5 Uji Korelasi dan Regresi	49
BAB 6 PEMBAHASAN	
6.1 Penjelasan Singkat Penelitian	51
6.2 Identifikasi Fungi dan Proses Ekstraksi	51
6.3 Penelitian Pendahuluan	52
6.4 KHM (Kadar Hambat Minimum)	52
6.5 KBM (Kadar Bunuh Minimum)	52
6.6 Penelitian terkait Kulit Pisang Ambon dan <i>Candida albicans</i>	53
6.7 Mekanisme Antimikroba Kulit Pisang Ambon	55
6.8 Keterbatasan Penelitian	57
BAB 7 PENUTUP	
7.1 Kesimpulan	58
7.2 Saran	58
Daftar Pustaka	60
Lampiran	63
Pernyataan Keaslian Tulisan	70

Abstrak

Pranata, Laksamana. 2019. **Uji Ekstrak Etanol Kulit Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) sebagai Antifungi terhadap *Candida albicans* secara *In Vitro***. Tugas Akhir, Program Studi S1 Pendidikan Dokter Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing : (1) Prof. Dr. Noorhamdani AS., DMM., Sp. MK (K). (2) dr. Catur Ari Setianto, Sp. S.

Candida albicans merupakan salah satu spesies *Candida* yang paling sering ditemui pada kasus kandidiasis. Fungi ini secara oportunistik bisa menyebabkan infeksi superfisial, maupun infeksi sistemik. Kandidiasis oral merupakan jenis kandidiasis yang paling sering dijumpai, sedangkan kandidiasis sistemik merupakan infeksi organ dalam dengan tingkat mortalitas mencapai 40% di wilayah Asia Tenggara. Penelitian terbaru banyak melaporkan bahwa mulai timbul resistensi obat terhadap *Candida albicans*. Demi mengatasi masalah resistensi tersebut, pengobatan alternatif perlu segera dicari. Kandungan tanin, flavonoid, dan quinon yang telah terbukti efektif untuk menghambat pertumbuhan *Candida albicans* ternyata terkandung di dalam kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.). Penelitian ini bertujuan untuk menelusuri efektivitas ekstrak etanol kulit pisang ambon terhadap pertumbuhan fungi *Candida albicans* secara in-vitro. Sampel pada penelitian ini berasal dari stok Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Konsentrasi ekstrak yang digunakan adalah : 0%, 20%, 25%, 30%, 35%, dan 40%. Metode yang digunakan adalah metode dilusi tabung. Pada uji *one way* ANOVA, terlihat adanya perbedaan yang signifikan antara perubahan konsentrasi ekstrak etanol kulit pisang ambon terhadap jumlah koloni fungi *Candida albicans* ($p < 0,05$). Uji korelasi juga menunjukkan bahwa pertumbuhan koloni *Candida albicans* terhambat (Korelasi, $r = -0,905$; $p < 0,05$). Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) mempunyai efek antifungi terhadap *Candida albicans* dengan kadar bunuh minimumnya pada konsentrasi 40%, sementara kadar hambat minimumnya tidak dapat ditentukan dengan metode dilusi tabung.

Kata kunci: *Candida albicans*, ekstrak etanol kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.), antifungi.

Abstract

Candida albicans is one of the *Candida* species that is most often found in cases of candidiasis. This fungus can cause superficial and systemic infections opportunistically. Oral candidiasis is the most common type of candidiasis, while systemic candidiasis is an internal organ infection with a mortality rate up to 40% in the Southeast Asian region. Many recent studies have reported that drug resistance has begun to develop against *Candida albicans*. In order to overcome the problem of resistance, alternative medicine needs to be found immediately. Tannins, flavonoids, and quinones that have been proven effective to inhibit the growth of *Candida albicans* are actually contained in the skin of ambon bananas (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.). This study aims to explore the effectiveness of the ethanol extract of ambon banana peel on the growth of fungi *Candida albicans*. The sample in this study came from the FKUB Microbiology Laboratory stock. The extract concentrations used were: 0%, 20%, 25%, 30%, 35%, and 40%. The method used is the tube dilution method. In the one-way ANOVA test, there was a significant difference between the addition of the concentration of ethanol extracts of ambon banana peels to the number of fungi colonies of *Candida albicans* ($p < 0.05$). The correlation test also showed that the growth of *Candida albicans* colonies was inhibited (Correlation, $r = -0.905$; $p < 0.05$). From this study it can be concluded that the ethanol extract of ambon banana peel (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) has an antifungal effect on *Candida albicans* with a minimum bactericidal concentration rate at 40%, while its minimum inhibitory concentration cannot be determined by the tube dilution method.

Kata kunci: *Candida albicans*, Ambon banana peel (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.), antifungal

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pisang, di Indonesia, menjadi tanaman dengan komoditas paling tinggi, karena memiliki nilai ekonomis yang baik, terutama buahnya. Namun, pada umumnya masyarakat hanya mengonsumsi buahnya, sedangkan kulitnya dibuang begitu saja. Padahal, kulit pisang mengandung banyak sekali unsur unsur kimia yang bisa dimanfaatkan, seperti karbohidrat, kalsium, dan fosfor (Mirsa, 2013).

Karbohidrat yang terkandung pada kulit pisang bisa diolah menjadi bioethanol bila dihidrolisis, lalu difermentasikan dengan *Saccharomyces cerevisiae* (Seftian, 2012). Tanin dan flavonoid, merupakan jenis fitokimia etanol yang bisa diekstraksi dari kulit pisang dan telah diuji efektivitasnya sebagai antiketombe, namun belum terbukti sebagai antifungi secara universal (Dyah, 2017).

Jamur merupakan salah satu organisme yang bisa bersifat patogenik pada manusia. Oleh karena itu, hingga saat ini cukup banyak dilakukan penelitian untuk menemukan antifungi yang memiliki nilai terapiutik yang optimal.

Kandidiasis adalah salah satu penyakit yang disebabkan oleh jamur dari Genus *Candida*. Pada normalnya, *Candida* ada di saluran pencernaan dan bagian oral manusia sebagai flora normal. Namun, pada individu dengan kondisi defisiensi imun, *Candida* bisa bersifat patogenik (Erdogan, 2015). Ada lebih dari 20 spesies *Candida* yang bisa menginfeksi manusia, dan salah satu yang paling sering ditemui pada kasus kandidiasis adalah *Candida albicans*.

Ada dua jenis infeksi utama yang disebabkan oleh *Candida albicans* : infeksi superfisial, dan infeksi sistemik. Infeksi superfisial yang paling sering terjadi adalah kandidiasis oral dan kandidiasis vulvovaginal . Infeksi sistemik yang disebabkan oleh *Candida albicans* merupakan infeksi yang mengancam nyawa dengan tingkat mortalitas sebesar 40% di regio Asia Tenggara (Singh, 2017).

Kandidiasis vulvovaginal adalah jenis kandidiasis yang paling sering timbul pada wanita. Setidaknya sekali dalam hidupnya, sekitar 75% wanita akan menderita kandidiasis vulvovaginal (VVC) dan sekitar 90% dari infeksi ini disebabkan oleh *C. albicans* (van Schalkwyk *et al.*, 2015). Adapun faktor resiko yang menjadi predisposisi dari VVC adalah kondisi diabetes mellitus, penggunaan kontrasepsi oral, terapi hormonal, status menopause, dan kehamilan (Mayer *et al.*, 2013).

Kandida merupakan salah satu penyebab umum infeksi sistemik, dan terhitung menjadi 8-15% kasus sepsis di Amerika Serikat. Kandidiasis sistemik yang terjadi bisa disebabkan oleh tindakan medis yang invasif, tidak adanya integritas mukosa, atau defek pada fungsi sistem imun tubuh. Kandidiasis sistemik karena defek fungsi sistem imun tubuh contohnya pada pasien HIV-AIDS, dan kelainan bawaan seperti Leukemia. Kandidiasis sistemik mampu menyebarkan infeksi ke mata, jantung, serta meningen (Brooks *et al.*, 2013).

Pertimbangan obat untuk kandidiasis didasarkan pada manifestasi klinis yang ada. Kombinasi amphotericin B, echinocandin, atau fluconazole digunakan untuk Kandidiasis sistemik , Nistatin untuk kandidiasis oral, dan Clotrimazole untuk kandidiasis vulvovaginal (Tortora, 2010). Tetapi,

berdasarkan penelitian *University of Tennessee Health Science Center* USA di tahun 2017, mulai timbul resistensi pada *Candida albicans*. Adanya gen

ERG11 pada jamur menyebabkan turunnya efektivitas obat golongan Azole, khususnya Fluconazole (Berkow *et al*, 2017).

Dilihat dari berbagai aspek yang telah dipaparkan di atas, dapat disimpulkan bahwa *Candida albicans* adalah fungi yang pada kondisi tertentu bisa menjadi berbahaya. Manifestasi yang berbahaya, dan kemampuan *Candida albicans* untuk memunculkan resistensi tentu akan menjadi momok permasalahan kesehatan yang serius. Oleh karena itu, perlu untuk segera melahirkan solusi, salah satunya penemuan antifungi yang baru dengan efektivitas yang optimal. Ekstrak etanol yang diambil dari berbagai jenis tanaman telah banyak diteliti efektivitasnya dalam menghambat *Candida*. Diharapkan, hasil penelitian ini mampu menyumbangkan bukti ilmiah bahwa ekstrak etanol dari kulit pisang dapat menghambat pertumbuhan serta membunuh jamur ini.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah terdapat efek antifungi pada ekstrak etanol kulit pisang (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) terhadap *Candida albicans*?

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Untuk membuktikan bahwa ekstrak etanol kulit pisang (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) mempunyai efek antifungi terhadap *Candida albicans*.

1.3.2 Tujuan Khusus

Mengetahui kadar hambat minimal (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) pada bakteri *Candida albicans* dengan menggunakan ekstrak etanol kulit pisang (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) sebagai antifungi.

1.4. Manfaat Penelitian

1.4.1. Manfaat Akademis

- a. Sebagai sumbangan informasi ilmu pengetahuan yang dapat digunakan sebagai dasar penelitian lebih lanjut.
- b. Memberikan informasi tentang penggunaan senyawa etanol ekstrak kulit pisang (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) sebagai referensi atau acuan dalam penelitian selanjutnya terhadap penyakit lainnya.

1.4.2. Manfaat Praktis

- a. Ekstrak etanol kulit pisan ambon sebagai alternatif antifungi baru yang dapat diaplikasikan dalam masyarakat.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Candida albicans*

2.1.1 Morfologi dan Identifikasi

Klasifikasi *Candida albicans* (Brooks *et al.*, 2005) :

Divisio	: Thallophyta
Subdivisio	: Fungi
Classis	: Deuteromycetes
Ordo	: Moniliales
Familia	: Cryptococcaceae
Genus	: <i>Candida</i>
Spesies	: <i>Candida albicans</i>

Pada kultur jaringan, spesies *Candida* tumbuh sebagai sel ragi oval bertunas berukuran 3-6 μm . *Candida* juga membentuk pseudohifa ketika tunas tumbuh tetapi gagal melepaskan diri, membentuk rangkaian sel memanjang yang menyempit pada batas antarsel. Tidak seperti spesies *Candida* lainnya, *Candida albicans* bersifat dimorfik, selain ragi-ragi dan pseudohifa, ia juga bisa menghasilkan hifa sejati. *Candida* berkembang biak dengan *budding* (Brooks *et al.*, 2013).

Pada media agar *saboraud* yang dipaparkan suhu 37°C atau suhu kamar selama 24 jam, spesies *Candida* menghasilkan koloni-koloni halus berwarna krem yang berbau ragi. Pertumbuhan permukaan terdiri atas sel-sel bertunas lonjong. Pertumbuhan di bawahnya terdiri atas pseudomiselium. Pseudomiselium terdiri atas pseudohifa yang

membentuk blastokonidia pada nodus-nodus dan kadangkala klamidokonidia pada ujung-ujungnya (Tortora, *et al.*, 2013).

Dua tes morfologi sederhana bisa dilakukan untuk membedakan spesies *Candida albicans*, patogen yang paling sering, dari spesies candida lainnya: Setelah inkubasi dalam serum sekitar 90 menit pada suhu 37°C, sel-sel ragi *Candida albicans* akan mulai membentuk hifa sejati atau tabung benih dan pada media yang kekurangan nutrisi, *Candida albicans* akan menghasilkan klamidiospora yang bulat dan besar. Tes fermentasi dan asimilasi gula bisa digunakan untuk memastikan identifikasi dan membedakan *Candida albicans* dari spesies *Candida* lainnya (Brooks *et al.*, 2013).



