

Kode>Nama Rumpun Ilmu: 379/Analisis Medis

LAPORAN AKHIR PENELITIAN DOSEN PEMULA



JUDUL PENELITIAN

**UJI AKTIVITAS KITINASE ACTINOMYCETES TERHADAP
CANDIDA ALBICANS YANG DIISOLASI DARI PENDERITA
TUBERKULOSIS PARU**

TIM PENELITIAN:

**Novi Utami Dewi, SKM., M.Kes
NIDN : 4002117601**

**Entuy Kurniawan, S.Si, MKM
NIDN : 4011118603**

**POLITEKNIK KESEHATAN BANDUNG
JURUSAN ANALIS KESEHATAN
2020**

HALAMAN PENGESAHAN

Judul Penelitian	Uji Aktivitas Kitinase <i>Actinomyces</i> Terhadap <i>Candida albicans</i> Yang Diisolasi Dari Penderita Tuberkulosis Paru
Kode>Nama Rumpun Ilmu	379 / Analis Medis
Ketua Peneliti	Novi Utami Dewi, SKM, M.Kes
NIP / NIDN	197611022001122001 / 4002117601
Jabatan Fungsional	Lektor
Program Studi	Teknologi Laboratorium Medis
Nomor HP	082346757626
Alamat Surel (e-mail)	novi.tlm@staff.poltekkesbandung.ac.id
Anggota Peneliti	Entuy Kurniawan, S.Si, MKM
NIP / NIDN	196811111992031001 / 4011116803
Program Studi	Teknologi Laboratorium Medis
Perguruan Tinggi	Poltekkes Kemenkes Bandung
Tahun pelaksanaan/Lama	2020 / 1 (satu) tahun
Biaya Penelitian Keseluruhan	Rp 18.750.000,-

Cimahi, 31 Desember 2020

Kepala Pusat PPM

Ketua Tim Peneliti,

Dr. RR Nur Fauziah, SKM, MKM
NIP. 197007281993032002

Novi Utami Dewi, SKM., MKes
NIP. 197611022001122001

Mengetahui
Direktur Poltekkes Kemenkes Bandung

Dr. Ir. H. Osman Syarief, MKM
NIP. 196008061983121002

ABSTRAK

Koinfeksi *Candida* 40% terjadi pada penderita tuberkulosis paru (TBC), terutama *Candida albicans* (50-59%). *Actinomycetes* adalah bakteri yang menghasilkan metabolit sekunder bioaktif yang meliputi antibiotik, agen antitumor, dan enzim immunosupresif. Metabolit ini diketahui pula memiliki kemampuan sebagai antibakteri, anti jamur, antioksidan, neuritogenik, anti kanker, anti alga, anti cacing, anti malaria dan anti inflamasi. Hampir 80% antibiotik di dunia dibuat dari *Actinomycetes* yaitu genus *Streptomyces* dan *Micromonospora*. *Actinomycetes* memiliki kemampuan sebagai antijamur melalui mekanisme penghambatan kitinase terhadap kitin yang merupakan komponen dinding sel jamur. *Streptomyces albus* merupakan *Actinomycetes* kitinolitik yang telah diisolasi dan diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi, fisiologis dan biokimianya. Penelitian ini merupakan penelitian eksperimen bertujuan untuk menentukan daya hambat kitinase isolat *Actinomycetes* terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang diisolasi dari penderita TBC serta penentuan konsentrasi hambat minimum. Penentuan daya hambat kitinase terhadap *Candida albicans* menggunakan konsentrasi Kitinase 12,5 mg/mL, 6,25 mg/mL, 3,125 mg/mL, 1,562 mg/mL, 0,781 mg/mL dan 0,390 mg/mL menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan dari berbagai konsentrasi perlakuan berdasarkan uji Dunnett T3 ($P < 0.05$). Konsentrasi terendah enzim kitinase pada penelitian masih menunjukkan hambatan pertumbuhan sebesar 58,15% dengan demikian dapat disimpulkan Kitinase yang diproduksi dari isolat *Actinomycetes Streptomyces albus* subspecies *albus* InaCC A490 mampu menghasilkan penghambatan sebesar 58.15% terhadap pertumbuhan *Candida albicans* pada konsentrasi hambat minimum sebesar 0.390 mg/mL. Kitinase sebagai produk metabolit sekunder *Actinomycetes Streptomyces albus* subspecies *albus* InaCC A490 memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Candida albicans* penyebab koinfeksi tuberkulosis paru, disarankan dilakukan penelitian lanjutan sehingga kitinase dapat dimanfaatkan sebagai antifungi.

Kata Kunci: Aktivitas kitinase, Isolat *Actinomycetes*, *Minimum Inhibition Concentration* (MIC), *Candida albicans*, TBC Paru

KATA PENGANTAR

Puji syukur kami panjatkan kehadirat Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat, taufik dan hidayah-Nya atas perkenan-Nya kami dapat menyelesaikan Laporan Akhir Penelitian Dosen Pemula Tahun 2020 yang berjudul “Uji Aktivitas Kitinase *Actinomyces* Terhadap *Candida albicans* Yang Diisolasi Dari Penderita Tuberkulosis Paru.”

Laporan Akhir penelitian ini dapat tersusun berkat dukungan dan bantuan dari berbagai pihak, oleh karena itu kami mengucapkan terimakasih kepada:

1. Dr Ir. H. Osman Syarif, MKM selaku Direktur Poltekkes Kemenkes Bandung yang telah memberikan kesempatan kepada penulis untuk melaksanakan penelitian dosen
2. Dr. RR Nur Fauziah, SKM, MKM selaku Kepala Pusat PPM Poltekkes Kemenkes Bandung, yang telah memberikan arahan serta dukungan dalam proses pembinaan dalam kegiatan Penelitian Dosen Poltekkes Bandung
3. Dr. Betty Nurhayati, S.Si., M.Si dan Dr. Hotma Rumahorbo, S.Kp, M.Epid sebagai reviewer yang telah memberikan arahan, bimbingan, saran dan masukan yang sangat berharga sehingga penelitian dapat terlaksana dengan baik
4. Ka. Sub Unit Laboratorium Jurusan Analis Kesehatan dan Staff Laboratorium Parasitologi dan Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Analis Kesehatan
5. Ka Unit dan staff Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Bandung atas izin dan bimbingan teknisnya selama pelaksanaan penelitian
6. Direktur dan staff Laboratorium Aretha Medika Utama yang telah bekerjasama dan membantu dalam penyelesaian penelitian
7. Semua pihak yang telah memberi dukungan dan bantuan yang kami tidak dapat sebutkan satu persatu.

Semoga semua bantuan yang telah diberikan kepada penulis dicatat sebagai amal baik yang tidak pernah terputus dan hanya Allah jualah Tuhan Yang Maha Esa yang dapat membalasnya. Penulis menyadari dalam penyusunan laporan ini penulis tidak lepas dari kesalahan oleh karena itu kami berharap kritik dan saran untuk kesempurnaan laporan hasil penelitian ini.

Besar harapan penulis semoga laporan penelitian ini memberikan sebesar-besarnya manfaat, dapat menginspirasi para pembaca dan bermakna bagi perkembangan dunia kesehatan Indonesia. Aamiin

Cimahi, 31 Desember 2020

Tim Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN PENGESAHAN

ABSTRAK	ii
KATA PENGANTAR	iii
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii

BAB I PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang Masalah.....	1
1.2. Masalah Penelitian.....	5
1.3. Tujuan Penelitian.....	5
1.4. Manfaat Penelitian.....	5

BAB II TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Dasar Teori.....	6
2.2. Tinjauan Tentang Tuberkulosis Paru.....	9
2.3. Tinjauan tentang <i>Candida albicans</i>	11
2.4. Kerangka Konsep.....	17
2.5. Alur Penelitian.....	18
2.6. Defenisi Operasional.....	19
2.7. Hipotesis.....	19

BAB III METODE PENELITIAN

3.1. Jenis Penelitian.....	20
3.2. Desain Penelitian.....	20
3.3. Populasi dan Sampel.....	21
3.4. Tempat dan Waktu Penelitian.....	21
3.5. Objek dan Subjek Penelitian.....	21

3.6. Prosedur Penelitian.....	21
3.7. Pengolahan dan Analisis data.....	32
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1. Hasil Penelitian.....	35
4.2. Pembahasan.....	39
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN	43
5.1. Kesimpulan.....	43
5.2. Saran.....	43
DAFTAR PUSTAKA.....	44
LAMPIRAN - LAMPIRAN	48

DAFTAR TABEL

Tabel 3.1	Desain Penelitian.....	21
Tabel 3.2	Skema Pengerjaan Uji Aktivitas.....	28
Tabel 3.3	Hasil Pembacaan Standar N asetilglukosamin.....	29
Tabel 3.4	Hasil Pengukuran <i>Optical Density</i> (OD) Pengaruh Kitinase Terhadap <i>Candida albicans</i>	33
Tabel 3.5	Hasil Perhitungan Jumlah Sel Hidup dan Persentase Penghambatan Kitinase Terhadap <i>Candida albicans</i>	34
Tabel 4.1	Distribusi Spesies <i>Candida</i> sp Pada Sputum Penderita Tuberkulosis Paru.....	35
Tabel 4.2	Hasil Perhitungan Enzim Index.....	36
Tabel 4.3	Hasil Pembacaan Absorbansi Uji Aktifitas Kitinase.....	36
Tabel 4.4	Hasil Pengukuran Daya Hambat Kitinase Terhadap <i>Candida albicans</i>	37

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Morfologi Umum Jamur Patogen.....	12
Gambar 2.2	Patogenitas <i>Candida albicans</i>	14
Gambar 2.3	Kerangka Konsep.....	17
Gambar 2.4	Alur Penelitian.....	18
Gambar 3.1	Isolasi <i>Candida</i> dari sampel sputum.....	22
Gambar 3.2	Pewarnaan BTA.....	23
Gambar 3.3	Koloni <i>Candida</i> Pada Media BAP dan SDA.....	23
Gambar 3.4	Koloni <i>Candida albicans</i> Pada Media Chrome Agar.....	24
Gambar 3.5	Gambaran Mikroskopis Hasil Pewarnaan Gram <i>Candida albicans</i> Dari Media BAP Dan <i>Chromogenic Candida Agar</i>	25
Gambar 3.6	Proses Pembuatan Koloidal Kitin.....	26
Gambar 3.7	Skrining Kitinase Pada Media Kitin Koloidal Agar.....	27
Gambar 3.8	Media Produksi Kitin.....	28
Gambar 3.9	Kurva Standar N asetilglukosamin.....	29
Gambar 3.10	Persiapan Inokulum <i>Candida</i>	32
Gambar 3.11	Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum.....	33
Gambar 4.1	Persentase Viabilitas <i>Candida albicans</i> Setelah Pemberian Kitinase.....	38
Gambar 4.2	Persentase Inhibisi Kitinase Terhadap Kitinase Terhadap <i>Candida albicans</i>	38

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran 1	Persetujuan Etik.....	48
Lampiran 2	Log Book Penelitian.....	49
Lampiran 3	Hasil Uji Statistik.....	58
Lampiran 4	Laporan Keuangan.....	62
Lampiran 5	Biodata Peneliti.....	66

BAB I

PENDAHULUAN

1.1.Latar Belakang Masalah

Tuberkulosis (TBC) masih merupakan masalah kesehatan utama. Setiap tahun, sekitar dua juta orang di dunia meninggal karena TBC dan sembilan juta menjadi terinfeksi.¹ TBC paru merupakan penyakit yang umumnya disebabkan oleh *Mycobacterium tuberculosis*, TBC termasuk 10 penyebab utama kematian di seluruh dunia. Lebih dari 95% kasus TBC paru telah dilaporkan dari negara-negara berkembang, terutama dari Asia, Afrika, Timur Tengah dan Amerika Latin yang memiliki peralatan diagnostik dan terapeutik yang terbatas. Angka kematian telah mencapai sekitar tiga juta orang dewasa dan anak-anak.²

Terjadinya TBC bersifat global, pada tahun 2016, jumlah kasus TBC baru yang tertinggi terjadi di Asia, dengan 45% kasus baru, diikuti oleh Afrika, dengan 25% kasus baru. Pada 2016, 87% kasus baru berasal dari 30 negara dengan TBC tinggi. Tujuh negara (India, Indonesia, Cina, Filipina, Pakistan, Nigeria, dan Afrika Selatan) bertanggung jawab atas 64% kasus TBC baru.²

Indonesia menempati peringkat ketiga negara dengan kasus tuberkulosis terbanyak di dunia, sekitar 8% dari total 10 juta kasus TB terjadi di Indonesia pada tahun 2017, sehingga memiliki beban kasus TB global dan diakui oleh Organisasi Kesehatan Dunia (WHO) sebagai negara dengan beban tinggi untuk TBC, *Multi-Drug Resistant TB* (MDR-TB) dan TB/HIV. Pengembangan Sumber daya manusia, pelatihan untuk staf di daerah terpencil, keterampilan manajemen, dan kapasitas untuk perawatan HIV dan MDR-TB kurang optimal dan tetap menjadi tantangan untuk eliminasi TBC di Indonesia.³

