

Efek antifungi minyak atsiri rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap *Microsporium gypseum* secara in vitro

The antifungal effect of essential oil of *Alpinia galanga* rhizome on *Microsporium gypseum* in vitro

AYU INDRASARI, RUBEN DHARMAWAN, SUTARMIADJI DJUMARGA
Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret. Jl. Ir. Sutami 36A Surakarta 57126, Jawa Tengah

Manuskrip diterima: 3 Januari 2012. Revisi disetujui: 20 Februari 2013.

Abstract. Indrasari A, Dharmawan R, Djumarga S. 2013. The antifungal effect of essential oil of *Alpinia galanga* rhizome on *Microsporium gypseum* in vitro. *Biofarmasi* 11: 24-30. This study aimed to determine the effect of essential oil of ginger rhizome on *Microsporium gypseum* in vitro. The study was performed as an experimental kuasi laboratory. The object of study was *M. gypseum* which took by a purposive sampling standardized by McFarland technique (equivalent with 0.5 McFarland turbidity). The study used the colonies of *M. gypseum* on 21 Sabouraud Dextrose Agar plates which containing cloramphenikol. Each plate had two or four holes. Every hole was filled by etanol 70% as a negative control (K1), miconazole 5 mg as a positive control (K2) and various concentrations of ginger rhizome extract by K3-K10 (0.5%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5% and 4%). The plates were incubated on the temperature of 30°C in an incubator for 6 days and measured the diameter of inhibition zone. The data were collected and analyzed by Kruskal-Wallis Test and Mann-Whitney Test by the program of SPSS 16.0 for Windows. The results of study showed that the means of the diameter of inhibition zone (K1) was 6 mm, K2 = 24.4 mm, K3 = 27.2 mm, K4 = 23.5 mm, K5 = 25.3 mm, K6 = 22.7 mm, K7 = 23.1 mm, K8 = 21.14 mm, K9 = 21.14 mm and K10 = 19 mm. The result of Kruskal-Wallis Test showed that there was the difference of the diameter of inhibition zone means between all of group (K1-K10) significantly ($p < 0.05$). The result of Mann-Whitney Test showed that there was the difference between a negative control and all of various concentrations of ginger rhizome extract ($p < 0.05$). The study was concluded that there was an antifungal effect of essential oil of ginger rhizome on *M. gypseum* in vitro.

Keywords: Antifungal, essential oil of ginger rhizome, *Microsporium gypseum*

PENDAHULUAN

Minyak atsiri merupakan unsur organik berbau harum yang berasal dari tumbuhan. Minyak atsiri memperlihatkan sifat antifungi. Mekanismenya yaitu dengan mengubah struktur dinding sel dan morfologi dari beberapa organ seluler fungi (Abad et al. 2007) melalui aktivitas penghambatan terhadap sintesis senyawa ergosterol (Pinto Dias et al. 2006). Salah satu jenis tumbuhan penghasil minyak atsiri yaitu lengkuas (*Alpinia galanga* L.). Bagian dari lengkuas yang sering digunakan sebagai obat adalah rimpangnya (Parwata dan Dewi 2008), karena kandungan minyak atsiri pada rimpang lengkuas bermanfaat sebagai antifungi (Dian dan Wien 2001). Minyak atsiri pada rimpang lengkuas diantaranya mengandung metil-sinamat 48%, sineol 20-30%, dan eugenol. Selain itu, rimpang lengkuas juga mengandung flavonoid (galangin, *kaempferide*), *acrid resin*, *galangol*, fenol, dan terpenoid (Dalimartha 2009; Parwata dan Dewi 2008).

Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa lengkuas dapat berfungsi sebagai antifungi terhadap infeksi *Trichophyton mentagrophytes* (Gholib dan Darmono 2008). Eugenol bermanfaat dalam membasmi *Microsporium gypseum* (Lee et al. 2006). Selain itu, minyak atsiri lengkuas juga dapat menghambat pertumbuhan jamur dan bakteri, seperti *Candida albicans*,

Penicillium sp., *Neurospora* sp. (Yuharmen et al. 2002), *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus* (Parwata dan Dewi 2008). Menurut Chusnie dan Lamb (2005), flavonoid dapat berfungsi sebagai antifungi dengan cara menghambat germinasi spora (pertumbuhan spora).

Penyakit kulit akibat infeksi jamur yang paling banyak dijumpai di Indonesia adalah dermatofitosis (Harahap 2000). Romano et al. (2008) menyatakan bahwa di Siena, Italia, pada tahun 2005-2006, 14 kasus dermatofitosis yang disebabkan *M. gypseum* merupakan 6,8% dari seluruh kasus dermatofitosis yang dilaporkan. Menurut staf pengajar Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia (2009), di Indonesia dermatofitosis cukup banyak ditemukan, baik pada laki-laki maupun perempuan. Namun, angka tepatnya insiden dermatomikosis di Indonesia belum ada (Adiguna 2004).

Di Medan, pasien penderita tinea kapitis sekitar 0,4% (tahun 1996-1998) dari kasus dermatofitosis dan biasanya terjadi musiman. Di FKUI/RSCM, kasus tinea kapitis pada tahun 1989-1992 berkisar antara 0,61-0,87% dari seluruh kasus jamur kulit. Di Manado, pada tahun 1990-1991 insiden tinea kapitis mencapai 1,2-6,0% dari seluruh kasus dermatofitosis. Di RSUP H. Adam Malik dan RSUD dr. Pringadi, Medan, jumlah penderita dermatomikosis pada tahun 1996-1998 sebanyak 4.162 orang dari 20.951 penderita baru penyakit kulit (Nasution et al. 2001). Pada

tahun 2002, penyakit dermatofitosis merupakan penyakit kulit yang menduduki urutan pertama dibandingkan dengan penyakit kulit yang lain (Nasution 2006).

