UJI EFEK EKSTRAK KULIT LEMON *(Citrus limon L.)* SEBAGAI ANTIFUNGI TERHADAP CANDIDA ALBICANS SECARA IN VITRO

TUGAS AKHIR

Untuk Memenuhi Persyaratan

Memperoleh Gelar Sarjana Kedokteran Gigi

Oleh :

RIZQI PRIASA PAMUNGKAS

0910743016

PROGRAM STUDI PENDIDIKAN DOKTER GIGI

FAKULTAS KEDOKTERAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2013

HALAMAN PERSETUJUAN

LEMBAR PENGESAHAN

TUGAS AKHIR

UJI EFEK EKSTRAK KULIT LEMON *(Citrus limon L.)* SEBAGAI ANTIFUNGI TERHADAP CANDIDA ALBICANS SECARA IN VITRO

Oleh:

Rizqi Priasa Pamungkas

0910743011

Telah diuji pada:

Hari : Senin

Tanggal : 4 Maret 2013

Dan dinyatakan lulus oleh :

Penguji I

(Dr. dr. Nurdiana, Mkes)

NIP.19551015 198503 2 001

Penguji II/Pembimbing I	Penguji III/Pembimbing II
(dr.Aulia Abdul Hamid, MSc.SpM)	(drg. Delvi Fitriani, M.Kes)
NIP. 19770601 200312 1 005	NIP. 701208 07 1 2 0018

Mengetahui,

Ketua Program Studi Pendidikan Dokter Gigi

(Dr. drg. M. Chair Effendi, SU, SpKGA)

NIP. 19530618 197912 1 005

KATA PENGANTAR

Segala puji hanya bagi Allah SWT yang telah memberi petunjuk dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan tugas akhir dengan judul "Uji Efek Ekstrak Kulit Lemon*(Citrus Limon L.)* Sebagai Antifungi Terhadap Candida Albicans Secara*In Vitro*"

Ketertarikan penulis pada topik ini didasari oleh fakta bahwa jamur *Candida albicans*merupakan salah satufungi patogen yang umum menjangkiti manusia baik secara oral, genital, maupun sistemik yang dapat mengancam jiwa yang disebut kandidiasis. Disisi lain, banyak penduduk Indonesia yang lebih memilih bahan alami untuk mengatasi kandidiasis. Salah satu alternatif terapi adalah dengan bahan alami, yaitu kulit lemon (Citrus limon L). Kandungan aktif kulit lemon yang diduga bermanfaat sebagai antimikroba adalah limonene, β-pinene dan γ-terpinene. Penelitian ini akan menjadi langkah awal untuk membuktikan efek antifungi ekstrak kulit lemonterhadap *Candida albicans* secara *in Vitro.*

Proses penulisan Tugas Akhir ini merupakan sebuah pengalaman yang sangat berharga. Pengalaman yang memberikan tantangan dalam segi keilmuan dan juga sarat ujian mental dan fisik yang mungkin akan sangat berat jika tidak ada pihak-pihak yang bersedia meluangkan waktu, tenaga, dan pikirannya untuk membantu saya. Melalui kesempatan ini, sayaingin mengucapkan terima kasih yang tak terhingga kepada:

1. Dr.dr. KaryonoMintaroem, SpPA, dekan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang telah memberikan saya kesempatan menuntut ilmu di Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

2. dr. Aulia Abdul Hamid, MSc, SpM, drg Delvi Fitriani, M.Kes dan Dr. dr. Nurdiana, M.kes selaku dosen penguji atas saran dan kritik yang telah diberikan sehingga dapat menyempurnakan tugas akhir ini.
3. Dr. Dra. Sri Winarsih, Apt., MSi, dr Soemardini M.Pd dan segenap anggota Tim Pengelola Tugas Akhir FKUB yang telah memberikan banyak informasi, bantuan dan dukungan.
4. Yang tercinta bapak Kamdani dan ibu Sri Mulyani, ketiga kakakku dan mas ipar. Paluvita Chamida S, Yunita Dwi RS, Rida Trian SDS, Wawan, Bambang, Taufik dan kekasih Mirzia Dwi Rahma terimakasih atas segala pengertian, dukungan moral dan kasih sayangnya selama ini.
5. Teman-teman jurusan Pendidikan Dokter Gigi angkatan 2009 khususnya PDG 2009 atas persahabatannya selama ini. Sahabat-sahabatku Rizki Maulana, Sendy Tanaka, Phandu Putra, Satria Aji, Syarif Hussein, Luqman Rahardian, Reza Pahlevi, Dyka Arief Darmawan, Eko Wicaksono, Meilia Aquina Hakim dan teman-teman seangkatan yang sama-sama mengerjakan tugas akhir di Lab. Mikrobiologi. Terimakasih telah mendukung satu sama lain selama proses pembuatan tugas akhir ini.
6. Staff di Mikro mas Slamet, mbak Uci yang tidak lelah memberikan masukan dan selalu membantu penulis dalam menjalani penelitian di lab.

Penulis menyadari bahwa penulisan ini masih jauh dari sempurna, oleh karena itu penulis membuka diri untuk segala saran dan kritik yang membangun.. Akhirnya, semoga Tugas Akhir ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, 4 April 2013

Penulis

ABSTRAK

Pamungkas, Rizqi Priasa. 2013. Uji Efek Ekstrak Kulit Lemon (*Citrus limon L.*) Sebagai Antifungi Terhadap*Candida albicans* Secara *In Vitro.*Tugas Akhir, Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Pembimbing: (1) Aulia Abdul Hamid. Dr. MSc. SpM (2) Delvi Fitriani, drg, Mkes.

Candida albicans (*C. albicans*) merupakan fungi patogen utama penyebab kejadianKandidiasis akibat genus *Candida*(kandidiasis). Studi penelitian pada masyarakat menemukan angka prevalensi kandidiasis yang sangat tinggi dibanding dengan penyebab infeksi rongga mulut lainnya.Meskipun pilihan terapi yang tersedia tampak efektif, banyak penduduk Indonesia yang lebih memilih bahan alami untuk mengatasi kandidiasis. Salah satu alternatif terapi adalah dengan bahan alami, yaitu kulit lemon (*Citrus Limon L).* Kandungan aktif kulit lemon yang diduga bermanfaat sebagai antimikroba adalah *limonene, β-pinene dan γ-terpinene*. Penelitian ini merupakan langkah awal untuk membuktikan efek antifungi ekstrak kulit lemon terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara *in vitro.* Studi eksperimental berupa *post test only control group design* dilakukanterhadap *Candida albicans* dengan metode dilusi tabung. Kelompok kontrol tidak diberi ekstrak (0%) sedangkan kelompok perlakuan diberi ekstrak kulit lemon dengan dosis 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% dan 8%. Dari hasil penelitian, didapatkan bahwa KHM dan KBM ekstrak berturut – turut adalah 4% dan 8%. Berdasarkan uji statistik, diperoleh bahwa terdapat perbedaan yang bermakna antara dosis ekstrak kulit lemon dengan pertumbuhan koloni *Candida albicans* (ANOVA $p<0,05$). Terdapat hubungan yang sangat erat dan berkebalikan antara dosis ekstrak dengan jumlah koloni yang tumbuh (Uji Regresi Linier $R = -0.977$). Oleh karena itu, dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit lemon mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans* secara signifikan.

Kata kunci: *Candida albicans,* ekstrak kulit lemon (*Citrus Limon L.)*, antimikroba

ABSTRACT

Pamungkas, Rizqi Priasa. 2013. Effect test of Lemon (*Citrus lemon* L.) Peel Extractas antifungal agent to*Candida albicans*in Vitro. Final Assignment, Faculty of Medicine, Brawijaya University. Supervisors: (1) Aulia Abdul Hamid. Dr. MSc. SpM (2) Delvi Fitriani, drg, Mkes.

Candida albicans (*C. albicans*) is the main etiologic agent of mycoses due to *Candida* genus(*candidiasis*). Study in the past has reported high candidiasis prevalence, compared to other oral infection disease. Many adequate treatments are available for candidiasis, but Indonesian peopleprefer to use natural ingredients to overcome the disease. One of the natural alternative therapy that can be used is extract of lemon peel (*Citrus lemon L.*). The active compositions of lemon peel which was allegedly useful as antimicrobial were*limonene, β-pinene and γ-terpinene*. This research was conducted to prove the antifungal effect of lemon peel extract to the growth of *Candida albicans* in vitro. This experimental study was using post-test only control group design with tube dilution method. The control group was given no extract (0%), while the trial groups were given the extract of pomegranate seed with variable doses, such as 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% and 8%. The result indicated that the pomegranate seed extract has antifungal properties, with MIC (Minimun Inhibition Concentration) and MBC (Minimum Bactericidal Concentration) are 4% and 8% respectively. Statistical analysis showed that there was significant difference between various doses of lemon peel extract and the growth of *Candida albicans*. (ANOVA $p < 0.05$). There were strong and reverse correlation between dose of lemon peel extract and growth of fungi (Regression correlation test $R = -0.977$). This experiment brought up a conclusion that lemon peel extract has antifungal effect to *Candida albicans* reflected by the inhibition of fungal growth.

Keywords: *Candida albicans,*lemon peel extract(*Citrus lemon L.*), antimicrobe

DAFTAR ISI

Halaman Judul ..... **i**

Halaman Pengesahan ..... **ii**

Kata Pengantar ..... **iii**

Abstrak ..... **v**

Abstract ..... **vi**

Daftar Isi ..... **vii**

Daftar Gambar ..... **xi**

Daftar Tabel ..... **xii**

Daftar Lampiran ..... **xiii**

Daftar Singkatan ..... **xiv**

BAB 1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang..... 1

1.2 Rumusan Masalah..... 3

1.3 Tujuan Penelitian..... 4

1.3.1 Tujuan Umum..... 4

1.3.2 Tujuan Khusus..... 4

1.4 Manfaat Penelitian..... 4

1.4.1 Manfaat Akademik..... 4

1.4.2 Manfaat Praktis..... 4

BAB 2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Candida albicans*..... 5

2.1.1 Taksonomi *Candida albicans*..... 5

2.1.2 Morfologi *Candida albicans*..... 5

2.1.3 Reproduksi *Candida albicans*..... 6

2.1.4 Struktur Fisik *Candida albicans*..... 7

2.1.5 Struktur Genetik *Candida albicans*..... 9

2.2 Kandidiasis..... 10

Definisi.....

2.2.1 Patogenesis dan Temuan Patologis..... 10

2.2.2	Kandidiasis Oral……	10
2.2.3	Definisi,Etiologi,Epidemiologi Kandidiasis Oral……	11
2.2.3.1	Klasifikasi dan Gejala Klinis……	11
2.2.3.2	Penatalaksanaan……	12
2.2.4	Lemon (*Citrus limon L)*……	16
2.3	Buah Lemon (*Citrus limon L.)*……	17
2.3.1	Kandungan Kulit Buah Lemon (*Citrus limon L.)*……	17
2.3.2	Manfaat Kulit Buah Lemon (*Citrus limon L*……	18
2.3.3	Terpenoid……	19
2.4	Obat Antifungi……	20
2.5	Mekanisme Aksi Antifungi……	22
2.5.1	Antifungi yang Mempengaruhi Sterol Jamur……	23
2.5.1.1	Azole……	23
2.5.1.1.1	Polyene……	23
2.5.1.1.2	Allylamine……	23
2.5.1.1.3	Antifungi yang Aktif terhadap Dinding Sel Jamur……	25
2.5.1.2	Antifungi yang Menghinhibisi Asam Nukleat……	25
2.5.1.3	Resistensi terhadap Antifungi……	25
2.5.2	Antifungi yang Mempengaruhi Sterol Jamur……	26
2.3.2.1	Resistensi terhadap Azole……	26
2.5.2.1.1	Resistensi terhadap Polyene……	26
2.5.2.1.2	Resistensi terhadap Allylamine……	26
2.5.2.1.3	Antifungi yang Aktif terhadap Dinding Sel Jamur……	27
2.5.2.2	Antifungi yang Menghinhibisi Asam Nukleat……	27
2.5.2.3	Uji Kepekaan Terhadap Antifungi Secara *In Vitro*……	27
2.6	Metode Dilusi Tabung……	27
2.6.1	Metode Dilusi Agar……	28
2.6.2	Metode Difusi Cakram……	29
2.6.3	Macam Macam Proses Ekstraksi……	29
2.7	Prinsip Maserasi……	30
2.7.1	Prinsip Soxhletasi……	31
2.7.2	Prinsip Perkolasi……	31
2.7.3	Prinsip Refluks……	32
2.7.4	Prinsip Destilasi Uap Air……	32
2.7.5	Prinsip Rotavapor……	33

2.7.6	**KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS**	33
BAB 3	Kerangka Konsep……	34
3.1	Hipotesis……..	34
3.2	**METODE PENELITIAN**	35
BAB 4	Rancangan Penelitian……	36
4.1	Sampel Penelitian……..	36
4.2	Variabel Penelitian……...	36
4.3	Variabel Tergantung……..	36
4.3.1	Variabel Bebas……..	37
4.3.2	Tempat dan Waktu Penelitian……	37
4.4	Instrumen Penelitian……...	37
4.5	Alat……..	37
4.5.1	Bahan……	37
4.5.2	Bahan Untuk Identifikasi Jamur *Candida albicans*……	37
4.5.2.1	Bahan Untuk Pembuatan Ekstrak Petroleum Eter Kulit Lemon…..	37
4.5.2.2	Bahan Uji Kepekaan Ekstrak Petroleum Eter Kulit Lemon……..	37
4.5.2.3	Definisi Operasional……..	38
4.6	Prosedur Penelitian……	38
4.7	Proses Pembuatan Ekstrak Petroleum Eter Kulit Lemon……	39
4.7.1	Pemeriksaan Mikroskopis……	39
4.7.2	Tes Germinating Tube……...	40
4.7.3	Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans*……...	41
4.7.4	Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Petroleum Eter Kulit Lemon	41
4.7.5	Terhadap Candida albicans……..	
	Analisis Data……	42
BAB 5	**HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA**	
5.1	Hasil Penelitian……	45
5.1.1	Hasil Identifikasi Candida Albicans……	45
5.1.2	Gambaran Ekstrak Kulit Lemon……	46
5.1.3	Hasil Analisis Pertumbuhan Candida albicans pada Media SDA dan Analisis KHM……	46
5.1.4	Hasil Pengukuran Pertumbuhan Candida albicans pada Media SDA dan Analisis KBM……48	

5.2 Analisis Data…….. 52
5.2.1 Analisis Data dengan Metode One-way Anova……..... 52
5.2.2 Analisis Data degan Uji Korelasi dan Regresi Linier…….. 54
BAB 6 PEMBAHASAN…… 55
BAB 7 PENUTUP…… 61
7.1 Kesimpulan…… 61
7.2 Saran…… 61
DAFTAR PUSTAKA
LAMPIRAN

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Perubahan Morfologi Candida albicans…….....	6
Gambar 2.2	Skema Dinding Sel Candida albicans……..	8
Gambar 2.3	Kandidiasis Pseudomembranosus Akut……..	13
Gambar 2.4	Kandidiasis Atropik Akut……..	14
Gambar 2.5	Kandidiasis Atropik Kronik……	14
Gambar 2.6	Kandidiasis Hiperplastik Kronik……..	15
Gambar 2.7	Median Rhomboid Glositis……..	15
Gambar 2.8	Keilitis Angularis……	16
Gambar 2.9	Buah Lemon (*Citrus limon L.*)……..	18
Gambar 2.10	Struktur Kimia Golongan Terpenoid……..	19
Gambar 2.11	Jalur Biosintesis Ergosterol……..	22
Gambar 2.12	Representasi Skematik Interaksi Antara Amphotericin B dan Kolesterol Dalam Phospolipid Bilayer……	24
Gambar 3.1	Kerangka Konsep……..	34
Gambar 4.1	Ekstraktor Soxhlet……	40
Gambar 5.1	Morfologi Koloni dan Sel Candida albicans……..	45
Gambar 5.2	Pseudohifa……..	46
Gambar 5.3	Tingkat Kekeruhan Pada Tabung……	47
Gambar 5.4	Jumlah Koloni Candida albicans pada Media SDA……..	51
Gambar 5.5	Grafik Pertumbuhan Candida pada Media SDA dengan Konsentrasi Tertentu Ekstrak Kulit Lemon……	52

DAFTAR TABEL

Tabel 5.1 Tingkat Kekeruhan Jamur Candida albicans 47

Tabel 5.2 Jumlah Koloni Candida albicans pada media SDA 49

Tabel 5.3 Ringkasan Nilai Signifikasi (p<0.05) Post Hoc Test 53

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1 Pernyataan Keaslian Tulisan..... 68
Lampiran 2 Foto Alat yang Digunakan 69
Lampiran 3 Foto Ekstrak Petroleum eter kulit lemon..... 70
Lampiran 4 Penelitian Pendahuluan..... 71
Lampiran 5 Hasil Analistik Statistik..... 72

DAFTAR SINGKATAN

C.	: *Candida*
CFU	: *Colony Forming Unit*
KBM	: Kadar Bunuh Minimum
KHM	: Kadar Hambat Minimum
KJ	: Kontrol Jamur
NaCl	: *Natrium klorida*
OD	: *Optical density*
OI	: *Original inoculum*
PMN	: *Polymorphonuclear*
SDA	: *Saboaroud Dextrose agar*
SPSS	: *Statistical Product of Service Solution*
UV	: *Ultraviolet*

BAB 1

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Infeksi jamur yang paling banyak ditemukan disebabkan oleh spesies *Candida* terutama *Candida albicans.Candida albicans* adalah spesies jamur yang secara normal terdapat pada permukaan rongga mulut mausia. Menurut penelitian, *Candida Albicans* terdapat sekitar 30-40%pada rongga mulut orang dewasa sehat, 45% pada neonatus, 45-65% pada anak-anak sehat, 50-65% pada pasien yang memakai gigi tiruan lepasan, 65-88% pada orang yang mengkonsumsi obat jangka panjang, 90% pada pasien leukemia akut yang menjalani kemoterapi, dan 95% pada pasien HIV/AIDS (Akpan *et al*, 2002).

Sebenarnya *Candida albicans* pada rongga mulut individu yang sehat merupakan organisme komensal yang hidup bersama dengan mikrobial flora mulut dalam keadaan seimbang. Tetapi, jika terjadi gangguan pada keseimbangan antara *Candida albicans* dengan anggota mikrobial mulut lainnya, maka organisme ini dapat berproliferasi, berkolonisasi, menginvasi jaringan dan menghasilkan infeksi oportunistik yang dikenal sebagai kandidiasis (Siar *et al*, 2003).

Berbagai faktor dapat menyebabkan terjadinya gangguan keseimbangan antara *Candida albicans* dengan mikroba lainnya, seperti pada keadaan xerostomia, pemakaian gigi palsu, merokok, penyakit sistemik seperti diabetes, kondisi imunosupresif seperti HIV, keganasan seperti leukemia, defisiensi nutrisi, dan pemakaian obat-obatan seperti antibiotik spektrum luas dalam jangka waktu lama, kortikosteroid, dan kemoterapi. Ketidakseimbangan *Candida albicans* inilah yang menimbulkan berbagai infeksi di rongga mulut.Salah satunya adalah kandidiasis oral (Jawetz *et al*, 1996).