Banyak faktor yang memperburuk keadaan seseorang dengan penyakit tuberkulosis paru atau ekstraparu dan menyebabkan masalah dalam diagnosis dan pengobatan. Hal yang diketahui dapat memperburuk dan menyebabkan kerusakan paru kronik diantaranya diabetes, pasien usia lanjut, kadar kolesterol tinggi, kanker paru-paru, defisiensi imun, dan infeksi jamur paru-paru. Dalam beberapa waktu terakhir, terdapat minat yang kuat pada diagnosis infeksi jamur karena

fakta bahwa pasien yang mengidap penyakit jamur menunjukkan terjadinya penyakit. infeksi paru-paru seperti TBC.⁴ Penurunan imunitas dan penggunaan antituberkulosis non spesifik pada penderita tuberkulosis akan meningkatkan prevalensi infeksi jamur oportunistik yang akan menjadi patogen disebabkan reproduksi jamur flora normal dan membentuk koloni jamur melekat pada jaringan paru-paru.¹

Berbagai jamur patogen terlibat dalam TBC paru seperti *Aspergillus*, *Histoplasma* dan *Cryptococcus* tergantung pada distribusi geografis dan susunan genetik, tetapi *Candida albicans* adalah jamur jenis yeast/ragi yang paling umum diisolasi dari pasien TBC. *Candida albicans* menyebabkan infeksi sekunder yang parah pada pasien tersebut. *C. albicans* adalah flora normal saluran pernapasan, dapat ditemukan pada lebih dari 50% dahak pasien dengan TBC paru, sekitar 25% ditemukan pada pasien di rumah sakit dengan kondisi lain dan lebih dari 10% ditemukan pada orang sehat. Dari semua faktor predisposisi, kandidiasis sebagian besar terkait dengan terapi antibakteri spektrum luas pada pasien dengan penyakit bronkopulmoner kronis.¹

Prevalensi mikosis oportunistik telah meningkat selama beberapa tahun terakhir. Jamur oportunistik ini merupakan patogen potensial pada pasien yang mengalami gangguan kekebalan, pasien dengan beberapa penyakit yang sudah ada sebelumnya dan pasien dengan riwayat antibiotik yang panjang. Tingkat infeksi jamur oportunistik pada pasien TBC juga sangat tinggi. Alasan meningkatnya prevalensi adalah menurunnya sistem kekebalan tubuh karena TBC dan penggunaan obat antituberkulosis dari tindakan nonspesifik, yang mendorong pertumbuhan dan reproduksi flora jamur dan pada akhirnya memperberat infeksi dalam jaringan paru-paru.¹ Infeksi saluran pernafasan adalah salah satu keadaan yang terjadi bersamaan infeksi tuberkulosis koinfeksi jamur dengan demikian pasien TBC koinfeksi *Candida* harus rutin dilakukan uji kepekaan terhadap anti jamur baik untuk *Candida albicans* atau spesies *Candida* lainnya.

Candida adalah jamur yang umumnya merupakan flora normal orofaring, saluran pencernaan, dan saluran kemih pada manusia yang sehat. Namun *Candida albicans* merupakan jamur oportunistik, dapat bersifat patogen pada manusia,

Candida dapat menyerang beberapa organ, termasuk otak, mediastinum, ginjal, jantung, paru-paru, pankreas, hati dan peritoneum.⁴ *Candida albicans* telah berevolusi sebagai jamur yang berpotensi patogen, bukan sebagai flora normal selaput lendir, namun penyebab infeksi penyerta pada pasien dengan penyakit bronkopulmoner, hal ini dapat meningkatkan komplikasi pada penyakit tuberkulosis. Kasus koinfeksi *Candida* terjadi 40% pada TBC paru yaitu dengan jenis spesies: *C. albicans* (50-59%), diikuti oleh *C. tropicalis* (20%) dan *C. glabrata* (20%). Spesies *Candida* ditetapkan sebagai agen jamur yang paling umum diisolasi dari sputum pasien TB paru.^{5,6}

Berdasar hasil penelitian di India Prevalensi jamur total di antara 60 pasien dengan tuberkulosis paru pada SDA adalah 33 (55%) *Candida* dan 3 (5%) *Aspergillus*. Prevalensi spesies *Candida* dibedakan pada media ChromAgar menunjukkan *C. albicans* merupakan spesies yang dominan, diikuti oleh *Candida tropicalis* dan *Candida krusei*. Kelompok yang baru didiagnosis atau tidak diobati lebih jarang dikaitkan dengan mikosis paru daripada kelompok kronis atau yang diobati. Prevalensi infeksi *Candida* lebih banyak pada pria daripada wanita.¹

Hampir 80% dari antibiotik dunia dibuat dari *Actinomycetes* yaitu genus *Streptomyces* dan *Micromonospora*.^{7,8} *Streptomyces sp.* telah diakui sebagai produsen metabolit bioaktif yang paling produktif dengan berbagai manfaat. *Actinomycetes* juga memainkan peran penting dalam bioteknologi tanaman karena strain dengan aktivitas antagonistik terhadap patogen tanaman berguna dalam biokontrol. *Actinomycetes* menghasilkan metabolit sekunder bioaktif yang meliputi antibiotik, agen antitumor, dan enzim immunosupresif. Metabolit ini diketahui memiliki kemampuan sebagai antibakteri, antijamur, antioksidan, neuritogenik, anti kanker, anti alga, anti-cacing, anti-malaria dan anti-inflamasi.⁷

Actinomycetes digolongkan sebagai kelompok bakteri gram positif yang unik karena kemampuan membentuk spora dan pembentukan struktur miselia. Bakteri ini telah dikenal sebagai reservoir yang kaya akan antibiotik dan karenanya sangat relevan bagi para ilmuwan, industri farmasi dan industri pertanian. Sejumlah besar antibiotik yang saat ini digunakan termasuk

erythromycin, streptomycin, rifamycin dan gentamycin, semuanya merupakan produk yang diisolasi dari *Actinomycetes* tanah.⁹

Penelitian banyak dilakukan untuk mengeksplorasi beragam habitat yang belum dimanfaatkan dalam upaya untuk menemukan strain *Actinomycetes* dalam produksi enzim kitinase baru yang dapat diaplikasikan di berbagai industri misalnya untuk pengelolaan limbah, pengendalian hama di pertanian, dan perawatan kesehatan. Isolasi dan penjarangan bakteri dilakukan melalui kemampuan pembentukan enzim ekstraseluler kitinase. Berbagai macam bakteri di lingkungan adalah produsen kitinase ekstraseluler yang efisien, *actinomycetes* adalah produsen kitinase yang paling banyak diketahui.¹⁰

Actinomycetes banyak ditemukan ditanah, perairan dan lumpur sungai.¹¹ Tanah adalah sumber terbaik *Actinomycetes* dan sebagian besar penelitian telah difokuskan dan terkonsentrasi pada ekosistem tanah. *Actinomycetes* ditemukan berlimpah di semua tanah, tidak diolah, subur dan tidak subur serta telah dibudidayakan, di berbagai wilayah di seluruh dunia. Distribusi dan aktivitas *Actinomycetes* tergantung pada pH. Tanah asam dengan pH di bawah 5,0 akan banyak mengandung *Streptomyces*. Kompos terdiri dari banyak *Actinomycetes* mesofilik aktif.⁷ *Actinobacteria* memainkan peran penting dalam siklus rantai karbon terutama terkait dengan solubilisasi dinding sel jamur dan sel, serta kutikula serangga dan cangkang krustasea. *Actinobacteria* mengeluarkan berbagai protein ekstraseluler yang dapat dijadikan sumber enzim kepentingan industri. Enzim kitinolitik diproduksi oleh banyak jenis bakteri dan eukariota termasuk tanaman dan hewan tetapi dalam prokariota, aktinobakteria adalah merupakan pengurai kitin terbaik.¹²

Streptomyces albus merupakan aktinomisetes kitinolitik yang telah diisolasi diidentifikasi berdasarkan karakteristik morfologi, fisiologis dan biokimianya. Produksi kitinase maksimum ditemukan pada hari kelima inkubasi, dengan pH 8 dan 37°C menggunakan substrat koloid kitin. Kitinase aktinomisetes belum diketahui daya hambatnya terhadap jamur pathogen khususnya jamur koloni ragi *Candida albicans* yang diisolasi dari penderita TBC sebagai jamur oportunistik penyerta infeksi tuberkulosis paru.

1.2 Masalah Penelitian

- 1) Apakah kitinase dalam isolat *Actinomycetes* dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang diisolasi dari penderita tuberkulosis Paru?
- 2) Berapakah konsentrasi hambat minimum kitinase isolat *Actinomycetes* mampu menghambat pertumbuhan *Candida albicans*?

1.3 Tujuan Penelitian

- 1) Untuk menentukan daya hambat kitinase isolat *Actinomycetes* terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang diisolasi dari penderita tuberkulosis Paru
- 2) Untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum kitinase isolat *Actinomycetes* terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*

1.4. Manfaat Penelitian

1) Manfaat Umum

Penelitian ini diharapkan dapat memperkaya kepustakaan dibidang mikrobiologi mengenai peran kitinase *Actinomycetes* sebagai agen biokontrol jamur patogen *Candida albicans* secara *in vitro*.

2) Manfaat Khusus

Penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan masukan dan wawasan mengenai aktivitas daya hambat kitinase *Actinomycetes* terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* dan potensi kitinase sebagai antifungi.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Dasar Teori

1. *Actinomycetes*

Actinomycetes adalah bakteri aerobik, gram positif, membentuk spora, termasuk dalam ordo *Actinomycetales* ditandai dengan pertumbuhan miselium substrat dan miselium udara. Struktur genome memiliki rasio (G + C) DNA yang tinggi (> 55mol%). Nama *Actinomycetes* berasal dari bahasa Yunani atkis (sinar) dan mykes (jamur), yang memiliki karakteristik bakteri dan jamur, tetapi belum memiliki fitur khas yang cukup untuk membatasi mereka menjadi bakteri. *Actinomycetes* adalah produsen potensial antibiotik dan senyawa bermanfaat untuk pengobatan. Metabolit sekunder bioaktif yang diproduksi oleh *actinomycetes* termasuk antibiotik, agen antitumor, agen immunosupresif dan enzim. Metabolit ini dikenal memiliki peran sebagai antibakteri, antijamur, antioksidan, neuritogenik, anti-kanker, anti-alga, anti-helminik, anti-malaria dan anti-inflamasi. *Actinomycetes* telah terbukti kemampuannya dalam menghasilkan berbagai metabolit sekunder bioaktif dan untuk alasan ini, penemuan molekul baru antibiotik dan non-antibiotik melalui skrining metabolit sekunder mikroba menjadi semakin penting.¹³

Sebagian besar *Actinobacteria* (khususnya *Streptomyces*) adalah organisme saprofitik, yang hidup di tanah yang menghabiskan sebagian besar siklus hidupnya sebagai spora, terutama dalam kondisi kekurangan nutrisi. *Actinomycetes* berada di tanah, air tawar dan air mengandung garam, dan udara. Mereka lebih berlimpah di tanah daripada media lain, terutama di tanah alkali dan tanah yang kaya akan bahan organik, *Actinomycetes* merupakan bagian penting dari populasi mikroba. *Actinobacteria* dapat ditemukan di permukaan tanah dan pada kedalaman lebih dari 2 meter di bawah tanah.¹⁴

Kepadatan populasi *Actinobacteria* tergantung pada habitat dan kondisi iklim, pertumbuhan di tanah berkisar 10^6 hingga 10^9 sel per gram tanah, populasi di tanah didominasi oleh genus *Streptomyces*, yang menyumbang lebih dari 95%

dari strain *Actinomycetales* yang terisolasi dari tanah. Faktor-faktor lain, seperti suhu, pH, dan kelembaban tanah juga mempengaruhi pertumbuhan *Actinobacteria*, sebagian besar bersifat mesofilik, dengan pertumbuhan optimum pada suhu antara 25 dan 30 ° C, tumbuh di tanah dengan pH netral, pertumbuhan terbaik pada pH 6-9 dan pertumbuhan maksimum di sekitar pH netral. Akan tetapi untuk beberapa spesies seperti *Streptomyces* telah diisolasi dari tanah yang bersifat asam (pH 3,5).¹⁴

Enzim kitinolitik telah teridentifikasi dari beberapa *Streptomyces spp.* Diantaranya *S. antibioticus*, *S. griseus*, *S. plicatus*, *S. lividans*, *S. aureofaciens*, *Streptomyces albidoflavus*, *S. olivaceoviridis*, *S. thermidolromus*, *S. viridochromogenes* dan *S. halstedii*.¹⁵

Metabolit sekunder antijamur yang diproduksi oleh diisolasi pada tahun 2011 dari *Streptomyces sp.* Sceliphrolactam menunjukkan aktivitas antijamur yang kuat dengan MIC 4 ug / ml. Produk metabolit sekunder lainnya diisolasi dari actinomycetes tanah, *Streptomyces lavenduligriseus*. Glikidilfilipin III yang menunjukkan penghambatan kuat pertumbuhan *C. albicans* dengan nilai MIC 6,25 µg/ ml dibandingkan dengan MIC = 3,13 µg / ml untuk kontrol, nistatin. Pada 2017, *Streptomyces sp.* strain diisolasi dari sampel tanah yang dikumpulkan dari tambang batu bara pada kedalaman 20 cm di Nanchang, Jiangxi, Republik Rakyat Cina. Aktivitas anti jamur paling ampuh melawan *C. glabrata* ATCC 90030.¹⁶