Pengobatan dermatofitosis dapat dilakukan secara topikal dan sistemik. Pilihan obat untuk dermatofitosis antara lain mikonazol, ketokonazol, griseofulvin, dan itrakonazol. Obat dermatofitosis mempunyai kekurangan, antara lain menimbulkan efek samping dan resistensi. Ketokonazol bersifat hepatotoksik. Griseofulvin sudah menimbulkan resistensi (Budimulja 2007). Berdasarkan kondisi tersebut maka pada penelitian ini ingin diketahui efek minyak atsiri pada lengkuas terhadap *Microsporum gypseum* secara in vitro.

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui efek antifungi minyak atsiri rimpang lengkuas terhadap *M. gypseum* secara in vitro, serta mengetahui konsentrasi optimal minyak atsiri rimpang lengkuas untuk kemudian dibandingkan dengan daya hambat mikonazol sebagai antifungi terhadap *M. gypseum*.

BAHAN DAN METODE

Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Setia Budi, Surakarta dan Fakultas Kedokteran, Universitas Sebelas Maret, Surakarta.

Alat dan bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi cawan petri berdiameter 10 cm, ose, alat pembuat sumur berdiameter 6 mm, inkubator, autoclave, lampu spiritus, tabung reaksi, Erlenmeyer 1000 ml, gelas ukur, pipet, mikropipet, penggaris, spreader, dan timbangan digital.

Sementara itu, bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu biakan *M. gypseum*, Sabouraud Dextrose Agar (SDA), minyak atsiri dari rimpang lengkuas, kloramfenikol, mikonazol krim, NaCl 0,9%, etanol 70%, dan akuades steril.

Jenis penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental kuasi laboratorium dengan rancangan penelitian *the post-test only control group design* (Arief 2004).

Subjek penelitian

Biakan subkultur *M. gypseum* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Setia Budi, Surakarta.

Teknik sampling

Pengambilan sampel dilakukan secara *purposive sampling* dari media subkultur yang telah distandardisasi. *Purposive sampling* merupakan pendekatan pencuplikan sampel dengan memilih kasus-kasus dengan maksud (*purpose*) untuk mendapatkan sebuah sampel yang mewakili berbagai macam proses yang terlibat dalam penelitian (Murti 2010).

Cara kerja

Pembuatan minyak atsiri rimpang lengkuas

Pembuatan minyak atsiri dilaksanakan di LPPT Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Pembuatan minyak atsiri dilakukan dengan menggunakan metode destilasi uap air (*water and steam destillation*). Rimpang lengkuas dicuci dengan air mengalir, diiris dengan ketebalan ± 3 mm kemudian ditimbang. Selanjutnya, irisan rimpang dimasukkan ke dalam dandang destilasi yang telah diisi dengan air, dirangkai dengan pendingin air dan penampung destilat. Rimpang diletakkan di atas piringan atau plat besi berlubang seperti ayakan yang terletak beberapa sentimeter di atas permukaan air. Selanjutnya, sampel dipanaskan dengan kompor LPG dengan api sedang. Saat air mendidih, uap yang terbentuk akan melewati ayakan dan melewati celah-celah bahan. Minyak atsiri dalam bahan akan terikut bersama uap panas melalui pipa menuju ketel kondensor. Selanjutnya, uap air dan minyak atsiri akan mengembun dan ditampung dalam penampung destilat. Pemisahan air dan minyak atsiri dilakukan berdasarkan berat jenis. Pemanasan dihentikan setelah 6 jam dari destilat pertama menetes kemudian destilat didinginkan. Minyak atsiri yang dihasilkan diukur volumenya. Rimpang lengkuas yang digunakan seberat 11971 gr dan diperoleh sebanyak 12 ml minyak atsiri.

Penelitian pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk menentukan konsentrasi minyak atsiri rimpang lengkuas yang digunakan pada penelitian.

Pembuatan media Sabouraud Dextrose Agar. Sebanyak 11,7 g Sabouraud Dextrose Agar dilarutkan dalam 180 ml akuades kemudian diaduk dan dipanaskan sampai larut sempurna. Diasumsikan 30 ml larutan agar untuk satu cawan petri berdiameter 10 cm.

Pembuatan larutan kloramfenikol. Setiap 1000 ml Sabouraud Dextrose Agar cair memerlukan 400 mg kloramfenikol. Dengan demikian, kloramfenikol yang diperlukan untuk membuat 180 ml Sabouraud Dextrose Agar yaitu sebanyak:

$$= 180 \text{ ml} \times 400 \text{ mg} = 72 \text{ mg}$$

$$1000 \text{ ml}$$

Sebanyak 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,9%, dengan demikian:

$$\text{NaCl } 0,9 \% \text{ yang diperlukan} = \frac{72 \text{ mg} \times 10 \text{ ml}}{250 \text{ mg}} = 2,88 \text{ ml}$$

$$250 \text{ mg}$$

Larutan kloramfenikol ditambahkan ke dalam Sabouraud Dextrose Agar cair untuk mencegah tumbuhnya jamur dan bakteri kontaminan (Bridson 1998). Sabouraud Dextrose Agar cair disterilkan bersamaan dengan alat-alat yang akan digunakan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Pada setiap cawan petri dituang sebanyak 30 ml Sabouraud Dextrose Agar cair dan dibiarkan hingga dingin.

