

AKTIVITAS EKSTRAK ETANOL DAN FRAKSI AKAR SINGAWALANG (*Petiveria alliacea* L.) TERHADAP JAMUR PENYEBAB KETOMBE DENGAN METODE *BROTH MICRODILUTION*

Niken Indriyanti¹⁾, I Ketut Adnyana dan Elin Yulinah Sukandar²⁾

Fakultas Farmasi Universitas Mulawarman, Samarinda¹⁾
KK Farmakologi-Farmasi Klinik Sekolah Farmasi Institut Teknologi Bandung²⁾

ABSTRACT

Dandruff was an anomaly of scalp caused by abnormal growth of Pityrosporum ovale. Ketoconazole and sulfuric compounds known as antifungal, include antifungal against Pityrosporum ovale. One of medicinal plant that has polysulfide compounds was Singawalang (Petiveria alliacea L.). Activity of ethanol extract and fraction of singawalang roots tested using microdilution broth method appropriate to Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) standard, then growth profiles determined by colony count. Microdilution test results showed that Singawalang roots extract has antifungal activity against Pityrosporum ovale with Minimum Inhibition Concentration (MIC) 16 µg/mL and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) 64 µg/mL. Fraction that has highest activity against Pityrosporum ovale was n-hexane fraction of Singawalang roots with MIC 16 µg/ml dan MFC 128 µg/mL. The higher activity of the extract predicted that there were some polysulfide compounds have synergic activity.

Key words : *singalawang roots, polysulfide, Pityrosporum ovale*

ABSTRAK

Ketombe adalah suatu keadaan anomali pada kulit kepala disebabkan jamur *Pityrosporum ovale* dalam jumlah diatas normal. Selama ini antijamur yang digunakan adalah ketokonazol. Selain itu, senyawa sulfur juga diketahui aktif terhadap jamur. Salah satu tanaman yang telah diteliti mengandung senyawa polisulfida adalah tanaman singawalang (*Petiveria alliacea* L.). Penelitian aktivitasnya terhadap *Pityrosporum ovale* dilakukan dengan *Broth Microdilution* sesuai standar Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) terkecil ada pada ekstrak dan fraksi *n*-heksan, yaitu 16 µg/mL, seperempat dari aktivitas ketokonazol. Konsentrasi Fungisidal Minimum (KFM) terkecil ekstrak adalah 64 µg/mL, dan pada fraksi *n*-heksan ekstrak etanol akar singawalang dengan konsentrasi 128 µg/mL. Diduga aktivitas antijamur lebih kuat pada ekstrak karena adanya kombinasi aktivitas beberapa senyawa polisulfida yang bekerja sinergis.

Kata kunci : *Akar singawalang, polisulfida, Pityrosporum ovale*

PENDAHULUAN

Iklim Indonesia yang panas lembab menyebabkan infeksi jamur sangat mudah terjadi. Salah satunya adalah ketombe. Ketombe adalah suatu keadaan anomali pada kulit kepala, yang dikarakterisasi dengan terjadinya pengelupasan lapisan tanduk secara berlebihan dari kulit kepala membentuk sisik-sisik yang halus. Pada ketombe, ditemukan jamur *Pityrosporum ovale* dalam jumlah banyak. Sebenarnya jamur *Pityrosporum ovale* merupakan flora normal pada kulit kepala. Pada kondisi normal, kecepatan pertumbuhan jamur *Pityrosporum ovale* kurang dari 47 %. Akan tetapi, jika ada faktor pemicu yang dapat mengganggu kesetimbangan flora normal pada kulit kepala, maka akan terjadi peningkatan kecepatan pertumbuhan jamur *Pityrosporum ovale* yang dapat mencapai 74 %. Banyaknya populasi *Pityrosporum ovale* inilah yang memicu terjadinya ketombe (Sukandar, 2006). *Pityrosporum ovale* adalah mikroorganisme penyebab ketombe. *Pityrosporum ovale* mendapat nutrisi dari lipid dermal dan protein dan memfasilitasi aktivitas lipase, melepaskan *proinflammatory free fatty acid* sehingga menimbulkan inflamasi dan kerusakan jaringan. *Pityrosporum ovale* melepas zat kimia toksik yang berperan dalam infeksi jamur (Ravichandran, 2004). Sampai saat ini, antijamur yang digunakan untuk mengatasinya adalah ketokonazol, suatu obat sintetik.