2. Kitinase

Kitin merupakan homopolimer yang tersusun dari N-asetil-D-glukosamin dengan ikatan β -1,4 yang terdapat berlimpah di alam setelah selulosa. Secara umum kitin banyak terdapat pada integument insekta, crustacean, nematode dan beberapa protozoa serta merupakan komponen utama penyusun dinding sel fungi. Kitinase adalah enzim yang mendegradasi kitin menjadi N-asetilglukosamin, degradasi kitin dapat dilakukan oleh organisme kitinolitik dengan melibatkan enzim kitinase. Organisme pendegradasi kitin umumnya berasal dari kelompok mikroorganisme diantaranya bakteri.¹⁷

Kitinase adalah enzim yang menghidrolisis ikatan β -1,4 dari N-asetil glukosamin yang ada dalam rantai kitin. Karena banyak terdapat di lingkungan, biaya rendah, stabilitas dan produktivitas tinggi, kitinase mikroba memiliki kemampuan untuk pengelolaan limbah, pengendalian hama di pertanian, dan perawatan kesehatan manusia. Produksi enzim tergantung pada pemilihan strain, optimalisasi kondisi fermentasi, peningkatan genetik strain dan studi kinetik enzim. Berbagai macam bakteri di lingkungan adalah produsen kitinase ekstraseluler yang efisien. *Actinomycetes* adalah produsen kitin terbaik.¹⁰

Bakteri penghasil kitinase dapat menghambat pertumbuhan jamur, misalnya jamur patogen tanaman. Mekanisme penghambatannya adalah aksi kitinase dan β -glukanase pada kitin atau glukukan yang ada di dinding sel jamur ini, kitin dan glukukan bertindak sebagai agen pelindung. *Actinomycetes*, khususnya genus *Streptomyces*, yang merupakan bakteri miselium Gram-positif, ada di mana-mana di tanah, dikenal sebagai produsen banyak enzim ekstraseluler dengan sifat pengurai polimer, termasuk kitinase. *Actinomycetes* ditanam dalam kultur shake, pada medium kitin cair (Hsu dan Lockwood 1975) pada suhu 28 ° C selama 3 hari. Enzim kasar diperoleh setelah sentrifugasi dan supernatant.¹⁸

Untuk penentuan aktivitas kitinase, menggunakan kitin koloidal 1%, ditambahkan dengan 0,3% NaCl, 0,1% KH₂PO₄ dan agar 2,0%. Inokulasi spot dilakukan untuk semua isolat dan media diinkubasi pada suhu 28 ° C selama 7 hari. Setelah inkubasi zona bening transparan di sekitar koloni menunjukkan aktivitas kitinase dan Enzymatic Index (EI) ditentukan secara semikuantitatif. Untuk menganalisis potensi isolat terhadap profil enzim, pertumbuhan *Actinomycetes* dianalisis menggunakan Enzymatic Index (EI). *Enzymatic Index* (EI) diekspresikan oleh hubungan antara diameter rata-rata degradasi halo dan diameter rata-rata pertumbuhan koloni.¹⁹

$$EI = \frac{\text{Diameter Zona Jernih} - \text{Diameter koloni}}{\text{Diameter Koloni}}$$

Protein pengikat kitin dan kitinase dapat digunakan untuk mendeteksi infeksi jamur invasif pada pasien dengan immunosupresi. Kitinase, berkaitan dengan dinding sel jamur, memiliki peran dalam sporulasi jamur berfilamen. Ini

telah ditunjukkan dengan menggunakan inhibitor kitinase demethylallosamidin dan allosamidin, yang menyebabkan penghambatan fragmentasi hifa menjadi arthroconidia. *Trichoderma* yang merupakan jamur kitinolitik telah dianggap sebagai agen biokontrol terhadap jamur pathogen. Kitinase dan glukonase dari *Talaromyces flavus* dan *Trichoderma sp.* telah dimurnikan dan dikarakterisasi. Hartl dan rekan telah memberikan wawasan terperinci tentang keanekaragaman, sifat mekanistik, dan potensi bioteknologi dari beberapa jenis kitinase jamur lainnya.²⁰

2.2 Tinjauan Tentang Tuberkulosis Paru

Tuberkulosis (TBC) tergolong ke dalam sepuluh penyakit penyebab kematian di dunia. Berdasarkan data WHO pada tahun 2015 diperkirakan terjadi 10,4 juta kasus baru dimana 56% pada laki-laki, 34% pada perempuan dan 10% kasus pada anak-anak. Enam negara yaitu India, China, Nigeria, Pakistan, Afrika Selatan termasuk Indonesia menyumbang 60% dari jumlah kasus baru tersebut. Di seluruh dunia penurunan angka kejadian TB masih berkisar 1,5% pada tahun 2014-2015 dan harus ditingkatkan menjadi 4-5% untuk mencapai tujuan strategi eliminasi tuberkulosis di dunia pada Tahun 2020. Penanggulangan TB terkendala pula dengan terjadinya Multi-drug resistance (MDR) TB yang diperkirakan dari 580.000 kasus MDR-TB hanya 125.000 (20%) kasus yang dilaporkan, selain itu juga dilaporkan 55% pasien TB disertai hasil tes HIV, proporsi pasien HIV dengan antiretroviral virus menunjukkan 78% hasil positif TB.²¹

Infeksi tuberkulosis terjadi ketika basil tuberkulosis menyebar di udara dari pasien dengan tuberkulosis paru aktif, udara yang terhirup akan mencapai alveoli, kemudian akan difagosit dengan cepat oleh makrofag sebagai respon imun yang paling sering dapat membunuh bakteri yang masuk. Apabila bakteri dapat bertahan dari sistem ini, bakteri akan aktif membelah diri di dalam makrofag, berdifusi ke dalam sel yang berdekatan termasuk sel epitel endotel, setelah beberapa minggu pertumbuhan akan meningkat secara eksponensial dan bakteri bertambah banyak, selama tahap awal infeksi, MTB dapat berdifusi ke organ lain melalui limfatik dan penyebaran hematogen sehingga dapat menginfeksi sel-sel

lain, yang kemudian akan memicu respon imun adaptif terjadi migrasi netrofil, limfosit dan sel imun lainnya ke tempat awal terjadi infeksi awal membentuk granuloma, sehingga bakteri terisolasi dan terlindungi oleh respon imun pejamu.²²

Tuberkulosis ditularkan melalui tetesan ludah (droplet nuclei) yang menyembrot saat batuk, bersin dan berbicara dari seseorang yang terinfeksi, droplet yang terakumulasi diudara karena ukuran tetesan sangat kecil (diameter <5-10 µm) sehingga mudah kering dengan cepat dan dapat tetap di udara selama beberapa jam dan dapat mencapai saluran pernafasan terdalam ketika dihirup. Rumah adalah tempat yang paling rentan untuk kontak dengan droplet penderita TB dan merupakan faktor risiko penularan TB.²³

Tuberkulosis (TB) merupakan penyakit mematikan bagi manusia, masih merupakan beban bagi negara berpendapatan rendah dan menengah baik dari masalah kesehatan, sosial dan ekonomi. Tidak tersedianya vaksin yang efektif, tingginya harga obat, kurangnya ketersediaan obat, serta kurangnya alat diagnosis di negara endemik tuberkulosis menyebabkan kemunculan kembali (reemerging) tuberkulosis dan menjadi pandemi global.²²

Infeksi *Candida* umumnya terjadi pada pasien immunosupresif, terutama mereka yang telah diobati dengan immunosupresor. Penelitian terbaru menunjukkan bahwa *M. tuberculosis* dapat menyebabkan menurunnya modulasi mediator imun terhadap sel T helper (Th1) dan kemungkinan memiliki efek penekan pada sistem kekebalan inang.⁴ Koeksistensi antara patogen jamur dan TB paru adalah suatu kondisi klinis yang umumnya terjadi pada pasien immunosupresif, namun, lebih jarang pada pasien immunokompeten.²

Dari sekitar 611.000 spesies jamur, hanya 600 spesies saja yang pathogen terhadap manusia. Jamur yang berpotensi menyebabkan infeksi sistemik yang mengancam jiwa (misalnya, *Aspergillus fumigatus*), *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, dan *Candida albicans*. Jamur polimorfik *Candida albicans* adalah merupakan jamur flora normal manusia, pada sebagian besar individu, *C. albicans* hidup sebagai komensal seumur hidup dan tidak berbahaya. Namun, dalam keadaan tertentu, *C. albicans* dapat menyebabkan infeksi yang berkisar dari infeksi permukaan kulit hingga infeksi sistemik yang mengancam

jiwa. Beberapa faktor dan aktivitas telah diidentifikasi yang berkontribusi terhadap potensi patogen jamur ini. Diantaranya adalah molekul yang memediasi adhesi dan invasi ke dalam sel inang, sekresi hidrolase, transisi ragi ke hifa.²⁴

Mengenai infeksi kandidiasis diperkirakan sekitar 75% dari semua wanita menderita setidaknya sekali seumur hidup kandidiasis vulvovaginal (VVC), dengan 40-50% mengalami setidaknya satu kali terjadi infeksi berulang. Faktor predisposisi adalah diabetes mellitus, penggunaan antibiotik, kontrasepsi oral, kehamilan dan terapi hormon. Meskipun frekuensi dan morbiditasnya terkait, infeksi *C. albicans* superfisial tidak mematikan. Sebaliknya, kandidiasis sistemik dikaitkan dengan angka kematian yang tinggi, bahkan dengan terapi antijamur lini pertama.²⁴

Berbagai patogen jamur terlibat dalam tuberkulosis paru seperti *Aspergillus*, *Histoplasma* dan *Cryptococcus* tergantung pada distribusi geografis dan susunan genetik, tetapi *Candida albicans* adalah ragi yang paling umum diisolasi dari pasien tuberkulosis, merupakan penyebab infeksi sekunder yang memperparah kondisi pasien. *C. albicans* adalah flora normal saluran pernapasan. dapat ditemukan lebih dari 50% pasien dengan TB paru, sekitar 25% pasien di rumah sakit dengan kondisi lain dan lebih dari 10% orang sehat. Dari semua faktor predisposisi, kandidiasis sebagian besar terkait dengan terapi antibakteri spektrum luas pada pasien dengan penyakit bronkopulmoner kronis.¹

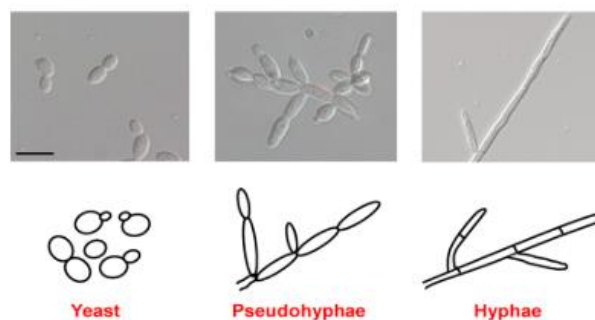
2.3 Tinjauan tentang *Candida sp*

Dari 611.000 keseluruhan jenis jamur 600 spesies telah diketahui bersifat patogen. Jamur yang menyebabkan infeksi ringan pada kulit (dermatofita), infeksi berat pada kulit (*Sporotrix schenckii*) dan jamur penyebab infeksi sistemik misalnya *Aspergillus fumigatus*, *Cryptococcus neoformans*, *Histoplasma capsulatum*, dan *Candida albicans*. *Candida albicans* merupakan penyebab infeksi sistemik keempat selain *Histoplasma capsulatum* dengan angka kematian mencapai 50%. *Candida albicans* menyebabkan dua jenis infeksi yaitu infeksi superfisial contohnya oral dan vagina kandidiasis serta infeksi sistemik.²⁴

Candida albicans merupakan jamur oportunistik yang patogen di saluran pencernaan dan saluran kemih, sekitar 70% manusia dan 75% wanita terinfeksi

candida sekali seumur hidupnya. Infeksi oleh candida dikenal dengan istilah kandidiasis. Kandidiasis dibagi menjadi dua kategori tergantung derajat keparahan penyakit. Kategori pertama dikenal dengan infeksi mukosa ditandai dengan adanya titik putih pada membrane yang terinfeksi, infeksi tersebut umumnya berdampak pada sel-sel epitel saluran pencernaan, sel vagina atau mukosa orofaring. Kategori kedua yaitu infeksi sistemik yang biasa terjadi pada orang dengan penurunan sistem kekebalan tubuh termasuk pasien HIV, penerima transplantasi organ, pasien dengan kemoterapi dan bayi berat badan rendah. Hampir semua spesies candida dapat menginfeksi seperti *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, and *Candida tropicalis* namun *C. albicans* merupakan penyebab infeksi terbanyak.²⁵