Penanaman *Microsporum gypseum*. Biakan jamur *M. gypseum* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi,

Universitas Setia Budi, Surakarta. *Microsporum gypseum* yang diperoleh merupakan biakan subkultur umur 6 hari dalam media *Sabouraud Dextrose Agar* miring. Biakan diambil dengan menggunakan ose steril dan dimasukkan ke dalam larutan NaCl 0,9% sampai mencapai kekeruhan yang ekuivalen dengan 0,5 standar McFarland. Sampel cair *M. gypseum* diinokulasikan sebanyak 0,2 ml ke dalam tiap-tiap cawan petri yang berisi *Sabouraud Dextrose Agar*. Cawan petri digoyang untuk meratakan sampel *M. gypseum* (Savitri 2010).

Pengenceran minyak atsiri rimpang lengkuas. Pengenceran minyak atsiri dilakukan dengan cara mengambil 0,2 ml minyak atsiri rimpang lengkuas dan ditambah dengan 9,8 ml etanol 70%, sehingga didapatkan konsentrasi 2%. Hal ini juga diberlakukan untuk konsentrasi yang lain yaitu 4%, 6%, 8%, dan 10%. Pada setiap cawan petri yang berisi media dibuat sumuran dengan diameter 6 mm, tiga sampai empat sumuran pada setiap cawan petri.

Persiapan mikonazol. Pada tahap ini, sebanyak 5 mg mikonazol krim ditimbang, dimana krim tidak diencerkan. Pada 5 mg mikonazol krim mengandung 87 µg mikonazol nitrat dengan perhitungan sebagai berikut: $2\% \times (\text{berat molekul mikonazol/berat molekul mikonazol nitrat}) \times 5 \text{ mg} = (0,02) \times (416/479) \times 5 \text{ mg} = 0,087 \text{ mg} = 87 \text{ µg}$.

Pada setiap sumuran diberikan 5 mg mikonazol krim 2% sebagai kontrol positif, 0,05 ml etanol 70% sebagai kontrol negatif, dan 0,05 ml minyak atsiri rimpang lengkuas dengan konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%. Semua cawan petri selanjutnya dimasukkan ke dalam inkubator pada suhu 30°C. Zona bening di sekeliling sumuran diukur dengan menggunakan penggaris.

Tahap penelitian

Penentuan jumlah sampel. Penentuan besar ulangan dihitung berdasarkan rumus Federer sebagai berikut:

$$(n-1)(t-1) > 15$$

Keterangan:

n = besar sampel

t = jumlah kelompok perlakuan

Oleh karena pada penelitian ini digunakan 10 kelompok perlakuan maka:

$$(n-1)(t-1) > 15$$

$$(n-1)(10-1) > 15$$

$$9n > 24$$

$$n > 2,7$$

Dengan demikian, untuk setiap kelompok perlakuan, jumlah sampel harus lebih dari 2,7. Dalam penelitian ini digunakan 7 kali ulangan dalam setiap kelompok.

Pembuatan media Sabouraud Dextrose Agar. Sebanyak 40,95 g *Sabouraud Dextrose Agar* dilarutkan dalam 630 ml akuades kemudian diaduk dan dipanaskan sampai larut sempurna. Diasumsikan 30 ml larutan agar untuk satu cawan petri berdiameter 10 cm.

Pembuatan larutan kloramfenikol. Setiap 1000 ml *Sabouraud Dextrose Agar* cair diperlukan 400 mg kloramfenikol, dengan demikian kloramfenikol yang diperlukan untuk 630 ml *Sabouraud Dextrose Agar* yaitu:

$$= 630 \text{ ml} \times 400 \text{ mg} = 252 \text{ mg}$$

$$\frac{252 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$$

Setiap 250 mg kloramfenikol dilarutkan dalam 10 ml NaCl 0,9%, dengan demikian:

$$\text{NaCl } 0,9\% \text{ yang diperlukan} = 252 \text{ mg} \times 10 \text{ ml} = 10,08 \text{ ml}$$

$$\frac{252 \text{ mg}}{250 \text{ mg}}$$

Larutan kloramfenikol ditambahkan ke dalam media *Sabouraud Dextrose Agar* cair untuk mencegah tumbuhnya jamur dan kuman kontaminan (Bridson 1998). *Sabouraud Dextrose Agar* cair disterilkan bersama dengan alat-alat yang akan digunakan dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Pada setiap cawan petri dituang sebanyak 30 ml *Sabouraud Dextrose Agar* cair dan dibiarkan hingga dingin.

Penanaman *Microsporum gypseum*. Biakan jamur diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi, Universitas Setia Budi, Surakarta. *Microsporum gypseum* yang diperoleh merupakan biakan subkultur umur 6 hari dalam media *Sabouraud Dextrose Agar* miring. Biakan diambil dengan menggunakan ose steril dan dimasukkan ke dalam larutan NaCl 0,9% hingga dicapai kekeruhan yang ekuivalen dengan 0,5 standar McFarland. Sampel cair *M. gypseum* diinokulasikan sebanyak 0,2 ml ke dalam tiap-tiap cawan petri yang berisi media *Sabouraud Dextrose Agar*. Cawan petri digoyang untuk meratakan sampel *M. gypseum* (Savitri 2010).

Pengenceran minyak atsiri rimpang lengkuas. Minyak atsiri rimpang lengkuas diencerkan dengan etanol 70%, sehingga diperoleh konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, dan 4%.

Persiapan mikonazol. Sebanyak 5 mg mikonazol krim ditimbang, dimana krim tidak diencerkan. Mikonazol yang digunakan sebanyak 5 mg pada setiap sumuran. Pada 5 mg mikonazol krim mengandung 87 µg mikonazol dengan perhitungan sebagai berikut: $2\% \times (\text{berat molekul mikonazol/berat molekul mikonazol nitrat}) \times 5 \text{ mg} = (0,02) \times (416/479) \times 5 \text{ mg} = 0,087 \text{ mg} = 87 \text{ µg}$.