Infeksi *Candida albicans* dapat diatasi dengan menggunakan obat antifungi yang bisa didapat dengan atau tanpa resep dokter, antara lain antifungi *polyene*, antifungi *azole, flucytosine,* dan antifungi *echynocandin*. Obat-obatan tersebut mengganggu keutuhan membran ergosterol atau dinding sel jamur yang pada akhirnya mengarah pada kematian *Candida albicans*. Meskipun demikian, masih banyak penduduk Indonesia yang lebih memilih bahan alami untuk mengatasi keluhan kesehatan mereka, meskipun pilihan terapi yang tersedia terbukti efektif (Klepser, 2001).

Indonesia memiliki keanekaragaman hayati yang paling besar di dunia, dengan kurang lebih 140 juta hektar hutan hujan tropis (NAFED, 2006). *The Indonesian Country Study on Biodiversity* (ICSB) (1993) memperkirakan bahwa terdapat 25.000 hingga 30.000 spesies tanaman berbunga di Indonesia, dan banyak diantaranya memiliki nilai medis yang belum dimanfaatkan.

Buah lemon sudah dikenal oleh masyarakat luas dan memiliki banyak manfaat, baik dalam bidang industri maupun kesehatan.Lemon sebagai sumber vitamin C juga banyak digunakan dalam produk minuman.Sudah sejak lama lemon digunakan sebagai salah satu alternatif pengobatan bagi penyakit penyakit tertentu. Ada beberapa alasan penggunaan lemon sebagai obat alternatif, selain karena murah dan mudah didapat karena pertumbuhannya yang terus menerus dan tidak mengenal musim, buah lemon juga banyak memiliki aroma segar yang cukup membuat nyaman pemakainya. Tidak hanya buah lemon, kulit lemon yang merupakan *by product* (produk sampingan dari industri pengolahan buah lemon) juga kaya manfaat dalam bidang medis (Maria *et al*, 2005).

Pada kulit lemon terkandung minyak atsiri disebut juga minyak essensial (*essential oil*) atau minyak yang menguap (*volatile oil*) yang terbentuk di dalam *reticulum endoplasmic* sel tanaman dan diperoleh dari penyulingan dengan uap

atau ekstraksi bagian buah, bunga, kayu, akar, daun dan biji tanaman (Ulfah, 2002). Minyak atsiri diketahui memiliki efek anti bakteri, anti oksidatif dan fungisida. Minyak atsiri terdapat pada bagian luar (pericarp) dari kulit lemon, yang sebagian besar komposisinya terdiri dari *limonene* (90%) dan *citral* (5%) serta*terpinol, linodylα-pinene, camphene, β-pinene, sabinene, myrcene, γ-terpinene,linalool, β-bisabolene, trans-α-bergamotene*dan *geranyl acetate* (Katzer, 2002). Diduga, komponen *limonene* yang terdapat dalam minyak atsiri memiliki efek antifungi yang cukup baik (Chee *et al*, 2009).

Obat antifungi yang ada untuk mengobati infeksi karena *Candida albicans* saat ini mempunyai toksisitas selektif yang rendah, sehingga seringkali mengganggu sel hospes manusia (Dzen dkk, 2003). Baik untuk penggunaan lokal maupun sistemik, obat antifungi sering menimbulkan efek samping berupa pusing, demam, mual, muntah, diare, kerusakan pada kulit, efek toksik pada organ lain, dan kelainan faal darah. Sementara itu, obat dengan toksisitas yang lebih selektif dijual dengan harga yang lebih tinggi dapat membunuh jamur tanpa merusak sel host (Ganiswara, 1995). Oleh karena itu, penulis tertarik untuk melakukan penelitian tentang manfaat kulit lemon yang banyak mengandung terpenoid sebagai anti fungi khususnya terhadap *Candida albicans* sebagai obat antifungi alternatif dengan efektivitas lebih baik.

1.2 Rumusan Masalah

Apakah ekstrak petroleum eterkulit lemon (*Citrus limon L.*) mempunyai efekantifungi terhadap*Candida albicans*secara *in vitro*.

1.3 Tujuan Penelitian

1.3.1 Tujuan Umum

Mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kulit lemon (*Citrus limon L.*) terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*.

1.3.2 Tujuan Khusus

a. Mengetahui kadar hambat minimum (KHM) ekstrak petroleum eter kulit lemon (*Citrus limon L.*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara *in vitro*.
b. Mengetahui kadar bunuh minimum (KBM) ekstrak petroleum eter kulit lemon (*Citrus limon L.*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara *in vitro.*

1.4 Manfaat Penelitian

1.4.1 Manfaat Akademik

a. Hasil dari penelitian ini diharapkan dapat dimanfaatkan sebagai dasar bagi penelitian selanjutnya dalam pengembangan obat antimikotik yang efektif, alamiah, dan murah dari bahan kulit buah lemon.
b. Menambah khazanah ilmu pengetahuan terutama dibidang kedokteran yang berkaitan dengan pemanfaatan kulit lemon (*Citrus limon L*) sebagai antimikotik (anti jamur).

1.4.2 Manfaat Praktis

a. Memberikan alternatif anti jamur untuk pengobatan pasien dengan infeksi *Candida albicans*.
b. Meningkatkan pemanfaatan limbah kulit buah lemon sebagaianti jamur dalam berbagai sediaan seperti obat tetes, obat kumur, obat salep untuk pengoba pasien dengan infeksi *Candida albicans*.

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Candida albicans*

2.1.1 Taksonomi *Candida albicans*

Taksonomi dari *Candida albicans* (Wirantara *et al*, 2008) :

Kingdom : Fungi

Phylum : Ascomycota

Subphylum : Saccharomycotina

Class : Saccharomycetes

Ordo : Saccharomycetales

Family : Saccharomycetaceae

Genus : Candida

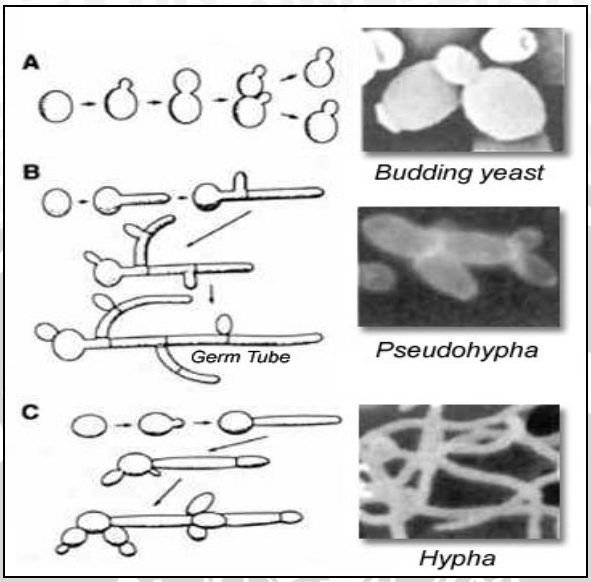
Spesies : *Candida albicans*

2.1.2 Morfologi *Candida albicans*

Candida albicans merupakan jamur dimorfik, yaitu jamur yang mampu tumbuh dalam dua bentuk yang berbeda sebagai sel tunas yang akan berkembang menjadi blastospora dan menghasilkan kecambah yang akan membentuk pseudohifa. Perbedaan bentuk ini tergantung pada faktor eksternal yang mempengaruhinya. Morfologi koloni *Candida albicans* pada medium padat agar *Sabouraud* dekstrosa, umumnya berbentuk bulat dengan permukaan sedikit cembung, halus, licin dan kadang-kadang sedikit berlipat-lipat terutama pada koloni yang telah tua. Koloni *Candida albicans* pada biakan berwarna putih kekuningan dan berbau asam (Geo *et al*, 2004).

Pada medium tertentu, di antaranya agar tepung jagung (*corn-meal agar*), agar tajin (*rice-cream agar*) atau agar dengan 0,1% glukosa terbentuk klamidospora terminal berdinding tebal dalam waktu 24-36 jam. Pada biakan lain dengan menggunakan medium agar eosin metilen biru dengan suasana CO2

tinggi selama 24-48 jam, menunjukkan adanya gambaran yang khas menyerupai kaki laba-laba atau pohon cemara (Geo *et al*, 2004).



Gambar 2.1 .Perubahan Morfologi *Candida albicans* (*Sumber: http://overcomingcandida.com*).

2.1.3 Reproduksi *Candida albicans*

Candida albicans memperbanyak diri dengan membentuk tunas yang akan terus memanjang membentuk hifa semu. Hifa semu terbentuk dengan banyak kelompok blastospora berbentuk bulat atau lonjong di sekitar septum. Pada beberapa *strain*, blastospora berukuran besar, berbentuk bulat atau seperti botol, dalam jumlah sedikit. Sel ini dapat berkembang menjadi klamidospora yang berdinding tebal dan bergaris tengah sekitar 8-12 µ. *Candida albicans* dapat tumbuh pada variasi pH yang luas, tetapi pertumbuhannya akan lebih baik pada pH antara 4,5-6,5. Jamur ini dapat tumbuh dalam perbenihan pada suhu 28^{o}Celcius - 37^{o}Celcius. *Candida albicans* membutuhkan senyawa organik sebagai sumber karbon dan sumber energi untuk pertumbuhan dan proses metabolismenya. Unsur karbon ini dapat diperoleh dari karbohidrat. Jamur ini merupakan organisme anaerob fakultatif yang mampu melakukan metabolisme

sel, baik dalam suasana anaerob maupun aerob. Proses peragian (fermentasi) pada *Candida albicans* dilakukan dalam suasana aerob dan anaerob. Karbohidrat yang tersedia dalam larutan dapat dimanfaatkan untuk melakukan metabolisme sel dengan cara mengubah karbohidrat menjadi CO_2 dan H_2O dalam suasana aerob (Tjampakasari, 2006).

Sedangkan dalam suasana anaerob hasil fermentasi berupa asam laktat atau etanol dan CO_2. Proses akhir fermentasi anaerob menghasilkan persediaan bahan bakar yang diperlukan untuk proses oksidasi dan pernafasan. Pada proses asimilasi, karbohidrat dipakai oleh *Candida albicans* sebagai sumber karbon maupun sumber energi untuk melakukan pertumbuhan sel. *Candida albicans* dapat dibedakan dari spesies lain berdasarkan kemampuannya melakukan proses fermentasi dan asimilasi. Pada kedua proses ini dibutuhkan karbohidrat sebagai sumber karbon. Pada proses fermentasi, jamur ini menunjukkan hasil terbentuknya gas dan asam pada glukosa dan maltosa, terbentuknya asam pada sukrosa dan tidak terbentuknya asam dan gas pada laktosa. Pada proses asimilasi menunjukkan adanya pertumbuhan pada glukosa, maltosa dan sukrosa namun tidak menunjukkan pertumbuhan pada laktosa (Tjampakasari, 2006).

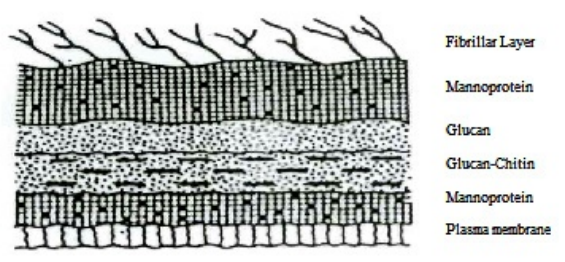
2.1.4 Struktur Fisik *Candida albicans*

Dinding sel *Candida albicans* berfungsi sebagai pelindung sekaligus sebagai target dari beberapa zat antifungi. Dinding sel juga turut berperan dalam proses penempelan dan kolonisasi sertabersifat antigenik (Segal, 1994). Fungsi utama dinding sel adalahmemberi bentuk bagi sel ragi sekaligus melindungi sel ragi dari lingkungannya (van Rij *et al*, 1984).

Candida albicans mempunyai struktur dinding sel yang kompleks dengan tebal antara 100 nmhingga 400 nm. Komposisi primernya terdiri dari glukan (47-

60% dari seluruh berat kering dinding sel), manan dan protein (15,2-30% dari seluruh berat kering dinding sel), serta khitin (0,6-9% dari seluruh berat kering dinding sel). Dalam bentuk ragi, kecambah, dan miselium, komponen-komponen ini menunjukkan proporsi yang serupa. Meskipun demikian, bentuk miselium memiliki khitin tiga kali lebih banyak dibandingkan dengan bentuk sel ragi (Segal, 1994).

Dinding sel *Candida albicans* ternyata berlapis-lapis. Segal (1994) mengemukakan bahwa dinding sel *Candida albicans* sebenarnya terdiri dari lima lapisan yang berbeda



Gambar 2.2 Skema Dinding Sel Candida albicans
(Library of Congress Cataloging in Publication Data,1994)

Seperti pada sel eukariotik lain, membran sel *Candida albicans* terdiri dari lapisan fosfolipid ganda. Membran protein inimemiliki aktifitas enzim seperti manan sintase, khitin sintase, glukan sintase, ATPase dan protein yang mentranspor fosfat. Keberadaan membran sterol pada dinding sel memegang peranan penting karena sterol merupakan target zat antifungi dan kemungkinan merupakan lokasi kerja enzim-enzim yang berperan dalam sintesis dinding sel (Roberts *et al.*, 1996). Mitokondria pada *Candida albicans* merupakan pembangkit daya sel. Organel ini memproduksi ATP dengan menggunakan energi yang diperoleh dari penggabungan oksigen dengan molekul-molekul makanan (Tjampakasari, 2006).

Seperti halnya pada eukariot lain, nukleus *Candida albicans* merupakan organel paling menonjol. Organel ini dipisahkan dari sitoplasma oleh dua lapis membran. Nukleus menyimpan semua DNA kromosom yang terkemas dalam serat-serat kromatin. Bagian dalam nukleus berhubungan dengan sitosol melalui pori-pori nukleus (Roberts *et al.*, 1996). Vakuola berperan dalam sistem pencernaan sel sebagai tempat penyimpanan lipid dan granula polifosfat. Mikrotubulus dan mikrofilamen terdapat didalam sitoplasma. Pada *Candida albicans,* mikrofilamen berperan penting dalam terbentuknya perpanjangan hifa (Roberts *et al.*, 1996).

2.1.5 Struktur Genetik *Candida Albicans*

Candida albicans memiliki genomdiploid. Ukuran kromosom *Candida albicans* diperkirakan berkisar antara 0,95-5,7 Mbp (Segal, 1994). Galur *Candida* albicans dapat dibedakan dengan beberapa metode yang menggunakan *Alternating Field Gel Electrophoresis*. Perbedaan Galur ini dapat dilihat dari pola pita yang dihasilkan dan metode yang digunakan. Galur yang sama memiliki pola pita kromosom yang sama berdasarkan jumlah dan ukurannya (Tjampakasari, 2006).

Sebanyak 17 galur isolat *Candida albicans* dari kasus kandidiasis telah dipelajari dan dikelompokkan menjadi 6 tipe dengan metode elektroforesis. Variasi dalam jumlah kromosom kemungkinan besar merupakan hasil penyusunan ulang kromosom (*chromosome rearrangement*) yang dapat terjadi akibat delesi, adisi atau variasi dari pasangan yang homolog. Peristiwa ini merupakan hal yang sering terjadi dan merupakan bagian dari daur hidup normal berbagai macam organisme. Hal ini juga seringkali menjadi dasar perubahan sifat fisiologis, serologis maupun virulensi (Segal, 1994).

Pada *Candida albicans*, frekuensi terjadinya variasi morfologi koloni dilaporkan sekitar 10^{-2} hingga 10^{-4}. Frekuensi ini meningkat oleh mutagenesis

akibat penyinaran UV dosis rendah yang dapat membunuh kurang dari 10% populasi. Terjadinya mutasi dapat dikaitkan dengan perubahan fenotip, berupa perubahan morfologi koloni menjadi putih halus, gelap halus, berbentuk bintang, lingkaran, berkerut tidak beraturan, berbentuk seperti topi, berbulu, berbentuk seperti roda, berkerut dan bertekstur lunak (Segal, 1994).

2.2 Kandidiasis

2.2.1 Definisi

Kandidiasis adalah suatu penyakit infeksi pada kulit dan mukosa yang disebabkan oleh jamur kandida. Kandida adalah suatu spesies yang paling umum ditemukan di rongga mulut dan merupakan flora normal. Telah dilaporkan spesies kandida mencapai 30 – 40 % dari seluruh populasi mikroorganisme rongga mulut (Akpan,2002).

Terdapat lima spesies Candida yaitu Candida albicans, Candida tropikalis, Candida glabrata, Candida krusei dan Candida parapsilosis. Dari kelima spesies Candida tersebut Candida albicans merupakan spesies yang paling umum menyebabakan infeksi di rongga mulut (Nolte,1982).

2.2.2 Patogenesis dan Temuan Patologis

Mekanisme pertahanan tubuh pada integumen yang *intact* merupakan perlawanan terhadap infeksi Kandidiasis. Beberapa hal yang memicu maserasi pada kulit akan menyebabkan munculnya tempat potensial untuk invasi *Candida* bahkan pada individu yang sehat. Beberapa tahun ini dikemukakan peran dari sel dendritik untuk mempertahankan integritas kulit dan mukosa. Apabila *Candida* menginvasi dermis atau masuk ke dalam aliran darah, maka sel leukosit polimorfonuklear (sel PMN) berperan penting pada pertahanan tubuh karena sel PMN memiliki kapasitas untuk merusak pseudohifa, untuk memfagositosis dan membunuh blastospora. Berdasarkan penelitian, enzim mieloperoksidase, hydrogen peroksida, dan anion superoksida merupakan mekanisme utama

dalam membunuh *Candida albicans* secara intraseluler. Disamping itu, neutrofil, monosit dan eusinofil juga memiliki fungsi fagositosis seperti sel dendritik. Akan tetapi, neutrofil dan monosit hanya sedikit memiliki mieloperoksidase, dimana hal ini menentukan kapasitas untuk membentuk hydrogen peroksida dan anion superoksida untuk membunuh *Candida albicans* dengan efektif. Sel-sel lain seperti sel endothelial dan sel epitel juga dapat menelan organism pada percobaan in vivo, namun tidak memiliki efek membunuh secara langsung. Platelet juga memiliki aktifitas anti-*Candida*, dimana *platelet-derived factor* menstimulasi produksi *germ tube* dan *Candida cell wall fractions agglutinate platelets* (Neville, 2009).

Pada bentuk manifestasi serius dari infeksi candida, organisme ini menyebar secara hematogen, membentuk mikro dan makroabses pada organ-organ utama dalam tubuh. Meskipun mekanisme pasti belum diketahui, namun kemungkinan besar Candida masuk ke aliran darah dari permukaan mukosa setelah berkembang dalam jumlah yang besar akibat penggunaan antibiotika. Perubahan bentuk dari blastospora menjadi pseudohifa dan hifa mengakibatkan candida dapat berpenetrasi ke jaringan dan menyebabkan manifestasi klinis (Neville, 2009).

