

Aktivitas Penghambatan *Candida krusei* oleh Ekstrak Etanol Batang Brotowali (*Tinospora crispa* L.)

Virgina Glory Brillianti¹, Suryani Hutomo², Christiane Marlene Sooai³, Maria Silvia Merry²

¹Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia

²Departemen Mikrobiologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia

³Departemen Parasitologi, Fakultas Kedokteran, Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, Indonesia

Alamat Korespondensi: suryani_hutomo@staff.ukdw.ac.id

Abstrak

Candida krusei merupakan salah satu jenis *Candida* dengan tingkat patogenitas yang lebih rendah dibandingkan *C. albicans*. Meskipun demikian spesies ini dapat menyebabkan penurunan respon imun inang karena memiliki struktur polisakarida *chitin* yang lebih tinggi. Pengobatan infeksi *Candida* yang disamaratakan mengakibatkan *C. krusei* menjadi resisten terhadap obat antijamur. Ekstrak etanol batang brotowali (*Tinospora crispa* L.) mengandung flavonoid dan alkaloid-berberin yang dapat menghambat pertumbuhan jamur. Penelitian ini bertujuan untuk menguji kemampuan ekstrak etanol batang brotowali dalam menghambat pertumbuhan *C. krusei*. Pembuatan ekstrak etanol batang brotowali dilakukan dengan menggunakan metode maserasi. Uji antijamur dilakukan dengan teknik difusi kertas cakram (*Kirby-Bauer test*). Ekstrak etanol batang brotowali mampu menghambat pertumbuhan *C. krusei* pada konsentrasi 2.500 µg/mL dan 5.000 µg/mL dengan zona hambat sebesar 17,75 mm dan 22,25 mm. Pada konsentrasi 1.250 µg/mL, zona hambat yang terbentuk sebesar 6,75 mm yang termasuk ke dalam kategori respon hambat pertumbuhan yang lemah. Analisis statistik menggunakan *One Way Anova* menunjukkan nilai $p < 0,05$. Kesimpulannya adalah ekstrak etanol batang brotowali mampu menghambat pertumbuhan *C. krusei* dengan konsentrasi efektif 2.500 µg/mL.

Kata Kunci: antijamur, *Candida krusei*, ekstrak etanol batang brotowali, *Tinospora crispa* L.

The Inhibitory Activity of Brotowali (Tinospora crispa L.) Stem Ethanolic Extract on Candida krusei

Abstract

Candida krusei, a variety of *Candida*, has lower pathogenicity than *C. albicans*. This species can cause a decrease in host immune response due to its higher *chitin* polysaccharide structure. Improper antifungals resulted in *C. krusei* resistance. Brotowali (*Tinospora crispa* L.) stem extract contains flavonoid and alkaloid-berberine that can inhibit the growth of fungi. This study aimed to determine brotowali stem ethanolic extract in inhibiting the growth of *C. krusei*. The ethanol extract of the brotowali stem was made using the maceration method. The antifungal activity test was carried out using the disc diffusion technique (*Kirby-Bauer test*). The ethanolic extract of brotowali stem inhibited the growth of *C. krusei* at the concentrations of 2,500 µg/ml and 5,000 µg/ml with inhibition zones of 17.75 mm and 22.25 mm. At a concentration of 1,250 µg/ml, the inhibition zone was 6.75 mm which was included in the category of weak growth inhibition response. Statistical analysis using *One Way Anova* showed a significant difference with $p < 0.05$. Ethanolic brotowali stem extract was able to inhibit the growth of *C. krusei* with a minimum inhibitory concentration of 2,500 µg/ml.

Keywords: *Candida krusei*, *Tinospora crispa* L., brotowali stem ethanolic extract, antifungal

How to Cite :

Brillianti V. G., Hutomo S., Sooai C. M., Merry M. S. Aktivitas Penghambatan *Candida krusei* oleh Ekstrak Etanol Batang Brotowali (*Tinospora crispa* L.). *J Kdkt Meditek*, 2022; 28(2), 120–125. Available from: <http://ejournal.ukrida.ac.id/ojs/index.php/Meditek/article/view/2221/version/2199>
DOI: <https://doi.org/10.36452/jkdoktmeditek.v28i2.2221>

