

BAB 2

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Kawis

Kawis merupakan tanaman yang termasuk suku jeruk-jerukan (*Rutaceae*) dengan nama latin *Limonia acidissima*, *Feronia elephantum*, *Feronia limonia*, *Hesperethusa crenulata*, atau *Schinus limonia*. Tanaman ini masih kerabat dekat dengan maja yakni sejenis jeruk-jerukan berasal dari Asia tropika dan subtropika. Persebaran tanaman kawis (*Limonia acidissima*) di dunia Internasional cukup luas, sehingga memiliki variasi nama seperti *olifantsappel* (Belanda), *elephant-apple*, *wood-apple* (Inggris), *bela* (Kanada), *kaitha*, *bilin* (Hindi), dan *kobit* (Arab) (Chitra, 2010; Eluru, 2012). Sedangkan di Indonesia, tanaman ini memiliki nama kawis (Sunda), kawista (Bali), kinco (Jawa), dan kabista (Madura) (Dewi, 2013).

2.1.1 Morfologi, Karakteristik, Habitat dan Khasiat

Tanaman kawis tumbuh alami pada daerah-daerah kering. Tanaman ini berupa pohon dengan tinggi 12 m. Kulit batangnya kasar, percabangannya ramping, dan ditumbuhi duri-duri yang tajam dan lurus, berdaun majemuk, menyirip dengan jumlah ganjil dan panjang mencapai 12 cm. Daun mengandung kantung-kantung minyak yang berbau aromatik bila diremas. Buah berbentuk bulat dengan diameter 10 cm. Cangkang buahnya tebal dan keras, berwarna putih keabuan. Daging buahnya berwarna merah kecoklatan menyerupai daging buah asam, beraroma khas, bisa dimakan, rasanya manis dan sedikit asam, memiliki banyak biji kecil dengan panjang 5-6 mm dan merambat (Sukamto, 2000).

Dahulu, tanaman ini berasal dari India terutama di daerah-daerah kering seperti Srilanka, Myanmar, dan Indo-China kemudian menyebar ke Malaysia dan Indonesia. Selain itu, Kawis (*Limonia acidissima*) cocok tumbuh di daerah yang beriklim monsun atau tropis pada ketinggian sampai 450 mdpl. Pohon ini banyak tumbuh di daerah pantai dan toleran terhadap kekeringan serta dapat beradaptasi baik pada tanah yang kurang subur (Sukamto, 2000). Setiap bagian dari pohon kawis (*Limonia acidissima*) memiliki manfaat bagi kehidupan masyarakat, antara lain kayunya yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan bangunan rumah dan peralatan pertanian. Kulit kayunya dapat digunakan sebagai antibakteri (Rahman and Gray, 2002). Getah yang berasal dari batangnya dapat digunakan sebagai obat untuk diare dan disentri (Qureshi *et al.*, 2010). Selain itu, daun kawis (*Limonia acidissima*) memiliki efek sebagai hepatoprotektif (Kamat *et al.*, 2006) dan daging buahnya memiliki aktivitas sebagai antihelmintik, antiinflamasi, antipiretik, dan analgesik (Ahmed *et al.*, 2008). Morfologi daun, batang, cangkang buah dan buah kawis (*Limonia acidissima*) disajikan pada Gambar 2.1



Gambar 2.1 Daun, batang, dan buah kawis (*Limonia acidissima*) (Vasant and Narasimhacharya, 2011)

2.1.2 Kandungan Zat Aktif dalam Kawis

Dalam hasil penelitian Ilango *et al.* pada tahun 2009 dinyatakan bahwa buah kawis mengandung flavonoid, glikosida, saponin, tanin, kumarin dan turunan tiramin. Selain berpotensi sebagai antioksidan buah kawis juga berpotensi sebagai antidiabetes serta daunnya sebagai hepatoprotektif. Kulit batang tanaman menghasilkan 2S-5,3-dihidroksi-4-metoksi-6, 6-dimetilkromeno-(7,8.2",3")-flavon bersama dengan beberapa senyawa alkaloid, kumarin, flavanon, lignan, sterol dan triterpen yang ditemukan memiliki aktivitas antimikroba (Dewi, 2013). Pada penelitian sebelumnya ditemukan bahwa hampir pada semua bagian tanaman kawis (*Limonia acidissima*) seperti daging buah, cangkang buah, batang, daun, dan bijinya sangat kaya dengan metabolisme sekunder. Adapun zat aktif tanaman kawis tersebut terdapat dalam Tabel 2.1