2.2.3 Kandidiasis Oral

2.2.3.1 Definisi, Etiologi, Epidemiologi Kandidiasis Oral

Kandidiasis oral merupakan salah satu penyakit pada rongga mulut berupa lesi merah dan lesi putih yang disebabkan oleh jamur jenis *Candida sp*, dimana *Candida albicans* merupakan jenis jamur yang menjadi penyebab utama. Kandidiasis oral pertama kali dikenalkan oleh Hipocrates pada tahun 377 SM, yang melaporkan adanya lesi oral yang kemungkinan disebabkan oleh genus Kandida. Terdapat 150 jenis jamur dalam famili *Deutromycetes*, dan tujuh diantaranya (*Candida albicans, Candida tropicalis, Candida parapsilosi, Candida*

krusei, Candida kefyr, Candida glabrata, dan Candida guilliermondii) dapat menjadi patogen, dan *Candida albicans* merupakan jamur terbanyak yang terisolasi dari tubuh manusia sebagai flora normal dan penyebab infeksi oportunistik (Cannon,1995). Terdapat sekitar 30-40% Candida albicans pada rongga mulut orang dewasa sehat, 45% pada neonatus, 45-65% pada anak-anak sehat, 50-65% pada pasien yang memakai gigi palsu lepasan, 65-88% pada orang yang mengkonsumsi obat-obatan jangka panjang, 90% pada pasien leukemia akut yang menjalani kemoterapi, dan 95% pada pasien HIV/AIDS (Akpan, 2002).

Kandidiasis oral dapat menyerang semua umur, baik pria maupun wanita. Meningkatnya prevalensi infeksi Kandida albikan ini dihubungkan dengan kelompok penderita HIV/AIDS, penderita yang menjalani transplantasi dan kemoterapi maligna. Odds dkk (1990) dalam penelitiannya mengemukakan bahwa dari 6.545 penderita HIV/AIDS, sekitar 44.8% adalah penderita kandidiasis (Monica, 2005).

2.2.3.2 Klasifikasi dan Gejala Klinis

Gambaran klinis kandidiasis oral tergantung pada keterlibatan lingkungan dan interaksi organisme dengan jaringan pada *host*. Adapun kandidiasis oral dikelompokkan atas tiga, yaitu :

1. Akut, dibedakan menjadi dua jenis, yaitu :

a. Kandidiasis Pseudomembranosus Akut

Kandidiasis pseudomembranosus akut yang disebut juga sebagai *thrush*, pertama sekali dijelaskan kandidiasis ini tampak sebagai plak mukosa yang putih, difus, bergumpal atau seperti beludru, terdiri dari sel epitel deskuamasi, fibrin, dan hifa jamur, dapat dihapus meninggalkan permukaan merah dan kasar (Akpan, 2002). Pada umumnya dijumpai pada mukosa pipi, lidah, dan palatum lunak. Penderita kandidiasis ini dapat mengeluhkan rasa terbakar pada mulut

(Allen, 1992). Kandidiasis seperti ini sering diderita oleh pasien dengan sistem imun rendah, seperti HIV/AIDS, pada pasien yang mengkonsumsi kortikosteroid, dan menerima kemoterapi (Ohio, 2005). Diagnosa dapat ditentukan dengan pemeriksaan klinis, kultur jamur, atau pemeriksaan mikroskopis secara langsung dari kerokan jaringan (Langlais, 2005).

Gambar 2.3 Kandidiasis Pseudomembranosus Akut (Neville, 2009).

b. Kandidiasis Atropik Akut

Kandidiasis jenis ini membuat daerah permukaan mukosa oral mengelupas dan tampak sebagai bercak-bercak merah difus yang rata. Infeksi ini terjadi karena pemakaian antibiotik spektrum luas, terutama Tetrasiklin, yang mana obat tersebut dapat mengganggu keseimbangan ekosistem oral antara *Lactobacillus acidophilus* dan Kandida albikan. Antibiotik yang dikonsumsi oleh pasien mengurangi populasi *Lactobacillus* dan memungkinkan Kandida tumbuh subur. Pasien yang menderita Kandidiasis ini akan mengeluhkan sakit seperti terbakar (Langlais, 2005).

Gambar 2.4 Kandidiasis Atropik Akut (Neville, 2009).

2. Kronik, dibedakan menjadi tiga jenis, yaitu :

a. Kandidiasis Atropik Kronik

Disebut juga "*denture stomatitis*" atau "alergi gigi tiruan". Mukosa palatum maupun mandibula yang tertutup basis gigi tiruan akan menjadi merah, kondisi ini dikategorikan sebagai bentuk dari infeksi Kandida. Kandidiasis ini hampir 60% diderita oleh pemakai gigi tiruan terutama pada wanita tua yang sering memakai gigi tiruan selagi tidur (Langlais, 2005).

Gambar 2.5 Kandidiasis Atropik Kronik (Neville, 2009).

b. Kandidiasis Hiperplastik Kronik

Infeksi jamur timbul pada mukosa bukal atau tepi lateral lidah berupa bintik-bintik putih yang tepinya menimbul tegas dengan beberapa daerah merah. Kondisi ini dapat berkembang menjadi displasia berat atau keganasan, dan

kadang disebut sebagai Kandida leukoplakia. Bintik-bintik putih tersebut tidak dapat dihapus, sehingga diagnosa harus ditentukan dengan biopsi. Kandidiasis ini paling sering diderita oleh perokok (Grrenberg, 2003).

Gambar 2.6 Kandidiasis Hiperplastik Kronik (Neville, 2009).

c. Median Rhomboid Glositis

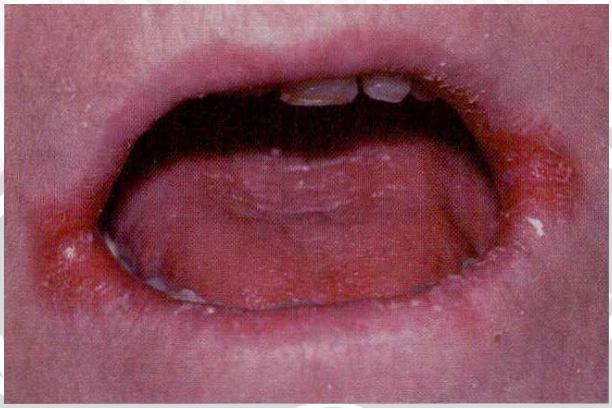
Median Rhomboid Glositis adalah daerah simetris kronis di anterior lidah ke papila sirkumvalata, tepatnya terletak pada duapertiga anterior dan sepertiga posterior lidah. Gejala penyakit ini asimptomatis dengan daerah tidak berpapila (Grrenberg, 2003).

Gambar 2.7 Median Rhomboid Glositis (Neville, 2009).

3. Keilitis Angularis

Keilitis angularis merupakan infeksi Kandida albikan pada sudut mulut, dapat bilateral maupun unilateral. Sudut mulut yang terkena infeksi tampak

merah dan pecah-pecah, dan terasa sakit ketika membuka mulut. Keilitis angularis ini dapat terjadi pada penderita defisiensi vitamin B12 dan anemia defisiensi besi (Samaranayake, 2006).



Gambar 2.8 Keilitis Angularis (Neville, 2009).

2.2.4 Penatalaksanaan

Pada pasien yang kesehatan tubuhnya normal, seperti perokok dan pemakai gigi tiruan, perawatan kandidiasis oral relatif mudah dan efektif, namun pasien yang mengkonsumsi antibiotik jangka panjang, dan pasien dengan sistem imun tubuh rendah yang mendapat perawatan kemoterapi dimana infeksi jamur mau tidak mau akan timbul, maka perawatan kandidiasisnya lebih spesifik. Adapun perawatan kandidiasis oral yaitu dengan menjaga kebersihan rongga mulut, memberi obat-obatan antifungal baik lokal maupun sistemik, dan berusaha menanggulangi faktor predisposisi, sehingga infeksi jamur dapat dikurangi (Ohio, 2005).

Kebersihan mulut dapat dijaga dengan menyikat gigi maupun menyikat daerah bukal dan lidah dengan sikat lembut. Pada pasien yang memakai gigi tiruan, gigi tiruan harus direndam dalam larutan pembersih seperti Klorheksidin, hal ini lebih efektif dibanding dengan hanya meyikat gigi tiruan, karena permukaan gigi tiruan yang tidak rata dan poreus menyebabkan Kandida mudah

melekat, dan jika hanya menyikat gigi tiruan tidak dapat menghilangkannya (Akpan, 2002).

Pemberian obat-obatan antifungal juga efektif dalam mengobati infeksi jamur.Terdapat dua jenis obat antifungal, yaitu pemberian obat antifungal secara topikal dan sistemik. Pengobatan antifungal topikal pada awal abad 20 yaitu dengan menggunakan gentian violet, namun karena perkembangan resisten dan adanya efek samping seperti meninggalkan stain pada mukosa oral, sehingga obat itu diganti dengan *Nystatin* yang ditemukan pada tahun 1951 dan *Amphotericin B* pada tahun 1956. Obat-obat tersebut bekerja dengan mengikat sterol pada membran sel jamur, dan mengubah permeabilitas membran sel. *Nystatin* merupakan obat antifungal yang paling banyak digunakan. Obat antifungal sistemik digunakan pada pasien yang tidak mempan terhadap obat antifungal topikal dan pada pasien dengan resiko tinggi menderita infeksi sistemik (Zunt, 2000).

Selain menjaga kebersihan rongga mulut dan memberi obat-obatan antifungal pada pasien, faktor predisposisi juga harus ditanggulangi. Penanggulangan faktor predisposisi meliputi pembersihan dan penyikatan gigi tiruan secara rutin dengan menggunakan cairan pembersih, seperti Klorheksidin, mengurangi rokok dan konsumsi karbohidrat, mengunyah permen karet bebas gula untuk merangsang pengeluaran saliva, menunda pemberian antibiotik dan kortikosteroid, menangani penyakit yang dapat memicu kemunculan kandidiasis seperti penanggulangan penyakit diabetes, HIV, dan leukemia (Samaranayake, 2006).

2.3 Lemon (*Citrus limon* L.)

2.3.1 Lemon (*Citrus limon* L.)

Buah lemon (Citrus limon L.) merupakan jaringan reproduktif yang mengelilingi biji angiosperma dari pohon lemon. Buah lemon digunakan untuk

tujuan kuliner dan non kuliner di seluruh dunia. Sari buah lemon mengandung 5% (kurang lebih 0,03 mol/Liter) *citric acid* , sehingga memberi lemon rasa kecut, dan memiliki pH 2 hingga 3 (Morton, 1987).

Berikut ini adalah taksonomi dari lemon

Kerajaan : Plantae

Divisio : Spermatophyta

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Geraniales

Familia : Rutaceae

Genus : Citrus

Spesies : Citrus limon L. Burm. F

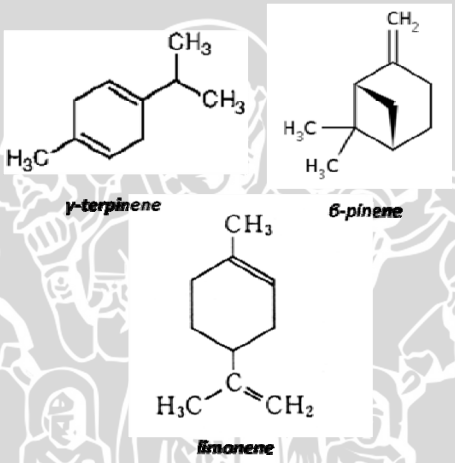
Gambar 2.9 : Buah Lemon (*Citrus limon* L.) (Herbal, 2006).

2.3.2 Kandungan Kulit Buah Lemon (*Citrus limon* L.)

Kulit lemon terdiri dari dua lapisan. Lapisan luar (pericarp) mengandung essensial oil 6%, yang sebagian besar tersusun dari *limonene* 90% dan *citral* 5% ditambah dengan sedikit *terpinol, linodyl dan geranyl acetate*. Lapisan dalam (*mucocarp*) tidak mengandung *essensial oil* tapi mengandung variasi dari flavones glycolides, *carisenoid, pectin*serta derivate dari *coumarine* (Katzer, 2002).

Mengenai komponen komponen kimia utama dari kulit buah lemon adalah *β-pinene , limonene, γ terpinene , α-pinene, camphene, sabinene, myrcene, α-terpinene, linalool, β-bisabolene, trans-α-bergamotene, nerol,* dan *neral.* Dari seluruh komponen kimia yang terdapat pada kulit buah lemon, yang diduga berfungsi sebagai antifungi adalah *limonene* yang termasuk dalam kelas terpenoid (Maria *et al*, 2005).

Tidak hanya itu, kulit lemon juga mengandung berbagai zat gizi antara lain kalsium, fosfor, potassium, asam askorbat dan vitamin A yang sangat berguna untuk kesehatan tubuh (Herbal, 2006).



Gambar 2.10 Struktur Kimia Golongan Terpenoid (Sumber: http://chemed.chem.purdue.edu/genchem/topicreview/bp/1organic/hydro.html)

2.3.3 Manfaat Kulit Buah Lemon (*Citrus limon* L.)

Kulit lemon adalah bagian dari *Citrus limon, nama ilmiah lemon. Kebanyakan orang membuang kulit lemon dan hanya memakan bagian dari daging buah lemon saja. Meskipun kulit lemon tidak selezat buahnya, namun kulit lemon mengandung banyak manfaat terutama dalam bidang medis.* Di Afrika, kulit lemon digunakan sebagai obat penyakit usus besar, dan di India kulit lemon digunakan untuk mengobati penyakit gastritis. Berdasarkan penelitian *British Pharmacopoeia, kulit lemon juga dapat dimanfaatkan sebagai aroma*

terapi yang dapat mengobati insomnia. Studi terbaru mengenai penemuan monoterpene pada kulit lemon yang disebut limonene menunjukkan bahwa zat tersebut sangat berguna untuk mengatasi pertumbuhan abnormal pada kulit, meningkatkan pembentukan sel darah putih, dan sebagai antibakteri. Berdasarkan penelitian terbaru, kandungan limonene juga dapat digunakan untuk membantu menurunkan kejadian *squamous cell carcinoma* pada kulit, meskipun masih diperlukan study lebih lanjut untuk membuktikannya (Herbal, 2006).

Kulit lemon yang juga kaya kandungan sitrat diketahui dapat mencegah penggumpalan kalsium sehingga dapat mencegah terjadinya arteriosklerosis. Selain itu juga berlimpah kandungan serat berupa pectin yang baik untuk menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida (Rahman, 2005).

2.4 Terpenoid

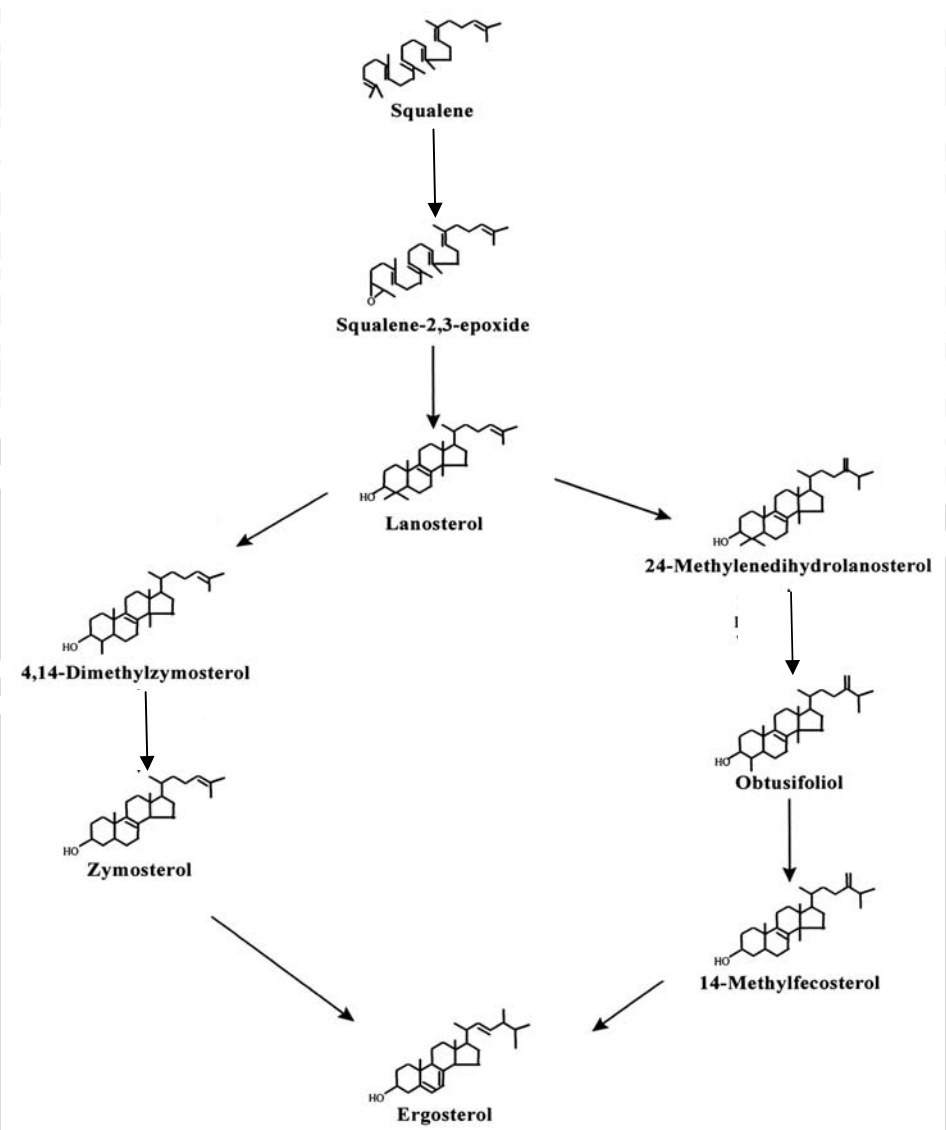
Terpenoid merupakan suatu golongan hidrokarbon yang banyak dihasilkan oleh tumbuhan dan terutama terkandung pada getah dan vakuolaselnya. Pada tumbuhan, senyawa-senyawa golongan terpena dan modifikasinya, terpenoid, merupakan metabolit sekunder. Terpenoid dihasilkan pula oleh sejumlah hewan, terutama serangga dan beberapa hewan laut. Di samping sebagai metabolit sekunder, terpenoid merupakan kerangka penyusun sejumlah senyawa penting bagi makhluk hidup. Sebagai contoh, senyawa-senyawa steroid adalah turunan skualena, juga karoten dan retinol (Rahman, 2005).