Indonesia memiliki banyak jenis tanaman berkhasiat yang salah satunya dapat digunakan sebagai antijamur alami. Tanaman singawalang (*Petiveria alliacea*) merupakan salah satu tanaman dalam famili Phytolaccaceae (gandola-gandolaan). Tanaman obat ini telah diuji aktivitasnya terhadap beberapa mikroba. Daun singawalang telah diteliti pada beberapa penelitian dan tidak menunjukkan

efek antijamur. *Petiveria alliacea* memiliki banyak komponen biokimia aktif termasuk benzaldehid, asam benzoat, benzyl-2-hydroxyethyl-trisulphide, coumarin, isoarborinol, isoarborinol acetate, isoarborinol cinnamate, isothiocyanates, polyphenols, senfol, tanin, dan trithiolaniacine (Wikipedia.org/wiki/*Petiveria alliacea*).

Kandungan kimia yang diteliti aktivitas antijamurnya oleh Benevides (2001) telah diisolasi dari akar Singawalang adalah dipropyl disulphide, dibenzyl sulphide, dibenzyl disulphide, dibenzyl trisulphide, dibenzyl tetrasulphide, benzylhydroxymethyl sulphide dan di(benzyltrithio) methane. Berdasarkan penelitian tersebut, dilakukan penelitian aktivitas akar singawalang terhadap jamur penyebab ketombe, yaitu *Pityrosporum ovale*. Tujuan penelitian adalah mengetahui aktivitas akar singawalang terhadap jamur penyebab ketombe.

METODE

Bahan.

Akar singawalang, etanol, aquades, *Potato Dextrose Broth* (PDB), *Potato Dextrose Agar* (PDA), minyak zaitun, NaCl 0,9% steril, dimetilsulfoksid (DMSO), ketokonazol

Alat.

Gelas piala, labu Erlenmeyer, rak tabung, batang pengaduk, gelas ukur, pipet tetes, pipet ukur, pipet volume, mikropipet 100 μ L, 5-50 μ L, 10 μ L, cawan petri, jarum ose, bunsen, pelat mikro 96 lubang, tabung reaksi, tip, vial, eppendorf, sudip, oven, vortex, otoklaf, inkubator, kuvet, spektrofotometer.

4. Metode

Pembuatan standar McFarland

Dicampurkan 0,5 mL BaCl₂ 0,048 mol/L (1,175 %b/v) BaCl₂.2H₂O) dan 99,5 mL H₂SO₄ 0,18 mol/L (1%v/v), diaduk campuran sampai homogen. Digunakan tabung bertutup dengan ukuran sama dengan yang digunakan untuk pembuatan inokulum jamur, aliquot 4-6 mL tiap tabung. Tabung disimpan di tempat gelap pada suhu ruangan. Validasi kekeruhan standar McFarland dilakukan dengan OD dan *colony count*. *Optical density* (OD) dibaca dengan standar dengan spektrofotometer dengan 1-cm *light path* dengan kuvet yang sesuai. Absorbansi diukur pada 530 nm (OD harus berada diantara 0,08 sampai 0,10). Setengah standar McFarland setara dengan 1-5 x 10⁶ yeast/mL (density yang direkomendasikan oleh CLSI untuk stok inokulum jamur).

Pengujian Broth Microdilution

Sebanyak 100 µL nutrient broth dimasukkan dalam pelat mikro pada kolom pertama (sebagai kontrol negatif). Suspensi jamur sebanyak 5 µL ditambahkan ke dalam 10 mL nutrient broth kemudian diaduk dengan alat vortex. Sebanyak 100 µL campuran tersebut dimasukkan dalam pelat mikro pada kolom kedua sampai kedua belas. Pada kolom kedua belas, ditambahkan 100 µL larutan antibiotik / ekstrak dengan konsentrasi tertentu kemudian dihomogenkan. Dari kolom kedua belas, diambil 100 µL kemudian dipindahkan ke kolom kesebelas. Pengenceran terus dilakukan sampai pada kolom ketiga yang akan memiliki konsentrasi terkecil. Pelat diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 x 24 jam kemudian diamati bagian yang jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba). Konsentrasi

terkecil di mana tidak terlihat pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai MIC.

Sebanyak 5 µL aliquot dari setiap bagian yang jernih dipindahkan dalam nutrient agar dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 x 24 jam kemudian diamati. Konsentrasi terendah di mana tidak terlihat adanya pertumbuhan mikroba ditetapkan sebagai *minimum fungicidal concentration* (MFC) atau Konsentrasi Fungisidal Minimum (KFM).