Gambar 2.1 *Candida albicans*.
Blastokonidia, hifa, dan pseudohifa
(Brooks *et al.*, 2013)



Gambar 2.2 Germ Tube (Brooks *et al.*, 2013)

2.1.2 Struktur Antigen

Penggunaan serum yang terabsorpsi menunjukkan 2 serotipe dari *Candida albicans*: A (yang termasuk *C. tropicalis*) dan B. Ketika infeksi, komponen dinding sel, seperti mannans, glukans, polisakarida dan glikoprotein lainnya, serta enzim dilepaskan. Makromolekul ini biasanya memunculkan sistem pertahanan bawaan inang dan respon imun Th1 dan Th2. Sebagai contoh, serum dari pasien dengan kandidiasis sistemik sering mengandung antibody yang bisa terdeteksi hingga enolase candida, protease sekretorik dan protein kejutan panas (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.3 Patogenesis dan patologi

Kandidiasis superfisial terjadi bila jumlah *Candida albicans* meningkat, dan terjadi kerusakan pada jaringan superfisial, yang menyebabkan invasi local oleh ragi dan pseudohifa. Kandidiasis sistemik terjadi ketika *Candida albicans* masuk ke system peredaran darah, dan sistem pertahanan tubuh inang tidak adekuat untuk menahan pertumbuhan serta penyebaran ragi. Dari sirkulasi, *Candida albicans* bisa menginfeksi ginjal, katup jantung buatan, dan infeksi hampir dimana saja. Gambaran histologi lokal pada lesi jaringan kutan dan mukosa ditunjukkan dengan adanya reaksi inflamasi seperti abses piogenik hingga granuloma kronis. Infeksi pada saluran pencernaan terjadi pada saat menelan antibiotic, dan ragi menembus mukosa usus.

Sel *Candida* mengandung polisakarida, protein, dan glikoprotein yang tidak hanya merangsang system pertahanan inang, tetapi juga membantu perlekatan dan invasi ke sel inang. *Candida albicans* memproduksi sejenis glikoprotein permukaan agglutinin-like sequence (ALS), yang sebagian menjadi

adhesion yang melekat ke reseptor inang dan menyediakan perlekatan ke sel epitel ataupun endotel. Mekanisme pertahanan bawaan inang memuat reseptor pengenalan pola yang mengikat ke molekul yang berhubungan dengan patogen. Sebuah contoh utamanya adalah lektin, dectin-1, yang mengikat β -1,3-glucan dari *C.albicans* dan fungi lain untuk merangsang respon inflamasi yang kuat. Respon ini ditandai dengan produksi sitokin, terutama TNF- α , IF- γ , dan faktor stimulasi koloni granulosit, yang mengaktifasi sel efektor antifungan, neutrophil, dan monosit. Sebagai tambahan, perlekatan β -glucan ke dectin 1 pada sel dendrit menginduksi limfosit Th17, yang mensekresi IL-17 (Brooks *et al.*, 2013).

2.1.4 Faktor Predisposisi

Kandidiasis merupakan penyakit yang memiliki sindrom multifaktorial, yang berarti ada beberapa faktor yang bisa menyebabkan infeksi ragi.

Adapun faktor yang menjadi faktor predisposisi terjadinya kandidiasis adalah (Martins *et al.*, 2014)

a) Penurunan Sekresi Digestif

Sekresi dari sistem digestif, seperti asam hidroklorik, enzim empedu, dan enzim pancreas, memiliki peran yang penting untuk mencegah pertumbuhan berlebihan *Candida* dan penetrasinya ke permukaan penyerapan dalam saluran cerna.

b) Faktor Diet dan Defisiensi Nutrisi

Proporsi dan pilihan nutrisi yang tepat diperlukan oleh organisme, baik makronutrisi maupun mikronutrisi. Makanan yang tinggi akan ragi dan jamur menyokong pertumbuhan *Candida*, seperti keju,

minuman beralkohol, dan buah yang dikeringkan. Produk olahan susu juga bisa merangsang pertumbuhan koloni *Candida* karena kandungan laktosa yang tinggi, serta adanya kandungan antibiotic didalamnya. Defisiensi mikronutrisi seperti Zinc, magnesium, selenium, asam lemak esensial, asam folat, dan vitamin B6 dan A sering dijumpai pada kandidiasis kronis.

c) Terganggunya Sistem Imun dan Penyakit yang Mendasari

Disfungsi sistem imun membuat tubuh manusia menjadi lebih rentan terhadap banyak jenis infeksi. Beberapa penyakit juga bisa mendasari terjadinya infeksi oleh *Candida*

Adapun penyakit yang mendasari :

- Diabetes mellitus
- Kanker
- Leukemia
- AIDS
- Disfungsi thyroid

d) Terganggunya Fungsi Liver

Modifikasi fungsi liver akibat luka maupun penyebab kimia, bisa menyebabkan terganggunya mekanisme detoksifikasi. Akumulasi toxin dalam tubuh bisa menyebabkan pertumbuhan berlebihan *C. albicans*.

e) Obat dan Penggunaan Antibiotik Jangka Panjang

Antibiotik membunuh bakteri intestinal, yang mencegah pertumbuhan ragi dan organisme pathogen lainnya, sehingga menyebabkan pertumbuhan berlebihan *C. albicans*. Kortikosteroid, kontrasepsi oral,

dan obat antiulcer juga bisa menyebabkan pertumbuhan berlebihan

Candida albicans.

f) Rusaknya Flora Normal

Flora intestinal membantu menjaga keseimbangan usus, serta berperan dalam status nutrisi, fungsi sistem imun, metabolisme, dan agen karsinogenik. Stress yang kronis serta obat-obatan, bisa merusak flora normal, sehingga bisa terjadi penekanan imun tubuh.

2.1.5 Resistensi

Pada sekitar tahun 1990, banyak pasien yang terinfeksi HIV menerima antifungi azole jangka panjang, terapi azole dosis rendah, yang menyebabkan resistensi azole pada *C. albicans*. Pada beberapa tahun belakangan, resistensi *C. albicans* tercatat pada pasien selain HIV. Dalam 5 tahun terakhir, beberapa mekanisme molekuler yang telah dikembangkan oleh *Candida albicans* telah banyak dibahas.

Mekanisme tersebut antara lain adalah : (White *et al.*, 2002)

a) Enzim ERG11

Obat golongan azole termasuk fluconazole bekerja pada lanosterol 14 α -demethylase, produk dari gen ERG11. ERG 11 adalah salah satu enzim dalam biosintesis ergosterol, sterol utama dari membrane fungi dan analog dari kolesterol pada sistem mamalia. Resistensi obat antifungi telah dikaitkan dengan mutasi dan peningkatan ekspresi dari ERG11. Terjadinya perubahan permeabilitas mikroba terhadap obat tertentu. Perubahan enzim lain juga bisa menyebabkan resistensi.

b) Drug Efflux

Drug efflux merupakan salah satu komponen resistensi pada *C. albicans*, terkait adanya Overekspresi pada 2 jenis pompa efflux yang berkorelasi dengan resistensi antifungi

c) Gen transporter ABC

Gen transporter ABC, CDR1 dan CDR2 menyandikan ATP-dependent efflux pumps yang diekspresikan berlebihan dalam banyak isolat resisten-azole. Penghapusan gen ini menghasilkan hipersensitivitas terhadap azoles

d) Gen MDR1

Gen fasilitator utama MDR1 mengkodekan pompa yang menggunakan gaya motif proton di membran untuk mengangkut obat dan senyawa lain melintasi membran plasma. Ekspresi berlebihan dari pompa ini juga terkait dengan resistensi, dan hasil penghapusan hipersensitivitas terhadap obat-obatan azole.

e) Gen FLU1

Recently, another major facilitator gene, *FLU1*, was identified in *C. albicans* (3). This gene increases the level of azole resistance when it is expressed in *Saccharomyces cerevisiae* and increases the level of susceptibility when it is deleted from *C. albicans*, but overexpression of the gene has not yet been correlated with azole resistance in clinical isolates of *C. Albicans*.

2.1.6 Manifestasi Klinis

Bentuk-bentuk kandidiasis yang lazim : (Martins *et al.*, 2014)

1. Kandidiasis Oral

Kandidiasis oral dan perioral adalah jenis yang paling sering dijumpai pada kandidiasis mukokutan akut. Karakteristiknya adalah timbulnya bintik kecil atau papil putih pada lidah, pipi bagian dalam, dan juga di palatina, membentuk lapisan mukosa yang berwarna krem dan sangat lengket. Pada beberapa kasus, penyebaran bisa sampai menutup lidah, palatina, dan faring, yang disebut angular cheilitis, dengan adanya penebalan mukosa, dan pemecahan. Kandidiasis ini biasa terjadi pada orang dengan kelainan sistem imun, dan pada orang dengan gigi palsu.

2. Genitalia Wanita

Kandidiasis vulvovaginal adalah tipe infeksi fungi yang paling sering pada daerah genital. Meskipun tidak mengancam nyawa, infeksi ini sangat mengganggu dengan menyebabkan rasa gatal, dan cairan warna putih yang banyak dan tebal.

3. Intrauterinal

Infeksi ini sering terjadi pada saat kehamilan. Penting untuk menghindari terjadinya tipe vaginitis yang intens pada beberapa minggu terakhir kehamilan karena bisa mempersulit dan menyebar ke uterus, dan menginfeksi bayi sebelum kelahiran.

4. Kuku

Ada 2 tipe infeksi *Candida* pada kuku, yaitu paronychia dan onychia. Paronychia ditandai dengan adanya inflamasi, rasa sakit, di kulit permukaan kuku, yang tampak merah dan berkilau. Sedangkan onychia sendiri adalah sekunder dari paronychia. Onychia ditandai dengan striasi yang progresif, perubahan warna dan kebeningan dari lempeng kuku, yang juga mengalami kerapuhan. Infeksi ini muncul tiba tiba, dan sangat sakit, serta bisa mengarah ke terlepasnya kuku dan bisa menyebar ke kuku lain.

5. Kandidiasis Anal

Infeksi tipe ini ditandai dengan rasa gatal, sensasi terbakar, dan kemerahan local pada daerah sekitar anus. Kulit bisa termaserasi, dengan lesi yang berbatas tegas, yang bisa menginvasi lipatan antargluteal.

6. Kandidiasis Sistemik

Kandidiasis sistemik yang terjadi bisa disebabkan oleh tindakan medis yang invasif, tidak adanya integritas mukosa, atau defek pada fungsi sistem imun tubuh. Kandidiasis sistemik karena defek fungsi sistem imun tubuh contohnya pada pasien HIV-AIDS, dan kelainan bawaan seperti Leukemia. Kandidiasis sistemik mampu menyebarkan infeksi ke mata, jantung, serta meningen (Brooks et al., 2013).

2.2 Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.

2.2.1 Determinasi dan Deskripsi Morfologi

- Kingdom : Plantae (Tumbuhan)
 - Subkingdom : Tracheobionta (Tumbuhan berpembuluh)
 - Superdivisi : Spermatophyta (Menghasilkan biji)
 - Divisi : Magnoliophyta (Tumbuhan berbunga)
 - Kelas : Liliopsida (Berkeping satu / monokotil)
 - Subkelas : Commelinidae
 - Ordo : Zingiberales
 - Famili : Musaceae (Suku pisang-pisangan)
 - Genus : *Musa*
 - Spesies : *Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.
- (Materia Medika, 2019).



Gambar 2.3 Spesimen Herbal Pisang Paradisiaca (Monigatti et al., 2010)

M.paradisiaca yang bersinonim *M. sapientum* L. berasal dari India. Pisang jenis ini biasa disebut pisang ambon di Indonesia ini, dan ada pula yang

menyebutnya sebagai pisang Beranga. Pisang adalah salah satu buah yang paling populer dan didistribusikan secara meluas di dunia. Produksi pisang jenis ini sangat tinggi di kawasan Asia Tenggara, Brazil, dan terutama di India. *Musa sapientum* sendiri adalah pisang yang dikenal sebagai pisang yang dapat dikonsumsi dan nama *Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt. berdiri untuk 'Plantain' dan buahnya biasanya lebih lebar, lengkung dan bertepung.

Pisang dapat ditanam didataran rendah bersuhu antara 21-32 °C dan beriklim lembab. Topografi yang optimal sebagai lahan untuk tanaman pisang adalah lahan datar dengan kemiringan sebesar 8 derajat, dan terletak di daerah tropis. Pada keadaan suhu kurang dari 13 °C atau lebih dari 38 °C, maka pisang tidak akan bisa tumbuh dengan baik dan meningkatkan kemungkinan untuk mati. (Suyanti dan Ahmad Supriyadi, 2008).

Akar pohon pisang termasuk jenis akar serabut yang berpangkal dari umbi batang yang sebagian terletak di bawah tanah. Diameter dari akarnya sekitar 0,5-1 cm, silinder. Panjang rata-rata dari akar pisang adalah 4-5 meter ke samping, namun hanya 75-150 cm yang menembus ke bawah tanah. Akarnya keluar dari batang dalam kelompok kelompok yang terdiri dari 3-4 akar. (Tjahjadi, 1991)

Batang pisang yang sebenarnya terdapat di dalam tanah dan kadang muncul di permukaan tanah sebagai umbi yang tumbuh akar dan tunas. Batang pisang yang biasa terlihat keluar dari tanah adalah batang semu yang tersusun atas pelepah daun yang besar di pangkalnya dan bertumpuk berselang seling sehingga terlihat kompak dan tampak tumbuh memanjang ke atas selayaknya batang tanaman lainnya (pseudo stem). (Nakasone, 1998)

Daun pisang sesuai taksonomi subkingdomnya yaitu Viridiaeplantae, atau tumbuhan hijau, berwarna hijau. Daun pisang yang telah dewasa tampak berwarna hijau tua, sedangkan untuk daun yang masih muda terlihat warnanya hijau muda. Daun pisang yang telah dewasa berbentuk lonjong, dan tulang daunnya menyirip, sedangkan untuk daun muda cenderung masih menggulung.