Tabel 2.1 Zat Aktif Kawis (*Limonia acidissima*) (Thomas dan Ponnammal, 2005)

No.	Fitokimia	Batang	Daun	Cangkang Buah	Daging Buah	Biji
1.	Alkaloid	+++	++	+++	+	+
2.	Flavonoid	-	-	-	++	+
3.	Saponin	+++	+++	++	+++	++
4.	Tanin	+	+	-	++	+
5.	Fenol	+++	+++	-	-	-
6.	Getah	++	-	+	++	++
7.	Minyak	-	+++	-	+++	+++

Keterangan:

- : Tidak ada
- + : Sedikit
- ++ : Sedang
- +++ : Banyak

Dari Tabel 2.1 dapat dilihat bahwa kandungan saponin tanaman kawis terdapat pada semua bagian tanaman. Alkaloid lebih banyak dikandung pada batang dan cangkang buah. Flavonoid hanya terdapat pada daging buah dan biji.

Fenol hanya ditemukan pada batang dan daun. Sedangkan tanin dikandung oleh batang, daun, dan biji buahnya (Thomas dan Ponnammal, 2005).

2.1.3 Alkaloid

Alkaloid adalah salah satu golongan organik yang berasal dari tumbuh-tumbuhan. Ada sekitar 40 famili tumbuh-tumbuhan atau sekitar 14% dari jumlah *family* tumbuhan yang diketahui mengandung alkaloid. Senyawa ini memberi kontribusi terbesar dalam bidang farmasi. Senyawa ini mengandung satu atau lebih atom nitrogen heterosiklik yang bersifat basa. Alkaloid berfungsi sebagai antijamur. Adapun mekanisme kerjanya adalah dengan cara merusak membran sel jamur (Harnas, 2012). Dan dapat diketahui juga Mekanisme kerja alkaloid sebagai antijamur diprediksi melalui penghambatan sintesis dinding sel yang menyebabkan sel akan mengalami lisis, sehingga sel akan mati (Lamothe *et al.*, 2009).

2.1.4 Saponin

Saponin adalah metabolit sekunder yang terdapat dalam berbagai macam spesies tumbuhan. Saponin disimpan dalam sel tumbuhan sebagai prekursor inaktif tetapi dengan segera bisa diubah menjadi antimikroba yang aktif secara biologik oleh enzim sebagai bentuk reaksi terhadap serangan patogen. Saponin adalah senyawa terglisosilasi yang tersebar pada kingdom tumbuhan dan dibagi ke dalam tiga kelompok, yakni triterpenoid, steroid, dan steroidal glikoalkaloida. Saponin mempunyai tingkat toksisitas yang tinggi melawan jamur. Mekanisme kerja saponin sebagai antijamur berhubungan dengan interaksi saponin dengan sterol membran sel jamur (Faure, 2002).

2.2 Metode Ekstraksi Senyawa Aktif Bahan Alam

Ekstraksi adalah penyarian zat-zat aktif dari bagian tumbuhan, hewan dan beberapa jenis biota laut. Zat-zat aktif terdapat didalam sel namun sel tanaman dan hewan berbeda demikian pula dengan ketebalannya, sehingga diperlukan metode ekstraksi dengan pelarut tertentu dalam mengekstraksinya. Tujuan ekstraksi bahan alam adalah menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam. Ekstraksi ini didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut. Untuk mengekstraksi senyawa kimia yang ada dalam tumbuhan terlebih dahulu bahan dikeringkan kemudian dihaluskan dengan derajat halus tertentu lalu diekstraksi dengan pelarut yang sesuai. Untuk mendapatkan sari yang kental dapat dilakukan dengan menguapkan hasil ekstraksi dengan bantuan *rotary evaporator*. Pelarut untuk ekstraksi terdiri atas, pelarut non polar, seperti N-heksan, diklorometan, kloroform, benzena, dietil eter. Pelarut polar seperti air, metanol, etanol. Dan terdapat pelarut semipolar seperti aseton, etil asetat, dan lain-lain (Ansel, 2008). Tekhnis ekstraksi bahan alam yang sering dilakukan adalah ekstraksi secara panas dengan cara refluks, sokletasi, digesti, infus, dekok dan ekstraksi secara dingin dengan cara maserasi dan perkolasi (Hamdani, 2011):

a. Maserasi

Maserasi adalah proses pengekstrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan (kamar). Maserasi kinetik berarti dilakukan pengadukan yang kontinu (terus menerus). Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya. Pengekstrakan

dengan cara ini dapat menarik zat-zat yang tahan terhadap pemanasan maupun tidak.