HASIL DAN PEMBAHASAN

Pengujian adanya aktivitas antijamur *Pityrosporum ovale* pada ekstrak akar singawalang dilakukan dengan metode mikrodilusi yang merupakan metode standar *Clinical and Laboratory Standard Institute*. Pada pengujian ini digunakan pelat mikro 96 well bertutup yang memungkinkan pengujian aktivitas antijamur dalam satu seri konsentrasi secara bersamaan. Suspensi mikroba dibuat secara aseptis dengan konsentrasi terukur menggunakan setengah standar McFarland. Konsentrasi ekstrak yang digunakan sebagai stok awal adalah 2048 ppm, dibuat secara aseptis sesaat sebelum dilakukan pengujian.

Obat pembanding yang digunakan adalah ketokonazol, karena Ketokonazol adalah derivat imidazol, merupakan senyawa azol dan digunakan sebagai antijamur. Aktivitas antijamur obat-obat azol dihasilkan dari pengurangan sintesis ergosterol melalui penghambatan enzim-enzim sitokrom P450 jamur. Obat-obat azol spesifik karena afinitasnya lebih besar terhadap jamur daripada terhadap manusia (Katzung, 2004). Ketokonazol dapat digunakan untuk dermatofitosis, kandidiasis kutan, pityriasis dan ketombe.

Aktivitas Ekstrak Etanol Dan Fraksi Akar Singawalang (*Petiveria alliacea L.*) Terhadap Jamur Penyebab Ketombe Dengan Metode Broth Microdilution

Tabel 1. Hasil uji aktivitas antijamur ekstrak etanol akar singawalang dan ketokonazol

Sampel	KHM ($\mu\text{g/mL}$)	KFM ($\mu\text{g/mL}$)
Ekstrak etanol akar singawalang	16	64
Ketokonazol (pembanding)	4	32

Pada pengujian ekstrak didapatkan hasil berupa konsentrasi hambat minimum (KHM) sebesar 16 ($\mu\text{g/mL}$), empat kali lebih besar dari KHM ketokonazol. Sedangkan Konsentrasi Fungisidal Minimum (KFM) ekstrak etanol akar singawalang sebesar 64 ($\mu\text{g/mL}$), dua kali dari KFM ketokonazol.

Hasil tersebut menunjukkan bahwa didalam ekstrak etanol akar singawalang terdapat senyawa atau campuran senyawa yang aktif terhadap jamur *Pityrosporum ovale*. Penelitian ini dilanjutkan ke tingkat fraksi untuk mengetahui tingkat kepolaran senyawa atau campuran senyawa aktif. Fraksinasi dilakukan dengan pelarut n-heksan, etilasetat dan etanol.

Tabel 2. Hasil uji aktivitas antijamur fraksi terhadap *Pityrosporum ovale*

Fraksi	Parameter	Hasil ($\mu\text{g/mL}$)
n-heksan	KHM	16
	KFM	128
Etilasetat	KHM	32
	KFM	512
Etanol	KHM	32
	KFM	512

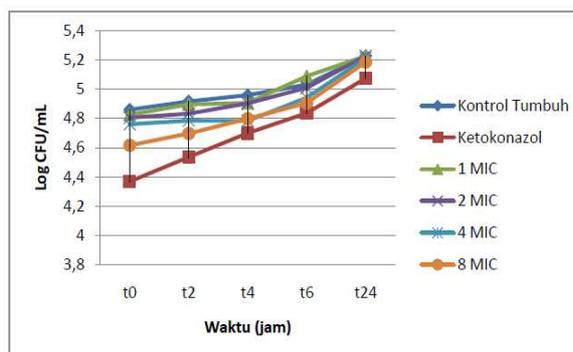
Pengujian aktivitas fraksi dilanjutkan dengan menentukan pengaruh fraksi uji terhadap profil pertumbuhan jamur. Fraksi n-heksan akar singawalang memiliki aktivitas tertinggi terhadap *P. ovale* ditunjukkan dengan KHM terkecil, yaitu 16 ppm. *P. ovale* yang dapat tumbuh dalam medium yang mengandung minyak. Senyawa yang terdapat dalam fraksi n-

heksan adalah senyawa-senyawa nonpolar. Senyawa nonpolar ini kemungkinan lebih mudah menembus sel *P. ovale* sehingga aktivitas antijamurnya lebih baik daripada fraksi lainnya.