Terpenoid memainkan peran yang sangat penting dalam kehidupan hewan dan tumbuhan. Untuk tanaman sangat berguna dalam berbagai proses termasuk respirasi, fotosintesis, pertumbuhan, perkembangan, dan adaptasi lingkungan. Dewasa ini terpenoid menjadi molekul yang sangat penting dalam dunia agrikultur dan medis. Terpenoid menjadi nutrisi penting untuk makanan, sebagai agen kemoterapi untuk pengobatan tumor, sebagai antibakteri, antifungi, anti inflamasi, anti tuberculosis, dan anti HIV.

Sedang penggunaan pada bidang agrikultur mencakup sebagai substansi dasar untuk insectisida (Ethan, 2001).

Terpenoid disebut juga isoprenoid. Hal ini dapat dimengerti karena kerangka penyusun terpenoid adalah isoprena (C_5H_8). Terpenoid memiliki rumus dasar $(C_5H_8)_n$, dengan n merupakan penentu kelompok tipe terpenoid. Modifikasi terpenoid adalah senyawa dengan struktur serupa tetapi tidak dapat dinyatakan dengan rumus dasar (Rahman, 2005).

Terpenoid dikenal sebagai komponen obat herbal tradisional serta memiliki efek antifungi, antibacterial, antineoplastik serta fungsi farmasi lainnya. Mekanisme kerja terpenoid sebagai antifungi belum sepenuhnya dipahami. Tetapi beberapa penelitian menemukan adanya efek toksik terpenoid terhadap struktur dan fungsi membrane. Terpenoid diketahui mampu menghambat sintesa ergosterol yang terjadi pada membrane sel. Dimana ergosterol merupakan komponen penting dalam membrane sel. Bagian lipofilik pada terpenoid berpartisipasi ke dalam struktur dan fungsi membran sehingga menyebabkan perubahan fluiditas membrane, mengubah lingkungan lipid protein membrane, melisiskan membrane sel, dan mengganggu aktivitas enzimatik membrane yang dapat menghambat pembentukan dinding sel (niescier, 2000; Daisy *et al*, 2008; Choi *et al*, 2008) .



Gambar 2.11Jalur Biosintesis Ergosterol (Ghannoum dan Rice, 1999)

2.5 Obat Antifungi

Obat antifungi merupakan obat yang digunakan untuk mengobati infeksi akibat jamur. Antifungi dapat dikelompokkan menjadi tiga kelas berdasarkan sasaran aksinya, yaitu antifungi azole yang menginhibisi sintesis ergosterol (sterol utama jamur); polyene yang berinteraksi secara fisikokimia denganmembran sterol jamur; serta 5-fluorocytocine, yang menginhibisi sintesis makromolekul (Ghannoum *and* Rice, 1999).

2.5.1 Mekanisme Aksi Antifungi

Berikut ini dijelaskan beberapa mekanisme aksi dari beberapa pilihan antifungi, yaitu antifungi yang mempengaruhi sterol jamur, dinding jamur, dan asam nukleat jamur.

2.5.1.1 Antifungi yang Mempengaruhi Sterol Jamur

Dalam pemanfaatan klinis, antifungi yang mempengaruhi sterol jamur dibagi menjadi tiga kelompok utama. Kelompok tersebut adalah : azole, polyene, dan allylamine/thiocarbamate. Seluruh aktivitas antifungi obat tersebut dikarenakan oleh inhibisi sintesis atau interaksi langsung dengan ergosterol, yang merupakan komponen utama membran sel jamur (Parks *and* Casey, 1996).

2.5.1.1.1 Azole

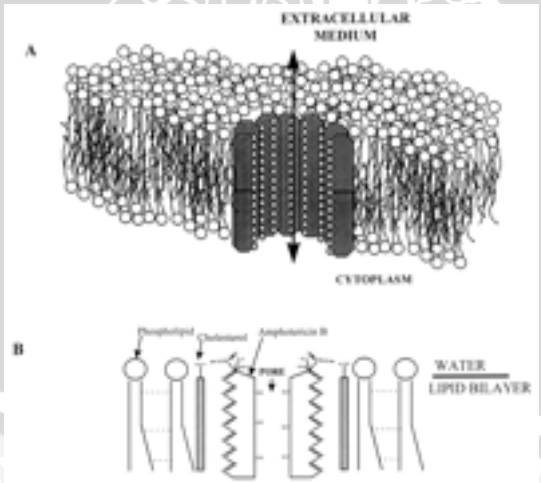
Laporan pertama mengenai aktifitas antifungi golongan azole diterbitkan pada akhir era 60-an (Holt, 1980; Seehan *et al.*, 1999). Komponen asli golongan ini, seperti miconazole dan econazole, beserta dengan komponen-komponen yang belakangan ditemukan, seperti ketoconazole, fluconazole, dan itraconazole, terbukti efektif untuk melawan infeksi jamur pada manusia. Diantara golongan azole, fluconazole merupakan obat yang banyak digunakan, terutama karena keamanan dan *efficacy* klinisnya (Hata *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1995; Perfect *and* Schell, 1995; Fothergill *et al.* 1996; Itoh *et al.* 1996; Law *and* Denning, 1996).

2.5.1.1.2 Polyene

Kerentanan suatu sel terhadap polyene seperti amphotericin B tergantung pada keberadaan sterol dalam membran plasma sel. Hal ini diperkuat fakta bahwa semua organisme yang rentan terhadap polyene seperti ragi, algae, dan protozoa memiliki sterol dalam membran luarnya, sementara organisme yang resisten tidak (Norman *et al.*, 1972). Pentingnya sterol membran bagi aktivitas

polyene juga didukung oleh studi-studi sebelumnya, yang menunjukkan bahwa jamur dapat dilindungi dari efek aksi inhibsi polyene tertentu dengan cara menambahkan sterol dalam medium pertumbuhan (Gottleib *et al.*, 1958; Lampen *et al.*, 1960; Zygmunt *and* Tavormina, 1966). Efek ini dipercaya merupakan hasil interaksi fisiokimia antara sterol dengan polyene, sehingga obat tidak dapat berikatan dengan sterol seluler.

Mekanisme polyene yang lebih besar seperti amphotericin B diduga merupakan hasil interaksi antara obat antifungi dengan sterol membran yang menimbulkan pori-pori *aqueous* yang terdiri dari sebuah cincin yang tersusun dari delapan molekul amphotericin B yang terikat secara hidrofobik pada membran sterol (de Kruijff *and* Demel, 1974; Holz, 1974). Konfigurasi ini mengubah permeabilitas membran sehingga terjadi kebocoran komponen sitoplasmik yang mengarah pada kematian organisme (Kerridge, 1980; Kerridge *et al.*, 1985). Selain itu, kematian *Candida albicans* juga dapat disebabkan oleh kerusakan oksidatif yang disebabkan oleh polyene (Titsworth *and* Grunberg, 1973; Graybill *et al.*, 1997).



Gambar 2.12 Representasi Skematik Interaksi Antara Amphotericin B dan Kolesterol Dalam Phospolipid Bilayer. (A) Pori yerbentuk oleh gabungan dua sumuran (B) Orientasi molekuler dalam pori pada kolesterol akibat amphotericin B. (Defever *et al.*, 1982)

2.5.1.1.3 Allylamine

Sebuah studi yang dilakukan oleh Ryder dan Favre (1997) menunjukkan bahwa target kerja allylamine adalah squalene epoxidase. Kematian sel jamur terjadi terutama karena akumulasi squalene, bukan karena defisiensi ergosterol. Dalam kadar tinggi, squalene dapat meningkatkan permeabilitas membran yang mengganggu keseluruhan organisasi seluler.

2.5.1.2Antifungi yang Aktif Terhadap Dinding Sel Jamur

Antifungi yang aktif terhadap dinding sel jamur bekerja dengan cara menginhibisi sintesis glucan. Dari tiga golongan antifungi yang bekerja secara spesifik sebagai inhibitor 3β-glucan synthase (aculeacin, echinocandin, dan papulacandin), hanya echinocandin yang terus diteliti secara klinis untuk mengevaluasi keamanan, tolerabilitas, dan *efficacy*nya melawan kandidiasis (Ghannoum *and* Rice, 1999).

Inhibitor β-glucan bekerja sebagai inhibitor nonkompetitif spesifik teradap β-(1,3)-glucan synthase. Akibatnya, pembentukan komponen glukan struktural menjadi terhambat. Meskipun demikian, sintesis asam nukleat dan mannan tetap berjalan. Inhibisi ini memiliki efek sekunder terhadap sel intak, seperti pengurangan kadar ergosterol dan lanosterol serta peningkatan kadar chitin di dinding sel. Hal ini mengakibatkan perubahan jamur setara sitologis dan ultrastruktural, dan lisis akan terestriksi, terutama di ujung-ujung tunas sel yang tumbuh (Ghannoum *and* Rice, 1999).

2.5.1.3 Antifungi yang Menghinhibisi Asam Nukleat

Antifungi yang menginhibisi asam nukleat seperti 5-fluorocytosine (5FC) memasuki sel dengan bantuan enzim permease. Begitu 5FC berhasil memasuki sel, antifungi ini akan dikonversi oleh enzim cytosine deaminase menjadi 5-flurouracil (5FU). Selanjutnya, 5FU akan dikonversi menjdi 5-fluorouridylic acid (FUMP) oleh UMP. FUMP akan difosforilasi lebih lanjut dan bergabung dengan

RNA. Pada akhirnya, hal ini akan mengganggu sintesis protein sel jamur (Polak *and* Scholer, 1975). 5FU juga dikonversi menjadi 5-flurodeoxyuridine monophosphate yang merupakan inhibitor thymidylate synthase poten.

Enzim tersebut terlibat dalam sintesis DNA dan pembelahan inti sel (Diasio *et al.*, 1978). Dengan demikian, 5FC bekerja dengan cara menghambat metabolisme pirimidin sekaligus sintesis RNA, DNA, dan protein di sel jamur.

2.5.2 Resistensi terhadap Antifungi

Resistensi terhadap antifungi dapat terjadi melalui berbagai mekanisme. Mekanisme ini antara lain meliputi perubahan target obat, perubahan biosintesis sterol, pengurangan konsentrasi enzim target intraseluler, dan overekspresi target obat antifungi (Ghannoum *and* Rice, 1999).

2.5.2.1. Antifungi yang Mempengaruhi Sterol Jamur

Berikut ini dijelaskan mekanisme resistensi terhadap antifungi yang mempengaruhi sterol jamur.

2.5.2.1.1 Resistensi terhadap Azole

Masih belum ada laporan mengenai modifikasi azole sebagai dasar mekanisme resistensi. Strain yang resisten terhadap azole menunjukkan adanya modifikasi kualitas dan kuantitas enzim target, mengurangan akses menuju target, atau kombinasi dari mekanisme-mekanisme ini (Ghannoum *and* Rice, 1999).

2.5.2.1.2 Resistensi terhadap Polyene

Meskipun sudah digunakan secara klinis selama lebih dari 30 tahun, resistansi terhadap antifungi polyene seperti amphotericin B dan nystatin jarang dilaporkan. Apabila ada, isolat yang umumnya resisten biasanya merupakan spesies-spesies *Candida* yang jarang dijumpai, seperti *Candida lusitaniae, Candida glabrata,* dan *Candida guilliermondii* (Martins *and* Rex, 1996). Fryberg (1974) memperkirakan bahwa perkembangan resistensi terhadap polyene terjadi

melalui seleksi alam oleh sel-sel yang secara alami telah resisten terhadap polyene. Sel-sel tersebut memproduksi sterol yang dimodifikasi sehingga memiliki afinitas lebih rendah terhadap antifungi polyene.

2.5.2.1.3 Resistensi terhadap Allylamine

Meskipun allylamine seperti terbinafine terkadang gagal menyembuhkan infeksi jamur, resistensi jamur patogen manusia terhadap allylamine masih belum dilaporkan. Meskipun demikian, peningkatan frekuensi penggunaan allylamine kemungkinan dapat memicu resistensi, karena Vanden Bossche *et al.* (1992) telah melaporkan bahwa satu strain *Candida glabrata* yang resisten terhadap fluconazole mengekspresikan *cross-resistance* terhadap terbinafine.

2.5.2.2 Antifungi yang Aktif terhadap Dinding Sel Jamur

Karena inhibitor sintesis glukan belum dimanfaatkan dalam praktek klinis, data mengenai adanya resistensi terhadap antifungi ini hanya didapat dari penelitian laboratorium (Kurtz, 1997; Kurtz *and* Douglas, 1997).

2.5.2.3 Antifungi yang Menghinhibisi Asam Nukleat

Resistensi 5-fluorocytosine dapat terjadi melalui penurunan *uptake* (hilangnya aktivitas permease) atau melalui hilangnya aktivitas enzimatik yang bertanggung jawab untuk mengonversi 5-fluorocytosine menjadi 5-florouridylic acid. Meskipun resistensi karena penurunan uptake 5FC telah dijumpai pada *S. cerevisiae* dan *C. glabrata*, mekanisme ini masih belum dijumpai pada *Candida albicans* atau *Cryptococcus neoformans* (Jund *and* Lacroute, 1970; Whelan, 1987).

2.6 Uji Kepekaan Terhadap Antifungi Secara*In Vitro*

Menurut Murray *et al.* (1999), teknik bakteriologi dasar untuk uji kepekaan terhadap antimikroba secara *in vitro* dapat digunakan untuk uji kepekaan terhadap antifungi di dalam laboratorium. Meskipun demikian, terdapat beberapa hal yang harus disesuaikan, yaitu:

a. Media yang dapat digunakan untuk *Candida albicans* adalah media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) *plate* atau *Sabouraud Dextrose Broth.*

b. Inkubasi membutuhkan suhu 35^{o}C dan waktu 24-48 jam karena fungi butuh waktu yang lebih lama untuk memperbanyak diri.

c. Pemeriksaan langsung spesimen klinik untuk *Candida albicans* menunjukkan bentukan *yeast* berdiameter 3-4 µm atau *pseudohyphae* berdiameter 5-10 µm. Bentukan hifa yang melengkung dan pendek biasanya didapati bersama sel yeast bulat yang mengumpul dalam kelompok-kelompok kecil.

d. Spektrofotometer diatur menggunakan λ = 530 nm agar sama dengan kekeruhan standar McFarland 0,5 ($1x10^6$ hingga $5x10^6$ CFU/ml)

e. Konsentrasi jamur untuk uji antifungi adalah $0,5x10^4$ hingga $2,5x10^4$ CFU/ml

Uji kepekaan terhadap antimikroba secara *in vitro* dapat dilakukan dengan beberapa metode, yaitu metode dilusi tabung, metode dilusi agar, dan metode difusi cakram (Dzen dkk., 2003).

2.6.1 Metode Dilusi Tabung

Tes ini dikerjakan dengan menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu bakteri yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Selanjutnya, seri tabung diinkubasikan pada suhu 37^{o}C selama 24-48 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri) adalah KHM (Kadar Hambat Minimal) dari obat. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada media agar, diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan

dengan tidak adanya pertumbuhan koloni bakteri adalah KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari obat terhadap bakteri uji (Dzen dkk., 2003).

2.6.2 Metode Dilusi Agar

Tes ini dikerjakan dengan menggunakan metode dilusi agar (*agar dilution test)*. Larutan antimikroba yang sudah diencerkan secara serial dicampurkan ke dalam medium agar yang masih cair (tetapi tidak terlalu panas) kemudian agar dibiarkan memadat, dan selanjutnya diinokulasi dengan bakteri atau jamur. Dibutuhkan enam cawan dan satu cawan untuk kontrol positif tanpa antimikroba. Dengan metode ini, satu atau lebih bakteri terisolasi yang tercampur per cawan. Pada metode dilusi agar, diperlukan larutan antimikroba dengan kadar menurun yang dibuat menggunakan teknik pengenceran serial. Selanjutnya, diinkubasikan pada suhu 37^{o}C selama 24-48 jam. Setelah di inkubasi, cawan diamati serta dihitung pertumbuhan bakteri (Dzen, 2003).

2.6.3 Metode Difusi Cakram

Tes ini dikerjakan dengan menggunakan cakram kertas saring yang mengandung bahan antimikroba yang telah ditentukan kadarnya. Cakram tersebut kemudian ditempatkan pada media padat yang telah diberi bakteri uji. Setelah diinkubasi, diameter area hambatan dihitung sebagai daya hambat obat terhadap bakteri uji (Jawetz*et al.,*1996). Area hambatan yang terbentuk ditunjukkan sebagai daerah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri di sekitar cakram kertas saring.

Evaluasi dapat dilakukan dua cara seperti berikut ini :

a. Cara Kirby Bauer

   Cara ini dilakukan dengan membandingkan diameter dari area jernih (zona hambatan) disekitar cakram dengan tabel standar yang dibuat oleh NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standard*). Dengan tabel NCCLS ini dapat diketahui kriteria sensitif, sensitif intermediet dan resisten.

a. Cara Joan-Stokes

Cara ini dilakukan dengan membandingkan radius zona hambatan yang terjadi antara bakteri kontrol yang sudah diketahui kepekaannya terhadap obat tersebut dengan isolat bakteri yang diuji. Pada cara Joan-Stokes, prosedur uji kepekaan untuk bakteri kontrol dan bakteri uji dilakukan bersama-sama dalam satu piring agar (Dzen dkk., 2003). Kriterianya adalah Sensitif : yaitu radius zona inhibisi kuman tes lebih luas, sama dengan atau lebih kecil tetapi tidak lebih dari 3 mm terhadap kontrol.Intermediet : yaitu radius zona inhibisi kuman tes lebih besar dari 3 mm, tetapi dibanding kontrol lebih kecil lebih dari 3 mm. Resisten : yaitu radius zona inhibisi kurang atau sama dengan 3 mm (Dzen dkk., 2003).

2.7 Macam-Macam Proses Ekstraksi

Ekstraksi merupakan suatu proses pemisahan zat dari bahan padat maupun cair dengan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya. Ekstraksi menggunakan pelarut didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran. Salah satu teknik ekstraksi adalah menggunakan air untuk mengambil pigmen alami dari tumbuhan. Terdapat beberapa faktor yang mempengaruhi laju ekstraksi suatu bahan atau zat, yaitu : (1) tipe persiapan sampel; (2) waktu ekstraksi; (3) Kuantitas pelarut; (4) suhu pelarut; dan (5) tipe pelarut (Luthana, 2009).

Pemilihan larutan penyaring harus mempertimbangkan banyak faktor. Larutan penyaring yang baik harus memenuhi kriteria yaitu murah dan mudah diperoleh, stabil secara fisika dan kimia, bereaksi netral, tidak mudah menguap dan tidak mudah terbakar, tidak mempengaruhi zat berkhasiat. Larutan pengekstraksi yang digunakan disesuaikan dengan kepolaran senyawa-senyawa

yang diinginkan. Larutan pengekstraksi yang digunakan yaitu petroleum eter (Lifton, 2007).

Petroleum eter adalah pelarut non polar yang merupakan campuran hidrokarbon cair yang bersifat mudah menguap . Petroleum eter akan melarutkan senyawa-senyawa yang bersifat kurang polar pada selubung sel dan dinding sel seperti lemak-lemak, terpenoid, klorofil dan steroid (Lifton, 2007).