Pendahuluan

Candida krusei merupakan salah satu jenis *Candida* yang diklasifikasikan dalam kerajaan *Fungi*, filum *Ascomycota*, subfilum *Saccharomycotina*, klas *Saccharomycetaceae*, genus *Candia*, dan spesies *C. krusei*.¹ Jamur ini berbentuk silinder menyerupai butiran beras dengan panjang sekitar 25 µm yang sangat berbeda dengan kebanyakan *Candida* yang berbentuk bulat dan oval. Seperti halnya dengan *C. albicans*, *C. krusei* memiliki sifat termodimorfisme, dimana dapat menghasilkan hifa pada suhu 37°C dan blastokonidia dan *pseudo*-hifa pada suhu rendah dan keadaan inkubasi. Koloni dari *C. krusei* memiliki morfologi yang sama dengan *Candida* lainnya, berwarna putih halus dan bertekstur *creamy* dengan ukuran 5-8 mm. *Candida krusei* dapat dikultur dengan baik pada media *malt yeast extract glucose agar*, *yeast extract peptone dextrose agar*, dan *sabouraud agar*.² Jamur ini menjadi salah satu penyebab kandidiasis dan mengambil peran sekitar 35-65% dalam kasus kandidemia.³

Saat ini, penelitian mengenai faktor virulensi *C. krusei* masih terbatas. *C. krusei* menjadi salah satu penyebab kandidiasis oral. Hal tersebut berkorelasi dengan keadaan imunokompromais, dimana penurunan sistem imun dapat memicu terjadinya infeksi *Candida* yang merupakan patogen oportunistik. Kondisi imunokompromais dijumpai pada penderita HIV/AIDS. Selain itu, *C. krusei* juga menjadi penyebab kandidemia pada pasien dengan gangguan hematologis.^{2,4}

Beberapa penelitian mengatakan bahwa golongan non-*albicans* seperti *C. krusei* memiliki kemampuan patogenitas yang lebih rendah dibanding *C. albicans*. Patogenitas yang rendah ini disebabkan oleh ketidakmampuan jamur tersebut untuk berubah bentuk menjadi hifa dan terjadi penurunan ekspresi dari Hwp1p (*hyphae specific polystrene*) yang berfungsi dalam proses perlekatan jamur.⁵ *Candida krusei* mampu memproduksi aspartil proteinase, fosfolipase, dan hemolisin yang merupakan enzim hidrolitik dan menjadi sumber energi bagi *C. krusei*.⁶ Enzim tersebut juga sekaligus dapat merusak jaringan dan membantu penyebaran *Candida* di dalam tubuh inang.⁷ Jamur ini memiliki struktur polisakarida berupa β -glucan, chitin, dan mannans, yang dimana kandungan chitin pada *C. krusei* lebih banyak 4,1 kali lipat dibanding *C. albicans*. Hal tersebut menyebabkan penurunan kemampuan reseptor imun inang untuk mengetahui keberadaan

C. krusei dan berakhir pada penurunan respon imun.^{2,8}

Kejadian resistensi terhadap *C. krusei* paling banyak terjadi pada agen antijamur golongan azol. Sering kali, kejadian tersebut diakibatkan oleh pengobatan infeksi *Candida* yang disamaratakan karena adanya anggapan bahwa semua infeksi oleh *Candida* memiliki virulensi yang sama. Dengan demikian, *C. krusei* yang kadar patogenitasnya dibawah *C. albicans*, ikut mengalami resistensi terhadap obat antijamur.⁹ Dengan adanya resistensi terhadap antijamur pada *C. krusei*, perlu dilakukan penelitian untuk menemukan antijamur ini.

Brotowali merupakan tanaman merambat yang sangat mudah ditemukan di Indonesia yang merupakan negara tropis. Tanaman ini memiliki batang berwarna coklat tua berbintil ketika tua, memiliki daun berbentuk hati, dan berbunga ketika sedang tidak berdaun.¹⁰ Brotowali memiliki kandungan fitokimia flavonoid dan alkaloid-berberin yang dapat berfungsi sebagai agen antijamur, yang 80% terkandung pada batang brotowali.¹¹ Tujuan penelitian ini adalah untuk menguji kemampuan ekstrak etanol batang brotowali sebagai antijamur terhadap *C. krusei*. Sebelumnya, telah terdapat penelitian yang menyatakan bahwa ekstrak etanol batang brotowali memiliki kemampuan antijamur terhadap *C. albicans* dan juga dapat berperan sebagai agen antibakteri dan antiprotozoa.^{11,12}