Hasil ini dapat dikatakan tidak lebih baik dari aktivitas ekstrak. Hal ini diduga karena adanya aktivitas beberapa senyawa dalam ekstrak yang bekerja sinergis, dan ada bagian senyawa tersebut yang terpisah karena fraksinasi. Jika yang memiliki aktivitas besar hanya satu senyawa nonpolar, maka Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dan Konsentrasi Fungisidal Minimum (KFM) fraksi n-heksan akan lebih kecil daripada KHM dan KFM ekstrak.

Pengujian dilanjutkan dengan penentuan pengaruh fraksi terhadap profil pertumbuhan jamur. Pengujian dilakukan dengan *colony count* menggunakan metode sebar pelat dan dibuat pada jam ke 0, 2, 4, 6 dan 8 setelah inokulum dipapar dengan fraksi uji/pembanding. Diambil salah satu fraksi uji secara acak, yaitu fraksi etilasetat ekstrak etanol akar singawalang. Konsentrasi ekstrak yang dibuat adalah 1 MIC, 2 MIC, 4 MIC dan 8 MIC.

Berikut ini adalah kurva profil pertumbuhan dari fraksi yang diuji.



Gambar 1. Pengaruh fraksi etilasetat akar singawalang terhadap *P. ovale*

Dilihat dari kurva yang diperoleh, fraksi uji dan ketokonazol belum menunjukkan kecenderungan aktivitas fungsitatik ataupun fungisida. Kurva yang didapat hanya dapat menggambarkan bahwa *Pityrosporum ovale* masih berada pada fase logaritmik. Diduga jeda waktu inokulasi terlalu pendek sehingga kurva yang didapat belum dapat menunjukkan profil pertumbuhan yang utuh, mengingat jamur *Pityrosporum ovale* memiliki masa tumbuh yang cukup lambat, sekitar 3-5 hari

KESIMPULAN

- a. Ekstrak etanol dan fraksi akar singawalang memiliki aktivitas antifungi terhadap *Pityrosporum ovale*, suatu jamur penyebab ketombe.
- b. KHM terkecil ada pada ekstrak dan fraksi n-heksan, yaitu 16 µg/mL, seperempat dari aktivitas ketokonazol. KFM terkecil ekstrak adalah 64 µg/mL, dan pada fraksi n-heksan ekstrak etanol akar singawalang dengan konsentrasi 128 µg/mL.
- c. Diduga aktivitas antijamur lebih kuat pada ekstrak karena adanya beberapa senyawa polisulfida yang bekerja sinergis.

DAFTAR PUSTAKA

1. Benevides, J.P.C., Maria Claudia M.Y., Astrea M.G., Nidia F.R. dan V.S. Bolzani, 2000. : Antifungal Polysulphides from *Petiveria alliacea*, *Journal of Phytochemistry*, 57, 743–747.
2. Brooks, G.F., Butel J.S. dan Morse S.A , 2001. : *Jawetz, Melnick & Adelberg's Medical Microbiology*, McGraw Hill., 23th Edition.
3. CLSI ,2008. : *M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*; Clinical and Laboratory Standard Institute, approved Standard-Second Edition.
4. Katzung B.G. , 2004. : *Farmakologi Dasar dan Klinik*, diterjemahkan oleh Bagian Farmakologi FK Unair, Buku 3 Ed. 8, Salemba Medika, 111-123.
5. Kim S., Kubec R. dan Musah R.A., , 2006. : Antibacterial and antifungal activity of sulfur-containing compounds from *Petiveria alliacea*, *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 188–192.
6. Ravichandran, G., Bharadwaj V.S., Kolhapure S.A. , 2004. : Evaluation of the clinical efficacy and safety of 'Anti-dandruff shampoo' in the treatment of dandruff, *The Antiseptic* 201 (1) 5-8.
7. Schwalbe, R., Moore L.S., Goodwin A.C., 2007. : *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, CRC Press Taylor & Francis Group, Broken Sound Parkway NW, 173-205, 220-228, 339-340.
8. Sukandar, E.Y., Suwendar. dan Ekawati E. , 2006. : *Aktivitas ekstrak etanol herba seledri (*Apium graveolens*) dan daun urang aring (*Eclipta prostrata* (L.)L.) terhadap *Pityrosporum ovale**, *Majalah Farmasi Indonesia*, 17(1), 7-12.