Seperti yang telah dijelaskan sebelumnya, daun pisang akan tumbuh bertumpuk tumpuk membentuk struktur seperti batang yang disebut sebagai pseudo stem.

Bunga tanaman pisang akan tumbuh dan terdiri atas dua baris. Bunga betina pada tanaman pisang akan tumbuh di bawah dan disusul bunga jantan di atas. Bunganya berkelamin satu dan berumah satu dalam satu tandan. Tandan bertangkai 0,5-1,5 m dengan daun penumpu yang berjejal rapat dan berbentuk spiral. Braktea atau daun pelindung yang berwarna merah tua, berlilin, mudah rontok membuka secara berurutan satu per satu tiap hari.

Buah dari tanaman pisang beraneka ragam, ada yang berbiji dan ada yang tidak (van Steenis, 1992). Masing masing node memiliki dua baris pada bunga yang membentuk tandan pada buah dan secara umum disebut sisir dengan buah individual yang disebut *finger*. Pisang ambon memiliki 16 sisir pertandan dengan 30 finger persisir dan berat tandan buah ± 70 kg (Nakasone, 1998). Bentuk buah lurus, pangkalnya bulat dan panjang 11 cm serta diameter buah 2,9 cm (Cahyono, 1995). Daging buah kuning kemerahan, tidak berbiji, rasa manis dan beraroma. (Penebar Swadaya, 2000).

2.2.2 Kandungan Kimia *Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.

Kulit buah *Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt. mengandung flavonoid, tanin, kuinon, fenol, steroid, dan phytosteroid. Flavonoid dan tanin dikenal sebagai komponen fenol yang memiliki efek antifungi (Ansari *et al.*, 2013). Komponen Quinon mempunyai efek antifungi dengan merusak rantai DNA (Debora *et al.*, 2018).

2.2.2.1 Tanin

Tanin merupakan salah satu senyawa metabolit sekunder yang terdapat pada tanaman dan disintesis oleh tanaman (Jayanegara dan Sofyan, 2008). Tanin merupakan senyawa yang mempunyai berat molekul 500-3000 dan mengandung sejumlah besar gugus hidroksi fenolik yang memungkinkan membentuk ikatan silang yang efektif dengan protein dan molekul-molekul lain seperti polisakarida, asam amino, asam lemak dan asam nukleat (Fahey and Berger, 1988).

Tanin dibagi menjadi dua kelompok yaitu tanin yang mudah terhidrolisis dan tanin terkondensasi. Tanin yang mudah terhidrolisis merupakan polimer gallic dan ellagic acid yang berikatan ester dengan sebuah molekul gula, sedangkan tanin terkondensasi merupakan polimer senyawa flavonoid dengan ikatan karbon-karbon berupa catechin dan gallo catechin (Patra dan Saxena, 2010). Tanin yang berasal dari hijauan (leguminosa) umumnya membentuk tanin terkondensasi dan mempunyai ikatan kompleks dengan protein yang lebih kuat dibandingkan dengan tanin terhidrolisis (Fahey & Berger, 1988).

Pada suatu penelitian terhadap *C. albicans*, tanin terbukti punya aktivitas antifungi. Adapun mekanisme antifungi yang dimiliki oleh tanin

adalah mengganggu pertumbuhan dinding sel fungi, melalui hambatan komposisi chitin dan β -glucan yang berperan penting dalam pengaturan struktur fungi dan pertumbuhan normal sel. Selain itu, tanin juga bisa menghambat transisi dimorfik dari *C. albicans* (Lopes *et al.*, 2013).

2.2.2.2 Flavonoid

Flavonoid adalah golongan penting dari produk alami; khususnya, mereka termasuk kelas metabolit sekunder tanaman yang memiliki struktur polifenol, banyak ditemukan pada buah-buahan, sayuran, dan minuman tertentu. Mereka termasuk golongan senyawa fenolik berbobot molekul rendah yang terdistribusi pada berbagai jenis tanaman. Mereka memiliki efek biokimia dan antioksidan yang beragam yang terkait dengan berbagai penyakit seperti kanker, penyakit Alzheimer (AD), aterosklerosis, dll (Panche *et al.*, 2016).

Flavonoid memiliki banyak efek kesehatan dan kecantikan karena sifat antioksidatif, anti-inflamasi, anti-mutagenik dan anti-karsinogenik yang digabungkan dengan kapasitas mereka untuk memodulasi fungsi-fungsi enzim seluler utama. Mereka juga dikenal sebagai penghambat potensial untuk beberapa enzim, seperti xanthine oxidase (XO), cyclooxygenase (COX), lipoxygenase dan phosphoinositide 3-kinase (Panche *et al.*, 2016).

Karena kemampuan flavonoid untuk menghambat perkecambahan spora patogen tanaman, senyawa ini telah direkomendasikan untuk melawan jamur patogen manusia (Cushnie *et al.*, 2005). Flavonoid memiliki mekanisme antijamur dengan mengganggu

homeostasis mitokondria, dan juga dengan mengganggu permeabilitas membran sel jamur (Christopher *et al.*, 2017).

Senyawa flavanon terpenilasi baru yang diisolasi dari semak belukar *Eysenhardtia texana* telah diidentifikasi sebagai 5,7,4'-trihydroxy-8-methyl-6- (3-methyl- [2-butenyl])-(2S)-flavanone dan terbukti memiliki

aktivitas melawan patogen oportunistik *Candida albicans*. Flavonoid 7-hidroksi-3',4'- (methylenedioxy) flavan, diisolasi dari kulit buah baleica

Terminalia juga telah terbukti memiliki aktivitas melawan *C. albicans*. Dua flavon baru dari *Artemisia girdi*, diidentifikasi sebagai 6,7,4'-trihydroxy-3', 5'-dimethoxyflavone dan 5,5'-dihydroxy-8,2',4'-trimethoxyflavone, bersama dengan 5,7,4'-Trihydroxy-3', 5'-dimethoxyflavone telah dilaporkan menunjukkan aktivitas terhadap *Aspergillus flavus*, spesies jamur yang menyebabkan penyakit invasif pada pasien immunosupresi. Aktivitas propolis terhadap dermatofit dan *Candida spp.* telah dikaitkan setidaknya sebagian dengan kandungan flavonoidnya yang tinggi. Galangin, flavonol yang umum ditemukan dalam sampel propolis, telah terbukti memiliki aktivitas penghambatan terhadap *Aspergillus tamarii*, *A. flavus*, *Cladosporium sphaerospermum*, *Penicillium digitatum* dan *Penicillium italicum* (Cushnie *et al.*, 2005).

2.2.2.3 Quinon

Quinon adalah cincin α , β -dienonic beranggota enam yang kecil dengan aktivitas fungsional yang terdapat pada tanaman, jamur, lumut, bakteri, ganggang, virus, serangga, dan organisme tingkat tinggi. Quinon telah diuji terhadap beberapa organisme, antara lain *Streptomyces*

coeruleorubidus, *Trypanosoma rhodesiense*, *Leishmania amazonensis*, dan juga *Candida albicans*. Quinon bekerja dengan cara merusak rantai DNA (Debora *et al.*, 2018).

2.3 Aktivitas Antifungi

Antifungi mempunyai dua mekanisme utama, yaitu fungisidal dan fungistatik. Fungisidal didefinisikan sebagai suatu senyawa yang dapat membunuh jamur, sedangkan fungistatik dapat menghambat pertumbuhan jamur tanpa mematikannya.

Mekanisme antifungi dibedakan atas target kerjanya, yaitu:

a) Merusak dinding sel

Dinding sel fungi merupakan struktur *multilayer* yang terdiri dari tiga komponen utama yaitu kitin, glukukan dan mannoprotein. Dengan merusak atau menghambat komponen-komponen tersebut, pertumbuhan fungi akan terganggu, sehingga komponen-komponen tersebut menjadi target kerja dari antifungi (Franklin & Snow, 2005).

- Penghambatan biosintesis kitin

Kitin sangat penting dalam pertumbuhan fungi, karena 60% kandungan miseliumnya berupa kitin. Penghambatan biosintesis kitin dapat dilakukan dengan cara memblokir kerja enzim kitin sintase yang berperan dalam pembentukan kitin dari 2 molekul UDP-N-asetilglukosamin. Antifungi akan bersaing menduduki sisi aktif enzim kitin sintase saat biosintesis

berlangsung, sehingga enzim tersebut terhambat kerjanya. Karena penghambatan tersebut, otomatis pertumbuhan dinding sel fungi akan terganggu.

Contoh: *Polyoxin D* dan *Nikkomycin Z* (Franklin & Snow, 2005).

- Penghambatan biosintesis glukukan

Antifungi dengan mekanisme ini akan

menghambat kinerja enzim 1, 3- β -glukan sintase yang berperan sebagai katalisator glukosa menjadi glukosa UDP yang tidak larut serta berperan sebagai sumber energi. Contoh: *Echinocandin B* dan *Caspofungin* (Franklin & Snow, 2005).

b) Merusak membran sel

- Merusak fungsi mannoprotein

Mannoprotein adalah komponen terbesar penyusun membran sel fungi. Dengan mengubah komponen mannoprotein, permeabilitas membran sel fungi terganggu, dan akan mengganggu pertumbuhan fungi tersebut. Contoh: *Pradimicin A* (Franklin & Snow, 2005).

- Interaksi dengan ergosterol

Antifungi dengan mekanisme ini akan membentuk kompleks-komplek dengan ergosterol dalam membran sel fungi. Komplek tersebut akan menyebabkan kerusakan dan kebocoran membran sel fungi. (Brooks

et al., 2013). Contoh : Azol – azol lain, Allylamin dan Morfolin (Franklin & Snow, 2005 ; Brooks *et al.*, 2013).

c) Antifungi polien

Polien merupakan antifungi yang diperoleh dari beberapa spesies bakteri *Streptomyces*. Polien tidak beracun, sehingga efektif dalam penggunaan klinisnya sebagai antifungi sistemik.

Polien akan terikat ke ergosterol membrane sel fungi dan akan melemahkan membrane, sehingga menyebabkan kebocoran, yang akan mengarahkan menuju kematian sel fungi. Contoh: Amphotericin B, Nistatin, dan Pimaricin (Franklin & Snow, 2005).

2.4 Maserasi

Maserasi adalah proses ekstraksi simplisia menggunakan pelarut yang dikocok beberapa kali pada suhu ruangan. Membran sel dari simplisia akan pecah sehingga senyawa aktif yang ada didalam simplisia akan tertarik akibat adanya perbedaan tekanan dalam proses maserasi.

Maserasi berasal dari Bahasa latin *Macerace*, yang berarti mengairi dan melunakkan. Maserasi adalah metode ekstraksi yang paling sederhana (Istiqomah, 2013).

Prinsip kerja maserasi adalah pelarutan bahan kandungan simplisia dari sel yang rusak saat penghalusan, dan ekstraksi (difusi) bahan kandungan sel yang masih utuh. Selesaiannya proses maserasi

ditandai dengan tercapainya keseimbangan konsentrasi antara bahan yang diekstraksi dari sel dengan cairan pelarut. Pengocokan pada proses maserasi bertujuan untuk mencapai keseimbangan konsentrasi menjadi lebih cepat. Setelah dilakukan pengocokan, bahan dan pelarut dibiarkan dalam keadaan diam sehingga terjadi pengendapan bahan aktif (Istiqomah, 2013).

2.5 Uji Aktivitas Antimikroba

Penentuan kerentanan dari pathogen terhadap obat antimikroba bisa dilakukan dengan dua metode utama : dilusi dan difusi. Penting untuk melakukan metode yang terstandar yang mengontrol semua faktor yang mempengaruhi aktivitas antimikroba. (Brooks *et al.*, 2013).

2.5.1 Metode Dilusi

Sejumlah zat antimikroba digabungkan ke dalam media cair atau padat. Biasanya, digunakan pengenceran dua kali lipat (\log_2) dari zat antimikroba. Media kemudian diinokulasi dengan mikroba uji dan diinkubasi. Titik akhir diambil sebagai jumlah zat antimikroba yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan— atau untuk membunuh — mikroba uji. Uji kerentanan dengan dilusi agar membutuhkan waktu yang sangat lama, dan penggunaannya terbatas pada keadaan khusus. Tes pengenceran kaldu lebih rumit dan sedikit digunakan ketika pengenceran harus dilakukan dalam tabung reaksi; namun, munculnya seri pengenceran kaldu yang disiapkan untuk banyak obat berbeda di piring mikrodilusi telah sangat ditingkatkan dan menyederhanakan metode.

Keuntungan dari tes pengenceran mikrobroth adalah bahwa mereka bisa memberikan hasil kuantitatif untuk dilaporkan, menunjukkan jumlah obat yang dibutuhkan untuk menghambat (atau membunuh) mikroorganisme yang diuji (Brooks *et al.*, 2013).