Uji minyak atsiri rimpang lengkuas, etanol 70%, dan mikonazol. Pada setiap cawan petri dibuat sumuran-sumuran dengan diameter 6 mm dimana masing-masing sumuran diisi dengan 0,05 ml etanol 70%, 5 mg mikonazol krim 2%, dan 0,05 ml minyak atsiri dengan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, dan 4%.

Analisis data

Data berupa diameter zona hambatan dianalisis dengan menggunakan uji statistik parametrik *One-Way Anova* kemudian dilanjutkan dengan uji *Least Significance Difference* (LSD). Data selanjutnya diolah dengan Program *Statistical Product and Service Solution (SPSS) for Windows release 16.0*.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Dari hasil uji pendahuluan, ditetapkan sebanyak 8 konsentrasi minyak atsiri rimpang lengkuas yang

selanjutnya digunakan pada tahap penelitian. Penetapan konsentrasi tersebut berdasarkan pada perbandingan diameter zona hambatan antara minyak atsiri rimpang lengkuas pada berbagai konsentrasi dibandingkan dengan diameter hambatan yang dihasilkan pada kontrol positif. Konsentrasi maksimal minyak atsiri rimpang lengkuas yang digunakan yaitu sebesar 4%, karena pada uji pendahuluan konsentrasi tersebut merupakan konsentrasi terendah yang memiliki efek antifungi melebihi kontrol positif. Dengan demikian, konsentrasi minyak atsiri rimpang lengkuas yang digunakan pada tahap penelitian yaitu 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, dan 4%.

Hasil penelitian tentang pengaruh minyak atsiri rimpang lengkuas terhadap pertumbuhan *M. gypseum* secara in vitro dapat dilihat pada Tabel 2. Dari Tabel 2 dapat diketahui adanya perbedaan rata-rata (*mean*) diameter zona hambatan yang menunjukkan perbedaan efek antifungi pada masing-masing kelompok perlakuan. Pada kelompok perlakuan dengan menggunakan etanol 70% (kontrol negatif) tidak terdapat zona hambatan, dimana 6 mm merupakan diameter sumuran, bukan diameter zona hambatan. Hal ini menunjukkan bahwa etanol 70% tidak mempunyai efek antifungi. Adapun pada kelompok perlakuan kontrol positif, rata-rata diameter zona hambatan sebesar 24,4 mm yang menunjukkan adanya efek antifungi. Pada kelompok minyak atsiri rimpang lengkuas terlihat efek antifungi yang bervariasi terhadap *M. gypseum*.

Pada kelompok minyak atsiri rimpang lengkuas konsentrasi 0,5% diperoleh rata-rata diameter zona hambatan sebesar 27,2 mm, pada konsentrasi 1% rata-rata diameter zona hambatan 23,5 mm, pada konsentrasi 1,5% diperoleh rata-rata diameter zona hambatan 25,3 mm, pada konsentrasi 2% rata-rata diameter zona hambatan 22,7 mm, pada konsentrasi 2,5% rata-rata diameter zona hambatan 23,1 mm, pada konsentrasi 3% dan 3,5% rata-rata diameter zona hambatannya 21,14 mm, dan pada konsentrasi 4% rata-rata diameter zona hambatan 19 mm.

Uji Normalitas dan Homogenitas Varians

Pertama-tama dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas data. Uji normalitas terhadap data hasil penelitian dilakukan untuk mengetahui sebaran data penelitian. Oleh karena jumlah sampel pada penelitian ini lebih dari 50 sampel maka dilakukan uji normalitas dengan menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Hasil uji Kolmogorov-Smirnov menunjukkan adanya sebaran data penelitian yang tidak terdistribusi normal. Hal ini dapat dilihat pada kelompok perlakuan minyak atsiri 1% dan 3%.

Hasil uji homogenitas varians data penelitian menunjukkan nilai probabilitas, yaitu sebesar 0,003 ($p < 0,05$). Hal ini berarti bahwa variasi data sampel penelitian tidak homogen. Dengan demikian, analisis data dengan uji Anova tidak dapat dilakukan karena syarat uji analisis Anova tidak terpenuhi untuk distribusi dan homogenitas varians data. Oleh karena itu, analisis data penelitian dilakukan dengan uji alternatif yang lain, yaitu uji Kruskal-Wallis.

Uji Kruskal-Wallis

Berdasarkan hasil uji Kruskal-Wallis yang dilakukan terhadap seluruh kelompok perlakuan diperoleh nilai probabilitas sebesar 0,000 ($p < 0,05$). Hal ini menunjukkan bahwa terdapat perbedaan yang signifikan di antara kesepuluh kelompok perlakuan. Kemudian, untuk mengetahui letak perbedaan yang signifikan di antara kelompok perlakuan, dilanjutkan analisis data dengan menggunakan uji Mann-Whitney.

Uji Mann-Whitney

Dari hasil uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol negatif dan kontrol positif diperoleh nilai probabilitas sebesar 0,001 ($p < 0,05$). Demikian juga hasil uji Mann-Whitney terhadap kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan minyak atsiri pada berbagai konsentrasi diperoleh nilai probabilitas 0,001 ($p < 0,05$). Artinya, terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kesembilan kelompok perlakuan yang lain.

Dari hasil analisis data dengan uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol positif dan kelompok konsentrasi 1% dan 4% diperoleh nilai probabilitas sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kontrol positif dengan kelompok konsentrasi minyak atsiri 1% dan 4%.