b. Perkolasi

Proses penyarian simplisia dengan melewati pelarut secara lambat pada simplisia dalam suatu perkolator, yang umumnya dilakukan dalam suhu ruangan. Tujuan perkolasi ialah untuk menarik senyawa aktif dan biasanya dilakukan untuk senyawa aktif yang tahan ataupun tidak tahan pemanasan.

c. Refluks

Bahan yang akan diekstraksi direndam dengan cairan penyari dalam labu alas bulat yang dilengkapi dengan alat pendingin tegak, lalu dipanaskan sampai mendidih. Cairan penyari akan menguap, uap tersebut akan diembungkan dengan pendingin tegak dan akan kembali menyari zat aktif dalam simplisia tersebut, demikian seterusnya. Ekstraksi ini biasanya dilakukan 3 kali dan setiap kali diekstraksi selama 4 jam.

d. Sokletasi

Ekstraksi dengan cara ini pada dasarnya ekstraksi secara berkesinambungan. Cairan penyari dipanaskan sampai mendidih. Uap penyari akan naik melalui pipa samping, kemudian diembungkan lagi oleh pendingin tegak. Cairan penyari turun untuk menyari zat aktif dalam simplisia. Selanjutnya bila cairan penyari mencapai sifon, maka seluruh cairan akan turun ke labu alas bulat dan terjadi proses sirkulasi. Demikian seterusnya sampai zat aktif yang terdapat dalam simplisia tersari seluruhnya yang ditandai jernihnya cairan yang lewat pada tabung sifon.

e. Digesti

Digesti adalah maserasi kinetik (dengan adanya pengadukan kontinu) pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur ruangan (kamar), ssecara umum dilakukan pada temperatur 40-50° C.

f. Infus

Infus adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 96-98°C) selama waktu tertentu (15-20 menit).

g. Dekok

Dekok adalah infus pada waktu yang lebih lama dengan temperatur pada titik didih air.



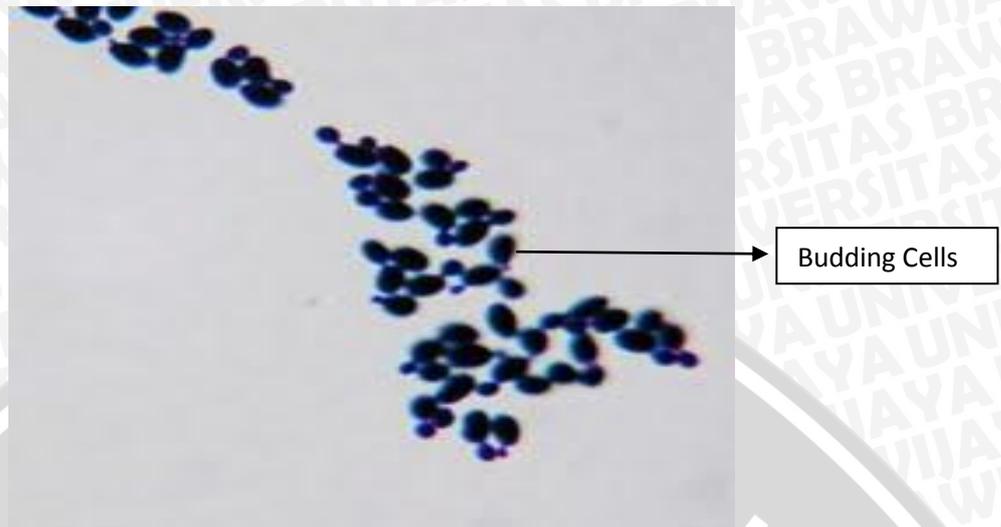
2.3 *Candida albicans*

2.3.1 Taksonomi

Kingdom	:	Fungi
Phylum	:	Ascomycota
Subphylum	:	Saccharomycotina
Class	:	Saccharomycetes
Ordo	:	Saccharomycetale
Family	:	Saccharomycetaceae
Genus	:	<i>Candida</i>
Spesies	:	<i>Candida albicans</i>
Sinonim	:	<i>Candida stellatoidea</i> (Kayser et al., 2003)



Gambar 2.2. Koloni *Candida albicans* penanaman pada SDA (Yuri, 2010)



Gambar 2.3 *Budding Cells Candida albicans* pada Pewarnaan Gram pembesaran 1000X (Yuri, 2010)

2.3.2 Morfologi

Candida albicans merupakan jamur dimorfik karena kemampuannya untuk tumbuh dalam dua bentuk yang berbeda yaitu sebagai sel tunas yang akan berkembang menjadi blastospora dan menghasilkan kecambah yang akan membentuk hifa semu. Perbedaan bentuk ini tergantung pada faktor eksternal yang mempengaruhinya. Sel ragi (blastospora) berbentuk bulat, lonjong atau bulat lonjong dengan ukuran $2-5 \mu \times 3-6 \mu$ hingga $2-5,5 \mu \times 5-28 \mu$. *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 (Magdalena, 2009).