2.5.2 Metode Difusi

Metode yang banyak digunakan di laboratorium yang lebih kecil adalah difusi cakram uji. Piringan kertas saring yang berisi kuantitas obat yang diukur diletakkan di permukaan media padat yang telah diinokulasi di permukaan dengan organisme uji. Setelah inkubasi, diameter zona yang jelas dari inhibisi mengelilingi piringan digunakan sebagai ukuran daya penghambatan obat terhadap organisme uji tertentu. Metode ini tunduk pada banyak faktor fisik dan kimia selain interaksi sederhana antara obat dan organisme (misalnya sifat dari medium dan kemampuan untuk berdifusi, ukuran molekul, dan stabilitas dari obat). Namun demikian, standarisasi kondisi mungkin menentukan kerentanan organisme.

Interpretasi hasil tes difusi harus berdasarkan perbandingan antara pengenceran dan metode difusi. Perbandingan semacam itu telah mengarah pada penetapan referensi standar. Garis regresi linier dapat mengekspresikan hubungan antara log konsentrasi hambat minimum dalam uji pengenceran dan diameter zona inhibisi dalam difusi tes.

Penggunaan piringan tunggal untuk setiap antibiotik dengan standarisasi yang hati-hati dari pengujian kondisi memungkinkan memberikan hasil kerentanan atau ketahanan untuk mikroorganisme

dengan membandingkan ukuran zona penghambatan dengan standar obat yang sama.

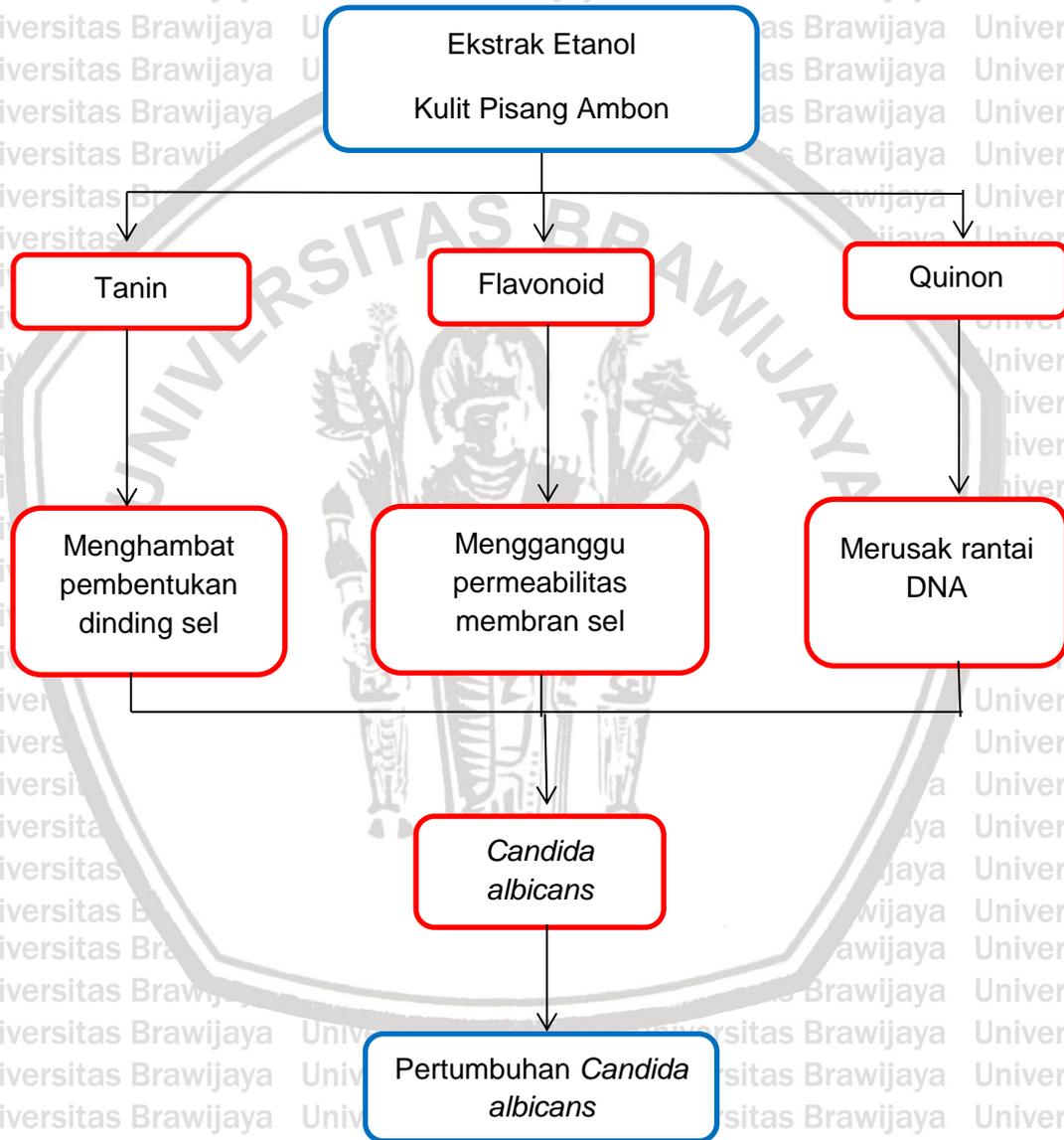
Inhibisi di sekitar piringan yang berisi jumlah antimikroba tertentu tidak menyiratkan kerentanan dari konsentrasi yang sama obat per mililiter media, darah, atau urine. (Brooks *et al.*, 2013).



BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep Penelitian

Keterangan :

[Red box]

= Efek ekstrak etanol kulit pisang ambon

[Blue box]

= Variabel yang diteliti



3.2 Deskripsi Kerangka Konsep

Pengekstrakan etanol kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) akan dilakukan dengan metode maserasi dengan pelarut etanol 96%. Ekstrak dari kulit pisang ambon ini mengandung Flavonoid dan Tanin. Flavonoid yang merupakan golongan senyawa polifenol mempunyai aksi merusak permeabilitas membran sel dari pathogen *Candida albicans*. Tanin juga merupakan golongan senyawa polifenol yang mempunyai aksi menghambat sintesis kitin yang berperan dalam pembentukan dinding sel pada fungi. Quinon mempunyai peran merusak rantai DNA dari fungi. Kandungan ketiga senyawa polifenol tersebut akan diujicobakan ke fungi yang dibiakkan untuk mengetahui efektifitas ekstrak etanol kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) dalam menghambat ataupun membunuh fungi *Candida albicans*.

3.3 Hipotesis Penelitian

Ekstrak etanol kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) mempunyai efek antifungi terhadap *Candida albicans* secara in vitro yang dilihat dari adanya KHM dan KBM.

BAB 4 METODE PENELITIAN

4.1 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode *true experimental design* dengan *post test only control group design*. Uji laboratorium akan dilakukan untuk membuktikan dan mengukur efek antifungi ekstrak etanol kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) terhadap pertumbuhan *Candida albicans*. Uji sensitivitas antifungi yang digunakan adalah uji sensitivitas antifungi dengan metode dilusi tabung. Metode dilusi tabung ekstrak etanol pisang ambon ini akan melewati 2 tahap, yaitu tahap pengujian bahan di media cair untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM), kemudian dilanjutkan dengan tahap penggosokan pada media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*) yang mengandung koloni *Candida albicans* untuk menentukan Kadar Bunuh Minimum (KBM) dari ekstrak etanol pisang ambon terhadap *Candida albicans*.

4.2 Sampel Penelitian

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah fungsi *Candida albicans* yang diperoleh dari *stock culture* Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang yang berasal dari isolat pasien Rumah Sakit Saiful Anwar Malang.

4.3 Pengulangan

Banyaknya pengulangan yang diperlukan untuk penelitian ini dapat dihitung dengan menggunakan rumus (Solimun, 2001):

$$p(n-1) \geq 15$$

Keterangan :

p = jumlah perlakuan

n = jumlah ulangan yang diperlukan

Penelitian ini menggunakan 5 konsentrasi dari ekstrak etanol kulit pisang

ambon, satu kontrol bahan dan satu kontrol fungsi ($p = 5+2 = 7$) maka didapatkan

jumlah pengulangan:

$$7(n-1) \geq 15$$

$$7n - 7 \geq 15$$

$$7n \geq 22$$

$$n \geq 3,143 \approx 4$$

Jadi jumlah pengulangan yang perlu dilakukan pada penelitian ini adalah 4 kali.

4.4 Variabel Penelitian

4.4.1 Variabel bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah ekstrak etanol pisang ambon, dengan konsentrasi yang telah diperoleh melalui penelitian pendahuluan.

4.4.2 Variabel tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan *Candida albicans*. Adapun cara untuk mengukur variable ini yaitu dengan mengamati tingkat kekeruhan tabung untuk menentukan kadar hambat minimum serta jumlah koloni *Candida albicans* pada media agar padat (SDA).

4.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya pada bulan Januari 2018 sampai bulan Juni 2018.

4.6 Alat dan Bahan

4.6.1 Alat

1. Neraca analitik
2. Gelas ekstraksi
3. Botol steril 1 buah
4. Tabung reaksi steril
5. Rak tabung
6. *Vortex*
7. *Colony counter*
8. *Object glass*
9. Korek api
10. Kapas
11. Spidol permanen
12. Stiker label
13. Mikropipet
14. Mikroskop
15. Bunsen
16. Ose
17. Inkubator

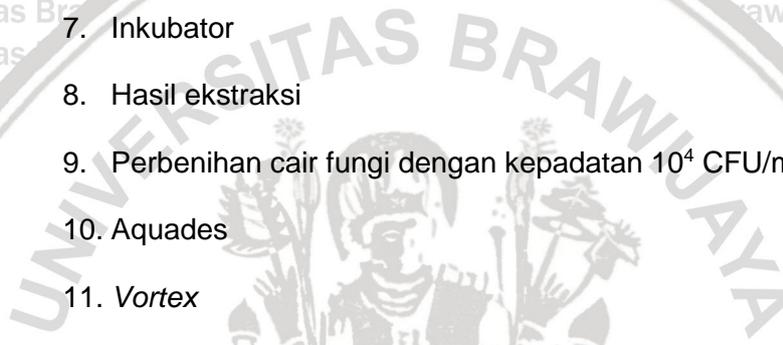


4.6.2 Bahan

1. Isolat fungi
2. Serum mamalia
3. *Object glass*
4. Mikroskop
5. Tabung reaksi
6. Pipet steril
7. Inkubator
8. Hasil ekstraksi
9. Perbenihan cair fungi dengan kepadatan 10^4 CFU/ml
10. Aquades
11. *Vortex*
12. SDA
13. Ose
14. Bunsen
15. *Sabouraud broth*
16. Pipet steril
17. Larutan NaCl
18. Spektrofotometer

4.7 Definisi Operasional

- a. Kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari UPT Matera Medica.



- b. Ekstrak kulit pisang ambon adalah konsentrasi kulit pisang ambon yang dilakukan ekstraksi dingin (maserasi) dengan menggunakan etanol 96%.
- c. Uji efektivitas adalah uji yang melalui hasil KHM (Kadar Hambat Minimum) dan KBM (Kadar Bunuh Minimum) bertujuan untuk menentukan efektif tidaknya ekstrak etanol kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) sebagai antifungi terhadap *Candida albicans*.
- d. KHM (Kadar Hambat Minimum) adalah konsentrasi minimal dimana larutan ekstrak etanol kulit pisang ambon mampu menghambat pertumbuhan fungi *Candida albicans*.
- e. KBM (Kadar Bunuh Minimum) adalah konsentrasi minimal dimana larutan ekstrak etanol kulit pisang ambon mampu membunuh fungi. Jumlah ini ditandai dengan tidak ditemukan pertumbuhan koloni fungi pada medium SDA yang telah dilakukan streaking dengan satu ose larutan ekstrak etanol kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) atau dengan jumlah koloni fungi $< 0,1\%$ *original inoculum*.
- f. *Original inoculum* adalah inokulasi fungi dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml pada media agar padat yang digunakan untuk mencari kategori KBM.
- g. Kontrol fungi adalah tabung berisi fungi dengan konsentrasi ekstrak etanol sebesar 0% yang dapat digunakan untuk memastikan apakah ada kontaminasi bakteri lain.

h. Kontrol bahan adalah bahan berupa larutan ekstrak etanol kulit pisang ambon untuk memastikan apakah bahan yang digunakan steril.

i. % adalah persentase konsentrasi akhir larutan ekstrak etanol kulit pisang ambon setelah diberikan fungi.

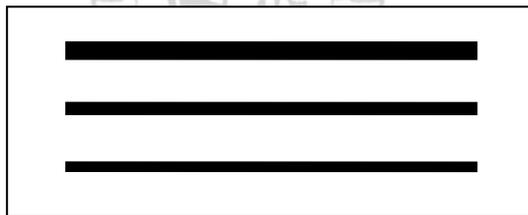
j. Pengamatan kualitatif digunakan untuk menentukan skor pertumbuhan *Candida albicans* berdasarkan ketebalan bayangan tiga garis hitam yang tampak di balik tabung. Kriteria skoring adalah sebagai berikut:

0 : jernih (ketiga garis nampak jelas)

1 : agak keruh (garis pertama dan kedua tampak, garis ketiga tidak tampak)

2 : keruh (garis pertama tampak, garis kedua dan ketiga tidak tampak)

3 : sangat keruh (ketiga garis tidak tampak)



Semakin rendah skor, menunjukkan semakin efektif bahan coba dalam menghambat ataupun membunuh fungi.

k. Pengamatan kuantitatif digunakan untuk mengukur pertumbuhan fungi *Candida albicans* secara kuantitatif dengan menghitung koloni bakteri dengan *colony counter*.