Metodologi

Persiapan Ekstrak

Pembuatan ekstrak etanol batang brotowali digunakan metode maserasi. Batang brotowali yang telah dikeringkan, dipotong-potong dan ditumbuk menjadi bentuk simplisia, direndam dalam etanol 96% selama 24 jam dalam wadah tertutup. Ampas batang brotowali dalam rendaman kemudian diperas dan larutan rendaman disaring. Ampas batang brotowali tadi direndam etanol 96% kembali selama 24 jam. Selanjutnya, larutan dievaporasi menggunakan *vacuum evaporator* dengan suhu 70°C yang bertujuan untuk menguapkan etanol dalam larutan tersebut.¹³ Ekstrak etanol batang brotowali (*Tinospora crispa* L.) diencerkan menggunakan *dimethyl sulfoxide* 2% (DMSO, *Merck, Germany*) untuk mendapatkan konsentrasi awal ekstrak sebesar 5.000 µg/ml yang selanjutnya disaring menggunakan *filter milipore* (*Sartorius, Germany*). DMSO digunakan sebagai pelarut ekstrak karena tidak memberikan pengaruh terhadap pertumbuhan mikroba. Sehingga respon

mikroba yang didapat, benar-benar berasal dari larutan uji.¹⁴

Persiapan fungi

Isolat *C. krusei* merupakan isolat klinik dari pasien RS Bethesda Yogyakarta dan telah diidentifikasi dengan menggunakan media *chrom agar* (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany). Koloni *C. krusei* pada *chrom agar* berwarna merah jambu (*pink*). Dua koloni *C. krusei* dari kultur media padat *yeast pepton dextrose* (YPD, Sigma, Missouri, USA) dikultur kembali pada media YPD cair (Sigma, Missouri, USA) dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Setelah inkubasi, kultur disentrifugasi selama 15 menit pada kecepatan 3000 rpm. Supernatan dibuang dan endapan diresuspensi menggunakan pepton (Oxoid, USA) hingga kekeruhannya setara dengan kekeruhan larutan standar McFarland 0,5.¹⁵

Uji antijamur

Uji aktivitas antijamur ekstrak etanol batang brotowali dilakukan dengan menggunakan modifikasi metode difusi kertas cakram (*Kirby Bauer test*).¹⁵ Cakram kosong (*blank disc*, Oxoid, USA) direndam dalam berbagai konsentrasi ekstrak etanol batang brotowali selama 5 menit. Konsentrasi ekstrak etanol yang digunakan pada penelitian ini sebesar 5.000 µg/mL, 2.500 µg/mL, dan 1.250 µg/mL. Sebagai kontrol positif digunakan flukonazol (Dexa Medica, dilarutkan dengan akuades) 2 mg/mL. Kontrol negatif dibuat dengan meletakkan kertas cakram kosong pada kultur media YPD. Isolat *C. krusei* diusapkan merata pada seluruh permukaan media agar YPD menggunakan kapas lidi steril dan diinkubasi selama 24 jam dalam suhu ruang. Pengukuran zona hambat dilakukan dengan menggunakan jangka sorong. Eksperimen dilakukan dengan pengulangan 4 kali dengan 3 hasil yang konsisten.

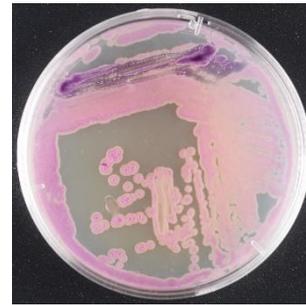
Analisis statistik

Analisis statistik pada penelitian diawali dengan uji normalitas menggunakan *Shapiro-Wilk test* dan uji homogenitas menggunakan *Levene test*. Uji hipotesis menggunakan uji *One Way Anova*. Nilai signifikan (p) secara statistik < 0,05.

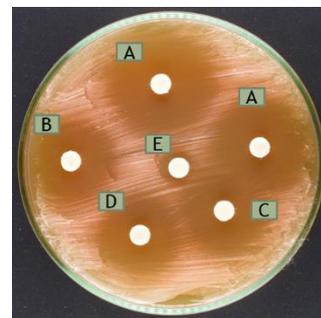
Hasil dan Pembahasan

Hasil yang didapat pada pengamatan biakan *C. krusei* dalam 24 jam, terlihat zona hambat pertumbuhan sudah terbentuk tetapi pertumbuhan *C. krusei* pada media agar YPD belum merata

(Gambar 1). Dengan demikian inkubasi diperpanjang 24 jam lagi (Gambar 2).