2.3.3 Identifikasi *Candida albicans*

2.3.3.1 Karakteristik

Beberapa spesies *Candida*, seperti *Candida albicans*, bisa diidentifikasi dengan mudah, dengan mengamati karakteristik dasar pertumbuhannya, karakteristik morfologi, bukti metabolit dan biokimianya dan dengan kit komersial yang bias mengevaluasi asimilasi karbohidrat dan raksi fermentasi dan mampu menentukan identifikasi spesies *candida* yang diisolasi dalam waktu 2–4 hari (Kayser *et al.*, 2003; Vazquez and Sobel, 2003).

2.3.3.2 Pewarnaan Gram

Pada pemeriksaan mikroskopis dengan pengecatan gram, ditemukan *candida albicans*, sebagai berikut, yeast, berbentuk oval dengan ukuran 4–6 μ , dan berdinding sel tipis. Sering ditemukan pseudohifa gram positif dan kadang mycelia bersepta (Kayser *et al.*, 2003).

2.3.3.3 Uji Produksi Germ Tube

Germ tube merupakan istilah untuk menyebut proyeksi hifa pada awal siklus sel sbelum septasi (Suzuki *et al.*, 2000). Cara cepat identifikasi *Candida albicans* bisa dilakukan dengan uji produksi germ tube, walaupun tidak spesifik (Vazquez and Sobel, 2003). Uji ini dilakukan dengan cara, menumbuhkan jamur dalam serum pada suhu 37⁰ C dan mengamati pertumbuhan proyeksi kecil dinding sel yang berkembang setelah masa inkubasi, sekitar 60–90 menit.

2.3.4 Patogenitas dan Virulensi

Pada manusia, *Candida albicans* sering ditemukan di dalam mulut, feses, kulit dan di bawah kuku orang sehat. *Candida albicans* dapat membentuk blastospora dan hifa, baik dalam biakan maupun dalam tubuh. Bentuk jamur di dalam tubuh dianggap dapat dihubungkan dengan sifat jamur, yaitu sebagai

saproba tanpa menyebabkan kelainan atau sebagai parasit patogen yang menyebabkan kelainan dalam jaringan. Penyelidikan lebih lanjut membuktikan bahwa sifat patogenitas tidak berhubungan dengan ditemukannya *Candida albicans* dalam bentuk blastospora atau hifa di dalam jaringan. Terjadinya kedua bentuk tersebut dipengaruhi oleh tersedianya nutrisi, yang dapat ditunjukkan pada suatu percobaan di luar tubuh. Pada keadaan yang menghambat pembentukan tunas dengan bebas, tetapi yang masih memungkinkan jamur tumbuh, maka dibentuk hifa (Cotter and Kavanagh, 2000).

2.3.5 Gambaran Klinis

Beberapa gambaran klinis penyakit pada organ-organ tubuh yang disebabkan oleh *Candida albicans* adalah sebagai berikut:

A. Mulut

Salah satu penyakit mulut yang disebabkan oleh *Candida albicans* adalah *thrush*. Infeksi ini terjadi pada selaput mukosa pipi bagian dalam, lidah, palatum mole dan permukaan rongga mulut yang lain dan tampak sebagai bercak-bercak (pseudomembran) putih coklat muda kelabu yang sebagian besar terdiri atas pseudomiselium dan epitel yang terkelupas, dan hanya terdapat erosi minimal pada selaput. Lesi dapat terpisah-pisah dan tampak seperti kepala susu dan rongga mulut. Bila pseudomembran terlepas dari dasarnya tampak daerah yang basah dan merah. Selain itu, penyakit lainnya adalah *perleche* yaitu lesi berupa fisur pada sudut mulut, lesi ini mengalami maserasi, erosi, basah dan dasarnya eritematosa (Magdalena, 2009).