Jamur tumbuh dalam tiga morfologi seluler yaitu bentuk ragi, pseudohifa dan hifa. Ragi adalah sel tunggal yang oval dan dapat menunjukkan tunas aksial dan bipolar. Banyak jamur diketahui dominan dalam ragi contohnya *Saccharomyces cereviceae*. Pseudohifa dan hifa yang biasa disebut dengan bentuk berfilamen karena jenis pertumbuhan sel terpolarisasi, berbentuk memanjang dan saling menganyam. Pseudohifa umumnya berbentuk elips (ukuran lebarnya lebih besar ditengah dibanding kedua ujungnya) dan memiliki penyempitan di pertemuan septum, sedangkan sel hifa umumnya memiliki bentuk parallel, lebarnya seragam dan memiliki septa. Tidak seperti sel pseudohifa, sel berbentuk hifa memiliki pori di setiap septanya untuk komunikasi antar sel.²⁶



Gambar 2.1. Morfologi umum jamur pathogen.²⁶

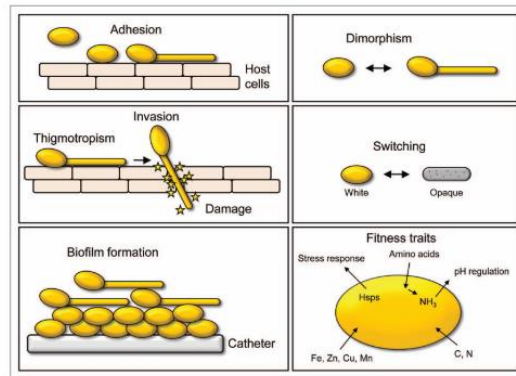
Gambar Atas: (Bentuk *Candida albicans* dengan mikroskop Differential interference contrast/DIC) Gambar Bawah: Skema masing-masing bentuk jamur

Pada beberapa jenis jamur pathogen, bentuk ragi dan ekspresi gen yang berkaitan dengan sel ragi memiliki korelasi dengan virulensi jamur, Korelasi ini sangat baik dipelajari dari 6 (enam) jenis jamur dimorfik penyebab lebih dari satu juta infeksi pertahun yaitu *Histoplasma capsulatum*, *Coccidioides immitis*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Blastomyces dermatitidis*, *Penicillium marnefei* dan *Sporothrix schenckii*.²⁶

Jamur transisi bentuk ragi ke hifa (dimorfik) yang pathogen adalah *Candida albicans* dan merupakan jenis jamur yang masih menjadi fokus di mikologi molekuler dan mikologi kedokteran. Beberapa jenis jamur pathogen, morfologi hifa dan ekspresi gen hifa spesifik merupakan hal yang sangat berkaitan dengan virulensi, terutama *Candida albicans*. Pembentukan hifa *Candida albicans* diketahui sebagai faktor virulensi melalui beberapa mekanisme yaitu: Hifa dapat menginvasi lapisan sel epitel dengan mengerahkan kekuatan mekanik, invasi dapat menyebabkan jamur tumbuh diantara sel-sel epitel dan dapat pula memasuki setiap sel. Hifa mampu meraih dan merusak sel-sel endotel kemudian diikuti dengan proses fagositosis. Pertumbuhan hifa *Candida albicans* dapat menyebabkan lisis makrofag dan netrofil. Selain itu, thigmotropisme atau pengindraan kontak diyakini memungkinkan hifa *Candida albicans* mampu mengidentifikasi, menembus celah, alur kecil, dan titik lemah jaringan inang selama infeksi.

3. Patogenitas *Candida albicans*

Patogenitas *Candida albicans* adalah perubahan bentuk dari sel ragi membentuk hifa, ekspresi adesin dan invasi ke permukaan sel, thigmotropism, pembentukan biofilm, perubahan fenotipik dan sekresi enzim hidrolitik. Demikian pula dengan kemampuan adaptasi terhadap fluktuasi pH, fleksibilitas metabolisme, kemampuan untuk mendapatkan nutrisi dan respon terhadap kondisi yang kurang menguntungkan.



Gambar 2.2. Patogenitas *Candida albicans* ²⁴.

Mekanisme patogenitas *Candida albicans* dimulai dari sel ragi melekat pada sel inang dan mengeksresikan adhesin, kontak dengan sel inang akan merangsang pembentukan hifa dan tumbuh melalui thigmotropisme. Ekspresi invasin akan menginduksi terjadinya endositosis. Adhesi, tekanan mekanik dan sekresi enzim hidrolase memfasilitasi mekanisme invasi, dan selanjutnya membentuk biofilm. Respon terhadap tekanan dari lingkungan yang tidak menguntungkan dimediasi dengan eksresi ammonia dan heat shock protein (Hsps). Fleksibilitas metabolik *Candida* ditunjukkan dengan kemampuan mencerna berbagai sumber karbon diantaranya N, Fe, Zn, Cu dan Mn.²⁴

4. Uji Aktivitas Kitinase

Produksi enzim kitinase dilakukan dengan menumbuhkan isolat *Actinomyces* pada media yang mengandung kitin sebagai substrat dan diinkubasi pada waktu, pH, dan suhu tertentu. Deteksi kinerja enzim kitinase terlihat dari pengukuran aktivitas selama mendegradasi substrat. Substrat yang digunakan untuk mengukur aktivitas kitinase yaitu koloidal kitin. Aktivitas kitinase ditentukan dengan menggunakan metode Schales, yaitu menggunakan reagen berwarna dan diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 420 nm. Berdasarkan penelitian aktivitas enzim kitinase dari bakteri termofilik, pada suhu ruang ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) konsentrasi substrat stabil hingga 1% dan terjadi penurunan pada konsentrasi substrat 2%, sedangkan pada suhu 37°C , 50°C , dan 60°C mengalami kenaikan sampai pada konsentrasi substrat 1% dan cenderung konstan pada konsentrasi substrat 2% dan 4%. Enzim kitinase yang

dihasilkan dari isolat bakteri termofil B1211 menghasilkan aktivitas tertinggi pada penggunaan konsentrasi substrat 1% dan suhu produksi 60°C, yaitu 0,75 U/mL (Hardi, Jusman, Razak, & Silva, 2016)

Pengujian aktivitas kitinase dapat dilakukan dengan menggunakan metode Ueda dan Arai (1992) dengan beberapa modifikasi. Sebanyak 300 µl koloidal kitin (1%), 150 µl buffer fosfat pH 7 dan 150 µl enzim yang akan uji, dihomogenisasi dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 55°C selama 30 menit. Pengujian dilakukan dengan ditambahkan reagen Schales. Hasil perlakuan diukur absorbansinya pada $\lambda = 420$ nm. Pengukuran konsentrasi N-asetil-D-glukosamin hasil hidrolisis dihitung berdasarkan kurva standar N-asetil-D-glukosamin. Satu unit aktivitas enzim kitinase didefinisikan sebagai sejumlah enzim yang menghasilkan satu µmol N-asetil-D-glukosamin per menit²⁷.

5. Minimum Inhibition Concentration (MIC)

Penentuan potensi antibiotik terhadap bakteri dengan menilai konsentrasi hambat minimal (MIC/*minimum inhibition concentration*) menggunakan medium cair mikrodilusi telah dikembangkan lebih dari lima puluh tahun yang lalu. Untuk antibiotik tertentu kadang membutuhkan modifikasi untuk mengamati aktivitas yang optimal, sebagai contoh daptomisin memerlukan penambahan kalium pada medium perbenihan sebagai suplemen dan lipoglikopeptida dalbavancin dan oritavancin membutuhkan penambahan Tween 80 untuk ditambahkan ke media perbenihan untuk mencegah pengurangan konsentrasi obat disebabkan adsorpsi *microplate plastic*.²⁸

Pengujian aktivitas antijamur ditunjukkan dengan konsentrasi minimal yang menghambat pertumbuhan jamur (MIC: *minimum inhibition concentration*). Uji aktivitas antijamur merupakan tes fenotipik untuk jamur ragi dan filament. Dua metode standar sebagai rujukan yang diakui internasional yaitu metode CLSI (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) dan EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*). CLSI dan EUCAST merupakan metode dengan prinsip yang sama yaitu metode mikrodilusi yang sesuai untuk penentuan semua jenis jamur, perbedaan terdapat pada

konsentrasi glukosa, ukuran inoculum, titik akhir pembacaan) pada akhir pengujian.²⁹

Prosedur berdasarkan *Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)* adalah merupakan metode rujukan untuk pengujian antifungal baik jamur ragi atau jamur berfilamen. Pada medium cair teknik mikrodilusi yang direkomendasikan CLSI adalah dengan waktu inkubasi 42-72 jam dalam penentuan kepekaan terhadap antimikroba terhadap jamur pathogen. Pengujian dengan metode CLSI memerlukan pengamatan visual dan memerlukan kontrol. Metode CLSI membutuhkan waktu lama dalam pengerjaannya sehingga metode alternatif dikembangkan beberapa tahun terakhir.³⁰

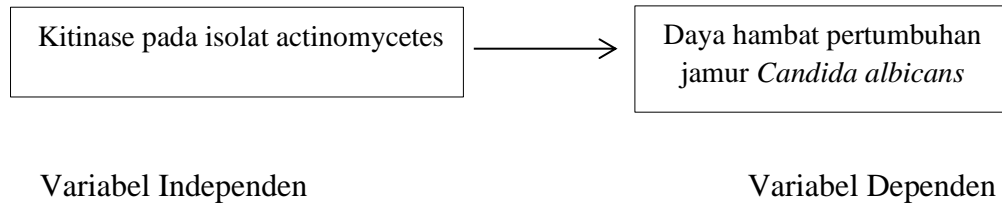
Berdasarkan metode CLSI umumnya MIC untuk spesies *Candida* berkorelasi baik terhadap antifungi flukonazol dan vorikonazol, metode EUCAST lebih rendah dibandingkan dengan CLSI terutama untuk amphotericin B, anidulafungin, mikafungin dan posakonazol. MIC terhadap flukonazol yaitu ≤ 2 mg/L, amphotericin B ≤ 1 mg/L.³¹

Metode alternatif untuk penentuan daya hambat antifungi terhadap jamur adalah metode otomatis contohnya Vitek 2. Metode fenotipik ini memiliki kelemahan membutuhkan biakan murni sebelum dilakukan pengujian. Namun walaupun demikian SYO, Etest dan Vitek 2 merupakan metode komersial yang sangat baik digunakan sebagai metode acuan pengujian invitro terhadap daya hambat spesies *Candida* dan atau *Aspergillus* dan dapat dijadikan metode referensi dengan kenyamanan dan fleksibilitas dalam pengerjaannya.²⁹

Infeksi jamur yang disebabkan oleh *Candida* dan *Aspergillus* masih berkaitan dengan angka kematian yang tinggi walaupun telah dikembangkan pencegahan, penegakan dini diagnosis dan pengobatan menggunakan anti jamur. pengobatan yang umum digunakan adalah antifungi yang sangat efektif yaitu derivat azole seperti posakonazol atau vorikonazol untuk menurunkan angka kejadian infeksi jamur pada pasien berisiko tinggi yang mengobati secara tuntas dan menyembuhkan dengan baik sehingga menghindari adanya spesies jamur yang resisten terhadap pengobatan. Dengan demikian uji kepekaan terhadap antijamur sangatlah penting untuk ketepatan pemilihan regimen obat yang sangat sensitive