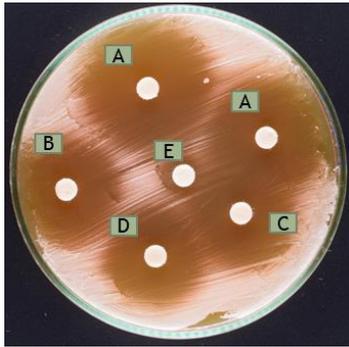


Gambar 1. Identifikasi *C. krusei* Menggunakan *Chrom Agar* yang Ditandai dengan Koloni Berwarna Merah Jambu (*pink*)



Gambar 2. Uji Antijamur Ekstrak Etanol Batang Brotowali terhadap Pertumbuhan *C. krusei* dengan Inkubasi Selama 24 Jam pada Suhu Ruang. (A) Kontrol positif, (B) 5.000 µg/mL, (C) 2.500 µg/mL, (D) 1.250 µg/mL, (E) Kontrol negatif

Efek antijamur oleh ekstrak etanol batang brotowali setelah inkubasi 48 jam terlihat pada konsentrasi 1.250 µg/mL, 2.500 µg/mL, dan 5.000 µg/mL, didapatkan rerata zona hambat sebesar 6,75 mm, 17,75 mm, dan 22,25 mm (Gambar 3). Berdasarkan klasifikasi respon hambat pertumbuhan jamur, konsentrasi 1.250 µg/mL, 2.500 µg/mL, dan 5.000 µg/mL, secara berurut, termasuk dalam kategori respon hambat pertumbuhan jamur yang lemah, kuat, dan sangat kuat (Tabel 1).



Gambar 3. Uji Antijamur Ekstrak Etanol Batang Brotowali terhadap Pertumbuhan *C. krusei* dengan Inkubasi Selama 48 Jam pada Suhu Ruang. (A) Kontrol positif, (B) 5.000 µg/mL, (C) 2.500 µg/mL, (D) 1.250 µg/mL, (E) Kontrol negatif

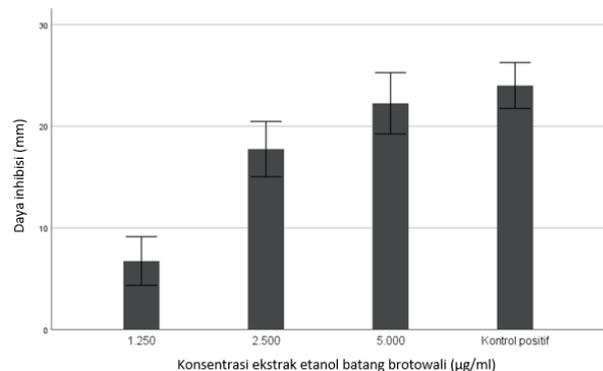
Tabel 1. Klasifikasi Respon Hambat Pertumbuhan Jamur¹⁶

Diameter zona (mm)	Kategori Respon Hambat Pertumbuhan Jamur
> 20	Sangat kuat
16-20	Kuat
1-1,5	Sedang
< 1	Lemah

Pada analisis data, uji normalitas dengan *Shapiro-Wilk test* didapatkan nilai signifikan ($p > 0,05$) yang berarti data terdistribusi normal. Uji homogenitas menggunakan *Levene test* didapatkan $p = 0,931$ sehingga $p > 0,05$ yang berarti data homogen. Uji hipotesis menggunakan *One Way Anova* didapatkan $p = 0,000$, yang berarti terdapat perbedaan yang signifikan dari keseluruhan data. Dari analisa statistik yang dilakukan, dapat disimpulkan bahwa terdapat pengaruh yang bermakna dalam peningkatan konsentrasi ekstrak etanol batang brotowali, yang mana semakin besar konsentrasi ekstrak etanol batang brotowali, semakin besar pula daya hambat pertumbuhan yang didapat (Gambar 4).