Pada kelompok kontrol positif yang dibandingkan dengan kelompok 0,5 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, dan 3,5 % menunjukkan nilai $p > 0,05$, artinya tidak ada perbedaan yang signifikan. Pada kelompok perlakuan minyak atsiri rimpang lengkuas 0,5% dan 3,5%, kelompok 0,5% dan 4%, kelompok 1% dan 4%, serta kelompok 1,5% dan 4% menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan $p < 0,05$. Adapun pada kelompok minyak atsiri rimpang lengkuas dengan konsentrasi 0,5-4% yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan $p > 0,05$ yaitu kelompok 0,5% dengan kelompok 1-3%, kelompok 1,5% dengan kelompok 0,5-3,5%, kelompok 2% dengan kelompok 0,5-4%, kelompok 2,5% dengan kelompok 0,5-4%, kelompok 3% dengan kelompok 0,5-4%, serta kelompok 3,5% dengan kelompok 1-4%. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa konsentrasi 1,5% = 2% = 2,5% = 3%.

Pembahasan

Pada tahap persiapan, sebelum penelitian dilakukan uji pendahuluan yang bertujuan untuk menentukan konsentrasi minyak atsiri rimpang lengkuas yang akan digunakan dalam penelitian. Pada uji pendahuluan, konsentrasi minyak atsiri rimpang lengkuas dibuat dalam lima taraf konsentrasi yaitu 2%, 4%, 6%, 8%, dan 10%. Diameter zona hambatan hasil uji pendahuluan dapat dilihat pada Tabel 1.

Selanjutnya, data hasil uji pendahuluan minyak atsiri rimpang lengkuas dibandingkan dengan efek antifungi mikonazol 5 mg. Perbandingan awal ini bertujuan untuk menentukan konsentrasi minyak atsiri rimpang lengkuas yang akan digunakan dalam penelitian, sehingga dari berbagai konsentrasi tersebut diharapkan terdapat efek antifungi yang tidak berbeda secara signifikan dengan efek

antifungi kontrol positif atau memiliki efek antifungi yang setara.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi minimal dari minyak atsiri yang dapat menimbulkan diameter zona hambat yang setara dengan kontrol positif. Pada uji pendahuluan, konsentrasi minyak atsiri 4% merupakan konsentrasi terkecil yang menghasilkan efek antifungi melebihi kelompok kontrol positif, sehingga konsentrasi 4% dijadikan sebagai konsentrasi maksimal yang akan digunakan dalam uji penelitian. Oleh karena itu, konsentrasi yang digunakan pada penelitian ini dimulai dari konsentrasi 0,5% hingga 4% dengan interval 0,5%.

Pada tahap uji penelitian, biakan *M. gypseum* dibagi dalam sepuluh kelompok yang masing-masing diberi perlakuan yang berbeda. Kelompok pertama diberi perlakuan dengan etanol 70% sebagai kontrol negatif, kelompok kedua diberikan mikonazol krim 5 mg sebagai kontrol positif, kelompok ketiga sampai kesepuluh masing-masing diberi minyak atsiri rimpang lengkuas dengan konsentrasi 0,5%, 1%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, 3,5%, dan 4%.

Menurut Jawetz et al. (1996), ukuran zona penghambatan pertumbuhan bervariasi sesuai dengan ciri khas molekuler dari berbagai obat. Dengan demikian, ukuran zona suatu obat tidak dapat dibandingkan dengan ukuran zona obat lain yang bereaksi terhadap organisme yang sama. Namun, untuk setiap obat, ukuran zona dapat dibandingkan dengan suatu standar, asal perbenihan, ukuran inokulum, dan kondisi lain yang diatur secara seksama. Pada penelitian ini, minyak atsiri dibandingkan dengan standar mikonazol krim. Akan tetapi, banyak kekurangan pada penelitian ini yang tidak sesuai dengan pernyataan.

Penggunaan McFarland sebagai standar tidak benar. Menurut Hukum Beer-Lambert, jika sebuah berkas cahaya dilewatkan ke dalam larutan maka ada sebagian cahaya yang akan diserap, sebagian dilewatkan dan sebagian kecil lainnya dipantulkan. Selain itu, Hukum Beer-Lambert juga menyatakan bahwa absorpsi cahaya berbanding lurus dengan konsentrasi larutan dan ketebalan bahan/medium (Bassett et al. 1994). Contohnya pada larutan gula, saat konsentrasi larutan gula ditambah dengan cara menambah massa gula, daya sinar yang ditransmisikan akan semakin kecil. Hal ini menunjukkan bahwa transmisi semakin kecil, sehingga absorpsi semakin besar.

Pada penelitian ini, partikel yang dibandingkan jelas berbeda. McFarland berisi asam sulfat dan barium klorida berupa suspensi, sedangkan *M. gypseum* yang digunakan berupa hifa. Ketebalan medium juga berbeda karena tabung McFarland dan *M. gypseum* berbeda jenis. Oleh karena itu, penggunaan McFarland sebagai standar kekeruhan tidaklah benar.

Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah etanol 70%. Berdasarkan hasil uji pendahuluan pada Tabel 1 dan uji penelitian pada Tabel 2 dapat dilihat bahwa pada kelompok pertama yang menggunakan etanol 70% sebagai kontrol negatif tidak terdapat zona hambat. *Microsporum gypseum* dapat tumbuh dengan baik di sekitar sumuran. Hal ini berarti etanol 70% tidak memiliki efek antifungi terhadap *M. gypseum*.