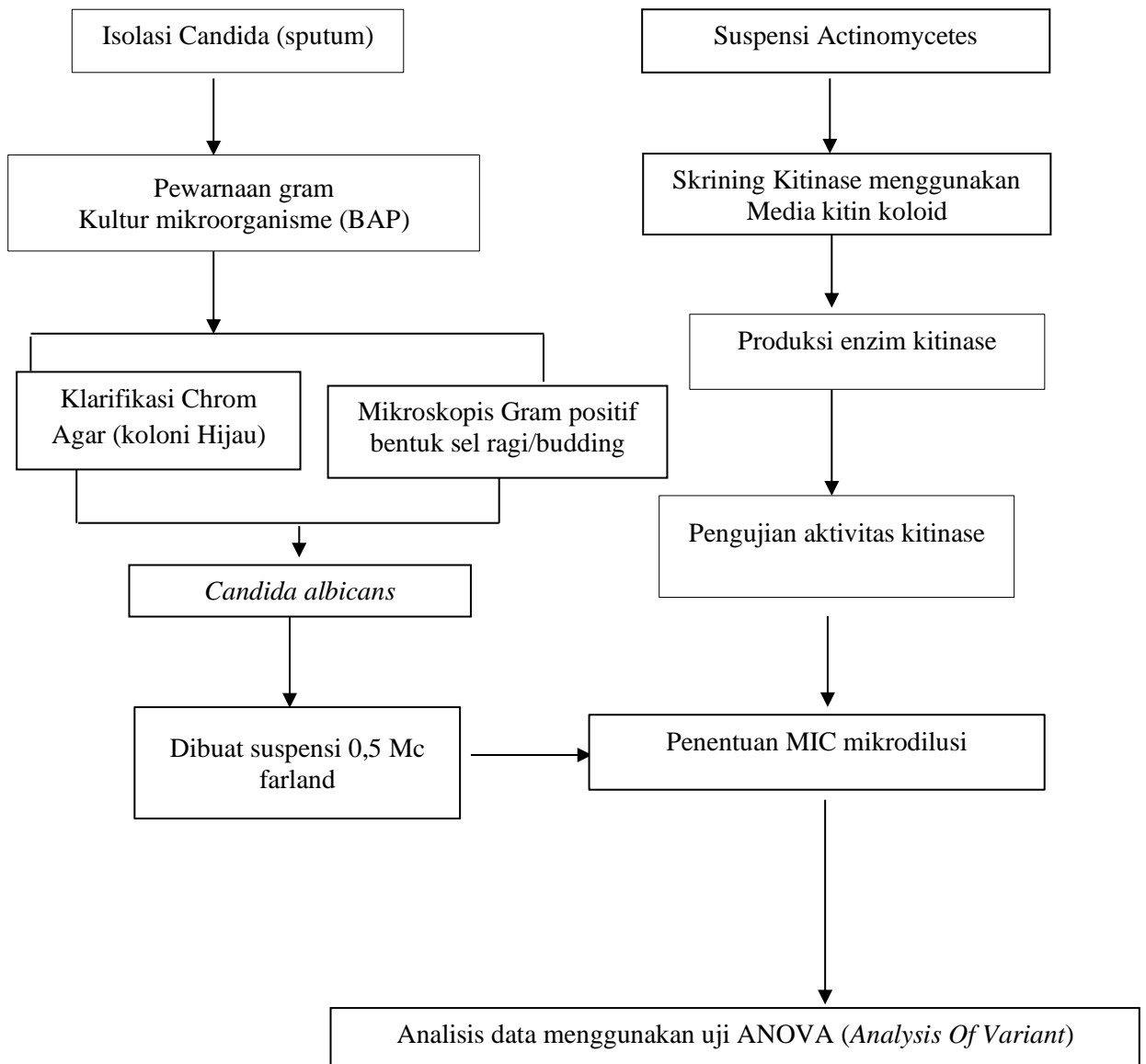
termasuk untuk jamur selain *Aspergillus* misalnya infeksi *Mucor*, *Fusarium* atau *Scedosporium apiospermum*.²⁹

2.4 KERANGKA KONSEP



Gambar 2.3 Kerangka Konsep

2.5 ALUR PENELITIAN



Gambar 2.4 Alur Penelitian

2.6.DEFENISI OPERASIONAL

Variabel	Defenisi	Cara Ukur	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Kitinase	Enzim ysnng dihasilkan oleh bakteri Actinomycetes melalui produksi enzim setelah skiring kitinase <i>dan Uji aktivitas kitinase</i>	Aktivitas kitinase ditentukan dengan metode Saima et.al (2013) dengan mengukur absorban sisa kitin pada λ 420 nm	Spektrofoto- tometer UV-Vis	mg/mL	Rasio
Isolat Actynomy-cetes	Isolat yang menghasilkan enzim kitinase yaitu <i>Streptomyces albus</i> subspecies albus InaCC A490	Skrining kitinase pada media mengandung Kitin koloid diamati pembentukan zona bening pada medium kemudian dibandingkan diameter koloni.	Penggaris	Enzim Indeks (mm)	Rasio
Penentuan MIC/KHM	MIC/KHM adalah konsentrasi hambat minimum dari isolat actynomycetes yang dapat menghambat pertumbuhan jamur <i>Candida albicans</i>	Persen penghambatan kitinase terhadap <i>Candida albicans</i> dengan penentuan Kadar Hambat Minmum (KHM) metode CLSI	Microplate reader	Kuantita tif mg/mL	Rasio
<i>Candida albicans</i>	Jamur oportunistik penyebab koinfeksi kandidiasis pada penderita TBC	Isolasi dari sputum penderita TBC menggunakan media isolasi Chromogenic <i>Candida</i> Agar.	Visual	Pertum- buhan Koloni warna hijau	Kategori

2.7.HIPOTESIS

Kitinase Isolat Actinomycetes dapat menghambat pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang diisolasi dari penderita tuberkulosis paru.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Jenis Penelitian

Penelitian yang dilaksanakan adalah penelitian eksperimen. Yaitu kegiatan percobaan untuk mengetahui adanya hambatan pertumbuhan *Candida albicans* karena aktivitas kitinase *Actinomycetes*.

3.2 Desain Penelitian

Penelitian ini menggunakan rancangan percobaan *Post-test only control group design* memiliki kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Kelompok eksperimen yaitu menambahkan isolat *Actinomycetes* dengan berbagai konsentrasi. Berdasarkan rumus Gomez, banyaknya pengulangan dalam eksperimen ini adalah:

$$(t-1)(r-1) \geq 15$$

Keterangan:

t : jumlah perlakuan

r : jumlah replikasi

15 : derajat kebebasan

Penelitian terdapat 6 jenis perlakuan (konsentrasi kitinase), maka jumlah ulangan untuk tiap perlakuan dapat dihitung:

$$(6-1)(r-1) \geq 15$$

$$(r-1) \geq 15/5$$

$$r \geq 3$$

Jadi pengulangan pada penelitian ini dilakukan sebanyak 3 kali

Tabel 3.1 Desain penelitian

No	Kelompok	Perlakuan	Hasil
1.	Kontrol Positif	Media PDB + Kitinase	Tidak ada pertumbuhan
2.	Kontrol Negatif	<i>Candida albicans</i> + PDB	Pertumbuhan <i>Candida</i>
3.	Ekperimen	<i>Candida albicans</i> + Kitinase	Hambatan pertumbuhan <i>Candida</i>

3.3 Populasi dan Sampel

1) Populasi

Populasi adalah jamur *Candida albicans*

2) Sampel

Sampel adalah *Candida albicans* dari penderita TBC

3.4 Tempat dan Waktu Penelitian

1) Tempat penelitian

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Terpadu Politeknik Kesehatan Kemenkes Bandung dan Laboratorium Aretha Medika Utama Bandung.

2) Waktu penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli – Desember 2020

3.5 Objek dan Subjek Penelitian

Objek penelitian adalah *Candida albicans* dan subjek penelitian adalah Kitinase pada isolat *Actinomyces*.

3.6 Prosedur Penelitian

1) Isolasi *Candida albicans* dari sputum penderita tuberkulosis

Sputum penderita tuberkulosis didapatkan dari sisa pemeriksaan sputum penderita tuberkulosis yang telah menjalani 2-6 bulan pengobatan. Penanganan specimen dilakukan mengikuti standar pengepakan bahan biologis infeksius dan pengerjaan isolasi, pembuatan preparat BTA

dilakukan di *Biological Safety Cabinet* level IIA di laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Bandung.



Gambar 3.1. Isolasi *Candida* dari sampel sputum

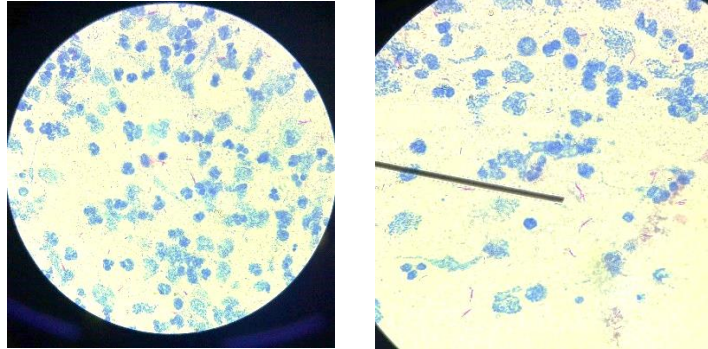
Pewarnaan Basil Tahan Asam

- a) Sputum dilakukan pewarnaan Basil Tahan Asam untuk konfirmasi sputum positif tuberkulosis dengan prosedur:
- b) Dibuat preparat dengan sistem koiling diatas objek glass dengan ukuran 2 cm x 3 cm dengan memberikan lingkaran diobjek glass terlebih dahulu untuk acuan pembuatan sediaan
- c) Fiksasi di atas lidah api untuk merekatkan dan mematkan bakteri serta mengeringkan sebelum proses pewarnaan dengan dijaga sediaan tidak sampai gosong.

Dilakukan pewarnaan Kinyoun Gabbet yaitu:

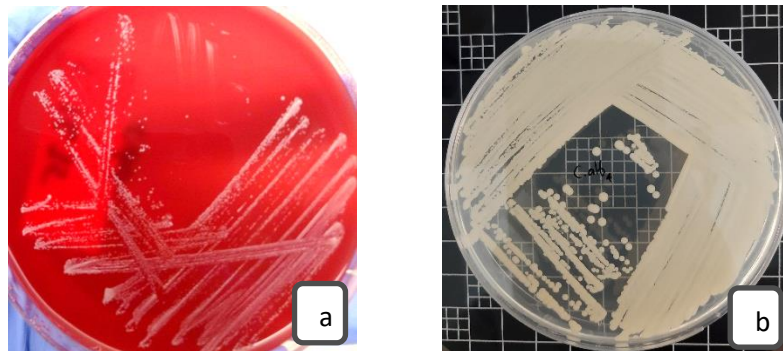
- a) Menggenangi sediaan dengan larutan Kinyoun selama 3 menit
- b) Kelebihan larutan dibuang dibilas perlahan dengan air mengalir
- c) Menggenangi sediaan dengan larutan pewarna Gabbet selama 1 menit
- d) Membilas kembali dengan air mengalir
- e) Preparat diletakan dalam posisi vertikal diatas kertas tissue sampai preparat kering
- f) Ditetesi minyak immersi kemudian preparat diamati menggunakan mikroskop lensa objektif 100 x

Hasil: BTA : Bakteri berwarna merah
Non BTA : Bakteri berwarna biru

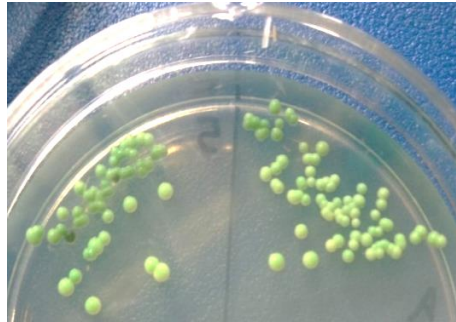


Gambar 3.2. Hasil Pewarnaan BTA
Sumber: Data Primer, 2020

Kemudian diidentifikasi adanya jamur *Candida albicans* dengan isolasi pada media *Blood Agar Plate* (BAP) ditandai dengan koloni elevasi datar, berwarna putih, tidak menghemolisa darah (anhemolisa) apabila dilihat dengan kaca pembesar bagian dasar koloni seperti mencengkram kedalam media pertumbuhan. Media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dan media untuk penentuan spesies yaitu *Chromogenic Candida Agar* (CCA) ditandai dengan pertumbuhan koloni berwarna hijau.



Gambar 3.3 Koloni *Candida albicans* Pada media BAP (a) dan SDA (b)
Sumber :Data Primer, 2020



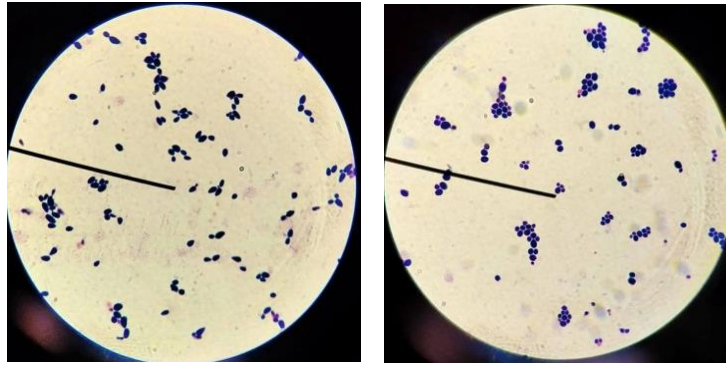
Gambar 3.4 Koloni *Candida albicans* pada media Chrome Agar
Sumber: data primer, 2020

2) Pewarnaan Gram

Dilakukan sterilisasi *inoculating loop* (ose) pada api bunsen hingga memerah, kemudian tunggu dingin selama sekitar 30 detik. Dengan menggunakan kaca objek bersih, 1 tetes NaCl fisiologis steril untuk membuat suspensi terlebih dulu dengan menambahkan koloni di tengah kaca objek. Dengan menggunakan ose, spesimen di apuskan di atas kaca objek sampai didapatkan lapisan yang tipis, kemudian keringkan di udara. Kaca objek difiksasi dengan melewatkannya di atas api bunsen sebanyak 2-3 kali.