2.7.1 Prinsip Maserasi

Maserasi merupakan cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan caramerendam serbuk simplisia dalam cairan penyari selama beberapa hari pada temperatur kamar dan terlindung dari cahaya. Metode maserasi digunakan untuk menyari simplisia yang mengandung komonen kimia yang mudah larut dalam cairan penyari, tidak mengandung benzoin, tiraks dan lilin. Keuntungan dari metode ini adalah peralatannya sederhana, sedangkan kerugiannya antara lain waktu yang diperlukan untuk mengekstraksi sampel cukup lama, cairan penyari yang digunakan lebih banyak, tidak dapat digunakan untuk bahan-bahan yang mempunyai tekstur keras seperti benzoin, tiraks dan lilin (Luthana, 2009).

2.7.2 Prinsip Soxhletasi

Soxhletasi merupakan penyarian simplisia secara berkesinambungan, cairan penyari dipanaskan sehingga menguap, uap cairan penyari terkondensasi menjadi molekul-molekul air oleh pendingin balik dan turun menyari simplisia dalam klongsong dan selanjutnya masuk kembali ke dalam labu alas bulat setelah melewati pipa sifon.

Keuntungan prinsip soxhletasi antara lain adalah dapat digunakan untuk sampel dengan tekstur yang lunak dan tidak tahan terhadap pemanasan secara langsung, pelarut yang digunakan lebih sedikit, pemanasannya dapat diatur. Sedangkan kerugian prinsip soxhletasi antara lain adalah karena pelarut didaur ulang, ekstrak yang terkumpul pada wadah bagian bawah terus-menerus

dipanaskan sehingga dapat menyebabkan reaksi peruraian oleh panas, Jumlah total senyawa-senyawa yang diekstraksi akan melampaui kelarutannya dalam pelarut tertentu sehingga dapat mengendap dalam wadah dan membutuhkan volume pelarut yang lebih banyak untuk melarutkannya, bila dilakukan dalam skala besar, mungkin tidak cocok untuk menggunakan pelarut dengan titik didih yang terlalu tinggi, seperti metanol atau air, karena seluruh alat yang berada di bawah komdensor perlu berada pada temperatur ini untuk pergerakan uap pelarut yang efektif.

2.7.3 Prinsip Perkolasi

Perkolasi adalah cara penyarian dengan mengalirkan penyari melalui serbuk simplisia yang telah dibasahi. Keuntungan metode ini adalah tidak memerlukan langkah tambahan yaitu sampel padat (marc) telah terpisah dari ekstrak. Kerugiannya adalah kontak antara sampel padat tidak merata atau terbatas dibandingkan dengan metode refluks, dan pelarut menjadi dingin selama proses perkolasi sehingga tidak melarutkan komponen secara efisien (Luthana, 2009).

2.7.4 Prinsip Refluks

Dalam metode ini, penarikan komponen kimia dilakukan dengan cara sampel dimasukkan ke dalam labu alas bulat bersama-sama dengan cairan penyari lalu dipanaskan. Kemudian, uap-uap cairan penyari terkondensasi pada kondensor bola menjadi molekul-molekul cairan penyari yang akan turun kembali menuju labu alas bulat, akan menyari kembali sampel yang berada pada labu alas bulat, demikian seterusnya berlangsung secara berkesinambungan hingga mencapai penyarian sempurna. Filtrat yang diperoleh, kemudian dikumpulkan dan dipekatkan. Keuntungan dari metode ini adalah digunakan untuk mengekstraksi sampel-sampel yang mempunyai tekstur kasar dan tahan pemanasan langsung. Sedangkan kerugian metode ini adalah membutuhkan

volume total pelarut yang besar dan sejumlah manipulasi dari operator (Luthana, 2009).

2.7.5 Prinsip Destilasi Uap Air

Destilasi uap adalah metode yang popular untuk ekstraksi minyak-minyak menguap (esensial) dari sampel tanaman. Metode destilasi uap air diperuntukkan untuk menyari simplisia yang mengandung minyak menguap atau mengandung komponen kimia yang mempunyai titik didih tinggi pada tekanan udara normal (Luthana, 2009).

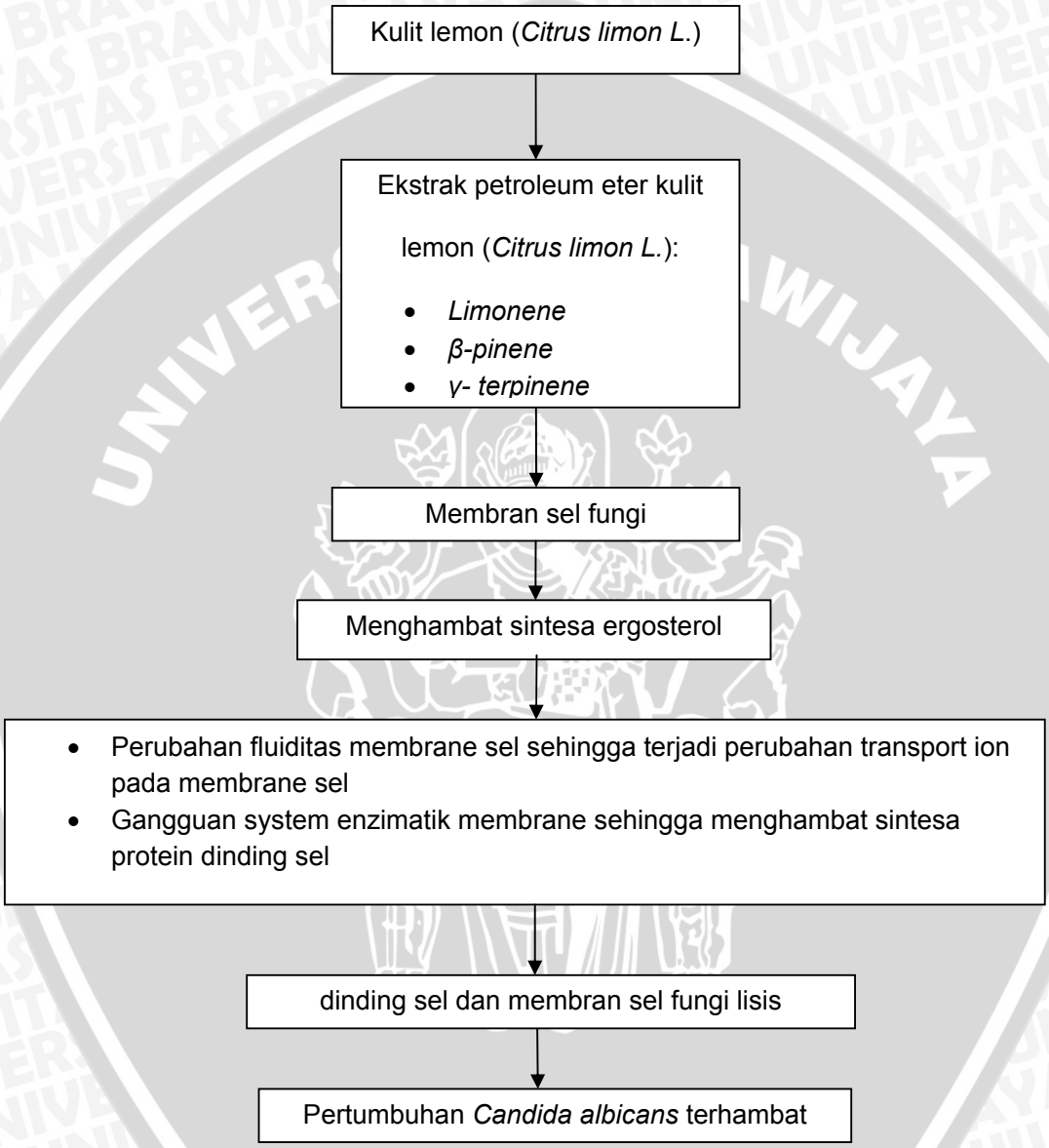
2.7.6 Prinsip Rotavapor

Proses pemisahan ekstrak dari cairan penyarinya dengan pemanasan yang dipercepat oleh putaran dari labu alas bulat, cairan penyari dapat menguap 5-10º C di bawah titik didih pelarutnya disebabkan oleh karena adanya penurunan tekanan. Dengan bantuan pompa vakum, uap larutan penyari akan menguap naik ke kondensor dan mengalami kondensasi menjadi molekul-molekul cairan pelarut murni yang ditampung dalam labu alas bulat penampung (Luthana, 2009).

BAB 3

KERANGKA KONSEP DAN HIPOTESIS

3.1 Kerangka Konsep



Gambar 3.1 Kerangka Konsep

Ekstrak petroleum eter kulit lemon akan menghasilkan kandungan *Citrus limon* berupa *limonene, β-pinene, γ-terpinene* yang ketiganya merupakan

golongan terpenoid. Golongan terpenoid ini bekerja menghambat sintesa ergosterol yang terjadi pada membrane sel. Ergosterol merupakan salah satu komponen penting pada membrane sel (Dewi, 2008). Pada Candida albicans, ergosterol memiliki peran penting dalam fluiditas membrane, permeabilitas membrane, morfologi sel, serta aktifitas enzim yang berperan dalam sintesis dinding sel. (Niescier, 2000; Daisy *et al*, 2008; Choi *et al*, 2008).

Salah satu prasyarat penting yang harus dipenuhi agar *Candida albicans* dapat hidup adalah terjaganya integritas sel. Dinding sel merupakan salah satu struktur terpenting *Candida albicans* karena berfungsi memberi bentuk sel dan melindungi sel dari pengaruh lingkungan luar. Dinding sel diproduksi melalui serangkaian reaksi enzimatik yang terjadi pada ergosterol membrane sel. Apabila sintesa ergosterol dihambat, produksi dinding sel pun akan terganggu, akibatnya *Candida albicans* kehilangan integritas struktural selnya dan mati (Segal, 1994). Sehingga pertumbuhan *Candida albicans* akan terhambat.

3.2 Hipotesis

Ekstrak petroleum eter kulit lemon mempunyai efek antifungi terhadap *Candida albicans* secara *in vitro*.

BAB 4

METODE PENELITIAN

4.1 Rancangan Penelitian

Desain penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah desain penelitian *true experimentalpost control design only* karena penelitian ini bisa dilihat hasilnya setelah dilakukan penelitian untuk mengetahui efek antifungi berbagai konsentrasi ekstrak petroleum eter kulit lemon (*Citrus limon L*) terhadap jamur *Candida albicans* dengan menggunakan metode *tube dilution test* yang dilanjutkan dengan penggoresan pada media *Saboaroud Dextrose Agar.*

4.2 Sampel Penelitian

Sampel pada penelitian ini adalah jumlah koloni jamur *Candida albicans* dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya dengan kepadatan 10^4 CFU/ml per *tube*. Jumlah pengulangan penelitian menggunakan sebagai berikut :(Lukito, 1998).

p (n-1) ≥ 16

8 (n-1) ≥ 16

8n-8 ≥ 16

8n ≥ 24→ n≥ 3

Keterangan:

p = jumlah perlakuan (8, yaitu 7 konsentrasi ekstrak petroleum eter, 1 kontrol)

n = jumlah pengulangan (3 kali pengulangan).

4.3 Variabel Penelitian

Variabel pada penelitian ini ada dua, yaitu variabel tergantung dan variabel bebas.

4.3.1 Variabel Tergantung

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah pertumbuhan jumlah koloni jamur *Candida albicans.*

4.3.2 Variabel Bebas

Variabel bebas adalah ekstrak petroleum eter kulit lemon (*Citrus limon L*) dengan konsentrasi 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% dan 8%.

4.4 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Mikrobiologi Fakultas kedokteran Universitas Brawijaya Malang dari bulan Januari 2012 sampai mei 2012.

4.5 Instrumen Penelitian

Instrumen yang digunakan pada penelitian ini terdiri dari alat dan bahan.

4.5.1 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah glas objek, ose, bunsen, tabung reaksi kosong steril, korek api, vortex, inkubator, plate kosong steril, mikroskop, pisau, nampan, timbangan, kertas timbel, ekstraktor soxhlet, *waterbath, rotatory evaporator,* cawan petri, mikropipet 1 ml, inkubator, label, *blue tip,* c*olony counter,* spektrofotometer (gambar alat dapat dilihat pada lampiran 1).

4.5.2 Bahan

4.5.2.1 Bahan untuk identifikasi jamur *candida albicans* adalah alkohol 96%, sda (*sabouraud dextrose agar*), *sabouraud dextrose broth,* kristal violet, lugol, safranin, aquadest, minyak imersi, kertas penghisap, kapas.

4.5.2.2 Bahan untuk pembuatan ekstrak petroleum eter kulit lemon adalah 3kg kulit lemon (*Citrus limon l.*) yang berasal dari perkebunan Punten kota Batu, 450 ml petroleum eter, air pendingin.

4.5.2.3 Bahan uji kepekaan ekstrak petroleum eter kulit lemon (*citrus limon l.)* adalahisolat *candida albicans,* ekstrak petroleum eter kulit lemon, *sabouraud dextrose broth, sda + tween* 0,05%, nacl, aquadest steril.

4.6 Definisi Operasional

a. Ekstrak petroleum eter kulit lemon adalah kulit luar dari buah lemon *(Citrus limon L.)* yang berasal dari perkebunan Punten Batu. Kulit dikeringkan pada suhu ruang kemudian dihaluskan dengan menggunakan grinder dan diekstraksi dengan pelarut petroleum eter.

b. Isolat jamur *Candida albicans adalah* isolat yang diperoleh dari sampel sputum pasien di Rumah Sakit Saiful Anwar Malang yang telah diidentifikasi oleh Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

c. Standar kepadatan jamur yang digunakan dalam penelitian ini sebesar 10^4 CFU/ml (Murray*et al*., 1999).

d. Satuan CFU merupakan singkatan dari *Colony Forming Unit.*

e. KHM adalah kadar hambat minimum, yaitu diamati hambatan pertumbuhan mikroba dengan membandingkan kekeruhan atau pertumbuhannya dengan kontrol yang mengandung media. KHM didapatkan pada tabung yang jernih pada pengenceran tertinggi. Penentuan KHM dilakukan dengan metode pengenceran (*dilution method*).

f. Kadar Bunuh Minimum (KBM) adalah kadar atau konsentrasi minimal larutan ekstrak kulit lemon yang mampu membunuh kuman uji (*Candida albicans*), ditandai dengan tidak terdapatnya pertumbuhan koloni kuman pada media *Saborous Dextrose Agar* (SDA) yang telah dilakukan *streaking* dengan satu ose larutan ekstrak kulit lemon yang tidak menunjukkan kekeruhan.

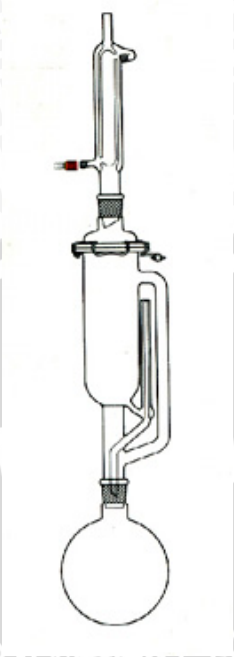
4.7 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian terdiri dari prosedur penelitian pendahuluan dan prosedur penelitian sesungguhnya. Penelitian pendahuluan disini dimaksudkan

untuk memperoleh konsentrasi yang digunakan dalam penelitian sesungguhnya. Tahapan dalam prosedur penelitian ini adalahprosedur proses pembuatan ekstrak petroleum eter, pemeriksaan mikroskopik, tes *germinating tube*, persiapan suspensi uji *Candida albicans*, dan uji aktivitas antifungal ekstrak kulit luar lemon (*Citrus limon L*) terhadap *Candida albicans*.

4.7.1 Proses Pembuatan Ekstrak Petroleum Eter Kulit Lemon (Wijiani : 2009)

a. Kulit lemon diiris.
b. Kulit lemon yang telah diiris diletakkan di atas nampan.
c. Kulit lemon dikeringkan pada suhu ruang.
d. Kulit lemon kering ditimbang dan diambil sebanyak 100 g kulit lemon kering.
e. Kulit lemon kering dimasukkan dalam kertas timbel yang telah dijahit.
f. Kulit lemon dimasukkan dalam ekstraktor soxhlet.
g. Petroleum eter sebanyak 450 ml dimasukkan ke dalam ekstraktor soxhlet.
h. Air pendingin dialirkan.
i. Petroleum eter dan kulit lemon kering dalam ekstraktor soxhlet dipanaskan dengan *waterbath*.
j. Ekstraksi dilakukan selama 7 kali siklus.
k. Setelah dilakukan ekstraksi, hasil yang diperoleh kemudian didinginkan dalam suhu ruang. Sehingga, didapatkan ekstrak yang masih bercampur dengan pelarut petroleum eter.
l. Ekstrak campur pelarut dimasukkan dalam *rotator evaporator* pada suhu 40-60°C.
m. Pelarut petroleum eter diuapkan sampai diperoleh ekstrak kental.
n. Didapatkan ekstrak konsentrasi 100%.



Gambar 4.1 Ekstraktor Soxhlet

4.7.2 Pemeriksaan Mikroskopis

a. Gelas objek dibersihkan dengan kapas, kemudian dilewatkan di atas api untuk menghilangkan lemak dan dibiarkan dingin.

b. 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.

c. Sediaan dikeringkan di udara, kemudian dilakukan fiksasi dengan cara melewatkan sediaan di atas api.

d. Sediaan pada gelas objek ditetesi dengan kristal violet selama 1 menit. Sisa kristal violet dibuang dan dibilas dengan air.

e. Sediaan ditetesi dengan lugol selama 1 menit. Sisa lugol dibuang dan dibilas dengan air.

f. Sediaan ditetesi dengan alkohol 96% selama 5-10 detik atau sampai warna cat luntur. Sisa alkohol dibuang dan dibilas dengan air.

g. Sediaan ditetesi safranin selama ½ menit. Sisa safranin dibuang dan dibilas dengan air.

h. Sediaan dikeringkan dengan kertas penghisap.

i. Sediaan dilihat di bawah mikroskop dengan lensa objektif perbesaran 1000x.

j. Hasil positif : *Candida albicans* tercat ungu (Gram positif).

4.7.3 Tes Germinating Tube

a. Isolat jamur diambil dari perbenihan dengan menggunakan ose yang sudah disterilisasi dengan cara pembakaran.

b. Dimasukkan tabung yang berisi serum mamalia 0,5 ml.

c. Diinkubasikan pada 35°C selama ± 4 jam.

d. Kultur di dalam serum diambil menggunakan ose dan diletakkan pada gelas objek, lalu ditutup dengan gelas penutup.

e. Diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran lensa objektif 40x.

f. Dicari bentukan *pseudohifa* memanjang khas *Candida albicans.*

4.7.4 Persiapan Suspensi Uji *Candida albicans*

a. Dipersiapkan jamur *Candida albicans* dari SDA yang telah diuji konfirmasi.

b. Ambil 5 koloni (d ≥ 1mm) dengan ose kemudian dimasukkan ke dalam 5 ml NaCl 0,85% steril. Kemudian diukur Optical Density (OD) atau kepadatan optisnya dengan spektrofotometer pada λ_{maks} = 530 nm. Dari

hasil yang diperoleh dibuat suspensi sel yang mengandung $1x10^6$ hingga $5x10^6$ CFU/ml dengan rumus $n_1 \times v_1 = n_2 \times v_2$ (Murray *et al*., 1999).

c. Untuk mendapatkan suspensi sel yang mengandung $0,5x10^4$ hingga $2,5x10^4$ 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 satu kali hingga mencapai konsentrasi suspensi jamur yang digunakan untuk tes, yaitu $0,5x10^4$ hingga $2,5x10^4$ CFU/ml (Murray *et al.*, 1999).