Tabel 1. Diameter zona hambat hasil uji pendahuluan

Ulangan	Kontrol negatif	Diameter zona hambatan (mm)					Kontrol positif
		Konsentrasi minyak atsiri rimpang lengkuas					
		2%	4%	6%	8%	10%	
1	6	11	26,5	33,5	37,5	36,5	22,5
2	6	10	34,5	40,0	41,5	41,0	21,0
3	6	10	39,0	38,5	41,0	38,5	23,0
Rata-rata	6	10,33	33,33	37,33	40,00	38,67	22,17

Keterangan: Pengukuran diameter zona hambat, termasuk diameter sumuran (6 mm).

Tabel 2. Diameter zona hambat hasil uji penelitian pada hari ke-4.

		Diameter zona hambatan (mm)					
Ulangan	Kontrol negatif	Konsentrasi minyak atsiri rimpang lengkuas					Kontrol positif
		2%	4%	6%	8%	10%	
1	6	27,5	33,5	30,5	21,0	32,5	27,0
2	6	32,0	22,0	20,5	24,5	22,5	19,0
3	6	32,5	19,0	21,0	26,0	32,5	30,0
4	6	18,5	20,0	26,0	16,0	19,0	19,0
5	6	27,5	23,5	24,0	17,5	23,0	19,0
6	6	27,5	23,0	27,5	28,0	17,0	17,5
7	6	25,0	23,5	27,5	27,0	15,5	16,5
Rata-rata	6	27,2	23,5	25,3	22,7	23,1	21,14

Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah mikonazol krim 5 mg. Mekanisme antifungi mikonazol yaitu menghambat sintesis sterol pada membran sel fungi, akibatnya permeabilitas dinding sel meningkat dan komponen-komponen intrasel dapat keluar. Hal ini menyebabkan kematian sel jamur. Mikonazol merupakan derivat azol yang berkhasiat sebagai fungisida kuat dengan spektrum kerja lebar (Tjay dan Rahardja 2007).

Pada penelitian ini, kontrol positif tidak dilarutkan tetapi langsung diletakkan pada sumuran. Seperti halnya penelitian yang dilakukan oleh Gholib dan Darmono (2008). Dari hasil penelitian Gholib dan Darmono (2008), kontrol positif dengan rata-rata diameter zona hambat 30 mm. Adapun penelitian yang dilakukan oleh Gholib dan Kusumaningtyas (2007) dengan menggunakan krim ketokonazol 2% yang dicairkan dengan cara dipanaskan terlebih dahulu dihasilkan diameter zona hambat 14 mm.

Kriteria efek antifungi pada penelitian ini merujuk pada interpretasi diameter zona sensitivitas oleh Pakshir et al. (2009). Penggunaan 5 mg salep dikarenakan pada uji pendahuluan 5 mg menimbulkan efek antifungi. Efek antifungi pada kontrol positif dari uji pendahuluan dan penelitian tidak jauh berbeda yaitu 22,17 mm dan 24,4 mm.

Faktor yang berpengaruh terhadap kontrol positif antara lain mikonazol yang digunakan bukan preparat khusus untuk penelitian, melainkan obat generik sehingga kualitasnya kurang. Selain itu, krim merupakan sediaan setengah padat yang mengandung air (Arief 2004), sehingga memudahkan zat aktif berdifusi. Faktor lainnya yaitu metode yang digunakan tidak tepat karena digunakan

timbangan digital, akibatnya kadar kontrol positif dapat berbeda pada tiap sumuran yang akan mempengaruhi efek antifungi. Kadar mikonazol akan lebih tepat jika diambil dengan menggunakan mikropipet. Kriteria efek antifungi dilakukan dengan menggunakan kriteria zona sensitivitas menurut Pakshir et al. (2009), sedangkan kadar mikonazol yang digunakan tidak sama dengan penelitian Pakshir et al. (2009). Pakshir et al. (2009) menggunakan kadar mikonazol 10 µg/petri. Sementara itu, penelitian ini menggunakan mikonazol 87 µg/sumuran. Hal ini menjadi kekurangan pada penelitian ini karena tidak ada mikonazol standar.

Pada uji pendahuluan, minyak atsiri rimpang lengkuas dengan konsentrasi 2% sudah dapat menghasilkan diameter zona hambatan. Hal ini berarti minyak atsiri rimpang lengkuas mulai konsentrasi 2% memiliki efek antifungi terhadap pertumbuhan *M. gypseum*. Peningkatan konsentrasi minyak atsiri diikuti dengan peningkatan efek antifungi hingga konsentrasi 8%. Perlu diperhatikan juga pada konsentrasi tertentu yang semakin meningkat dapat saja zona hambatan tersebut tidak meningkat, tetapi menurun karena mengalami kejenuhan. Hal inilah yang diduga terjadi pada konsentrasi 10%. Pada uji pendahuluan, efek antifunginya menurun.

Hasil penelitian pada Tabel 2 menunjukkan efek antifungi yang bervariasi diantara kelompok minyak atsiri. Pada konsentrasi 0,5% diperoleh rata-rata diameter zona hambatan 27,2 mm. Pada konsentrasi 1%, efek antifungi menurun yaitu sebesar 23,5 mm, sedangkan pada konsentrasi 1,5% rata-rata diameter zona hambatan meningkat menjadi 25,3 mm, kemudian menurun kembali pada konsentrasi 2% yaitu sebesar 22,7 mm. Pada konsentrasi 2,5%, rata-rata diameter zona hambatan sebesar 23,1 mm. Pada konsentrasi 3% dan 3,5% diperoleh rata-rata diameter zona hambatan yang sama yaitu sebesar 21,14 mm. Adapun pada konsentrasi 4%, rata-rata diameter zona hambatan sebesar 19 mm.