Prosedur Pewarnaan Gram:

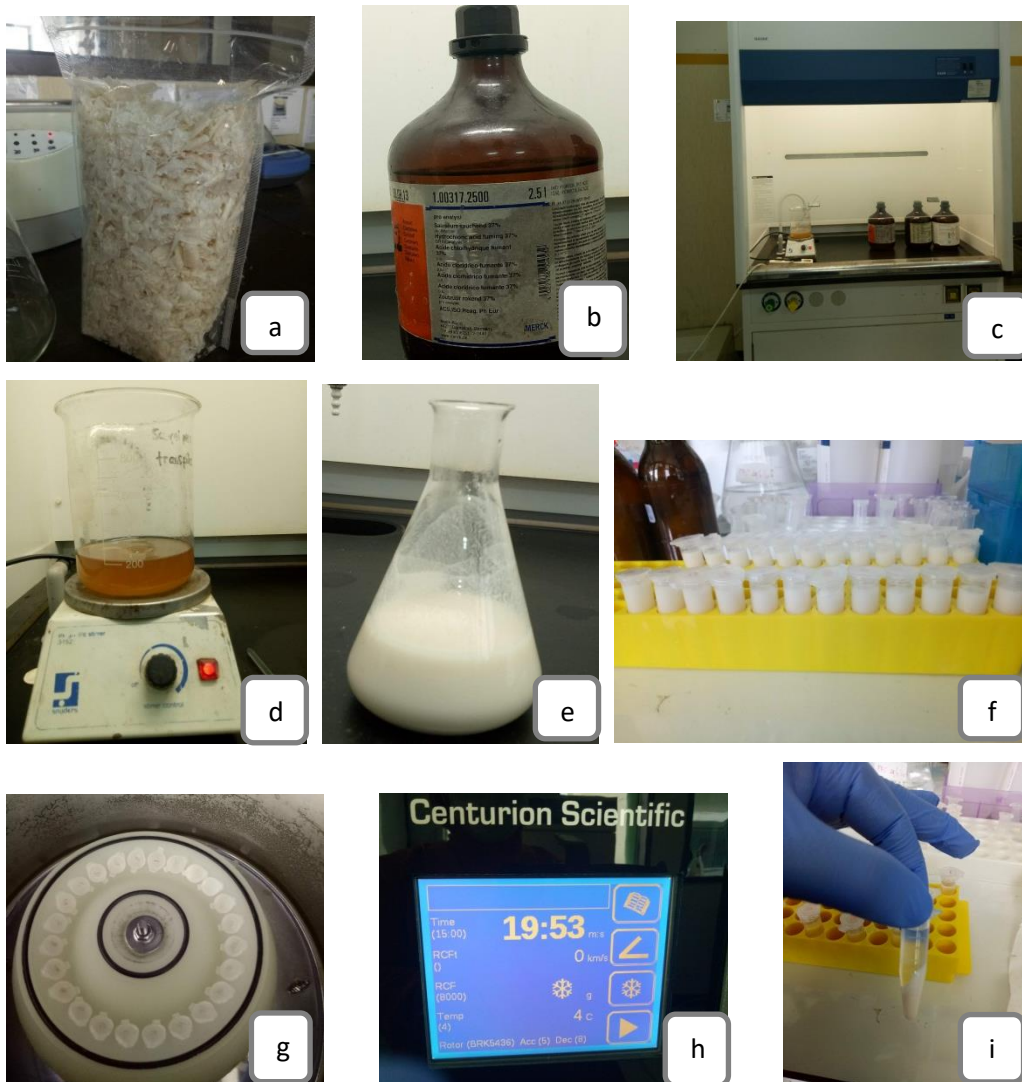
Preparat digenangi dengan pewarna kristal violet secara merata, didiamkan selama 1 menit. Kelebihan pewarna dibuang dengan cara memiringkan kaca objek dan dibilas dengan sedikit air mengalir. Menuangkan cairan mordant pada preparat, tunggu selama 1 menit, dimiringkan kembali preparat dan bilas dengan sedikit air mengalir. Melakukan dekolorisasi dengan cara meneteskan cairan dekolorisasi sedikit demi sedikit pada preparat hingga tidak ada zat warna yang mengalir keluar dari preparat, dibilas preparat dengan air mengalir. Menuangkan counterstain (safranin) pada preparat, ditunggu selama 30 detik sampai 1 menit, dibilas dengan air mengalir, kemudian preparat dikeringkan. Setelah dilakukan pengamatan preparat menggunakan mikroskop 400 kali diamati jamur *Candida albicans*. Dari media BAP didapatkan morfologi *Candida albicans* berbentuk bulat oval dan berwarna ungu gelap sedangkan yang berasal dari media *Chromogenic candida agar* berbentuk lebih bulat susunan bergerombol dan keduanya tampak adanya budding.



Gambar 3.5 Gambaran mikroskopis Hasil Pewarnaan Gram *Candida albicans* dari media BAP dan Chromogenic Candida Agar
Sumber: Data Primer, 2020

3) Pembuatan Kitin Koloidal.³²

Sebanyak 10 g kitin berbentuk flake ditambahkan 200 mL HCl pekat, distirer selama 2 jam kemudian diinkubasi di dalam lemari pendingin selama 24 jam. Larutan disaring dengan *glass wool* dan filtrat yang dihasilkan ditambah akuades steril (didinginkan 4°C satu malam), kemudian dinetralkan dengan NaOH 10 N sampai pH 7. Larutan disentrifugasi menggunakan *refrigerated centrifuge* dengan kecepatan 8.000g, 4°C selama 10 menit. Endapan dibilas dengan akuades steril dan disentrifugasi lagi dengan kecepatan 8.000g, 4°C selama 10 menit. Koloidal kitin disimpan di dalam lemari pendingin.



Gambar 3.6 Proses Pembuatan Koloidal kitin
 Sumber: Data Primer, 2020

Keterangan gambar:

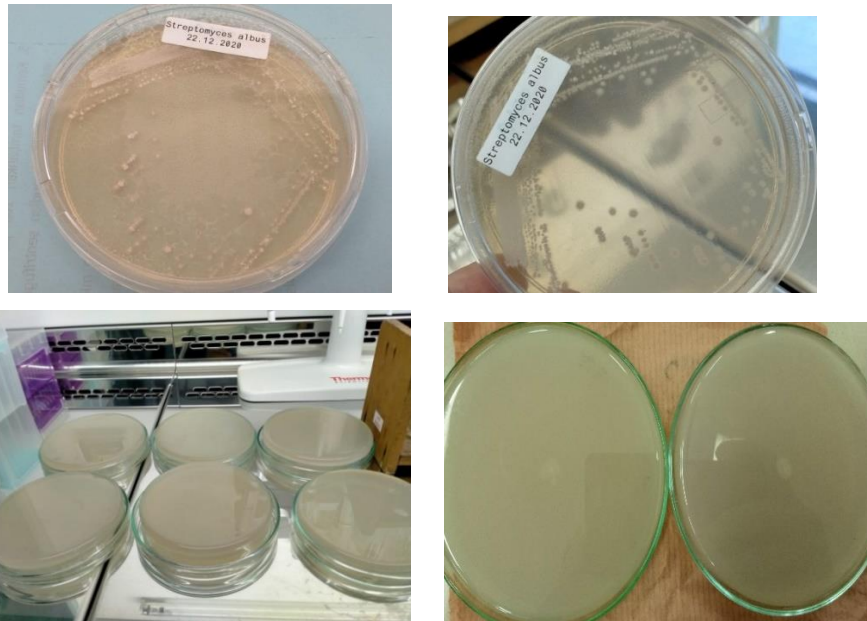
(a) Kitin, (b) HCL pekat p.a, (c) Pelarutan kitin di lemari asam (d) Kitin terlarut, (e) koloid setelah penambahan NaOH 10N, (f) aliquoting microtube, (g) refrigerate centrifuge, (h) pengaturan alat 8000 rpm, 4°C dan (i) Koloidal kitin.

4) Skrining Produksi Kitinase.³³

Skrining produksi kitinase isolat actinomycetes menggunakan Agar koloidal kitin dengan komposisi (g/L): 6 g Na₂HPO₄, 3 g KH₂PO₄, 1 g NH₄Cl, 0,5 g NaCl, 0,05 g yeast extract, 15 g agar, koloidal kitin 1% (b/v) (Saima et al.,

2013). Uji aktifitas kitinase dengan menanam single dot koloni actinomycets dan diinkubasi 37°C, zona hidrolisis diamati setelah 96 jam inkubasi. Kemudian ditentukan Kitinolitik indeks/ Enzim Index (EI) dengan rumus:³⁴

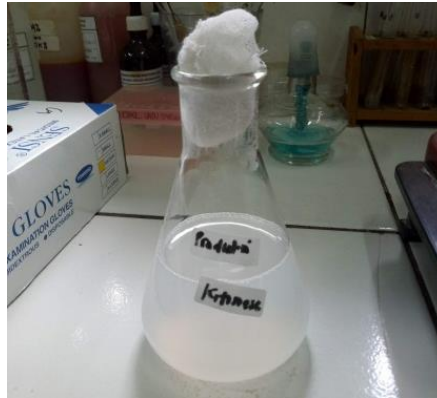
$$EI = \frac{\text{diameter zona jernih} - \text{diameter koloni}}{\text{diameter koloni}}$$



Gambar 3.7 Skrining Kitinase pada media kitin koloidal agar.

5) Produksi Enzim Kitinase.³³

Produksi enzim kitinase oleh *Streptomyces albus* subspecies albus InaCC A490, menggunakan metode modifikasi Brzezinska et al. (2012) menggunakan media yang mengandung: 2 (g/l) Kasein, 0.1 (g/l) Asparagin, 0.5 (g/l) K₂HPO₄, 0.1 (g/l) MgSO₄.7H₂O, 2 (g/l) kitin koloidal dengan pH 7.5



Gambar 3.8 Media Produksi Kitin

Kurang lebih 100 ml media produksi kitin disiapkan dan diinokulasikan suspensi 0,5 Mc Farland standar isolat *Streptomyces albus*. Produksi enzim dilakukan pada suhu 20-25°C selama 10 hari dengan rotator kecepatan 100 rpm. Setelah inkubasi, kultur secara aseptik diambil dan di sentrifuge pada 10.000 rpm selama 10 menit. Supernatan adalah enzim untuk prosedur selanjutnya.

6) Uji Aktifitas Kitinase.³³

Uji aktivitas kitinase dari supernatant dilakukan dengan metode modifikasi Saima et al. (2013).

Secara perlahan 150 µl supernatan kultur ditambahkan ke dalam larutan pereaksi yang terdiri dari 150 µl 0.1M buffer posfat (pH 7.0) dan 300 µl kitin koloidal 0.1%. Larutan campuran diinkubasi 55°C selama 10 menit kemudian di sentrifuge 10.000 rpm selama 5 menit. Supernatan adalah produksi enzim kitinase.

Sebanyak 400 µl supernatant ditambahkan ke dalam 1000 µl akuades dan 2000 µl reagen Schales.

Pembacaan aktivitas kitinase dilakukan sebagai berikut:

Tabel 3.2. Skema pengerjaan Uji Aktifitas Kitinase

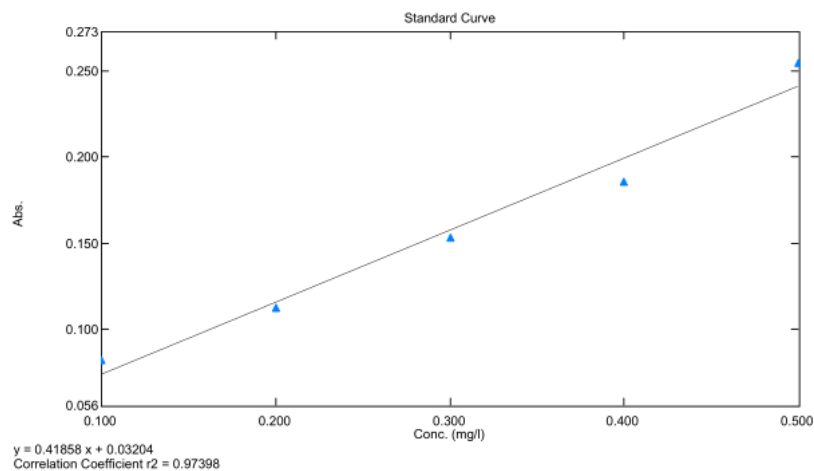
Tabung	Blangko	Standar	Sampel
Aquadest	1400 µl	1000 µl	1000 µl
Larutan Standar	-	400 µl	-
Sampel	-	-	400 µl
Reagen Schales	2000 µl	2000 µl	2000 µl

Kemudian campuran tersebut dididihkan selama 10 menit dan didinginkan segera. Absorbansi campuran larutan di baca pada spektrofotometer panjang gelombang 420 nm. Kurva Standar N asetilglukosamin dibuat dengan konsentrasi 0,5%. Dilarutkan 50 mg N-asetilglukosamin dalam 10 ml aquadest dalam labu ukur kemudian dilakukan pembuatan konsentrasi 0,4%, 0,3%, 0,2% dan 0.1%. Larutan Schales dibuat dengan cara melarutkan K₃ [Fe(CN)₆] 0,25 gram dalam 250 ml Na₂CO₃ 0,5 M.