4.7.5 Uji Aktivitas Antifungi Ekstrak Petroleum Eter Kulit Lemon(*Citrus limon L.*) Terhadap*Candida albicans*

Rangkaian uji aktivitas antifungi ekstrak petroleum eter kulit lemon adaah sebagai berikut:

a. Disediakan 9 tabung steril, 7 tabung sebagai uji antifungi dan 1 tabung sebagai kontrol jamur , 1 kontrol bahan.

b. Ekstrak petroleum eter *kulit* lemon (dalam bentuk cairan) dimasukkan pada tabung reaksi steril masing-masing sebanyak 0,1 ml, 0,15 ml, 0,2 ml, 0,25ml, 0,3 ml, 0,35 ml.

   Aquades steril dimasukkan pada masing-masing tabung sebanyak 0,9ml, 0,85ml, 0,8ml, 0,75ml, 0,7ml, 0,65ml.

c. Menyiapkan perbenihan cair perbenihan jamur dengan konsentrasi jamur $0,5x10^4$ hingga $2,5x10^4$ CFU/ml

   Perbenihan cair jamur dimasukkan pada semua tabung konsentrasi di atas, masing-masing sebanyak 1 ml. Sehingga konsentrasi akhir ekstrak petroleum eter kulit lemon (*Citrus limon L.*) adalah 0% (kontrol jamur), 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% dan8%.

d. Kontrol jamur (0%) digoreskan pada SDA sebagai *original inoculum* kemudian diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35^0C.
e. Masing-masing tabung di-*vortex* dan diinkubasi selama 24-48 jam pada suhu 35^0C.
f. Pada hari kedua, semua tabung dikeluarkan dari inkubator. KHM didapatkan dengan cara melihat kejernihan tabung.
g. Kemudian dari masing-masing tabung dilusi diambil satu ose kemudian diinokulasikan pada SDA. Kemudian diinkubasi 24-48 jam pada suhu 35^0C.
h. Pada hari ketiga didapatkan data KBM dan dilakukan pengamatan kuantitatif pada masing-masing konsentrasi dengan cara menghitungjumlah koloni jamur dengan *colony counter.* KBM ditentukan dari tidak adanya jumlah koloni yang tumbuh pada SDA atau jumlah koloninya kurang dari 0,1% jumlah koloni di OI.
i. Setelah ditemukan konsentrasi KBM kemudian dilakukan penelitian yang sesungguhnya dengan prosedur yang sama seperti pada penelitian pendahuluan dengan 8 konsentrasi A%,B%,C%,D%,E%,F%, G% dan H%. Konsentrasi tersebut ditentukan berdasarkan hasil eksplorasi dari penelitian pendahuluan. Rentang konsentrasi 1% digunakan untuk menentukan Kadar Bunuh Minimal (KBM) yang lebih tepat serta untuk mendapatkan persamaan regresi yang lebih teliti. Jarak ini masih dianggap ideal karena jarak yang terlalu dekat (<1%) akan menyebabkan tingkat kesalahan pengambilan ekstrak meningkat.

4.8 Analisis Data

Data terlebih dahulu dilakukan uji distribusi dan homogenitas varian menggunakan kolmogorov smirnov. Apabila data terdistribusi normal, analisis data yang digunakan adalah uji statistik *one way* ANOVA dan uji statistik korelasi-regresi. Uji statistik *one way* ANOVA dengan derajat kepercayaan 95 % (α = 0,05) digunakan untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian berbagai

konsentrasi ekstrak petroleum eter kulit lemon terhadap jumlah koloni jamur *Candida albicans*. Sedangkan uji korelasi-regresi digunakan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara konsentrasi ekstrak petroleum eter lemon terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Analisis data menggunakan program SPSS (*Statistical Product of Service Solution) for Windows* versi 17.0.

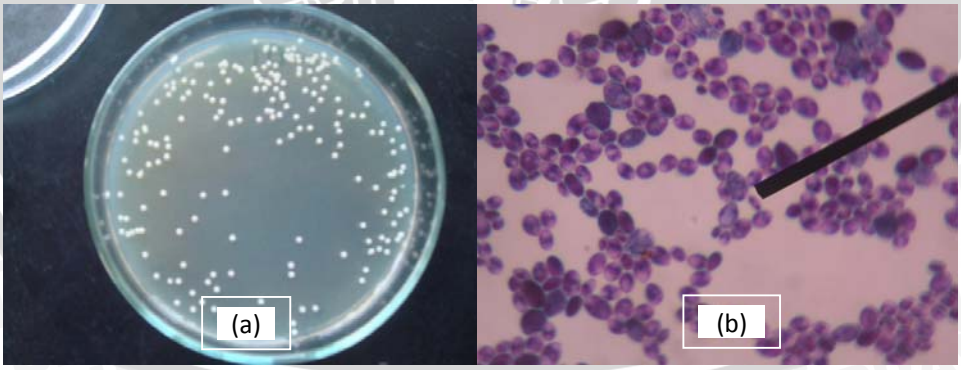
BAB 5

HASIL PENELITIAN DAN ANALISIS DATA

5.1 Hasil Penelitian

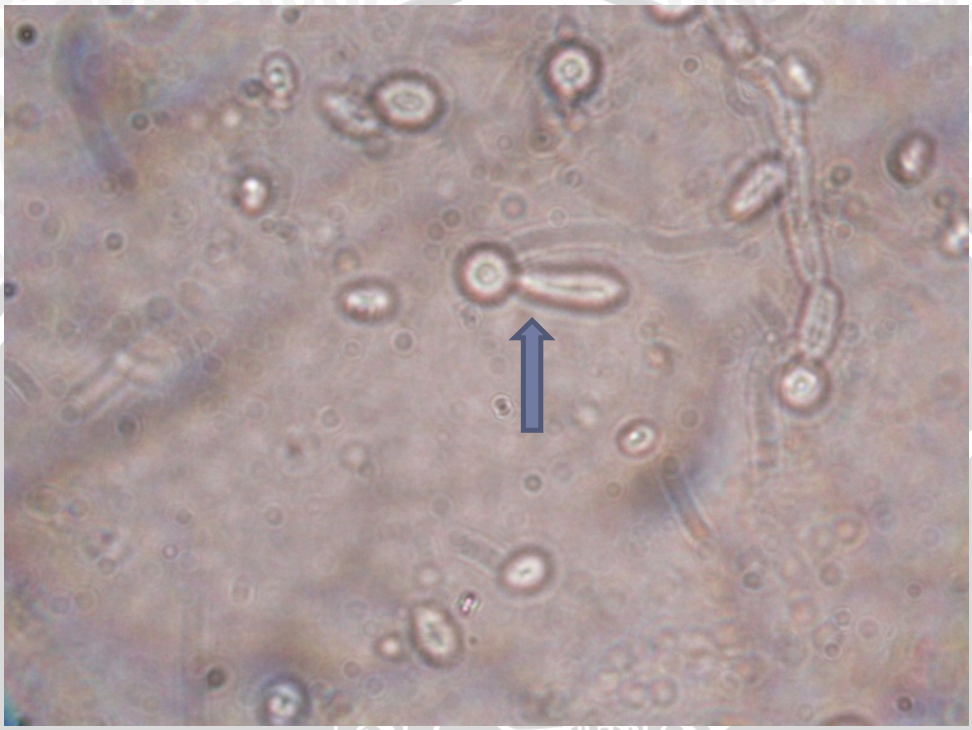
5.1.1 Hasil Identifikasi Candida albicans

Jamur *Candida albicans* yang digunakan di dalam penelitian ini berasal dari *isolate* yang didapatkan dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Masing-masing *isolate* jamur di *streaking* ulang di medium *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA), semua *isolate* jamur *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 pewarnaan Gram dan pengamatan dibawah mikroskop dengan pembesaran 1000x didapatkan gambaran sel ragi (blastospora) berbentuk bulat, lonjong atau bulat lonjong seperti pada Gambar 5.1b.



Gambar 5.1 Morfologi Koloni dan Sel *Candida albicans* (a) Koloni *Candida albicans* pada medium SDA; (b) Jamur *Candida albicans* pada pengecatan Gram pembesaran 1000x

Uji Germinating Tube Test telah dilakukan sebelumnya oleh labolatrium mikrobiologi Universitas Brawijaya. Pada pengamatan didapati bentukan *pseudohifa* memanjang (tanda panah) khas *Candida albicans* seperti terlihat pada Gambar 5.2



Gambar 5.2 Pseudohifa (Tanda panah) Candida albicans pada Uji Germinating Tube Test

5.1.2 Gambaran Ekstrak Kulit Lemon

Ekstrak kulit lemon (Citrus Lemon L.) berwarna kuning, sedikit keruh dan mudah larut dalam air.

5.1.3 Hasil Pengamatan Pertumbuhan Candida albicans pada Tabung dan Analisis KHM

Pada penelitian ini digunakan 7 macam konsentrasi ekstrak kulit lemon yaitu 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% dan 8% serta konsentrasi 0% (kontrol jamur atau jamur tanpa ekstrak). KHM (kadar hambat minimal) adalah kadar terendah dari antifungi yang mampu menghambat pertumbuhan jamur (ditandai dengan tidak

adanya kekeruhan pada tabung), setelah diinkubasi selama 24 jam (Dzen dkk, 2003). Tingkat kekeruhan larutan diamati untuk menentukan KHM.

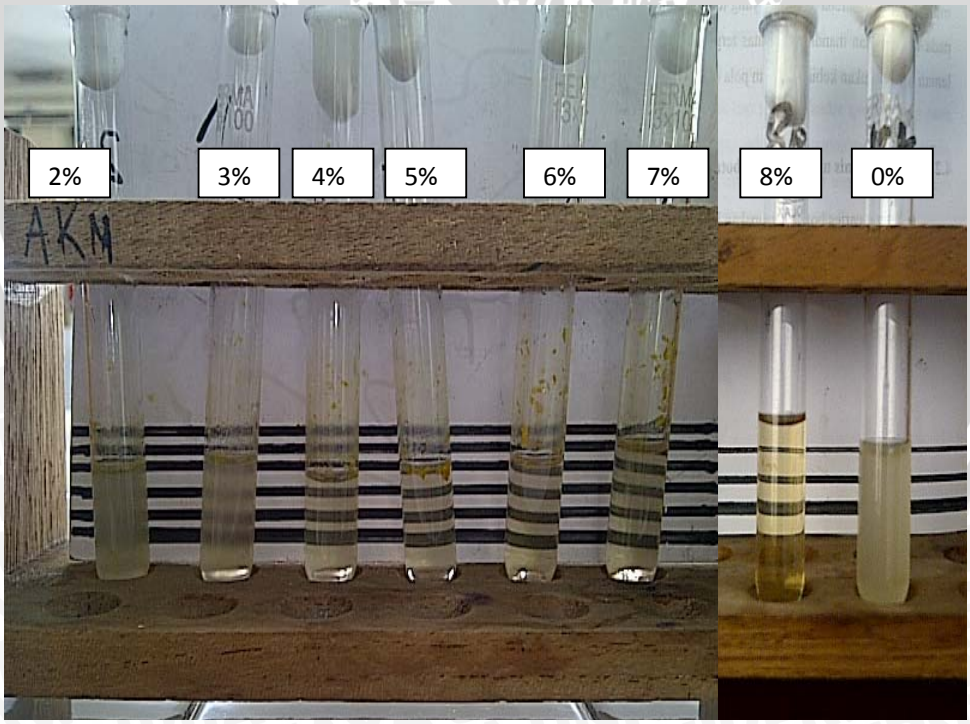
Hasil pengamatan efek ekstrak kulit lemon terhadap pertumbuhan Candida albicans pada tabung dapat dilihat pada Tabel 5.1

Tabel 5.1 Tingkat kekeruhan jamur *Candida albicans*

Ulangan	Konsentrasi Ekstrak Kulit Lemon							KJ
	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	
I	3	2	0	0	0	0	0	3
II	3	2	0	0	0	0	0	3
III	3	2	0	0	0	0	0	3

Keterangan :

1. Skor 0 : Jernih, berarti tidak tumbuh jamur
2. Skor 1 : Sedikit keruh, berarti tumbuh sedikit jamur
3. Skor 2 : keruh, berarti tumbuh banyak jamur
4. Skor 3 : Sangat keruh, berarti tumbuh sangat banyak jamur
5. KJ : Kontrol jamur, Candida albicans



Gambar 5.3 Tingkat Kekeruhan pada Tabung

Pada tabung konsentrasi 2% nampak sangat keruh yang berarti sangat banyak jamur yang tumbuh, pada tabung konsentrasi 3% nampak keruh yang berarti masih banyak jamur yang tumbuh, sedangkan pada tabung konsentrasi 4%, 5%, 6%, 7% dan 8% nampak jernih yang berarti tidak ada jamur yang tumbuh. Dari hasil pengamatan dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin kecil tingkat kekeruhan pada tabung dan dapat terlihat bahwa konsentrasi 4% merupakan konsentrasi terkecil yang tidak menunjukkan kekeruhan pada tabung, sehingga dapat disimpulkan bahwa KHM penelitian adalah konsentrasi 4%.

5.1.4 Hasil Pengukuran Pertumbuhan Candida albicans pada Media SDA dan Analisis KBM

Setelah tabung diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C dan diamati tingkat kekeruhannya untuk melihat KHM, tiap konsentrasi ekstrak tersebut diinokulasi pada SDA. Kemudian SDA diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Penghitungan jumlah koloni yang tumbuh pada masing-masing konsentrasi SDA dihitung keesokan harinya dengan menggunakan *colony counter.* Hal ini berlaku untuk ketiga *isolate* jamur *Candida albicans* untuk melihat kadar bunuh minimum.

KBM (Kadar Bunuh Minimal) adalah kadar terendah dari antifungi yang dapat membunuh jamur (ditandai dengan tidak tumbuhnya kuman pada SDA) atau pertumbuhan koloninya kurang dari 0.1% dari jumlah koloni inoculum awal (*Original Inoculum*/OI) pada medium SDA yang telah dilakukan penggoresan sebanyak satu ose (1 µl) (Dzen dkk. 2003). Hasil *streaking* jamur pada SDA dapat dilihat pada Gambar 5.4

Hasil pengukuran pertumbuhan *Candida albicans* dari perbenihan media SDA dapat dilihat pada Tabel 5.2

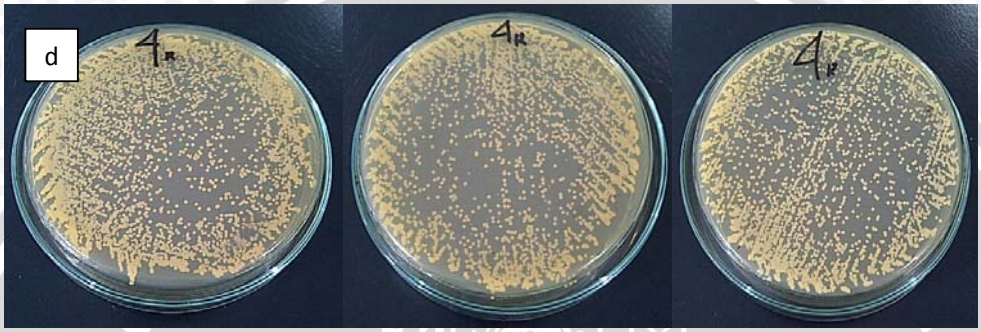
Tabel 5.2 Jumlah Koloni *Candida albicans* pada media SDA (CFU/Plate)

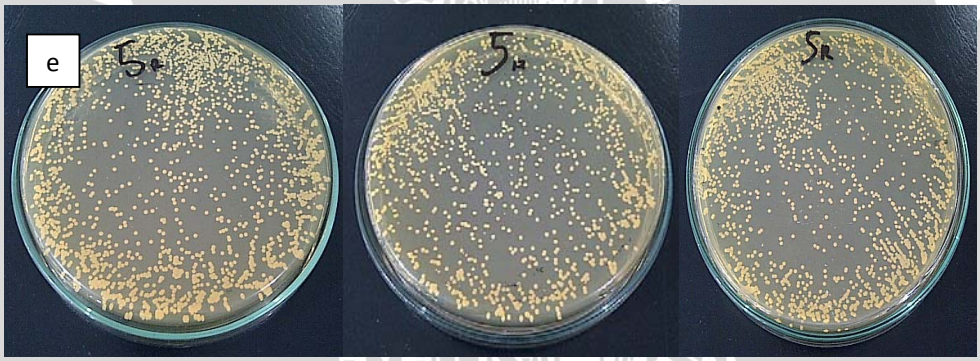
Ulangan	Konsentrasi Ekstrak Kulit Lemon								KJ (kontrol jamur)
	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%	OI	
I	6050	2450	528	341	193	5	0	167	212.000
II	5220	2780	600	313	183	6	0	201	199.000
III	5420	2650	583	370	190	4	0	358	177.000
Mean	5563	2627	570	342	188	5	0	242	196.000