Menurut Jawetz et al. (1996), sel-sel yang terletak di atas perbenihan padat tidak dapat bergerak. Oleh karena itu, apabila beberapa sel fungi diletakkan pada perbenihan padat, tiap sel akan tumbuh dan membentuk koloni yang terpisah. Zat ideal untuk sebagian besar perbenihan padat adalah agar-agar. Jika sudah memadat, agar-agar tidak akan mencair kembali, kecuali apabila dipanaskan pada suhu di atas 80°C. Pada penelitian ini, sampel cair *M. gypseum* diinokulasikan di atas media padat dan diduga sel-sel fungi tersebut akan tumbuh dan membentuk koloni secara terpisah, sehingga efek antifungi bervariasi akibat sebaran koloni yang tumbuh tidak merata.

Menurut Hostettmann (2001), penentuan aktivitas antimikroba dari suatu ekstrak tanaman dapat dilakukan apabila memenuhi persyaratan yang salah satunya yaitu ekstrak tanaman harus dapat kontak dengan dinding sel mikroorganisme. Penelitian ini menggunakan metode sumuran, dimana zat uji berupa minyak atsiri dimasukkan ke dalam sumuran pada media. Minyak atsiri dalam sumuran yang terletak di bawah belum tentu dapat berdifusi hingga mencapai bagian atas/permukaan dari media SDA, sehingga diduga efek antifungi minyak atsiri

yang timbul hanya dari bagian atas yang terjadi kontak dengan dinding sel jamur.

Selanjutnya, data hasil uji penelitian (Tabel 2) dianalisis dengan menggunakan Program *SPSS for Windows release 16.0*. Untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan diameter zona hambatan yang signifikan pada 10 kelompok perlakuan maka dilakukan analisis dengan menggunakan uji Anova. Untuk menggunakan uji Anova, terdapat beberapa syarat yang harus dipenuhi, yaitu varian data harus sama dan data yang diperoleh harus homogen (Dahlan 2008). Namun, data yang diperoleh tidak memenuhi syarat-syarat tersebut, sehingga analisis data dilakukan dengan menggunakan uji Kruskal-Wallis.

Uji Kruskal-Wallis digunakan untuk mengetahui perbedaan rata-rata diameter zona hambatan yang signifikan pada kesepuluh kelompok perlakuan. Hasil uji Kruskal-Wallis menunjukkan bahwa rata-rata diameter zona hambatan pada kesepuluh kelompok perlakuan berbeda secara signifikan dengan $p < 0,05$, hal ini menunjukkan bahwa minyak atsiri rimpang lengkuas mempunyai pengaruh yang berbeda pada setiap konsentrasi dalam menghambat pertumbuhan *M. gypseum* secara in vitro.

Hal ini sesuai dengan hipotesis awal yang menyebutkan bahwa minyak atsiri rimpang lengkuas memiliki efek antifungi terhadap *M. gypseum* secara in vitro. Menurut Buchauf (2003), minyak atsiri rimpang lengkuas mengandung senyawa eugenol, sineol, dan metil sinamat. Zona hambatan pada perlakuan minyak atsiri terbentuk karena minyak atsiri rimpang lengkuas mengandung eugenol. Eugenol tersebut diduga memberikan efek antifungi terhadap jamur *M. gypseum* seperti pada penelitian Lee et al. (2007) bahwa eugenol dapat membasmi jamur *M. gypseum*. Penelitian lain yang dilakukan oleh Gholib dan Darmono (2008) menunjukkan bahwa ekstrak lengkuas yang mengandung minyak atsiri dapat berfungsi sebagai antifungi terhadap infeksi *Trichophyton mentagrophytes*.

Selanjutnya untuk mengetahui kelompok perlakuan yang berbeda secara signifikan dengan kelompok lain maka dilakukan *Post-hoc Test*, yaitu dengan menggunakan uji Mann-Whitney (Riwidikdo 2008). Hasil uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol negatif dengan kontrol positif menunjukkan nilai probabilitas sebesar 0,001 ($p < 0,05$). Demikian juga uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol negatif dengan kelompok perlakuan minyak atsiri pada berbagai konsentrasi diperoleh nilai probabilitas 0,001 ($p < 0,05$). Artinya, terdapat perbedaan yang signifikan antara kelompok kontrol negatif dengan kesembilan kelompok perlakuan yang lain.

Analisis data dengan uji Mann-Whitney antara kelompok kontrol positif dan kelompok perlakuan 1% dan 4% diperoleh nilai probabilitas yaitu sebesar 0,000 ($p < 0,05$) yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan antara kontrol positif dengan kelompok 1% dan 4%. Pada kelompok kontrol positif yang dibandingkan dengan kelompok 0,5%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, dan 3,5% menunjukkan nilai $p > 0,05$, artinya tidak terdapat perbedaan yang signifikan.

Pada kelompok perlakuan minyak atsiri rimpang lengkuas 0,5% dan 3,5%, kelompok 0,5% dan 4%, kelompok 1% dan 4%, serta kelompok 1,5% dan 4% menunjukkan perbedaan yang signifikan dengan $p < 0,05$. Adapun kelompok minyak atsiri rimpang lengkuas dengan konsentrasi 0,5-4% yang menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan dengan $p > 0,05$, yaitu kelompok 0,5% dengan kelompok 1-3%, kelompok 1,5% dengan kelompok 0,5-3,5%, kelompok 2% dengan kelompok 0,5-4%, kelompok 2,5% dengan kelompok 0,5-4%, kelompok 3% dengan kelompok 0,5-4%, kelompok 3,5% dengan kelompok 1-4%. Dengan demikian dapat disimpulkan bahwa konsentrasi 1,5% = 2% = 2,5% = 3%.

Secara statistik, konsentrasi 0,5%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, dan 3,5% memiliki efek antifungi yang tidak berbeda secara signifikan dalam menghambat pertumbuhan *M. gypseum* secara in vitro.