Tabel 3.3. Hasil Pembacaan Standar N Asetilglukosamin

Standard Table

	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL420.0	Wgt.Factor	Comments
1	std 0,1%	Std-Repeat		0.100	0.083	1.000	
2	std 0,1%-2	Std-Repeat		0.100	0.080	1.000	
3	std 0,1%-3	Std-Repeat		0.100	0.083	1.000	
4	std 0,1%-Avg	Average		0.100	0.082	1.000	Avg of preceding 3 Samples
5	std 0,2%	Std-Repeat		0.200	0.110	1.000	
6	std 0,2%-2	Std-Repeat		0.200	0.112	1.000	
7	std 0,2%-3	Std-Repeat		0.200	0.115	1.000	
8	std 0,2%-Avg	Average		0.200	0.112	1.000	Avg of preceding 3 Samples
9	std 0,3%	Std-Repeat		0.300	0.150	1.000	
10	std 0,3%-2	Std-Repeat		0.300	0.155	1.000	
11	std 0,3%-3	Std-Repeat		0.300	0.154	1.000	
12	std 0,3%-Avg	Average		0.300	0.153	1.000	Avg of preceding 3 Samples
13	std 0,4%	Std-Repeat		0.400	0.186	1.000	
14	std 0,4%-2	Std-Repeat		0.400	0.185	1.000	
15	std 0,4%-3	Std-Repeat		0.400	0.187	1.000	
16	std 0,4%-Avg	Average		0.400	0.186	1.000	Avg of preceding 3 Samples
17	std 0,5%	Std-Repeat		0.500	0.259	1.000	
18	std 0,5%-2	Std-Repeat		0.500	0.247	1.000	
19	std 0,5%-3	Std-Repeat		0.500	0.258	1.000	
20	std 0,5%-Avg	Average		0.500	0.255	1.000	Avg of preceding 3 Samples



Gambar 3.9 Kurva Standar N Asetilglukosamin
Sumber: Data Primer, 2020

7) Penentuan Daya Hambat Kitinase Terhadap *Candida albicans*

- a. Penentuan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) dilakukan dengan penentuan MIC metode CLSI.

Bahan: *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Himedia), *Potato Dextrose Broth* (PDB) (Himedia), ddH₂O, Enzim Kitinase (C03101069), Kultur Isolat *Candida albicans* (Sputum penderita TBC)

Alat : Microwave (Shivaki, SMW 103), Autoclave (HiClave, H-50), *Biosafety Cabinet* (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II), *CO₂ Incubator* (Thermo IH3543), *Spektrofotometer* (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300), Gelas Ukur (Iwaki), Gelas Beaker (Herma), Vortex (WiseMix VM-10), *Falcon tube* 15 mL (SPL 50015), *Disposable petri dish*, *Microtube* 1,5 mL (SPL, 62015), *96 well plate* (Costar, 3596), *Tips Blue, yellow, white* (Borosil)

Konsentrasi Uji

- a. *Working solution* : 25 mg/mL; 12.5 mg/mL; 6.25 mg/mL; 3.13 mg/mL; 1.63 mg/mL; 0.78 mg/mL
- b. *Final concentration* : 12.5 mg/mL; 6.25 mg/mL; 3.13 mg/mL; 1.63 mg/mL; 0.78 mg/mL; 0.39 mg/mL

Prosedur

- a. Pembuatan Media Tumbuh *C. albicans*

Medium PDA, 38 gr medium MHA dilarutkan dalam 1 liter ddH₂O

Medium PDB, 21 gr medium MHB dilarutkan dalam 1 liter ddH₂O

Medium dipanaskan menggunakan microwave hingga mendidih dan homogen.

Medium disterilisasi menggunakan autoclave dengan suhu 121°C, selama 25 menit.

- b. Preparasi Kitinase

- 1) Larutan Stok

Larutan stok enzim kitinase yang digunakan memiliki konsentrasi 25 mg/mL.

- 2) Pembuatan Seri *Working Solution* (WS)

Pengenceran stok enzim kitinase dilakukan dengan menggunakan media *Potato Dextrose Broth* (PDB) sebagai media tumbuh dari *C. albicans*. Seri konsentrasi kitinase yang digunakan adalah sebagai berikut:

K 25 mg/mL : 1000 μ L larutan stok (Larutan A)

K 12.5 mg/mL : 500 μ L larutan A + 500 μ L PDB (Larutan B)

K 6.25 mg/mL : 500 μ L larutan B + 500 μ L PDB (Larutan C)

K 3.125 mg/mL: 500 μ L larutan C + 500 μ L PDB (Larutan D)

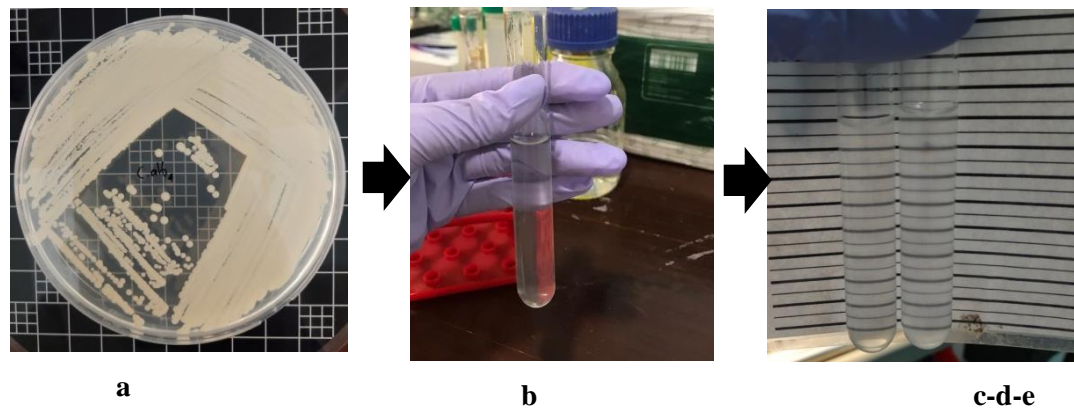
K 1.625 mg/mL: 500 μ L larutan D + 500 μ L PDB (Larutan E)

K 0.781 mg/mL: 500 μ L larutan D + 500 μ L PDB (Larutan E)

c. Uji MIC

1) Persiapan inokulum candida

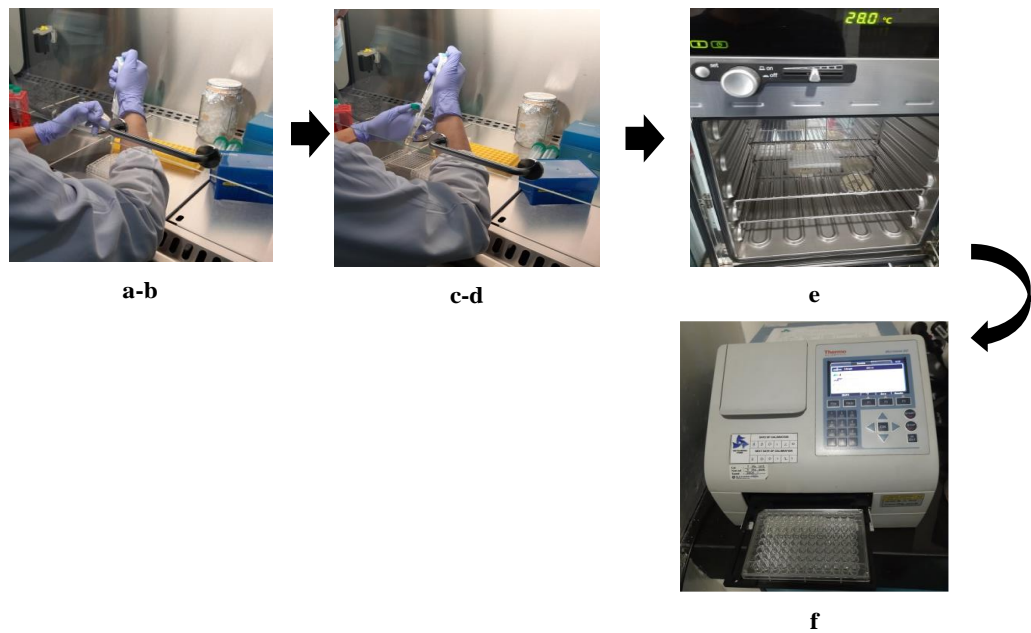
- a) Dilakukan sub kultur isolat *C. albicans* pada media PDA selama 24 jam dengan suhu 28°C.
- b) Sejumlah koloni *C. albicans* diinokulasikan pada 10 mL larutan fisiologis (NaCl 0.85%).
- c) Kekeruhan dari larutan tersebut kemudian disesuaikan dengan kekeruhan larutan standar McFarland 0.5 untuk mendapatkan inokulum dengan jumlah *Candida* pada rentang $1-5 \times 10^6$ CFU/mL.
- d) Dilakukan pengenceran pada larutan tersebut menggunakan larutan fisiologis dengan perbandingan 1:50 untuk menghasilkan inokulum dengan jumlah *Candida* pada rentang $2 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ CFU/mL.
- e) Kemudian dilakukan pengenceran menggunakan media PDB dengan perbandingan 1:20 untuk menghasilkan inokulum dengan jumlah *Candida* pada rentang $1-5 \times 10^3$ CFU/mL.



Gambar 3.10 Persiapan Inokulum *Candida albicans*

2) MIC-microdilution test

- a) Sebanyak 100 μ l inokulum ditambahkan pada *well* sejumlah seri konsentrasi enzim kitinase yang digunakan.
- b) Sebanyak 100 μ l dari *working solution* setiap konsentrasi enzim kitinase ditambahkan pada *well* yang telah berisi inokulum sehingga konsentrasi enzim mencapai konsentrasi akhir (*final concentration*).
- c) Sebanyak 200 μ l inokulum ditambahkan pada *well* sebagai kontrol tumbuh dan kontrol negatif aktivitas penghambatan
- d) Sebanyak 100 μ l PDB dan 100 μ l dari *working solution* setiap konsentrasi enzim kitinase ditambahkan pada *well* sebagai *blank*
- e) Plate diinkubasi selama 24 jam pada inkubator bersuhu 28°C
- f) Dilakukan pengukuran OD pada panjang gelombang 405 nm
- g) Pertumbuhan *Candida* ditentukan dengan cara membandingkan nilai OD perlakuan dengan OD *blank*-nya masing-masing
- h) Nilai MIC ditentukan pada konsentrasi enzim kitinase terendah yang mampu memberikan efek penghambatan pertumbuhan *Candida*.



Gambar 3.11. Penentuan Konsentrasi hambat minimum

Tabel 3.4. Hasil Pengukuran *Optical Density* (OD) pengaruh Kitinase terhadap *C albicans*.

Sampel	Absorban sampel			Blanko	Absorban setelah dikoreksi			Rata-rata
	1	2	3		1	2	3	
K 12.5 mg/mL	0.383 9	0.385 0	0.387 3	0.3623	0.021 6	0.022 7	0.0250	0.0231
K 6.25 mg/mL	0.411 3	0.412 6	0.413 6	0.3812	0.030 1	0.031 4	0.0324	0.0313
K 3.25 mg/mL	0.449 4	0.456 9	0.461 8	0.3934	0.056 0	0.063 5	0.0684	0.0626
K 1.562 mg/mL	0.475 8	0.470 3	0.468 7	0.3977	0.078 1	0.072 6	0.0710	0.0739
K 0.781 mg/mL	0.490 6	0.511 3	0.483 6	0.4007	0.089 9	0.110 6	0.0829	0.0945
K 0.390 mg/mL	0.503 4	0.531 8	0.496 4	0.4027	0.100 7	0.129 1	0.0937	0.1078
Kontrol	0.639 0	0.644 4	0.665 9	0.3921	0.246 9	0.252 3	0.2738	0.2577

Absorbansi setelah koreksi adalah absorban sampel dikurangi absorbansi blanko. Rata -rata merupakan rata-rata absorbansi sampel setelah dikoreksi blanko.