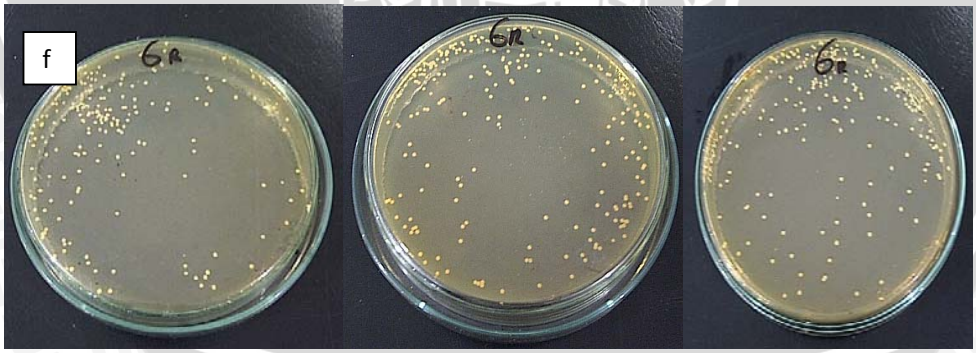
Catatan : OI (*Original Inokulum*)

a

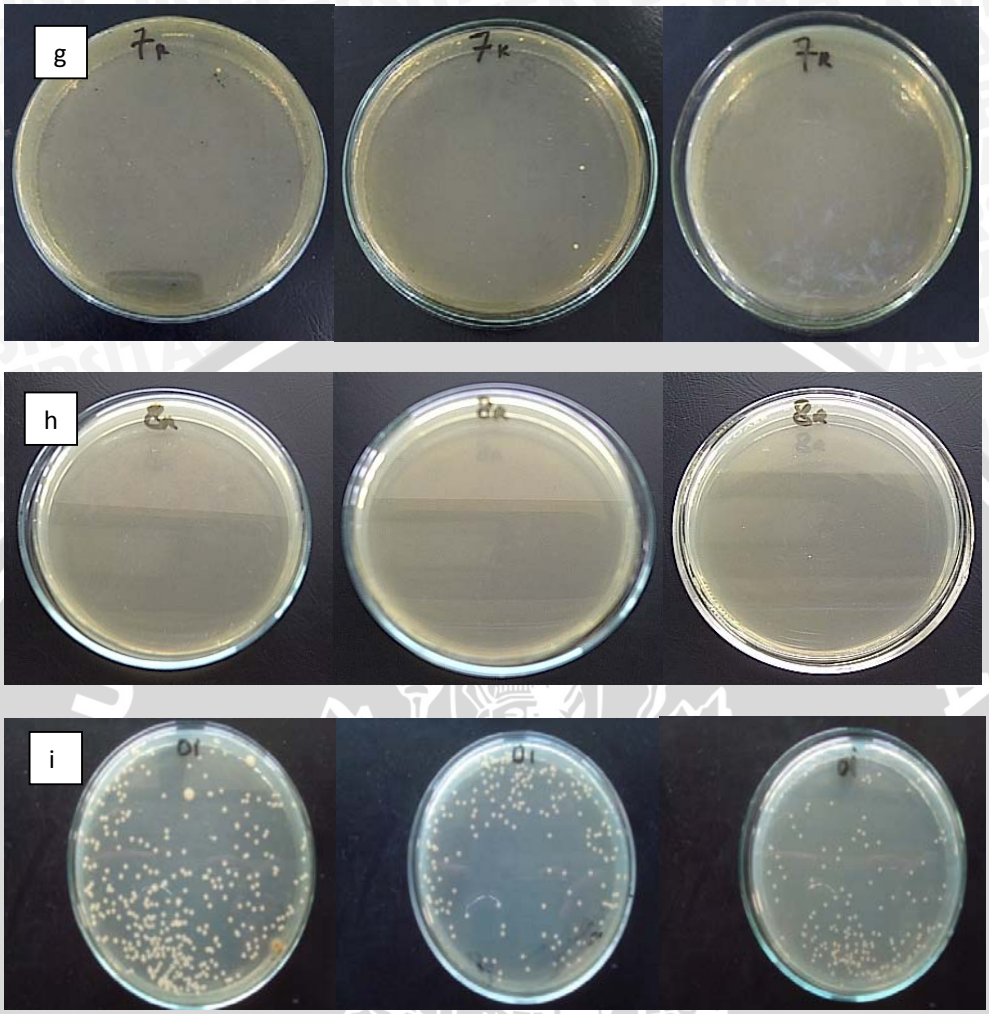
b







repository.ub.ac
UNIVERSITAS BRAWIJAYA



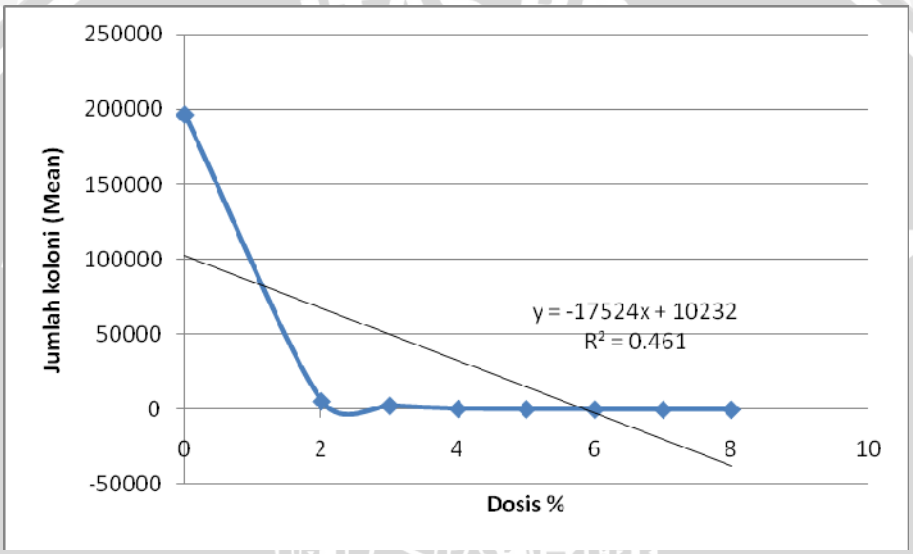
Gambar 5.4 Jumlah Koloni Candida albicans pada Media SDA

Keterangan:

(a) Pertumbuhan koloni pada konsentrasi ekstrak 0% atau kontrol jamur
(b) Pertumbuhan koloni pada konsentrasi ekstrak kulit lemon 2%
(c) Pertumbuhan koloni pada konsentrasi ekstrak kulit lemon 3%
(d) Pertumbuhan koloni pada konsentrasi ekstrak kulit lemon 4%
(e) Pertumbuhan koloni pada konsentrasi ekstrak kulit lemon 5%
(f) Pertumbuhan koloni pada konsentrasi ekstrak kulit lemon 6%
(g) Pertumbuhan koloni pada konsentrasi ekstrak kulit lemon 7%
(h) Pertumbuhan koloni pada konsentrasi ekstrak kulit lemon 8%
(i) Pertumbuhan koloni pada*original inoculum*

Pada konsentrasi 2% didapatkan koloni rata-rata sejumlah 5563 koloni, pada konsentrasi 3% didiapatkan koloni rata-rata sejumlah 2627 koloni, pada konsentrasi 4% didapatkan koloni rata-rata sejumlah 570 koloni, pada konsentrasi 5% & didapatkan koloni rata-rata sejumlah 342 koloni, pada

konsentrasi 6% didapatkan koloni rata-rata sejumlah 188 koloni, pada konsentrasi 7% didapatkan koloni rata-rata sejumlah 5 koloni dan baru pada konsentrasi 8% didapatkan koloni rata-rata sejumlah 0 koloni. Dari hasil pengukuran dapat diketahui bahwa terjadi penurunan rata-rata jumlah koloni Candida albicans seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak kulit lemon dan didapatkan KBM pada konsentrasi 8% karena pada konsentrasi tersebut tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni jamur Candida albicans.



Gambar 5.5 Grafik Pertumbuhan Candida albicans pada Media SDA dengan Konsentrasi Tertentu Ekstrak Kulit Lemon

5.2 Analisis Data

Hasil penelitian ini kemudian dianalisa dengan menggunakan analisis statistic SPSS versi 17.0 untuk windows. Tabel One-way Anova, Post Hoc Tukey, Correlations and Regresi Linier terdapat pada lampiran.

5.2.1 Analisis Data dengan Metode One-way Anova

Metode One–way Anova digunakan untuk mengetahui perbandingan pengaruh berbagai konsentrasi ekstrak kulit lemon terhadap Candida albicans. Dari uji Anova diperoleh nilai signifikansi 0.000 yang artinya perbedaan bermakna antar perlakuan.

Langkah selanjutnya adalah mengolah yang ada dengan menggunakan metode Post Hoc test untuk mengetahui perbedaan yang bermakna diantara berbagai konsentrasi ekstrak. 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* dapat diketahui bahwa ada perbedaan yang signifikan di setiap pasangan kelompok sampel yang ditunjukkan oleh angka signifikansi 0,000 ($p< 0,05$).

Dari Post Hoc test diketahui terdapat perbedaan bermakna antara berbagai konsentrasi, diantara Konsentrasi 0% (Kontrol Jamur) bermakna terhadap seluruh konsentrasi yang ada, konsentrasi 2% bermakna terhadap konsentrasi yang ada, konsentrasi 3% bermakna terhadap konsentrasi yang ada, konsentrasi 4% bermakna terhadap konsentrasi yang ada, konsentrasi 5% bermakna terhadap konsentrasi yang ada, konsentrasi 6% bermakna terhadap konsentrasi yang ada, konsentrasi 7% bermakna terhadap konsentrasi yang ada, konsentrasi 8% bermakna terhadap konsentrasi yang ada.

Tabel 5.3 Ringkasan Nilai Signifikansi (p<0.05) Post Hoc Test

Konsentrasi	0%	2%	3%	4%	5%	6%	7%	8%
0%		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2%	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
3%	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
4%	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000	0.000
5%	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000	0.000
6%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000	0.000
7%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000		0.000

8%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	

5.2.2 Analisis Data dengan Uji Korelasi dan Regresi Linier

Analisis data dengan uji korelasi bertujuan untuk mengetahui kekuatan hubungan antara pemberian ekstrak kulit lemon terhadap jumlah koloni Candida albicans.Uji korelasi nyang digunakan adalah metode Pearson.

Dari uji korelasi Pearson didapatkan nilai signifikansi 0.000 yang berarti terdapat hubungan antara pemberian ekstrak kulit lemon terhadap pertumbuhan candida albicans. Nilai Pearson Correlation menunjukkan nilai R=-977 yang artinya terdapat hubungan yang sangat erat antar variabel, nilai negative menunjukkan arah hubungan berkebalikan antar variabel yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin sedikit jumlah koloni yang tumbuh

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.

Dari Uji regresi linier didapatkan nilai Adjusted R Square(R^2) = 0.953 yang artinya persentase pengaruh pemberian ekstrak kulit lemon terhadap pertumbuhan Candida albicans adalah 95.3% sedangkan 4.7% dipengaruhi variabel perancu yang tidak diteliti. Faktor-faktor tersebut bisa merupakan akibat dari lama penyimpanan ekstrak atau akibat resistensi jamur itu sendiri.

BAB 6

PEMBAHASAN

Penelitian ini dimaksudkan untuk mengetahui efek antifungi ekstrak kulit lemon terhadap pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro*, serta untuk mengetahui berapa KHM dan KBM ekstrak kulit lemon terhadap penghambatan pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara *in vitro*. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode dilusi tabung (*tube dilution test*). Dengan metode ini akan diketahui Kadar Hambat Minimum (KHM) yang diamati dari tingkat kekeruhan tabung dilusi dan Kadar Bunuh Minimum (KBM) yang dilihat dari pertumbuhan koloni jamur pada *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) < 0,1 % *original inoculums.* Selain itu, dapat pula diketahui hubungan antara konsentrasi ekstrak kulit lemon terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans.*

Jamur yang digunakan dalam penelitian ini disediakan oleh Laboratorium Mikrobiologi FKUB. Jamur diidentifikasi dengan pewarnaan Gram dan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x. Pada pengamatan didapatkan sel ragi berwarna ungu yang menunjukkan sifat Gram positif. Uji *Germinating Tube* dilakukan untuk membedakan spesies *Candida albicans* dengan spesies *Candida* lainnya. Dengan uji *Germinating Tube*, didapatkan gambaran pseudohifa memanjang yang hanya didapati pada *Candida albicans*. Pengamatan secara makroskopis juga dilakukan dengan melihat pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans* pada *Sabouraud Dextrose Agar*. Pada

pengamatan makroskopis, terlihat koloni yang berwarna putih kekuningan pada *Sabouraud Dextrose Agar*. Pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans* juga mudah dikenali dengan aroma khas seperti tape (Suprihatin, 1982). Isolat tersebut kemudian dibuat biakan cair dengan standar kepadatan (1-5)x10^4 CFU/ml.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kulit lemon, diekstrak dengan metode ekstraksi *soxhlet* petroleum eter 96% karena dapat digunakan untuk sampel dengan tekstur yang lunak dan tidak tahan terhadap pemanasan secara langsung, pelarut yang digunakan lebih sedikit, pemanasannya dapat diatur, proses penyarinya sempurna, prosesnya cepat. Petroleum eter dipilih sebab bahan aktif yang diduga terdapat pada kulit lemon, yaitu golongan trepenoid, cenderung larut terhadap petroleum eter.

Penelitian ini dilakukan dalam dua tahap, tahap yang pertama *Candida albicans* ditumbuhkan dalam media cair yang dicampurkan dengan ekstrak kulit lemon dan inkubasi selama 24 jam untuk diamati kekeruhannya yang selanjutnya digunakan dalam menentukan KHM. Tahap yang kedua adalah penggoresan (*streaking*) pada medium SDA kemudian diinkubasi selama 24 jam untuk dihitung jumlah koloni dengan menggunakan colony counter yang selanjutnya digunakan untuk menentukan KBM

Konsentrasi ekstrak kulit lemon yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh berdasarkan penelitian pendahuluan yaitu dengan dosis 50%, 25%, 12,5%, 6,125%, 3,125%, 1,562% pada tanggal 14 Agustus 2012. Penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya dengan dosis 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, 4% pada tanggal 21 Agustus 2012. Penelitian lanjutan dari penelitian sebelumnya dengan dosis 0,25%, 0,5%, 0,75%, 1%, 1,25%, 1,5% pada tanggal 28 Agustus 2012. Dalam penelitian tersebut didapatkan konsentrasi akhir ekstrak kulit lemon 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7% dan 8%. Konsentrasi ekstrak kulit lemon

pada penelitian ini berdasarkan konsentrasi yang dapat memberikan hasil pertumbuhan terbaik yang masih dapat dihitung dengan kemampuan dan ketersediaan prasarana yang ada.

Dari hasil pengamatan pada tabung dapat ditentukan bahwa KHM ekstrak kulit lemon terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* adalah pada konsentrasi 4% sedangkan KBM didapatkan pada konsentrasi 8% karena pada konsentrasi ini tidak terdapat koloni jamur yang tumbuh. Dari hasil ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit lemon mempunyai aktifitas dalam menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans*, semakin besar konsentrasi ekstrak kulit lemon yang diberikan semakin besar pula daya hambat pada pertumbuhan *Candida albicans*, dimana pada konsentrasi 8% tidak didapatkan pertumbuhan *Candida albicans*.

Pada penelitian ini, hasil perhitungan jumlah koloni yang tumbuh pada medium SDA dianalisis dengan uji statistic One Way Anova, uji Post Hoc, Korelasi dan Regresi Linier menggunakan SPSS 17.

Uji statistik One Way Anova digunakan untuk mengetahui seberapa signifikan efek ekstrak kulit lemon terhadap pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans*. Dari uji ini didapatkan angka signifikansi 0.000 ($p < 0.05$) sehingga kesimpulan yang dapat diambil adalah ekstrak kulit lemon memberikan efek yang signifikan terhadap penghambatan pertumbuhan koloni jamur *Candida albicans*. Uji statistic Post Hoc digunakan untuk mengetahui kelompok pemberian konsentrasi mana yang berbeda dan mana yang tidak berbeda. Dari uji Post Hoc dapat disimpulkan bahwa semua konsentrasi tidak mempunyai perbedaan yang signifikan satu sama lainnya.

Uji Korelasi Pearson digunakan untuk mengetahui apakah ada hubungan antara konsentrasi ekstrak kulit lemon dengan jumlah koloni *Candida albicans.* Uji Korelasi menunjukkan nilai signifikansi 0.000 yang berarti terdapat hubungan

antara pemberian ekstrak kulit lemon terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. Kemudian hasil analisis menunjukkan nilai R=-977 yang artinya terdapatnya hubungan yang sangat erat antar variabel, nilai negatif menunjukkan konsentrasi ekstrak kulit lemon terhadap jumlah koloni *Candida albicans* yang bersifat berlawanan, dimana semakin tinggi konsentrasi kulit lemon maka semakin rendah jumlah koloni *Candida albicans*.

Uji Regresi Linier bertujuan untuk mengetahui bagaimana gambaran hubungan antara peningkatan konsentrasi ekstrak kulit lemon terhadap penurunan jumlah koloni. Dari Uji Regresi Linier didapatkan nilai Adjusted R Square (R^2) = 0.953 yang artinya persentase pengaruh pemberian ekstrak kulit lemon terhadap pertumbuhan *Candida albicans* adalah 95.3%, sedangkan 4,7% dipengaruhi variabel perancu yang tidak diteliti.

Kandungan kulit lemon tersusun oleh berbagai macam zat aktif, diantaranya *Limonene, β-pinene dan γ-terpinene* yang mempunyai sifat antimikotik. *Limonene* yang merupakan senyawa trepenoid yang terkandung didalam ekstrak kulit lemon dapat menghancurkan struktur-struktur pada dinding *Candida albicans*. Dinding sel *Candida albicans* yang bersifat antigenik ini sendiri berfungsi sebagai pelindung dari lingkungannya dan berperan pula pada penempelan serta pertumbuhan kolonisasi jamur (Katzer, 2002). Disamping *Limonene*, kulit lemon juga mengandung *β-pinene dan γ-terpinene*. Pada penelitian Pawar *et al* tahun 2011 melaporkan *β-pinene* memiliki aktivitas antifungi yang kuat terhadap *Candida albicans*. *β-pinene* dan *γ-terpinene* merupakan golongan terpenoid. Golongan terpenoid ini bekerja menghambat sintesa ergosterol yang terjadi pada membrane sel. Ergosterol merupakan salah satu komponen penting pada membrane sel (Dewi, 2008). Dengan demikian ekstrak kulit lemon melalui kandungan zat aktif yang terkandung didalamnya memiliki efek antimikotik terhadap *Candida albicans*.

Penelitian *British Pharmacopoeia, kulit lemon juga dapat dimanfaatkan sebagai aroma terapi yang dapat mengobati insomnia.* Penemuan lain monoterpene pada kulit lemon yang disebut limonene menunjukkan bahwa zat tersebut sangat berguna untuk mengatasi pertumbuhan abnormal pada kulit, meningkatkan pembentukan sel darah putih, dan sebagai antijamur. Berdasarkan penelitian terbaru, kandungan limonene juga dapat digunakan untuk membantu menurunkan kejadian *squamous cell carcinoma* pada kulit. (Herbal, 2006). Penelitian lain kulit lemon yang juga kaya kandungan sitrat diketahui dapat mencegah penggumpalan kalsium. Sehingga dapat mencegah terjadinya arteriosklerosis. Selain itu juga berlimpah kandungan serat berupa pectin yang baik untuk menurunkan kadar kolesterol dan trigliserida (Rahman, 2005).

Berdasarkan hasil penelitian dan analisa data diatas dapat disimpulkan bahwa ekstrak kulit lemon memiliki efek antijamur terhadap pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro*, semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit lemon semakin sedikit koloni jamur *Candida albicans* yang tumbuh.