Senyawa fitokimia dalam batang brotowali memiliki efek antijamur dalam berbagai mekanisme.¹¹ Senyawa flavonoid dalam batang brotowali dapat menghambat pertumbuhan jamur dengan mendistrupsi membran plasma, menginduksi kerusakan mitokondria, dan menghambat pompa efluks. Membran plasma yang terdistrupsi dapat menyebabkan komponen intraseluler keluar dari dalam sel akibat kebocoran membran. Mitokondria dirusak dengan

mengganggu *Electron Transport Chain (ETC)* yang menyebabkan penurunan potensial membran.¹⁷ Mitokondria yang dirusak akan mengganggu pompa proton dan mengganggu proses pembentukan ATP dan akan berakhir pada kematian sel. Selain itu, kematian sel juga didorong akibat adanya modulasi aktivitas faktor transkripsi yang berperan dalam mengontrol ekspresi protein mitokondria, dimana komponen tersebut akan meningkatkan regulasi pro-apoptosis, dan menurunkan regulasi anti-apoptosis.^{18,19}



Gambar 4. Grafik Rerata dan Standar Deviasi Besar Daya Hambat Ekstrak Etanol Batang Brotowali terhadap Pertumbuhan *C. krusei* dengan Inkubasi Selama 48 Jam

Terhambatnya pompa efluks pada sel jamur, akan menyebabkan sel jamur tidak dapat memompa senyawa asing yang merugikan sel jamur, sehingga agen antijamur tetap dalam dosis yang efektif dan dapat bekerja dengan maksimal.²⁰ Penghambatan pompa efluks oleh flavonoid bekerja secara sinergi dengan molekul farnesol yang bekerja sebagai *Quorum Sensing Inhibitor (QSI)* alami dari dalam sel jamur tersebut. Kejadian tersebut akan mengarah pada apoptosis dini.²¹

Selain flavonoid, terdapat senyawa berberine yang merupakan turunan dari alkaloid. Berberin menghambat pertumbuhan jamur dengan menghambat kerja sterol yang dibutuhkan sel jamur dalam membentuk formasi biofilm dan mengganggu biosintesis dinding sel. Berberin juga menghambat formasi dinding sel dengan menghambat sintesis β -glucan dan chitin yang menjadi komponen penting dalam proses formasi dinding sel.²² Formasi dinding sel yang dihambat akan berdampak pada penurunan kerja monoprotein dengan sifat immunosupresifnya. Sehingga sel jamur tidak memiliki kemampuan dalam melawan sistem imunitas tubuh.²³ Selain itu, berberin dapat bersifat agonis terhadap produksi

Reactive Oxygen Species (ROS) yang dapat menimbulkan stres oksidatif pada sel jamur dan berujung pada kebocoran membran.²⁴

Adanya kemampuan penghambatan pompa efluks dan penurunan kemampuan pertahanan sel jamur oleh senyawa fitokimia batang brotowali, dapat dijadikan dasar dalam penggunaan batang brotowali sebagai alternatif pengobatan yang berkaitan dengan kejadian resistensi terhadap antijamur.

Simpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan, dapat disimpulkan bahwa ekstrak etanol batang brotowali mampu menghambat pertumbuhan *C. krusei* dengan konsentrasi hambat minimum pada penelitian ini adalah 2.500 µg/mL dengan adanya peningkatan daya hambat pertumbuhan seiring dengan peningkatan konsentrasi ekstrak etanol batang brotowali.

Ucapan Terima Kasih

Peneliti berterima kasih kepada Fakultas Kedokteran Universitas Kristen Duta Wacana, Yogyakarta, karena telah membantu dalam menyediakan fasilitas bagi pengerjaan penelitian ini.