KESIMPULAN

Minyak atsiri rimpang lengkuas memiliki efek antifungi terhadap *M. gypseum* secara in vitro. Secara statistik, minyak atsiri rimpang lengkuas dengan konsentrasi 0,5%, 1,5%, 2%, 2,5%, 3%, dan 3,5% menunjukkan efek antifungi yang tidak berbeda secara signifikan dengan kontrol positif atau memiliki efek antifungi yang setara. Minyak atsiri rimpang lengkuas dengan konsentrasi 0,5% dan 1,5% memiliki efek antifungi yang lebih besar dari 5 mg mikonazol krim.

DAFTAR PUSTAKA

- Abad M, Ansuategui M, Bermeja P. 2007. Active antifungal substances from natural sources. *ARKICOV* 7: 116-145.
- Adiguna MS. 2004. Epidemiologi dermatomikosis superfisialis. Dalam: Budimulja U (ed.). *Dermatomikosis Superfisialis*. Balai Penerbit FKUI, Jakarta.
- Arief M. 2004. Prinsip umum dan dasar farmakologi. Gadjah Mada University Press, Yogyakarta.
- Bassett J, Denney RC, Jeffery GH et al. 1994. Buku Ajar Vogel Kimia Analisis Kuantitatif Anorganik. Edisi ke-4. EGC, Jakarta.
- Bridson EY. 1998. The oxoid manual, 8th edition. Oxoid Limited, Hampsire, UK.
- Buchbauer G. 2003. Original research paper. *Acta Pharm* 53 : 73-81
- Budimulja U. 2007. Mikosis. Ilmu Penyakit Kulit dan Kelamin. Edisi V. Fakultas Kedokteran, Universitas Indonesia, Jakarta.
- Chusnie TPT, Lamb AJ. 2005. Riview antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 26: 343-356.
- Dahlan MS. Statistik untuk kedokteran dan kesehatan. 2008. Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Dalimartha S. 2009. Lengkuas dalam atlas tumbuhan obat Indonesia, jilid 6. Pustaka Bunda, Jakarta.
- Gholib D, Darmono. 2008. Pengaruh ekstrak lengkuas putih [*Alpinia galangal* (L.) Willd] terhadap infeksi trichophyton mentagrophytes pada kelinci. *Jurnal Ilmu Kefarmasian Indonesia* 6:57-62.
- Gholib D, Kusumaningtyas E. 2007. Uji daya hambat ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga* SW) dan daun sirih (*Piper betel* L.) terhadap kapang dermatofit secara in vitro dan in vivo. Pros. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner. Bogor, 21-22 Agustus 2007. Puslitbang Peternakan, Bogor.
- Harahap M. 2000. Ilmu Penyakit Kulit. Hipokrates, Jakarta.
- Hostettmann K, Wolfender JL, Terreaux C. 2001. Modern screening techniques for plant extracts. *Pharm Biol* 39 Suppl 1: 18-32.
- Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. 1996. Mikrobiologi Kedokteran, Edisi ke-20. EGC, Penerbit Buku Kedokteran, Jakarta.
- Lee SJ, Han JJ, Lee GS, et al. 2007. Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporum gypseum* in a guinea pig model. *Biol Pharmaceut Bull* 30 (1): 184-188.
- Murti B. 2006. Desain dan Ukuran Sampel untuk Penelitian Kuantitatif dan Kualitatif di Bidang Kesehatan. GMU Press, Yogyakarta.
- Nasution MA, Muis K, Rusmawardiana. Tinea Capitis. Dalam: Budimulya U, et al. (ed). *Dermatomikosis Superfisialis*. Balai Penerbit FKUI, Jakarta.
- Nasution MA. 2006. Mikologi dan Mikologi Kedokteran: Beberapa Pandangan Dermatologis. Dalam Pidato Pengukuhan Jabatan Guru Besar Tetap dalam Bidang Ilmu Kesehatan Kulit dan Kelamin pada Fakultas Kedokteran USU, Medan.
- Pakshir K, Bahaedinie L, Rezaei Z, Sodaifi M, Zomorodian K. 2009. In vitro activity of six antifungal drugs against clinically important dermatophytes. *Jundishapur J Microbiol* 2 (4): 158-163.
- Parwata OA, Dewi FS. 2008. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak. Atsiri dari Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga* L.). Universitas Udayana, Badung, Bali.
- Pinto Dias JC 2006. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). *Ann Intern Med* 144: 772-774.
- Riwidikdo, H., 2008, Statistik Kesehatan, Mitra Cendikia Press, Yogyakarta
- Romano C, Massai L, Gallo A, Fimiani M. 2009. *Microsporum gypseum* infection in the Siena area in 2005-2006. *Mycoses* 52 (1):67-71.
- Savitri FR. 2010. Efek Antifungi Ekstrak Biji Jinten Hitam. (*Nigella Sativa*) Terhadap Pertumbuhan *Microsporum Gypseum* Secara. In Vitro. [Skripsi], Fakultas Kedokteran Universitas Sebelas Maret. Surakarta,
- Sundari D, Winarno MW. 2001. Informasi tumbuhan obat sebagai antifungi. *Cermin Dunia Kedokteran* 130: 28-34.
- Tjay TH, Rahardja K. 2007. Obat-Obat Penting Khasiat, Penggunaan, dan Efek-Efek Sampingnya. Edisi ke VI. PT Elex Media Komputindo, Jakarta.
- Yuharmen Y, Eryanti Y, Nurbalatif. 2002. Uji Aktivitas Antimikrobia Minyak Atsiri dan Ekstrak Metanol Lengkuas (*Alpinia galanga*). *Jurnal Nature Indonesia* 4 (2): 17.