B. Genitalia Wanita (vulvovaginitis)

Candida albicans penyebab yang paling sering dari vulvovaginitis. Hilangnya pH asam merupakan predisposisi timbulnya vulvovaginitis

candida. Dalam keadaan normal pH yang asam dipertahankan oleh bakteri vagina. Vulvovaginitis menyerupai sariawan tetapi menimbulkan iritasi, gatal yang hebat dan pengeluaran sekret. Fluor albus pada kandidosis vagina berwarna kekuningan. Tanda khas ialah disertai gumpalan-gumpalan sebagai kepala susu berwarna putih kekuningan. Gumpalan tersebut berasal dari massa yang terlepas dari dinding vulva atau vagina atas bahan nekrotik, sel-sel epitel dan jamur (Kuswadi, 2010).

C. Genitalia Pria (Balanitis atau balanopostitis)

Penderita mendapat infeksi karena kontak seksual dengan wanitanya yang menderita vulvovaginitis. Lesi berupa erosi, pustule dengan dindingnya yang tipis, biasanya menginfeksi glans penis dan sulkus koronarius glandis.

D. Kulit (kandidiasis kutis)

Kandidiasis kulit yang terdapat pada lapisan terluar kulit, merupakan bentuk yang paling sering dari infeksi candida. Pada kebanyakan kasus tidak bersifat invasif atau mengancam nyawa. Infeksi kulit terutama terjadi pada bagian-bagian tubuh yang basah, hangat seperti ketiak, lipatan paha, skrotum, atau lipatan-lipatan di bawah payudara. Infeksi paling sering terdapat pada orang gemuk dan diabetes. Daerah-daerah itu menjadi merah dan mengeluarkan cairan dan dapat membentuk vesikel. Infeksi candida pada kulit antara jari-jari tangan paling sering terjadi bila tangan direndam cukup lama dalam air secara berulang kali, ini terjadi pada pembantu rumah tangga, tukang masak, pengurus sayuran dan ikan (Kuswadi, 2010)

2.4 Antijamur

2.4.1 Definisi

Antijamur adalah suatu bahan yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme jamur. Pemakaian bahan antijamur merupakan suatu usaha untuk mengendalikan jamur yaitu berupa menghambat, membasmi, atau menyingkirkan jamur. Tujuan utama pengendalian jamur untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi jamur pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan, serta kerusakan oleh jamur. Ada beberapa hal yang harus dipenuhi oleh suatu bahan antijamur, seperti mampu mematikan jamur, mudah larut dan bersifat stabil, tidak bersifat racun bagi manusia dan hewan, tidak bergabung dengan bahan organik, efektif pada suhu kamar dan suhu tubuh, tidak menimbulkan karat dan warna, berkemampuan menghilangkan bau yang kurang sedap, murah dan mudah didapat (Angriawin, 2012).

2.4.2 Mekanisme Kerja Antijamur

Mekanisme antijamur dapat dikelompokkan sebagai berikut:

- 1) gangguan pada membran sel, gangguan ini terjadi karena adanya ergosterol dalam sel jamur, ini adalah komponen sterol yang sangat penting sangat mudah diserang oleh antibiotik turunan polien. Kompleks polien-ergosterol yang terjadi dapat membentuk suatu pori dan melalui pori tersebut konstituen esensial sel jamur seperti ion K, fosfat anorganik, asam karboksilat, asam amino dan ester fosfat bocor keluar hingga menyebabkan kematian sel jamur. Penghambatan biosintesis ergosterol dalam sel jamur, mekanisme ini merupakan mekanisme yang disebabkan oleh senyawa turunan imidazol karena mampu menimbulkan ketidakteraturan membran sitoplasma jamur dengan cara mengubah

permeabilitas membran dan mengubah fungsi membran dalam proses pengangkutan senyawa–senyawa essensial yang dapat menyebabkan ketidakseimbangan metabolik sehingga menghambat pertumbuhan atau menimbulkan kematian sel jamur (Hakim, 2009).

- 2) Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein jamur merupakan mekanisme yang disebabkan oleh senyawa turunan pirimidin. Efek antijamur terjadi karena senyawa turunan pirimidin di metabolisme dalam sel jamur menjadi suatu bahan antimetabolit. Metabolit antagonis tersebut kemudian bergabung dengan asam ribonukleat dan kemudian menghambat sintesis asam nukleat dan protein jamur.
- 3) Penghambatan mitosis jamur, efek antijamur ini terjadi karena adanya senyawa antibiotik griseofulvin yang mampu mengikat protein mikrotubuli dalam sel, kemudian merusak struktur spindle mitotic dan menghentikan metafasa pembelahan sel jamur (Hakim, 2009).