Daftar Pustaka

1. Hameed AR, Ali SM, Ahmed LT. Biological study of *Candida* species and virulence factor. *Int J Adv Res Technol*. 2018;1:8-16.
2. Gomez-Gaviria M, Mora-Montes HM. Current aspects in the biology, pathogeny, and treatment of *Candida krusei*, a neglected fungal pathogen. *Infect Drug Resist*. 2020;13:1673-89.
3. Tan TY, Tan AL, Tee NW, Ng LS, Chee CW. The increased role of non-albicans species in candidaemia: results from a 3-year surveillance study. *Mycoses*. 2010;53(6):515-21.
4. Silangit IS. Identifikasi spesies *Candida* penyebab kandidiasis oral pada pasien HIV/AIDS di RSUP H. Adam Malik Medan. Repositori Universitas Sumatera Utara. 2017.
5. Ciurea CN, Kosovski I-B, Mare AD, Toma F, Pintea-Simon IA, Man A. *Candida* and candidiasis-opportunism versus pathogenicity: A review of the virulence traits. *Microorganisms*. 2020;8(6):857.
6. Ortega-Riveros M, De-Ia-Pinta I, Marcos-Arias C, Ezpeleta G, Quindos G, Eraso E. Usefulness of the non-conventional *Caenorhabditis elegans* model to assess *Candida* virulence. *Mycopathologia*. 2017;182(9-10):785-95.
7. Lestari PE. Peran faktor virulensi pada patogenesis infeksi *Candida albicans*. *Stomatognathic (JKG Unej)*. 2010;7(2):113-7.
8. Navarro-Arias MJ, Hernandez-Chavez MJ, Garcia-Carnero LC, Amezcua-Hernandez DG, Lozoya-Perez NE, Estrada-Mata E, et al. Differential recognition of *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, and *Candida auris* by human innate immune cells. *Infect Drug Resist*. 2019;12:783-94.
9. Sanguinetti M, Posteraro B, Lass-Flörl C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and Clinical Impact. *Mycoses*. 2015;58(2):2-13.
10. Hidayat S, Napitupulu R. Kitab tumbuhan obat (1 ed.). Jakarta: Agriflo; 2015.
11. Ahmad W, Jantan I, Bukhari SN. *Tinospora crispa* (L.) Hook. f. & Thomson: A review of its ethnobotanical, phytochemical, and pharmacological aspects. *Front Pharmacol*. 2016;7:59.
12. Warsinah H, Nuryanti. Screening of volatile compounds of brotowali (*Tinospora Crispa*) and antifungal activity against *Candida Albicans*. *IJPPR*. 2015;7(1):132-6.
13. Technology IC. Extraction technologies for medicinal and aromatic plants. Italy: Italian Ministry of Foreign Affairs; 2008.
14. Fitriani E. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sirsak (*Annona muricata* L.) terhadap *Shigella flexneri* secara *in vitro*. *Jurnal Mahasiswa PSPD FK Universitas Tanjungpura*. 2015;3(1).
15. Kirkpatrick WR, Turner TM, Fothergill AW, McCarthy DI, Redding SW, Rinaldi MG, et al. Fluconazole disk diffusion susceptibility testing of *Candida* Species. *J Clin Microbiol*. 1998;36(11):3429-32.
16. Puthera AAMPD, Agung IGN, Duniaji AS. Mempelajari pengaruh konsentrasi ekstrak rimpang lengkuas (*Alpinia galanga*) terhadap pertumbuhan *Aspergillus flavus* pada kacang tanah (*Arachis hypogaea* L.). *Jurnal ITEPA*. 2007;4(2):131-6.
17. Lagrouh F, Dakka N, Bakri Y. The antifungal activity of moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *J Mycol Med*. 2017;27(3):303-311.

18. Gibellini L, Bianchini E, De Biasi S, Nasi M, Cossarizza A, Pinti M. Natural compounds modulating mitochondrial functions. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015;2015:527209.
19. Guntuku L, Naidu VG, Yerra VG. Mitochondrial dysfunction in gliomas: pharmacotherapeutic potential of natural compounds. *Curr Neuropharmacol.* 2016;14(6):567-83.
20. Aboody MS, Mickymaray S. Anti-fungal efficacy and mechanisms of flavonoids. *Antibiotics.* 2020;9(2):45.
21. Sharma M, Prasad R. The quorum-sensing molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by ABC multidrug transporters and synergizes with drugs in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(10):4834-43.
22. Costa-de-Oliveira S, Rodrigues AG. *Candida albicans* antifungal resistance and tolerance in bloodstream infections: The triad yeast-host-antifungal. *Microorganisms.* 2020;(8)2:154.
23. Tania PO. Mekanisme escape dan respon imun innate terhadap *Candida albicans*. *Jurnal Ilmiah Kedokteran Wijaya Kusuma.* 2020;9(1):60-76.
24. Xie Y, Liu X, Zhou P. In vitro antifungal effects of berberine against *Candida* spp. in planktonic and biofilm conditions. *Drug Des Devel Ther.* 2020;14:87-101.