4.8 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian termasuk pembuatan ekstrak etanol kulit pisang ambon, identifikasi fungi (*Candida albicans*), persiapan suspensi uji *Candida albicans*, dan uji antifungii ekstrak etanol kulit pisang ambon.

4.8.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Kulit Pisang Ambon

Proses ekstraksi:

- a. Menimbang sampel kulit pisang ambon (100 g).
- b. Memasukkan sampel ke dalam gelas erlenmeyer ukuran 1 liter.
- c. Merendam sampel dengan 900 ml etanol 96% dalam gelas.
- d. Mengocok etanol 96% dengan sampel (\pm 30 menit).
- e. Mendinginkan selama 1 malam sampai mengendap.
- f. Proses ekstraksi ini dilakukan hingga hasil ekstraksi jernih. Kemudian hasil ekstraksi siap untuk dievaporasi.

Proses Evaporasi:

- a. Mengambil lapisan atas campuran etanol 96% dengan zat aktif kulit pisang ambon yang sudah terlarut, lalu dimasukkan dalam labu evaporasi 1 liter.
- b. Labu evaporasi dipasang pada evaporator.
- c. Mengisi *water bath* dengan air hingga penuh.
- d. Memasang semua rangkaian alat, termasuk *rotary evaporator*, pemanas *water bath* (diatur sampai suhu 90°C, sesuai dengan titik didih etanol), lalu disambungkan dengan aliran listrik.

- e. Larutan etanol 96% dibiarkan memisah dengan zat aktif yang sudah ada dalam labu.
- f. Ditunggu hingga aliran etanol 96% berhenti menetes pada labu penampung (\pm 1,5 sampai 2 jam untuk 1 labu).
- g. Menimbang ekstrak dengan neraca analitik.
- h. Memasukkan hasil ekstraksi ke dalam botol plastik, lalu menyimpannya ke dalam freezer.

4.8.2 Identifikasi *Candida albicans*

4.8.2.1 Pewarnaan Gram

1. Bersihkan gelas objek dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk hilangkan lemak, lalu dibiarkan dingin.
2. Meneteskan satu ose (1 μ l) aquades steril pada gelas objek ditambah sedikit biakan fungi yang diambil menggunakan ose, lalu disuspensikan dengan aquades pada gelas objek dan diratakan. Bila sediaan berbentuk cair, maka tidak perlu disuspensikan dengan aquades.
3. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.
4. Meneteskan kristal violet pada sediaan di gelas objek selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.
5. Meneteskan lugol pada sediaan selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.
6. Meneteskan alkohohl 96% pada sediaan selama 5-10 detik (sampai warna cat luntur). Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.

7. Meneteskan safranin pada sediaan selama $\frac{1}{2}$ menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.
8. Menggunakan kertas penghisap untuk mengeringkan sediaan.
9. Melihat sediaan di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x.
10. Hasil positif : *Candida albicans* tercat ungu (Gram positif), bentuk budding.

4.8.2.2 Uji Germinating Tube

1. Melakukan sterilisasi ose dengan cara pembakaran
2. Mengambil isolate fungi dari perbenihan dengan nose.
3. Memasukkan isolate fungi ke tabung yang berisi serum mamalia sebanyak 0,5 ml.
4. Diinkubasikan pada suhu 37°C selama \pm 4 jam.
5. Kultur di dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek, lalu ditutup dengan gelas penutup.
6. Gelas objek diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 40x.
7. Mencari *pseudohifa* memanjang khas *Candida albicans*

4.8.3 Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans*

1. Mempersiapkan fungi *Candida albicans* dari SDA yang telah diuji konfirmasi.

2. Diambil 5 koloni ($d \geq 1\text{mm}$) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian mengukur kepadatan optisnya atau Optical Density (OD) dengan menggunakan spektrofotometer pada $\lambda = 530\text{ nm}$. Lalu, dari hasil yang diperoleh membuat suspensi sel yang mengandung 1×10^6 hingga 5×10^6 CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$ (Murray *et al.*, 1999).

3. Untuk memperoleh suspensi sel yang mengandung $0,5 \times 10^3$ hingga $2,5 \times 10^3$ CFU/ml dilakukan dengan cara mengambil 1 ml (dari tabung yang mengandung 10^6 CFU/ml) untuk dicampur dengan 9 ml NaCl 0,85% steril. Maka akan didapatkan suspensi sel dengan konsentrasi 10^5 CFU/ml. Proses dilanjutkan dua kali hingga mencapai konsentrasi suspensi fungi yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5 \times 10^3$ hingga $2,5 \times 10^3$ CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

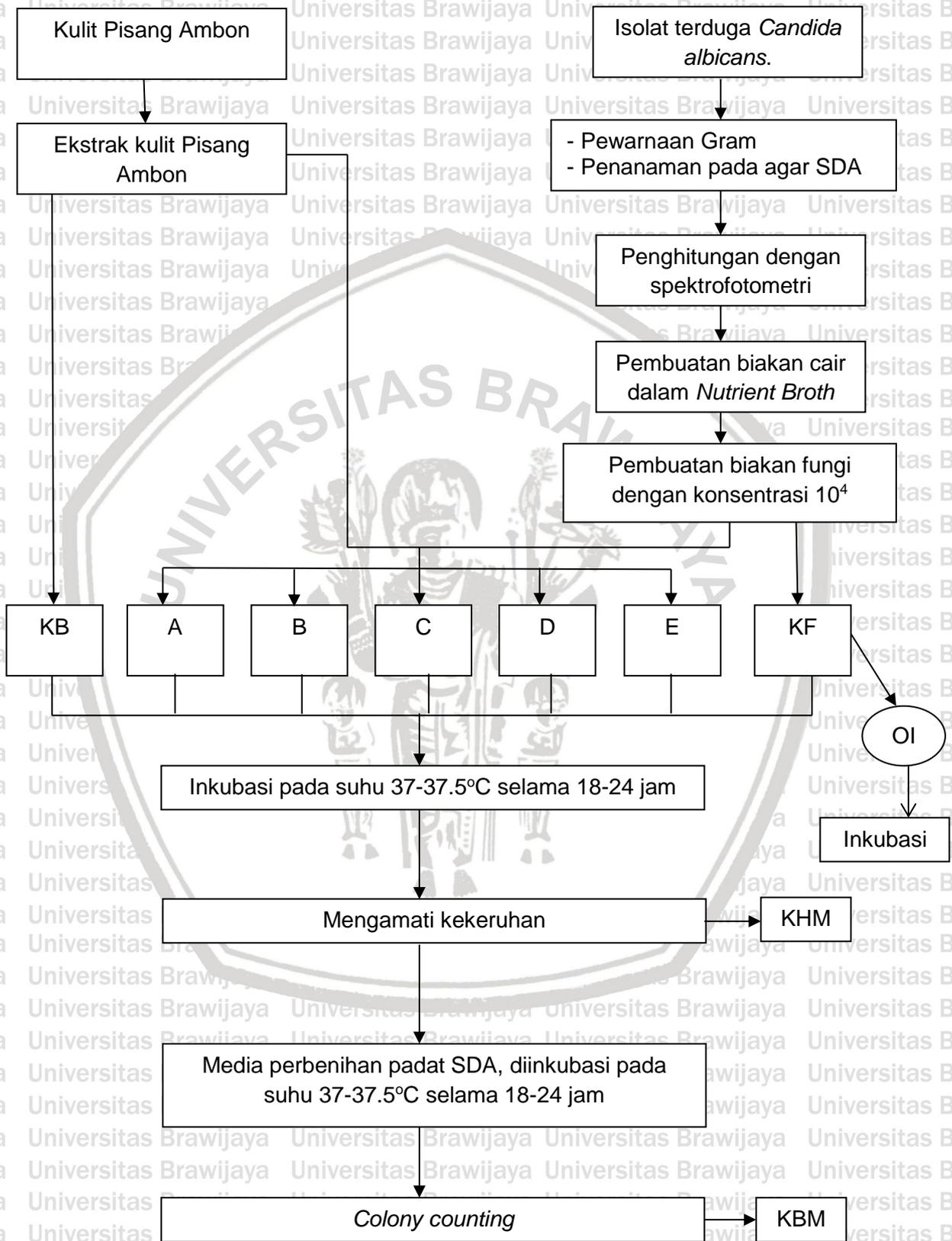
4.8.4 Uji Antifungi Ekstrak Kulit Pisang Ambon

1. Siapkan 7 tabung steril, beri tanda KK, A, B, C, D, E, dan KB (kontrol bahan). Kontrol bahan (KB) adalah ekstrak kulit pisang ambon. Kontrol fungi (KF) adalah biakan fungi *Candida albicans* dengan konsentrasi 10^4 CFU/ml.
2. Masukkan $1-x_1$ ml aquades steril ke dalam tabung bertanda A, lalu tambahkan x_1 ml ekstrak kulit pisang ambon.
3. Masukkan $1-x_2$ ml aquades steril ke dalam tabung bertanda B, lalu tambahkan x_2 ml ekstrak kulit pisang ambon.
4. Masukkan $1-x_3$ ml aquades steril ke dalam tabung bertanda C, lalu tambahkan x_3 ml ekstrak kulit pisang ambon.

5. Masukkan $1-x_4$ ml aquades steril ke dalam tabung bertanda D, lalu ditambahkan x_4 ml ekstrak kulit pisang ambon.
6. Masukkan $1-x_5$ ml aquades steril ke dalam tabung bertanda E, lalu ditambahkan x_5 ml ekstrak kulit pisang ambon.
7. Masukkan 1 ml aquades steril ke dalam tabung bertanda konsentrasi 0%.
8. Setiap tabung ditambahkan 1 ml biakan cair *Candida albicans*, kecuali tabung kontrol bahan.
9. Memasukkan 2 ml ekstrak kulit pisang ambon ke dalam tabung bertanda KB.
10. Dari tabung bertanda KF diambil 1 ose untuk diinokulasikan pada NAP (sebagai *original inoculum* (OI)).
11. Semua tabung dan plate *original inoculum* diinkubasi pada suhu 37° - $37,5^{\circ}$ C selama 18-24 jam.
12. Setelah 18-24 jam, derajat kekeruhan pada semua tabung diperhatikan dan dicatat. Derajat kekeruhan dapat dibaca dengan cara meletakkan sebuah kertas putih dibelakang tabung, dimana sebelumnya pada kertas tersebut digambar sebuah garis hitam, kemudian garis hitam tersebut diperhatikan dari depan tabung. Konsentrasi paling rendah yang tidak menunjukkan kekeruhan adalah KHM.
13. Jumlah koloni pada *original inoculum* dihitung dengan menggunakan *colony counter*.
14. Untuk mengetahui KBM, lakukan penggoresan dari seluruh tabung pada media NAP, kemudian diinkubasikan pada suhu 37° - $37,5^{\circ}$ C selama 18-24 jam.

15. Setelah 18-24 jam hitung jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh dengan colony counter, konsentrasi terendah dengan jumlah koloni kurang dari 0,1% original inoculum adalah KBM.





Gambar 4.1 Alur Kerja Penelitian

4.9 Analisis Data

Dari penelitian yang telah dilakukan dengan berbagai metode tersebut, kita bisa memperoleh hasil data yang bisa ditransfer ke dalam bentuk grafik.

Grafik tersebut dapat menggambarkan hubungan antara beberapa konsentrasi larutan ekstrak etanol kulit pisang ambon terhadap tingkat kekeruhan larutan suspensi fungi uji. Semakin tinggi konsentrasi larutan, maka akan semakin jernih larutan suspense fungi uji.

Data dianalisis menggunakan uji statistik one way Anova, pada taraf kepercayaan 95% ($\alpha < 0,05$), sehingga bisa diketahui pengaruh dari beberapa konsentrasi berbeda larutan ekstrak kulit pisang ambon terhadap jumlah koloni *Candida albicanss*. Selain itu, uji regresi linier sederhana dengan taraf kepercayaan 95% juga digunakan untuk mengetahui hubungan antara penambahan jumlah konsentrasi ekstrak terhadap penurunan jumlah koloni.