Aplikasi klinis dari penelitian ini memang masih memerlukan penelitian lebih lanjut mengenai standarisasi bahan aktif apa saja yang dapat digunakan dan berapa konsentrasi yang efektif sebagai antijamur. Beberapa zat aktif yang berperan sebagai antifungi dalam kulit lemon masih belum diketahui interaksinya, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui kemungkinan efek sinergisnya atau antagonisnya.Penelitian untuk mengetahi konsentrasi masing-masing zat aktif yang terkandung didalam kulit lemon juga diperlukan agar dapat diperkirakan dosis yang aman untuk dikonsumsi manusia. Namun berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka ekstrak kulit lemon ini dapat digunakan secara langsung oleh masyarakat sebagai pengobatan alternative infeksi *Candida albicans* secara topical. Sedangkan penggunaan secara sistemik masih memerlukan penelitian lebih lanjut secara in

vivo pada hewan coba untuk meneliti efek farmakokinetik, efek farmakodinamik dan efek toksiknya.

Dengan melihat fakta hasil penelitian, dimana didapatkan penurunan jumlah koloni *Candida albicans* seiring dengan peningkatan konsentrasi dan diperkuat dengan adanya data bahwa kulit lemon mengandung bahan aktif yang memiliki daya antijamur, maka dapat disimpulkan ekstrak kulit lemon efektif dalam penghambatan pertumbuhan jamur *Candida albicans* secara *in vitro*.

BAB 7

PENUTUP

7.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian ini dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak kulit lemon memiliki efek terhadap penghambatan pertumbuhan *Candida albicans* secara *in vitro*yang ditunjukkan dengan :

a. KHM, dari hasil pengamatan penguji, semakin tinggi konsentrasi ekstrak, semakin kecil tingkat kekeruhan pada tabung dan konsentrasi 4% merupakan konsentrasi terkecil yang tidak menunjukkan kekeruhan pada tabung.
b. KBM, dari hasil perhitungan koloni, terjadi penurunan rata-rata jumlah koloni C.albicans seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak dan konsentrasi 8% merupakan konsentrasi terkecil yang tidak menunjukkan adanya pertumbuhan koloni.

7.2 Saran

Adapun saran yang penliti berikan dari penelitian ini adalah :

a. Diharapkan dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai efek kulit lemon dengan menggunakan metode selain ekstrak petroleum eter.
b. Perlu penelitian lebih lanjut tentang konsentrasi bahan-bahan aktif yang terkandung dalam kulit lemon yang bersifat antijamur sehingga dapat diperkirakan dosis yang aman untuk dikonsumsi manusia.

c. Perlu penelitian lebih lanjut tentang bagaimana efek antijamur kulit lemon terhadap *Candida albicans* secara *in vivo* pada hewan coba atau manusia baik secara topical atau sistemik.

DAFTAR PUSTAKA

Akpan,A., Morgan,R. 200 *Med Journal* (78) : 455-459.

Allen, CM. 1992.Diagnosing and managing oral candidiasis.*JADA* (123) : 77-82.

Cannon, RD. Haffin, Lajean. 2001 Candidiasis in pediatric patients with cancer internedin a university hospital W. Colonization is a crucial factor in oralcandidiasis. *J Dent Ed*: 785-786.

Chee *et al*. 2009. Antifungal Activity of Limonene against Trichophyton rubrum. *J Microbiology* 37 (3) : 243-246.

Choi,H.W. 2008. A Role for a Menthone Reductase in Resistance againstMicrobial Pathogens in Plants, (online), http://www.plantphysiol.org/cgi/content/full/148/1/383.Diakses tanggal 4 Desember 2010 Jam 20.30.

Daisy,P.,Mathew,S., Suveena, S., Rayan, N.A. 2008. A Novel Terpenoid From Elephantopus Scaber - Antibacterial Activity on Staphylococcus Aureus: A substiante Computational Approach. *International Journal of Biomedical Science* 4(3) :196-203.

Defever, K., Whelan,W., Rogers,A., Beneke,E., Veselenak, J., Soll, D. 1982. Candida Albicans Resistance to 5-Fluorocytosine: Frequency Of Partially Resistant Strains among Clinical Isolates.*Antimicrob. Agents Chemother.* (22): 810-815

De Kruijff, B. dan Demel, R.A. 1974. Polyene Antibiotic-Sterol Interactions in Membranes of Acholeplasma Laidlawaii Cells and Lecithin Liposomes. III. Molecular Structure of the Polyene Antibiotic-Cholesterol Complexes. *Biochim Biophys Acta* (339):57-70.

Dewi, Dian Puspita. 2008. *Pemisahan Minyak Atsiri Daun Kemangi (Ocimum basilicum) Secara Kromatografi Lapis Tipis dan Aktivitasnya Terhadap Malassezia Furfur In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro Semarang. 2008

Diasio, R., Bennett, J., Myers, C. 1978. Mode of Action of 5-Fluorocytosine.*Biochem.Pharmacol*(27):703-707.

Dzen, SM., Roekistiningsih., S, Santoso., S, Winarsih. 2003. *Bakteriologi Medik*.

Malang: Bayumedia Publishing.

Ethan, Russo MD. 2001. *Cannabis Thera* 59 *in HIV/ AIDS*. New York: Haword press.

Fothergill, W.A., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G. 1996. *an In Vitro Head-To-Head Comparison of Schering 5692, Amphotericin B, Fluconazole, and Itraconazole Against a Spectrum of Filamentous Fungi*. Washington D.C.: American Society for Microbiologyp. 115.

Fryberg, M. 1974. *Sterol Biosynthesis in Antibiotic-Resistant Yeast: Nystatin*. Arch. Biochem. Biophys. (160): 83-89.

Ganiswara, SG. 1995. *Farmakologi dan Terapi Edisi 4*. Jakarta: Bagian Farmakologi FKUI. Hal 560-570.

Geo F, Janet S & Stephen A. 2004. *Medical Microbiology*. 23th edition. New York: Mc Graw Hill 645.

Ghannoum, M.A. dan Rice, L.B. 1999.Antifungi Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance.*Clin Microbiol Rev.*12(4):501-517.

Gottleib, D.H., Carter, H.E., Sloneker, J.H., Ammann, A. 1958.Protection of Fungi Against Polyene Antibiotics by Sterols. *Science* 128:361-365.

Graybill, J.R., Montalbo, E., Kirkpatrick, W.R., Revankar, S., Rinaldi, M., Patterson, T. 1997. *Candida albicans*: *Less Predictable Than We May Think*.13th International Conference for Human and Animal Mycology.

Greenberg.2008. *Burket's Oral Medicine. 11th ed*. USA : PMPH. P.33-57,81-106.

Hata, K., J. Ueno, H. Miki, *et al*. 1995. *ER-30346, a Novel Antifungi Triazole. III. In Vitro Activity and the Mode of Action*. Washington D.C.: American Society for Microbiology.

Herbal. Manfaat Lemon ,(online), http://www.viable-herbal.com/singles/herbs/s777.htm.Diakses tanggal 5 Desember 2010 Jam 21.30.

Holt, R.J. 1980. *The Imidazoles*. Chichester: John Wiley & Sonsp. 107-148.

Holz, R.W. 1974. *The* Effects of the Polyene Antibiotics Nystatin and Amphotericin B on Thin Lipid Membranes.*Ann. N. Y. Acad*. *Sc*i. 235:469-479.

ICSBD. 1993. *Indonesian Country Study in Biological Diversity*. Jakarta: Ministry of State for Population and Environment.

Itoh, K., Okonagi, K., Tasaka, A., Hayashi, R., Tamura, N., Tsuchimori, N.,*et al*.. 1996. *a New Antifungi Triazole: Synthesis and Antifungi Activity*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.p. 112.

Jawetz, E. 1996 :*Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology)*. Terjemahan

oleh Edi Nugroho dan Maulany, edisi 20. Jakarta: EGC.

Jund, R. dan Lacroute, F. 1970. Genetic and Physiological Aspects of Resistance to 5-Fluoropyrimidines in Saccharomyces cerevisiae.*J. Bacteriol*.102:607-615.

Katzer, G. 2002. Lime [*Citrus aurantifolia,* (online), http://www-ang.kfunigraz.ac.at/~katzer/engl/Citr_aur.html. 4 p./ Diakses tanggal 11 Januari 2011 Jam 08.30 WIB.

Kerridge, D. 1980. *The Plasma Membrane of Candida Albicans and Its Role in the Action of Antifungi Drugs*. Cambridge: Cambridge University Press. p. 103.

Kerridge, D., Koh, T.Y., Marriott, M.S., Gale, E.F. 1985. *Microbiology and Plant Protoplasts*. London: Churchill Livingston. p. 23-38.

Klepser, M.E. 2001. *Antifungi Resistance among Candida Species.*Pharmacotherapy 21(8s). Michigan: Pharmacotherapy Publications, (online), http://www.medscape.com/viewarticle/412677. Diakses tanggal 15 Desember 2010 pukul 20.15 WIB.

Kreger van Rij, N.J.W. 1984.*The Yeast: aTaxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier SciencePubl.

Kurtz, M.B. 1997. *New Antifungi Drug Targets: a Vision for the Future*. ASM News 64:31-39.

Kurtz, M.B. dan Douglas, C.M. 1997.Lipopeptide Inhibitors of Fungal Glucan Synthase. *J. Med. Vet. Mycol*. 35:79-86.

Lampen, J.O., Arnow, P.M., Safferman, R.S. 1960. *Mechanism of Protection by Sterol Against Polyene Antibiotics*. J. Bacteriol. 80:200-206.

Langlais,R.P.2003.Color Atlas of Common Oral Diseases.USA: Lippicott Williams & Wilkins.p. 130 – 131.

Law, D. dan Denning, D. W. 1996. *In Vitro Activity of Schering 56592, Compared with Fluconazole and Itraconazole against Candida Spp.* Washington, D.C.: American Society for Microbiology.

Loekito, HH.1998. Rancangan Penelitian. Malang: Universitas Negeri Malang.

Luthana. 2009. Pembuatan Simplisia dan Ekstrak Bahan Alam, (online), http://www.scribd.com/doc/16766786/Pembuatan-Simplisia-dan-Ekstrak-Bahan-Alam. Diakses tanggal 14 Desember 2010 jam 18.00 WIB.

Maria PT, Roberta G, Fabio M, Maria SC, Laura F, Pier LC, Ivano M. The Inhibition of Candida albicans by selected essential oils and their major components. Mycopathologia 2005; 159: 339 – 345.

Martins, M.D., Rex, J.H. 1996.*Resistance to Antifungi Agents in the Critical Care Setting: Problems and Perspectives*. New Horizons 4:338-344.

Monica FG, Katya RK Glauco Plens, Marcelo MS, Eliania MP, Joao Carlos DR. *Oral manifestations during chemotherapy for acute lymphoblastic leukemia : a case report (abstract)*. Quintessence International 2005; 36(4) : 307-13.

Morton,J.F., 1987. Fruits of Warm Climates.Florida : Florida Flair Books.p.160-168.

Murray PR, *et al*. 1999. *Manual of Clinical Microbiology 7th edition*. American Society for Microbiology. P. 1165-1704.

Nakamura, T., Sakai, R., Sonada, J., Katoh, T., Kaneko, T., Horie, T.1995.*ER-30346, a Novel Antifungi Triazole. IV. Pharmacokinetic and Toxicological Studies in Mice, Rats, and Dogs*,.Washington, D.C.: American Society for Microbiology. p. 129.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral & Maxillofacial Pathology. 2nd ed. 2002. Philadelphia: WB Saunders.

Niescier, R.,Anthony, J.2000. The Effects of Terpenoid Percusor Toxicity on Escheria Coli, (online), http://www.usp.edu/research/researchday/abstractDetail.asp?id=437. Diakses tanggal 12 Desember 2010 Jam 20.00.

Nolte. A.W.,1982. *Oral Microbiologi*,4 ed, The C.V Mosby co,St Louis, Toronto, London h. 523- 32.

Norman, A.W., Demel, R.A., de Kruijff, B., Guerts-van Kessel, W.S.M, Van Deenen, L.L.M. 1972. *Studies on the Biological Properties of Polyene Antibiotics: Comparison of Other Polyenes with Filipin in Their Ability to Interact Specifically with Sterol*. Biochim. Biophys. Acta 290:1-14.

Odds, FC *et al*. Isolation of Candida species on media with and without added fluconazole reveals high variability in relative growth susceptibility phenotypes. *J Antimicrob Agents Chemother*.1997 August; 41(8): 1625–1635.

Parks, L.W. dan Casey, W.M. 1996. *Fungal Sterols*. Florida: CRC Press, Inc. p. 63-82.

Perfect, J. R. dan Schell, W.A. 1995. *In Vitro Efficacy of the Azole, SCH 56592, Compared to Amphotericin B, Fluconazole, and Itraconazole Versus Cryptococcus neoformans*.Washington, D.C.: American Society for Microbiology. p. 124.

Polak, A. and Scholer, H. 1975. *Mode of Action of 5-fluorocytosine and Mechanisms of Resistance.* Chemotherapia 21:113-130.

Rahman. 2005. Studies in natural product chemistry vol 17 structure and chemistry Elsevier science.

Roberts, B., Bray, J., Lewis, J, *et al*. 1996.*Biologi Molekuler Sel 2nd Ed*. Jakarta: BalaiPenerbit FKUI.

Rukmana, H. Rahmat, dkk. 2001. *Jeruk Lemon*. Kanisius : Yogyakarta.

National Agency for Export Development (NAFED). 2006. *Biodiverity, Traditional Medicine and Sustainablle Use of Indigenous Medicinal Plants in Indonesia* (Online). Kementrian Perdagangan Republik Indonesia. http://www.nafed.go.id/docs/featuredpublications/Export_Agustus_tradisional%20medicine_ok.pdf. Diakses tanggal 3 Desember 2010 jam 21.00.

Ryder, N. dan Favre, B. 1997.Antifungi activity and mechanism of action of terbinafine. Rev. Contemp. Pharmacother. 8:275-287.

Samaranayake LP. Nutritional factors and oral candidiasis. J Oral Pathol 1986;15:61–5.

Segal. 1994. *Pathogenic Yeast and Yeast Infections*. Tokyo: CRC Press Inc.

Sheehan, D.J.,Hitchcock, C.A.,Sibley, C.M. 1999.*Current and Emerging Azole Antifungi Agents*. Clin. Microbiol. Rev. 12:40-79.

Siar, C. H. , Kok, Ng Han., Rasool, Salik., Ram, Saravanan., A, Jalil A., Kee, Peng,. 2003. Oral candidosis non-hodgkin's lymphoma: a case report. *J Oral Sci* 45(3) : 161-4.

Silverman S, Luangjarmekorn L, Greenspan D. Occurrence of oral candida in irradiated head and neck cancer patients. J Oral Med 1984;39:194–6.

Suprihatin, S.D. 1992*. Candida dan Kandidiasis Pada Manusia*. FK UI: Jakarta,.

The Ohio State University, Temple University. *Oral candidiasis: current concepts in the diagnosis and management in the institutionalized elderly patient a review.* Dental Forum 2005; 2(33) : 65-70.

Titsworth, E. dan Grunberg, E. 1973.*Chemotherapeutic Activity of 5-Fluorocytosine and Amphotericin B Against Candida Albicans in Mice*. Antimicrob. Agents Chemother. 4:306-308.

Tjampakasari, C.R. 2006. *Karakteristik Candida albicans* (Online). Cermin Dunia Kedokteran151: 33. http://www.kalbe.co.id/files/cdk/files/13_151_KarakteristikBiologikCandidaAlbicans.pdf/13_151_KarakteristikBiologikCandidaAlbicans.html. Diakses tanggal 3 Desember 2010 Pukul 19.00 WIB.

Ulfah, Maria. 2007. Minyak Esensial Alternatif Pengganti Antibiotika, (online), http://netfarm.blogsome.com/2007/10/01/antibiotik-dan-ruminansia/. Diakses tanggal 11 Januari 2011. Jam 08.00.

Vanden Bossche, H., Marichal, H.P., Odds, F., Le Jeune, L., Coene, M.C. 1992.*Characterization of an Azole-Resistant Candida GlabrataIsolate*. Antimicrob. Agents Chemother. 36:2602-2610.

Voigt, Rudolf. 1994. *Buku Pelajaran Teknologi Farmasi.*Terjemahan VEB Verlag Volk & Gesundheit.Yogyakarta : Gadjah Mada University Press.

Whelan, W.L. 1987. *The Genetic Basis of Resistance to 5-Fluorocytosine in Candida Species and Cryptococcus neoformans*. Crit. Rev. Microbiol.15:45-56.

Wijiani, Nurul. 2009. *Pengaruh Penghambatan Ekstrak Buah Pare (Momordica charantia) terhadap Pertumbuhan Mycobacterium tuberculosis secara In Vitro.* Malang : Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.

Wirantara, Yoga. 2008. Candida Krusei, (online), http://mikrobia2.files.wordpress.com/2008/05/candida-krusei.pdf. Diakses tanggal 3 Januari 2011.Jam 19.30.

Zunt SL. *Oral candidiasis: diagnosis and treatment*. J Practical Hygiene 2000 : 31-6.

Zygmunt, W.A. dan Tavormina, P.A. 1966.*Steroid Interference with Antifungi Activity of Polyene Antibiotics*. Appl. Microbiol. 14:865-869.

Lampiran 1 Pernyataan Keaslian Tulisan

PERNYATAAN KEASLIAN TULISAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Rizqi Priasa Pamungkas

NIM : 0910743016

Program Studi : Program Studi Pendidikan Dokter Gigi

Fakultas Kedokteran Universitas

Brawijaya

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa Tugas Akhir yang saya tulis ini benar-benar hasil karya sendiri, bukan merupakan pengambilalihan tulisan atau pikiran orang lain yang saya akui sebagai tulisan atau pikiran saya sendiri. Apabila dikemudian hari dapat dibuktikan bahwa tugas akhir ini adalah hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Februari 2013

Rizqi Priasa Pamungkas

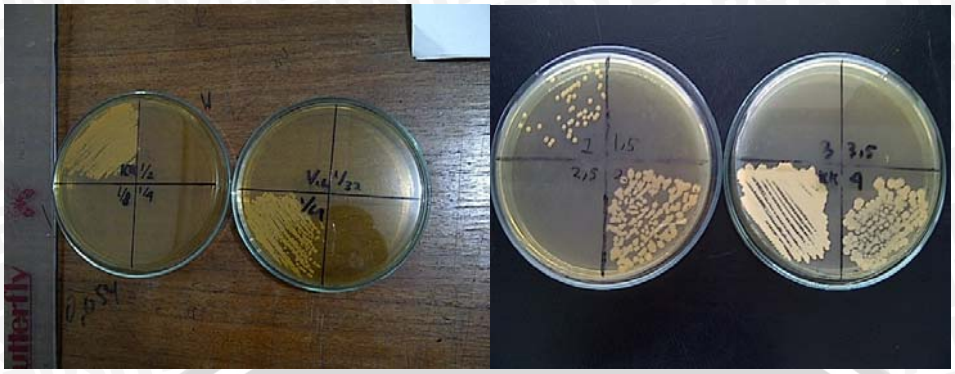
NIM 0910743016

Lampiran 2 Foto Alat yang Digunakan

Gambar Colony Counter

Gambar Spektrofotometer

Gambar Inkubator

Lampiran 3 Ekstrak Kulit Lemon (Citrus Limon L.)

Lampiran 4 Penelitian Pendahuluan