2.4.3 Uji Aktivas Antijamur Secara *In Vitro*

Aktivitas antijamur diukur secara *in vitro* agar dapat ditentukan potensi suatu zat antijamur dalam larutan, konsentrasi dalam cairan badan dan kepekaan suatu jamur terhadap konsentrasi obat-obat yang dinilai. Pengukuran aktivitas anti mikroba dapat dilakukan dengan dua metode:

A. Metode Dilusi

Prinsip dari metode ini adalah pengenceran antijamur sehingga diperoleh beberapa konsentrasi obat dicampur dengan media agar lalu ditanami jamur dan diinkubasi. Pada metode ini yang diamati adalah ada atau tidaknya pertumbuhan jamur, dengan cara menghitung jumlah koloni, cara dilusi ini dapat digunakan untuk menentukan Kadar Hambatan Minimum atau

Kadar Bunuh Minimum (KHM/KBM). Metode dilusi dibagi menjadi dua yaitu dilusi tabung dan dilusi agar.

Metode dilusi tabung (*tube dilution test*) dikerjakan dengan menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi medium cair dengan menggunakan konsentrasi 10^6 CFU/ml sel jamur yang akan diuji. Kemudian masing-masing tabung ini diisi dengan antijamur yang telah diencerkan secara serial. Selanjutnya seri tabung diinkubasikan pada suhu 37°C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah antijamur pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakkan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan jamur) adalah KHM dari antijamur. Selanjutnya biakkan dari semua tabung yang jernih diinokulasikan pada medium *agar* padat (*streaking* satu ose jamur dari masing-masing konsentrasi ke *plate* yang berbeda), diinkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni jamur yang tumbuh. Konsentrasi terendah antijamur pada biakkan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni jamur adalah KBM dari obat terhadap jamur uji. Untuk menentukan KHM obat, dapat juga dengan menggunakan medium *agar* padat yang disebut dengan metode *E test* (Dzen *et al.*, 2003).

Metode dilusi yang kedua adalah dilusi agar (*agar dilution test*). Metode ini dilakukan jika KHM tidak dapat ditemukan dengan menggunakan dilusi tabung. Pada metode ini, konsentrasi antijamur dicampur dengan *agar* dalam *plate*, setiap *plate* untuk satu konsentrasi. Cara melakukan metode ini adalah dengan mengencerkan antijamur untuk mendapatkan konsentrasi tertentu kemudian dicampur dengan medium *agar* hangat dan diletakkan pada *plate*. Kedua bahan yang dicampur tersebut ditunggu beberapa saat

hingga menjadi padat. Jamur dengan konsentrasi 1×10^2 CFU/ml ditetaskan pada *plate* yang berisi campuran antijamur dan medium *agar*. Selanjutnya, diinkubasikan pada suhu 37°C dan diamati pertumbuhan koloni jamur setelah 18–24 jam. Konsentrasi terendah yang menunjukkan tidak lebih dari satu atau dua CFU atau sedikit pertumbuhan disebut KHM. Metode ini memiliki kelebihan yaitu dapat menguji satu atau lebih jamur terisolasi pada setiap *plate* dengan satu konsentrasi antijamur yang sama. Namun, kekurangannya adalah metode ini tidak dapat digunakan untuk menentukan nilai KBM (Forbes, 2007).

B. Metode Difusi

Pada metode ini yang diamati adalah diameter daerah hambatan pertumbuhan kuman karena difusinya obat ini titik awal pemberian ke daerah difusi sebanding dengan kadar obat yang diberikan. Metode ini dilakukan dengan cara menanam kuman pada media *agar* padat tertentu kemudian diletakkan kertas samir atau disk yang mengandung obat atau juga dibuat sumuran kemudian diisi obat.

Pembacaan hasil dilakukan setelah diinkubasi 18-24 jam. Dalam metode ini dikenal dua pengertian yaitu zona radikal dan zona irradikal. Zona radikal yaitu suatu daerah disekitar disk atau sumuran di mana sama sekali tidak ditemukan adanya pertumbuhan jamur. Sedang zona irradikal adalah suatu daerah di sekitar disk atau sumuran di mana pertumbuhan jamur dihambat oleh antijamur, tetapi tidak mematikan hanya terlihat pertumbuhan jamur yang kurang subur dibanding dengan di luar pengaruh obat tersebut (Pranoto *et al*, 2012).