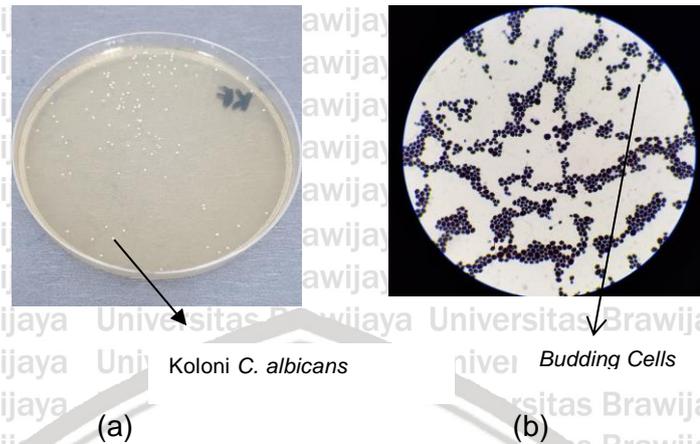
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Identifikasi Fungi

Fungi *Candida albicans* yang digunakan pada penelitian ini merupakan isolate yang telah dikultur di Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Untuk identifikasi, isolate fungi di-*streaking ulang* di *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), lalu dicat dengan pewarnaan Gram. Fungi *Candida albicans* yang telah diinkubasi pada medium *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) akan menghasilkan koloni yang berbentuk bulat, sedikit cembung. Isolat fungi di-*streaking*. Masing-masing isolat fungi di-*streaking ulang* di *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) kemudian diidentifikasi dengan pewarnaan Gram. Pada medium *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), semua isolat fungi *Candida albicans* akan menghasilkan koloni yang berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung yang terlihat pada Gambar 5.1a. Teksturnya halus, licin dan terkadang sedikit berlipat-lipat, terutama pada koloni yang sudah tua. Ukuran koloni dipengaruhi oleh umur biakan. Koloni berwarna putih kekuningan dan berbau asam seperti tape.

Pada perwarnaan Gram yang diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x, diperoleh bentukan sel ragi (blastospora) yang berbentuk bulat, maupun oval seperti terlihat pada Gambar 5.1b.



Gambar 5.1 Morfologi Koloni dan Sel *Candida albicans*

(a) Koloni *Candida albicans* pada Medium SDA; (b) Gambaran Mikroskopis Fungi *Candida albicans* pada Pengecatan Gram Menunjukkan Sifat Gram Positif dan Terdapat Budding Cells

Uji *germinating tube* dilakukan untuk membedakan *Candida albicans* dengan spesies *Candida* lainnya melalui ditemukannya pseudohifa memanjang.

Uji ini dilakukan di laboratorium mikrobiologi Universitas Brawijaya. Hasil uji dapat dilihat pada gambar 5.2.



Gambar 5.2 Gambaran Mikroskopis Pseudohifa *Candida albicans*

Terdapat gambaran pseudohifa khas *Candida albicans* pada hasil uji *germ tube*.

5.2 Gambaran Ekstrak Kulit Pisang Ambon

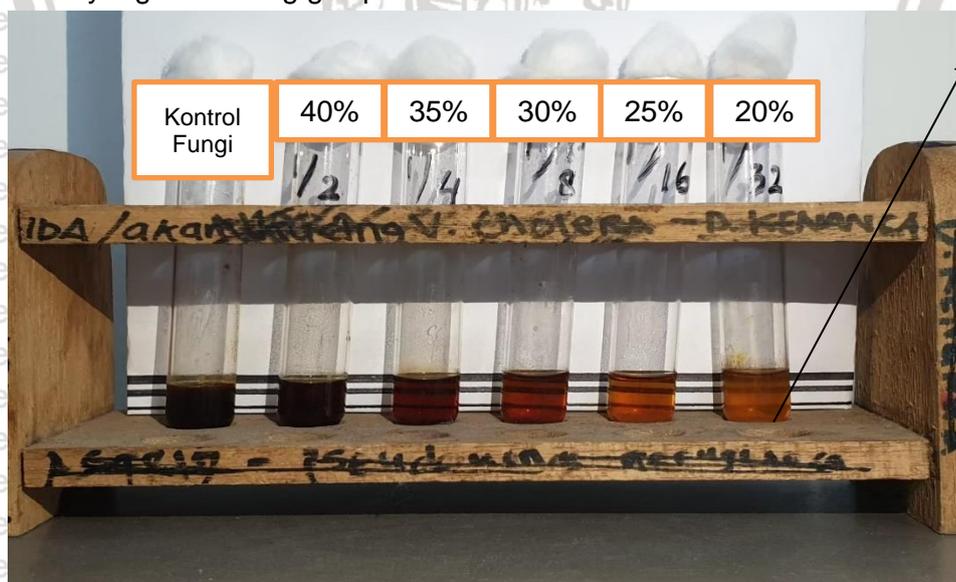
Ekstrak kulit pisang ambon berwarna coklat kehitaman dan keruh.

Ekstraknya kental dan sukar larut dalam air.

5.3 Hasil Pengamatan Kekeruhan dan Analisis terhadap KHM

Pada penelitian ini digunakan lima macam konsentrasi ekstrak kulit pisang ambon yaitu 20%, 25%, 30%, 35%, 40% serta konsentrasi 0% (kontrol fungi atau fungi tanpa ekstrak). KHM (Kadar Hambat Minimal) adalah konsentrasi terendah dari antifungi yang mampu menghambat pertumbuhan fungi (ditandai dengan tidak adanya kekeruhan pada tabung), setelah diinkubasikan selama 18-24 jam (Brooks *et al.*, 2013).

Berdasarkan hasil pengamatan, semua tabung menunjukkan kekeruhan, sehingga KHM tidak dapat dianalisis. Kekeruhan pada semua tabung bukan disebabkan oleh adanya pertumbuhan koloni bakteri, melainkan warna asli dari ekstrak yang cenderung gelap.



Gambar 5.3 Hasil Pengamatan Kekeruhan Isolat *Candida albicans*

Dari hasil pengamatan didapatkan garis tidak tampak karena kekeruhan ekstrak sehingga KHM tidak dapat ditentukan.

5.4 Hasil Penentuan KBM dan Analisis terhadap KBM

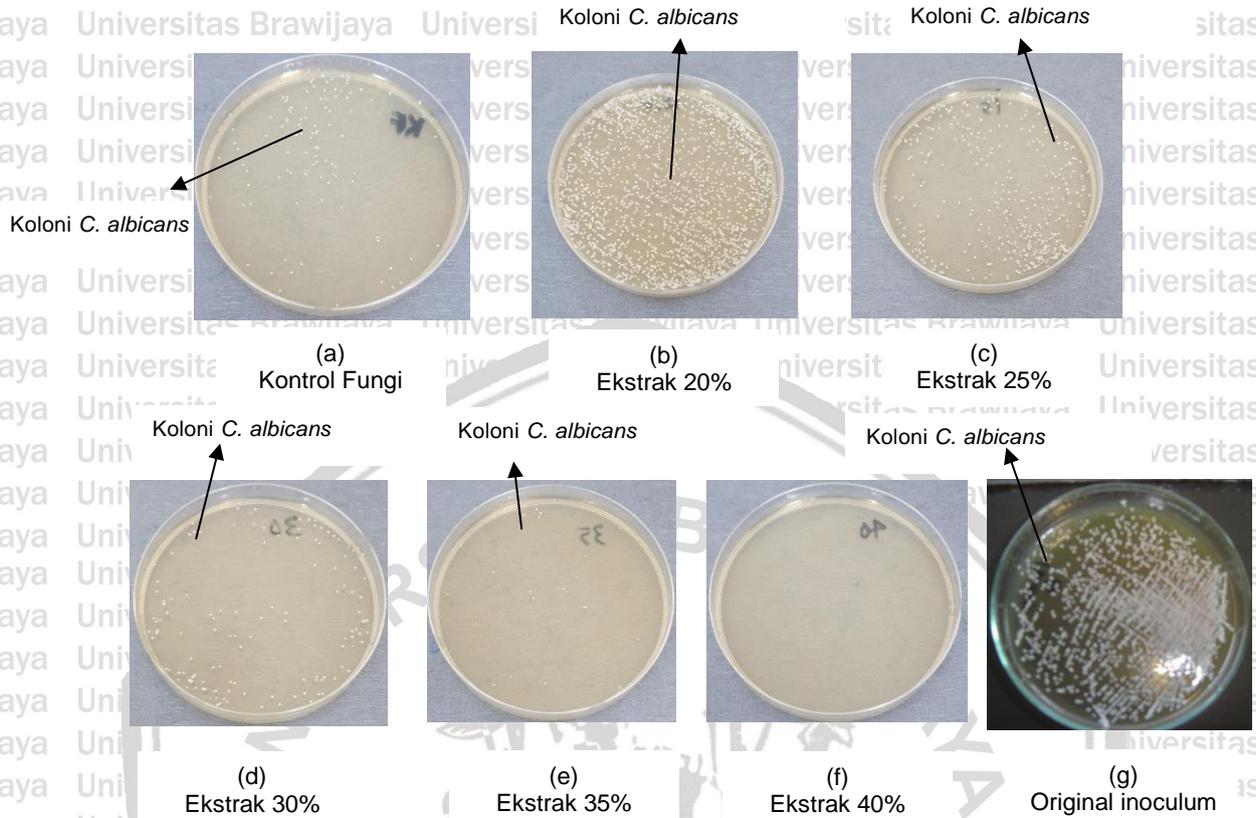
Setelah tabung diinkubasi selama 18-24 jam pada suhu 37°C dan diamati tingkat kekeruhannya untuk melihat KHM, tiap konsentrasi ekstrak tersebut diinokulasi pada SDA. SDA lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam.

Setelah diinkubasi, dilakukan penghitungan jumlah koloni yang tumbuh pada masing masing konsentrasi dengan menggunakan *colony counter*. Dilakukan pengulangan sebanyak empat kali.

KBM (Kadar Bunuh Minimal) adalah kadar terendah dari ekstrak antifungi yang dapat membunuh fungi (ditandai dengan tidak tumbuhnya kuman pada medium) atau pertumbuhan koloninya $<0,1\%$ dari jumlah koloni inokulum awal (*original inoculum* / Oi) pada medium SDA yang telah dilakukan penggoresan sebanyak satu ose (1 μ l). Hasil streaking fungi pada SDA dapat dilihat pada

Gambar 5. 4

Dari hasil inokulasi dan penghitungan koloni isolat fungi *Candida albicans* tersebut dapat ditentukan kadar bunuh minimal dari ekstrak kulit pisang ambon, yaitu tidak tumbuhnya koloni atau jumlah koloni $<0,1\%$ dari *original inoculum* pada SDA. Hasil penghitungan jumlah koloni yang tumbuh di medium SDA dengan menggunakan *colony counter* dapat dilihat pada Tabel 5.1.



Gambar 5.4 Pertumbuhan Koloni *Candida albicans* pada *Sabouraud Dextrose Agar*

Ada penurunan jumlah koloni pada setiap penambahan 5% konsentrasi ekstrak etanol kulit pisang.

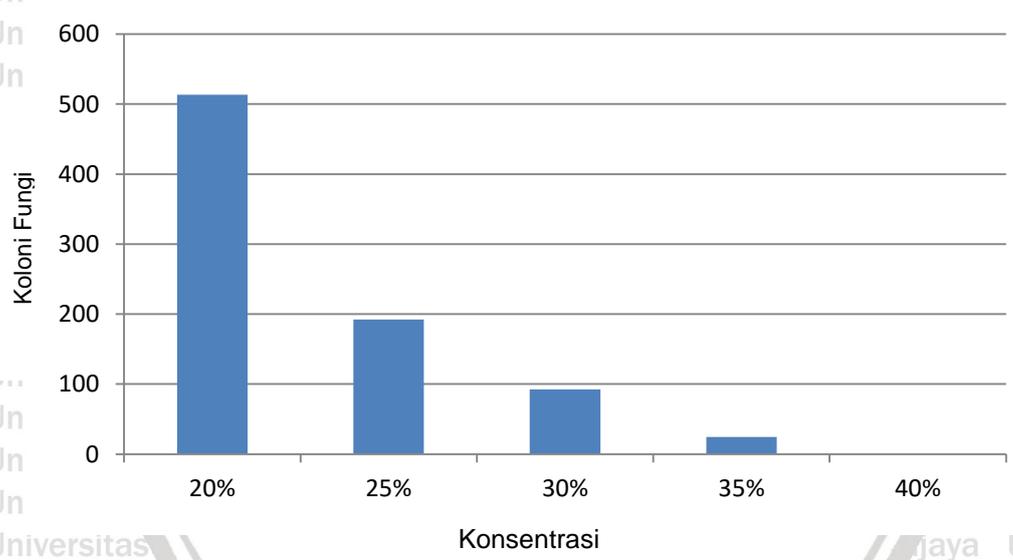
Tabel 5.1 Hasil Penghitungan Koloni Fungi yang Tumbuh Pada SDA

KONSENTRASI EKSTRAK	JUMLAH KOLONI PER ISOLAT				RATA - RATA
	Ulangan I	Ulangan II	Ulangan III	Ulangan IV	
0%	∞	∞	∞	∞	∞
20%	512	509	513	519	513,25
25%	196	189	193	191	192,25
30%	90	93	89	98	92,25
35%	26	21	24	27	24,5
40%	0	0	0	0	0
Ol	2335	1997	2201	2217	2187,5

Keterangan: ∞ = Tidak terbatas (tidak bisa dihitung karena terlalu banyak)

Data pada Gambar 5.4 dan Tabel 5.1 yang merupakan data hasil perhitungan jumlah koloni lalu digambarkan ke dalam sebuah grafik rerata jumlah koloni yang menunjukkan hubungan antara pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak kulit pisang ambon terhadap jumlah koloni *Candida albicans* yang tumbuh pada medium SDA.

Grafik rerata jumlah koloni menunjukkan penurunan yang signifikan pada setiap peningkatan 5% ekstrak kulit pisang ambon. Grafik rerata jumlah koloni dapat dilihat pada Gambar 5.5.



Gambar 5.5 Grafik Hasil Jumlah Koloni Tiap Isolat terhadap Berbagai Konsentrasi Ekstrak Kulit Pisang ambon

Ada penurunan jumlah koloni yang signifikan pada tiap 5% kenaikan konsentrasi ekstrak etanol kulit pisang.

5.5 Analisis Data

Hasil penelitian ini dianalisis menggunakan analisis statistik SPSS versi 16.0 untuk windows. Dalam perhitungan hasil penelitian ini digunakan taraf kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$).



5.5.1 Uji Normalitas

Uji normalitas adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui apakah sampel data yang digunakan memiliki sebaran yang normal. Metode yang digunakan adalah uji *Shapiro-Wilk*. Dari hasil uji normalitas (Lampiran 2.1) diperoleh nilai signifikansi > 0.05 yang menunjukkan bahwa sebaran data normal.

5.5.2 Uji Homogenitas

Uji homogenitas adalah uji yang dilakukan untuk menilai apakah variansi data yang digunakan homogen atau tidak. Dari hasil uji (Lampiran 2.2) diperoleh nilai signifikansi sebesar $0,150$ ($p > 0,05$) yang membuktikan bahwa data mempunyai variansi yang relatif homogen.

5.5.3 Uji One-Way ANOVA

One-Way ANOVA merupakan pengujian untuk mengetahui perbedaan nyata antar konsentrasi ekstrak kulit pisang ambon terhadap rerata pertumbuhan koloni empat kali pengulangan isolat *Candida albicans*. Dari hasil uji *One-Way ANOVA* (Lampiran 3.1) didapatkan angka signifikansi $0,000$ ($p < 0,05$). Hal ini berarti efek perubahan konsentrasi ekstrak kulit pisang ambon terhadap jumlah koloni rata-rata empat isolat *Candida albicans* adalah berbeda secara signifikan pada taraf kepercayaan 95% .

5.5.4 Uji Post Hoc Tukey

Uji *Post Hoc Tukey* merupakan uji perbandingan berganda (*multiple comparisons*). Uji ini menunjukkan pasangan kelompok sampel (kelompok perlakuan atau konsentrasi dan jumlah koloni) yang memberikan perbedaan yang signifikan dan yang tidak memberikan perbedaan secara signifikan. Dari hasil uji *Post Hoc Tukey* (lampiran 3.2) dapat diketahui bahwa ada perbedaan yang

signifikan di setiap pasangan kelompok sampel yang ditunjukkan oleh angka signifikansi 0,000 ($p < 0,05$).

Untuk mengetahui kelompok konsentrasi mana yang rata-ratanya tidak berbeda dilakukan uji lanjut *Homogenous Subsets* pada lampiran 3.3.

Hasil *Post Hoc test (Tukey's Test)* menunjukkan bahwa terdapat perbedaan bermakna jumlah koloni fungi *Candida albicans* yang dihasilkan pada medium SDA antara berbagai konsentrasi ekstrak kulit pisang ambon ($p < 0,05$).

5.5.5 Uji Korelasi dan Regresi

Uji Korelasi (Lampiran 4.1) menunjukkan angka signifikansi 0.000 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat hubungan yang bermakna antara pemberian ekstrak kulit pisang ambon dengan jumlah koloni fungi *Candida albicans*. Besar koefisien korelasi Pearson yaitu $R = -0,905$. Tanda negatif menunjukkan hubungan yang terbalik yaitu bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit pisang ambon maka semakin sedikit jumlah koloni fungi yang tumbuh, dan sebaliknya. Nilai 0,905 menunjukkan bahwa terdapat hubungan antara perlakuan konsentrasi dengan pertumbuhan fungi (nilai lebih dari 0,5).

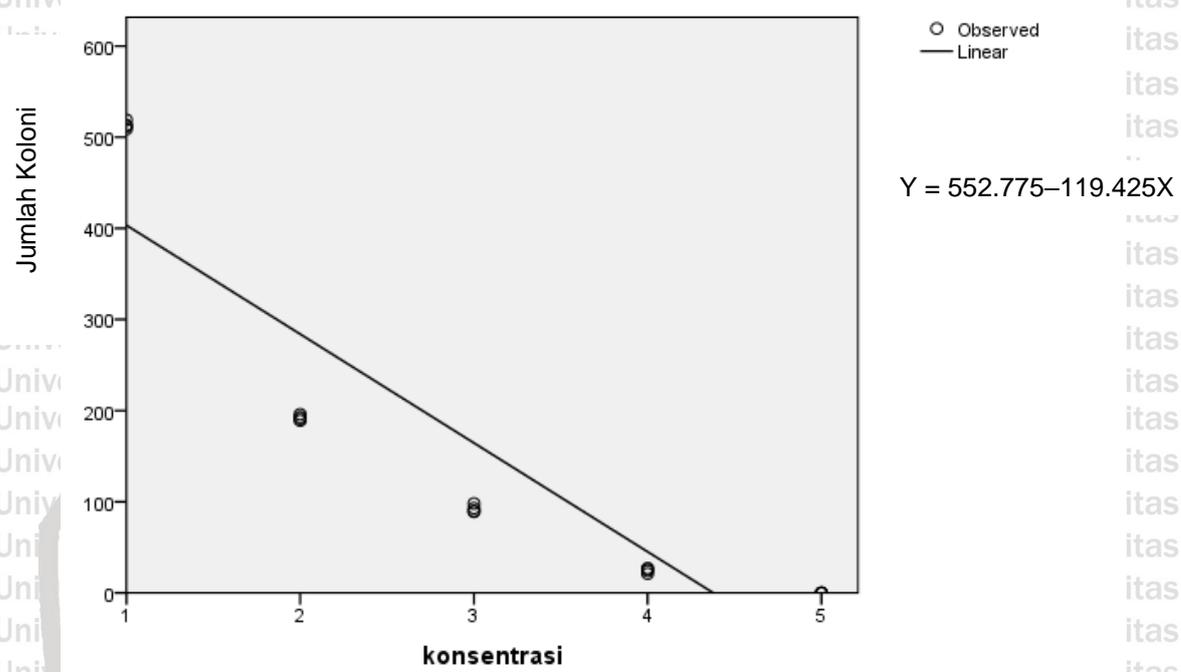
Analisis regresi digunakan untuk menentukan model yang paling sesuai untuk pasangan data serta dapat digunakan untuk membuat model dan menyelidiki hubungan antara dua variabel atau lebih. Dalam penelitian ini uji regresi digunakan untuk mengetahui sejauh mana hubungan antara peningkatan konsentrasi dengan kemampuan penghambatan terhadap koloni.

Koefisien Determinasi R Kuadrat (R^2) sebesar 0,818 berarti bahwa kontribusi pemberian ekstrak kulit pisang ambon dalam menurunkan jumlah koloni fungi *Candida albicans* sebesar 81,8% sedangkan sisanya 8,2% disebabkan oleh

faktor-faktor lain yang tidak diteliti. Faktor-faktor tersebut bisa merupakan akibat dari lama penyimpanan ekstrak atau akibat resistensi fungsi itu sendiri.

Hubungan antara perubahan konsentrasi ekstrak kulit pisang ambon dengan pertumbuhan koloni fungi *Candida albicans* dapat dinyatakan dengan rumus $Y = 552.775 - 119.425X$. Y adalah jumlah koloni fungi *Candida albicans* sedangkan X adalah konsentrasi ekstrak kulit pisang ambon. Hal ini berarti tanpa pemberian ekstrak kulit pisang ambon maka jumlah koloni *Candida albicans* yang dihasilkan di medium SDA akan meningkat konstan yaitu 552,775. Dengan pengaruh ekstrak maka setiap peningkatan konsentrasi ekstrak kulit pisang ambon sebesar 1% justru menyebabkan penurunan jumlah koloni fungi hingga 119,425 koloni fungi.





Gambar 5.6 Grafik Persamaan Linier Uji Regresi dari Jumlah Koloni *Candida albicans* terhadap Konsentrasi Ekstrak Kulit Pisang ambon



BAB 6 PEMBAHASAN

6.1 Penjelasan Singkat Penelitian

Penelitian ini bertujuan untuk mengeksplorasi efek antifungi ekstrak kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) terhadap *Candida albicans*. Penelitian ini bersifat eksperimental dan dilakukan secara *in vitro*.

Metode yang digunakan adalah metode dilusi tabung (*tube dilution*). Metode yang digunakan adalah metode dilusi tabung (*tube dilution*). Melalui metode ini, akan diketahui Kadar Hambat Minimum (KHM) yang diamati secara kualitatif dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) yang diamati secara kuantitatif.

6.2 Identifikasi Fungi dan Proses Ekstraksi

Fungi yang digunakan berasal dari *stock culture* yang disimpan di laboratorium Mikrobiologi FKUB. Tes identifikasi perlu dilakukan untuk memastikan identitas fungi yang akan digunakan, salah satunya adalah pewarnaan Gram. Dari tes pewarnaan Gram, ditemukan gambaran sel ragi yang bulat, atau oval.

Ekstrak yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.). Ekstraksi dilakukan di Laboratorium Teknik Kimia Politeknik Negeri Malang. Metode ekstraksi yang digunakan adalah maserasi dengan etanol 96%.

6.3 Penelitian Pendahuluan

Sebelum dimulai penelitian, dilakukan uji eksplorasi terlebih dahulu. Uji eksplorasi ini bertujuan untuk memperoleh konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian. Berdasarkan hasil uji eksplorasi, pada konsentrasi 50% pertumbuhan koloni fungi *Candida albicans* sudah tidak ditemukan. Lalu dilakukan perapatan dosis dengan selisih 5% yaitu, konsentrasi 20%, 25%, 30%, 35%, dan 40%. Hasilnya pada konsentrasi 40% tidak didapatkan adanya pertumbuhan koloni fungi.

6.4 KHM (Kadar Hambat Minimum)

Pada pengamatan dilusi tabung, terlihat semua tabung mengalami kekeruhan. Hal ini terjadi karena warna asli dari ekstrak yang cenderung keruh. Oleh karena itu, KHM dari masing masing konsentrasi tidak dapat dianalisis.

6.5 KBM (Kadar Bunuh Minimum)

Berdasarkan hasil *streaking* dan inkubasi selama 18-24 jam masing-masing konsentrasi dilusi tabung pada SDA menunjukkan bahwa pada konsentrasi 40% tidak ditemukan pertumbuhan fungi. Lalu, pada dosis 20%, 25%, 30%, dan 35% dilakukan penghitungan jumlah koloni menggunakan *colony counter*. Adapun perbedaan jumlah koloni fungi dapat dilihat pada Tabel 5.1. Pada tiap pengulangan, didapatkan jumlah koloni yang berbeda – beda.

6.6 Penelitian terkait Kulit Pisang Ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) dan *Candida albicans*

Pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) adalah salah satu bagian dari buah yang paling sering dikonsumsi oleh masyarakat karena nilai gizinya. Namun, kulitnya yang sering diabaikan, ternyata memiliki banyak sekali manfaat. Adapun manfaat dari kulit pisang adalah sebagai pengobatan untuk gigitan nyamuk, saluran cerna, dan kutil. Zat yang dimanfaatkan untuk pengobatan gigitan nyamuk, dan kutil sama dengan yang digunakan sebagai antifungi, yaitu fitokimia (Kapadia, 2015). Selain itu, beberapa penelitian lain juga menyebutkan bahwa kulit pisang punya efek antimikroba.

Kulit pisang ambon memiliki beberapa kandungan fitokimia. Beberapa kandungan fitokimia dari kulit pisang ambon mempunyai sifat antifungi, yaitu Tanin dan Flavonoid (Ansari *et al.*, 2013). Komposisi kandungan pada kulit pisang ambon bisa dilihat pada tabel 6.1.

Tabel 6.1 Komposisi Kandungan Fitokimia dari Ekstrak Kulit Pisang Ambon (Vijayakumar *et al.*, 2017).

Table 1
Phytochemical constitution of the aqueous extract of *Musa paradisiaca* fruit peel.

Chemical class	Strongly positive (+++)	Positive (++)	Trace (+)	Not detected (-)
Carbohydrates	-	-	-	-
Tannins	-	-	✓	-
Saponins	-	-	-	-
Flavonoids	-	✓	-	-
Alkaloids	-	-	-	-
Quinones	✓	-	-	-
Glycosides	-	-	-	-
Triterpenoids	-	-	-	-
Phenols	✓	-	-	-
Steroids and phytosteroids	✓	-	-	-
Anthraquinonines	-	-	-	-

Penelitian pada tahun 2015 menunjukkan bahwa ekstrak kulit pisang ambon efektif digunakan sebagai antimikroba untuk *Porphyromonas gingivalis*

dan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* dalam uji in vitro (Kapadia, 2015).

Selain itu kulit pisang ambon juga terbukti ampuh menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, dan *Proteus mirabilis* (Ighodaro, 2012).

Kulit pisang ini juga telah diuji efektifitasnya terhadap beberapa mikroba dalam penelitian oleh Chabuck, dan berhasil menunjukkan efek antimikroba pada mayoritas mikroba (Chabuck *et al.*, 2013).

Beberapa penelitian pada tahun sebelumnya banyak yang mencoba herbal lain untuk menekan pertumbuhan koloni *Candida albicans* secara in vitro.

Salah satunya adalah pemanfaatan daun sirih hijau (*Piper betle* L.) dan daun sirih merah (*Piper procatum*). Hasil dari penelitian ini membuktikan bahwa daun sirih hijau dan merah mampu menghambat pertumbuhan koloni fungi ini dengan zona hambat masing-masing sebesar 28,71 mm dan 15,46 mm (Gunawan *et al.*, 2015).

Hasil sejenis didapatkan pada penelitian menggunakan ekstrak air kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.). Pada penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak air kayu secang mampu menghambat pertumbuhan koloni *Candida albicans* dengan KHM sebesar 20%. KHM ini ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar lubang perforasi pada bahan uji (Karlina *et al.*, 2016).

Pada tahun 2018 telah dilakukan percobaan menggunakan kulit durian (*Durio zibethinus* L.) untuk menghambat pertumbuhan *Candia albicans*. Dari penelitian ini didapatkan hasil bahwa fraksi polar dari kulit durian mampu menekan angka pertumbuhan fungi ini pada konsentrasi 8%. Fraksi polar kulit

durian ini telah diteliti dan mengandung senyawa flavonoid, tanin, saponin, dan alkaloid. Untuk menghambat pertumbuhan koloni *Candida albicans*, senyawa yang paling efektif adalah flavonoid (Mulyani *et al.*, 2019).

Efektifitas kulit pisang ambon sebagai antimikroba memang sudah terbukti, namun efeknya sebagai antifungi masih perlu dilakukan penelitian yang lebih lanjut. Pada penelitian oleh Chabuck, kulit pisang ambon tidak terbukti menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. Namun, metode ekstraksi yang digunakan pada penelitian tersebut adalah metode ekstraksi distilasi air, sedangkan pada penelitian ini digunakan metode maserasi. Jumlah koloni *Candida albicans* yang digunakan pada penelitian tersebut juga lebih banyak, yaitu 1×10^8 CFU/ml, sedangkan pada penelitian ini, koloni fungi yang digunakan adalah 1×10^4 CFU/ml (Chabuck *et al.*, 2013).

Di sisi lain, berdasarkan penelitian yang sudah disebutkan sebelumnya, kandungan tanin dan flavonoid dari kulit pisang ambon diketahui mempunyai aktivitas antifungi. Pada penelitian lain disebutkan juga bahwa kulit pisang ambon berhasil menghambat fungsi *Malazzesia furfur*. Adanya beberapa penelitian di atas tidak menutup kemungkinan bahwa ekstrak kulit pisang ambon bisa digunakan untuk menghambat spesies fungi lain (Dyah, 2017).

6.7 Mekanisme Antifungi Kulit Pisang Ambon

Kandungan tanin dan flavonoid yang ada di dalam kulit pisang ambon secara sinergis memiliki sifat fungicidal. Adapun mekanisme antifungi dari tanin adalah mengganggu pertumbuhan dinding sel fungi. Sedangkan, flavonoid, bekerja dengan merusak membrane plasma dari fungi. Quinon bekerja dengan merusak rantai DNA dari fungi.

Dinding sel fungi terdiri dari beberapa lapis (*multilayer*) yang terdiri dari kitin, glukan, dan manoprotein. Terhambatnya biosintesis dari salah satu atau beberapa komponen tersebut, maka pertumbuhan fungi akan terganggu. Tanin yang terkandung di dalam kulit pisang ambon, mempunyai potensi untuk menghambat biosintesis kitin yang merupakan 60% penyusun miselium fungi, dan glukan sintase yang merupakan enzim penghasil energi bagi fungi. Rusaknya dinding sel fungi memungkinkan zat-zat aktif lain untuk masuk dan menembus membrane plasma sel.

Flavonoid bekerja dengan cara merusak membran plasma fungi, sehingga permeabilitas membran tersebut terganggu. Dengan terganggunya membran, maka zat-zat lain, terutama quinon, bisa menembus masuk membrane plasma dan bekerja dengan cara merusak rantai DNA dari fungi. Rusaknya rantai DNA fungi tersebut akan mengakibatkan pertumbuhan fungi tersebut terhambat atau bahkan terhenti, sehingga fungi akan mati, dan tidak bisa berkecambah.

Dengan adanya kombinasi dari 3 jenis fitokimia yang memiliki mekanisme antifungi yang berbeda, tentunya efektifitas dari ekstrak kulit pisang ambon dalam menghambat pertumbuhan fungi meningkat secara signifikan. Dengan dosis yang optimal, ekstrak kulit pisang ini mampu menjadi alternatif untuk menghambat pertumbuhan *Candida albicans*.

Efektivitas dari sifat antifungi dari ekstrak etanol kulit pisang ambon ini bersifat *dose-related*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang digunakan, maka akan semakin tinggi pula daya bunuh terhadap fungi. Pada penelitian ini, dosis optimal yang berhasil mengeradikasi fungi adalah 40%.

6.8 Keterbatasan Penelitian

Keterbatasan yang ada pada penelitian ini adalah ekstrak etanol yang digunakan berwarna gelap sehingga tidak bisa digunakan untuk menentukan KHM. Selain itu, penyimpanan ekstrak yang semakin lama akan semakin menurunkan kualitas dari ekstrak tersebut, menyebabkan perlunya penggantian ekstrak secara rutin supaya diperoleh hasil yang optimal.



BAB 7 PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian dan pembahasan maka dapat diambil kesimpulan bahwa :

7.1.1 Ekstrak kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.)

Kunt.) memiliki efek antifungi terhadap fungi *Candida albicans* secara *in vitro*.

7.1.2 Kadar Hambat Minimum (KHM) ekstrak kulit pisang ambon (*Musa*

paradisiaca var. *sapientum* (L.) Kunt.) terhadap fungi *Candida albicans*

tidak dapat ditentukan pada penelitian ini, sedangkan Kadar Bunuh

Minimum (KBM) ekstrak kulit pisang ambon (*Musa paradisiaca* var.

sapientum (L.) Kunt.) terhadap fungi *Candida albicans* adalah pada

konsentrasi 40%.

7.2 Saran

7.2.1 Diperlukan penelitian lebih lanjut mengenai zat-zat aktif lainnya selain

tanin dan flavonoid yang terdapat dalam kulit pisang ambon (*Musa*

paradisiaca var. *sapientum* (L.) Kunt.) yang mempunyai efek sebagai

antifungi.

7.2.2 Diperlukan penelitian lanjutan mengenai efek antifungi ekstrak kulit

pisang ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) secara *in*

vivo pada berbagai hewan coba maupun *clinical trial* untuk melihat

farmakodinamik, farmakokinetik dan toksisitas ekstrak kulit pisang

ambon (*Musa paradisiaca* var. *sapientum* (L.) Kunt.) agar pemanfaatan ekstrak ini dapat diaplikasikan ke manusia.



DAFTAR PUSTAKA

- Ansari, M.A., Anurag, A., Fatima, Z. and Hameed, S., 2013. Natural phenolic compounds: a potential antifungal agent. *Microb.*
- Berkow, E.L. and Lockhart, S.R., 2017. Fluconazole resistance in *Candida* species: a current perspective. *Infection and drug resistance.*
- Brooks, G. F., Carroll, K. C., Butel, J. S., Morse, S. A., Mietzner, T. A. 2013. *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*, 26th Edition., McGraw-Hill Education, New York.
- Cahyono B., 1995. *Budidaya Pisang dan Analisis Usahatani*, Kanisius, Yogyakarta.
- Calderone RA, Clancy CJ. 2012. *Candida and Candidiasis*: ASM Press, Washington, DC.
- CDC, 2017. *Antifungal Resistance – Fungal Resistance*, (Online), (www.cdc.gov. 26 June 2017, diakses 27 September 2018).
- Chabuck, Z.A.G., Al-Charrakh, A.H., Hindi, N.K.K. and Hindi, S.K.K., 2013. Antimicrobial effect of aqueous banana peel extract, Iraq. *Res Gate Pharm Sci.*
- Christopher, Diana Natalia, Sai Rahmayanti. 2017. Uji Aktivitas Ekstrak Etanol Umbi Bawang Dayak (*Eleutherina Americana* (Aubl.) Merr. Ex. K. Heyne.) terhadap *Trycophyton mentagrophytes* secara In Vitro.
- Cushnie, T.T. and Lamb, A.J., 2005. Antimicrobial Activity of Flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents.*
- Debora, Patricia G. Ferreira, Caroline D. Nicoletti, Luana P. Borba-Santos, Fernando C. Da Silva, Sonia Rozental, Vitor Fransisco Ferreira. 2018. *The Antifungal Activity of Naphthoquinones : An Integrative Review*, (Online), http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652018000301187, diakses tanggal 28 Oktober 2019.
- Dyah. 2017. *Eksplorasi Esktrak Etanol Beberapa Tumbuhan Berpotensi sebagai Antiketombe*, (Online), (<http://jurnalnasional.ump.ac.id/index.php/JRST/article/view/1671>). Diakses tanggal 29 September 2018.
- Erdogan A, Rao SS. 2015. Small Intestinal Fungal Overgrowth. *Current Gastroenterology Reports.*

Fahey, G. C., & L. L. Berger. 1988. Carbohydrate nutrition of ruminants. In : D.C Chruch (Ed.). *Digestive Physiology and Nutrition of Ruminants. The Ruminant Animal*. Prentice Hall Eglewood Cliffs, New Jersey

Franklin, T.J. and Snow, G.A., 2005. *Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action*. Springer Science & Business Media.

Istiqomah. 2013. *Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (Piperis retrofracti fructus)*.

Jayanegara, A. and Sofyan, A., 2008. Penentuan Aktivitas Biologi Tanin Beberapa Hijauan secara. *Vitro menggunakan*.

Kapadia, S.P., Pudakalkatti, P.S. and Shivanaiakar, S., 2015. Detection of antimicrobial activity of banana peel (*Musa paradisiaca* L.) on *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: An in vitro study. *Contemporary clinical dentistry*.

Lopes, G., Pinto, E., Andrade, P.B. and Valentão, P., 2013. *Antifungal Activity of Phlorotannins Against Dermatophytes and Yeasts: Approaches to the Mechanism of Action and Influence on Candida albicans Virulence Factor*. *PLoS One*.

Martins, N., Ferreira, I.C., Barros, L., Silva, S. and Henriques, M., 2014. Candidiasis: Predisposing Factors, Prevention, Diagnosis and Alternative Treatment. *Mycopathologia*.

Materia Medika, 2019. *Determinasi Tanaman Pisang Ambon*.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. 2013. *Candida albicans* Pathogenicity Mechanisms. *Virulence*.

Mirsa, 2013. *Pemanfaatan Limbah Kulit Pisang sebagai Karbon Aktif*. Universitas Pembangunan Nasional. Jakarta.

Nakasone, H.K. and Paull, R.E. 1998. *Tropical Fruits*. CAB International, Wallingford.

Panche, A.N., Diwan, A.D. and Chandra, S.R., 2016. Flavonoids: an Overview. *Journal of Nutritional Science*.

Patra, A. K. and J. Saxena. 2010. A New Perspective on the Use of Plant Secondary Metabolites to Inhibit Methanogenesis in the Rumen. *J. Phytochemistry*.

Penebar Swadaya. 2000. *Berkebun Pisang Secara Intensif*. Jakarta

Singh R, Chakrabarti A. 2017. Invasive Candidiasis in the Southeast-Asian Region. In *Candida albicans: Cellular and Molecular Biology*. Springer, Cham.

Solimun. 2001. *Diktat Metodologi Penelitian LKIP dan PKM Kelompok Agrokompleks*. Malang : Universitas Brawijaya.

Suyanti dan Ahmad Supriyadi. 2008. *Pisang, Budi Daya, Pengolahan dan Prospek Pasar*. Edisi Revisi. Penebar Swadaya, Jakarta

Tjahjadi.1991. *Taksonomi Tumbuhan Spermathophyta*. Gajah Mada University Press.Yogyakarta.

Tortora. *Microbiology an Introduction* (10th ed). San Fransisco, CA.: Pearson Benjamin Cummings.

van Schalkwyk J, Yudin MH, Allen V, Bouchard C, Boucher M, Boucoiran I, Caddy S, Castillo E, Kennedy VL, Money DM, Murphy K. 2015. Vulvovaginitis: Screening for and Management of Trichomoniasis, Vulvovaginal Candidiasis, and Bacterial Vaginosis. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*.

Van Steenis,C.G.G.J. 1992. *Flora*. Penerjemah : M Soeryowinoto,dkk. Cetakan 5. PT.Pradnya Paramita.Jakarta.

White, T.C., Holleman, S., Dy, F., Mirels, L.F. and Stevens, D.A., 2002. Resistance mechanisms in clinical isolates of *Candida albicans*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(6).