Dari pembacaan absorbansi sampel uji (*optical density*) pada alat *microplate reader* sudah terprogram secara otomatis alat dapat mengkalkulasi viabilitas yaitu persentase sel hidup setelah penambahan enzim kitinase dan persentase inhibisi yaitu persen penghambatan kitinase terhadap pertumbuhan *Candida albicans*

Tabel 3.5. Hasil Perhitungan jumlah sel hidup dan persentase penghambatan kitinase terhadap *Candida albicans*

Sampel	Sel Hidup (%)			Rata-rata	SD	SDR	Penghambatan (%)			Rata-rata	SD	SDR
	1	2	3				1	2	3			
K 12.5 mg/mL	8.38	8.81	9.70	8.97	0.67	7.51	91.62	91.19	90.30	91.03	0.67	0.74
K 6.25 mg/mL	11.68	12.19	12.57	12.15	0.45	3.68	88.32	87.81	87.43	87.85	0.45	0.51
K 3.25 mg/mL	21.73	24.64	26.55	24.31	2.42	9.97	78.27	75.36	73.45	75.69	2.42	3.20
K 1.562 mg/mL	30.31	28.18	27.55	28.68	1.45	5.04	69.69	71.82	72.45	71.32	1.45	2.03
K 0.781 mg/mL	34.89	42.92	32.17	36.66	5.59	15.25	65.11	57.08	67.83	63.34	5.59	8.83
K 0.390 mg/mL	39.08	50.10	36.36	41.85	7.28	17.39	60.92	49.90	63.64	58.15	7.28	12.51
Kontrol Tumbuh	95.82	97.92	106.26	100.00	5.52	5.52	4.18	2.08	-6.26	0.00	5.52	0.00

Keterangan :

SD : Simpangan baku

SDR: Simpangan baku relatif

3.7 Pengolahan dan Analisis Data

Data yang digunakan merupakan data primer. Data dikumpulkan dengan mengamati hambatan pertumbuhan. Data dianalisis dengan menggunakan uji statistik *one way Analysis of variant* (ANOVA) Data hasil pengukuran daya hambat yang didapatkan kemudian diuji secara statistik. Dalam penelitian ini uji statistik yang digunakan adalah Uji Normalitas, Uji Homogenitas, dan Uji PostHoc Dunnett T3. Uji statistik dilakukan dengan menggunakan aplikasi IBM Statistics SPSS 22.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

Kemampuan Actinomycetes dengan produk metabolit sekunder kitinase terhadap hambatan pertumbuhan jamur penyebab koinfeksi kandidiasis pasien penderita tuberculosis (TBC) telah diuji melalui tahapan Isolasi jamur *Candida* dari sputum penderita TBC, skrining produksi Kitinase isolat actinomycetes, Uji aktivitas kitinase serta penentuan daya hambat dan konsentrasi hambat minimum (MIC) kitinase diperoleh hasil sebagai berikut:

Penelitian diawali dengan Isolasi *Candida sp* sputum yang dilakukan dengan isolasi secara aseptik dan dilaksanakan dalam *biosafety cabinet* dari bahan sampel sputum penderita tuberculosis paru pada media pertumbuhan *Chromogenic Candida Agar* diperoleh hasil sebagai berikut:

Tabel 4.1 Distribusi Spesies *Candida sp* Pada Sputum Penderita Tuberculosis Paru

Spesies <i>Candida</i>	Jumlah	Persen
<i>Candida albicans</i>	13	62
<i>Candida glabrata</i>	2	9,5
<i>Candida parasilopsis</i>	1	4,7
Negatif	5	23,8
Total	21	100

Dari Tabel 4.1 diketahui 21 sampel sputum pasien tuberculosis yang diisolasi adanya *Candida sp* diperoleh 16 (76%) sampel positif *Candida sp*. Dengan distribusi spesies 62 % *Candida albicans*, 9,5% *Candida glabrata* dan 4,7% *Candida parasilopsis*.

Skrining Produksi Kitinase dari isolate Actinomycetes

Produksi kitinase isolat uji dilakukan dengan perhitungan kitinolitik indeks menggunakan medium mengandung koloidal kitin 1% (b/v). Penanaman isolat dengan single dot dan diamati adanya zona jernih dan diperhitungkan menggunakan rumus Enzim Indeks.

Tabel 4.2 Hasil Perhitungan Enzim index

Media kitin koloid	Diameter zona lisis	Diameter koloni	Enzim Index
I	13 mm	8 mm	0,625
II	11 mm	8 mm	0,375
III	11 mm	7 mm	0,571
EI Rata-rata			0,524

Berdasarkan hasil pengujian isolate Actinomycetes terhadap adanya aktivitas kitinase diperoleh kitinolitik indeks dari sampel Uji adalah EI = 0,524 Indeks kitinolitik menunjukkan kemampuan degradasi isolat actinomycetes terhadap kitin. Semakin banyak enzim yang dihasilkan maka zona jernih juga akan semakin luas karena kitin yang terdegradasi semakin banyak.

Uji Aktivitas Kitinase

Hasil Uji aktivitas kitinase dari isolate actinomycetes *Streptomyces albus* subspecies albus InaCC A490. Kadar kitinase dibaca menggunakan spektrofotometer UV-visible 17000 Shimadzu yang diperhitungkan dengan kurva standar N asetilglukosamin yang telah dibuat dan diperoleh konsentrasi enzim kitinase sebesar 25 mg/ml, berikut hasil pembacaan absorbansi uji aktivitas kitinase:

Tabel 4.3 Hasil Pembacaan Absorbansi Uji Aktifitas Kitinase

Sample Table						
	Sample ID	Type	Ex	Conc	WL420.0	Comments
1	Blanko	Unk-Repeat			0.041	
2	Blanko-2	Unk-Repeat			0.047	
3	Blanko-3	Unk-Repeat			0.043	
4	Blanko-Avg	Average		0.027	0.043	Avg of preceding 3 Samples
5	Sampel 1	Unk-Repeat			0.043	
6	Sampel 1-2	Unk-Repeat			0.044	
7	Sampel 1-3	Unk-Repeat			0.045	
8	Sampel 1-Avg	Average		0.028	0.044	Avg of preceding 3 Samples
9	Sampel 2	Unk-Repeat			0.040	
10	Sampel 2-2	Unk-Repeat			0.043	
11	Sampel 2-3	Unk-Repeat			0.041	
12	Sampel 2-Avg	Average		0.022	0.041	Avg of preceding 3 Samples

Pengujian daya hambat dinyatakan dengan persen penghambatan pertumbuhan *Candida albicans* melalui pengukuran absorbansi sampel dibandingkan absorbansi kontrol.

Tabel 4.4. Hasil Pengukuran Daya Hambat Kitinase terhadap *Candida albicans*.

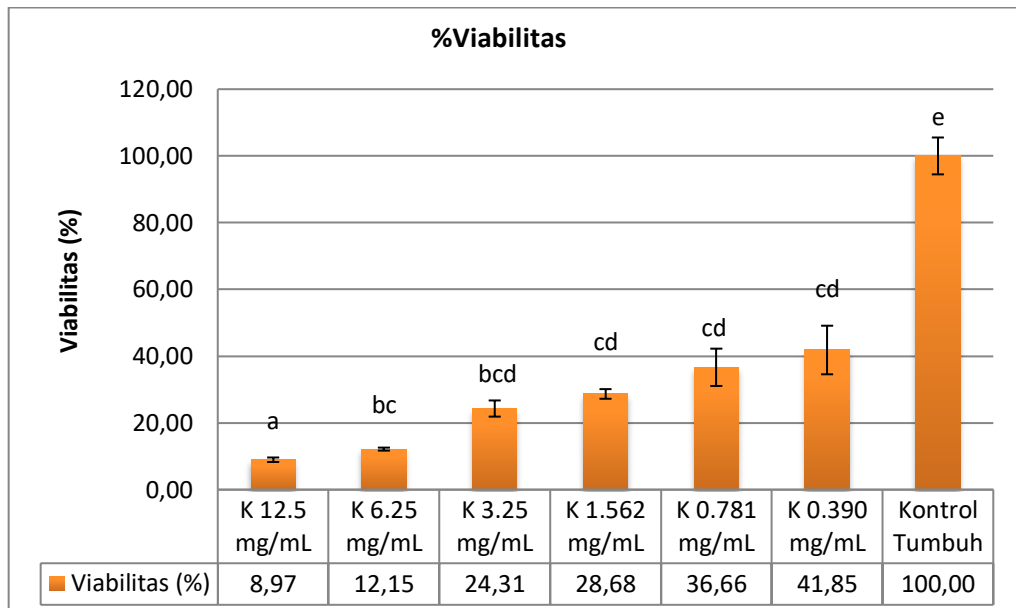
Sampel	Viabilitas Sel (%)		Inhibisi (%)	
K 12.5 mg/mL	8.97	± 0.67 ^a	91.03	± 0.67 ^e
K 6.25 mg/mL	12.15	± 0.45 ^{bc}	87.85	± 0.45 ^{cd}
K 3.25 mg/mL	24.31	± 2.42 ^{bcd}	75.69	± 2.42 ^{bcd}
K 1.562 mg/mL	28.68	± 1.45 ^{cd}	71.32	± 1.45 ^{bc}
K 0.781 mg/mL	36.66	± 5.59 ^{cd}	63.34	± 5.59 ^{bc}
K 0.390 mg/mL	41.85	± 7.28 ^{cd}	58.15	± 7.28 ^{bc}
Kontrol	100.00	± 5.52 ^e	0.00	± 5.52 ^a

*Data yang disajikan merupakan rata-rata ± standar deviasi. Huruf (a,bc,bcd,cd,e) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan berdasarkan uji Dunnett T3 (P<0.05).

Keterangan Tabel:

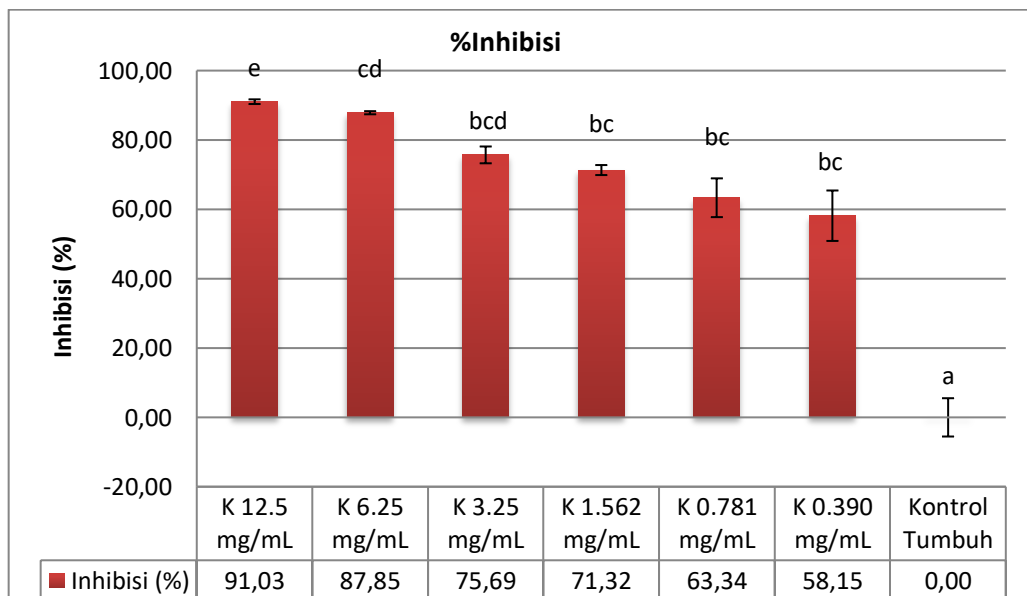
- K 12,5 mg/ml : Sampel *Candida albicans* + enzim kitinase konsentrasi 12,5 mg/ml
- K 6,25 mg/ml : Sampel *Candida albicans* + enzim kitinase konsentrasi 6,25 mg/ml
- K 3,25 mg/ml : Sampel *Candida albicans* + enzim kitinase konsentrasi 3,25 mg/ml
- K 1,562 mg/ml : Sampel *Candida albicans* + enzim kitinase konsentrasi 1,562 mg/ml
- K 0,781 mg/ml : Sampel *Candida albicans* + enzim kitinase konsentrasi 0,781 mg/ml
- K 0,390 mg/ml : Sampel *Candida albicans* + enzim kitinase konsentrasi 0,390 mg/ml

Dari tabel 4.3 terlihat hasil pengukuran yang menunjukkan persen penghambatan kitinase (persen inhibisi) terhadap *Candida albicans* dengan variasi konsentrasi dan viabilitas sel (dalam persen) yang menggambarkan jumlah sel yang masih hidup dalam sampel uji setelah penghambatan oleh enzim kitinase. Tingkat penghambatan yang ditunjukkan kitinase berbanding lurus dengan tingkat konsentrasinya, semakin tinggi konsentrasi kitinase maka semakin tinggi daya hambat yang dihasilkan. Pada penelitian ini penghambatan terendah pada 58,15% dan tertinggi pada 91,03%. Nilai MIC ditentukan pada konsentrasi enzim kitinase terendah yang mampu memberikan efek penghambatan pada pertumbuhan *Candida*. Persentase viabilitas dan penghambatan dapat dilihat pula pada grafik gambar 4.1 dan 4.2 berikut ini:



Gambar 4.1. Persentase Viabilitas *C. albicans* setelah pemberian kitinase.

*Data yang disajikan merupakan rata-rata \pm standar deviasi. Huruf (a,bc,bcd,cd,e) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan berdasarkan uji Dunnett T3 ($P < 0.05$).



Gambar 4.2. Persentase Inhibisi Kitinase terhadap *C. albicans*.

*Data yang disajikan merupakan rata-rata \pm standar deviasi. Huruf (a,bc,bcd,cd,e) menunjukkan adanya perbedaan yang signifikan berdasarkan uji Dunnett T3 ($P < 0.05$).

4.2 Pembahasan

Spesimen sputum penderita tuberkulosis, setelah dilakukan isolasi pada media pertumbuhan agar darah, media SDA kemudian diisolasi pada media selektif untuk identifikasi spesies pada media Chromogenic agar didapatkan 76% sampel ditemukan *Candida* sp. Pada penelitian ini dari 21 sampel sputum tuberkulosis berhasil diisolasi 13 sampel positif *Candida albicans* (62%), *Candida glabrata* sebanyak 9,5% dan *Candida parasilopsis* sebanyak 4,7%. Hal ini sesuai dengan penelitian Astekar yang menyatakan prevalensi infeksi oportunistik kandidiasis pada penderita tuberkulosis, yang disebabkan oleh *Candida albicans* yang merupakan flora normal saluran pernapasan, dapat ditemukan pada lebih dari 50% dahak pasien dengan TBC paru¹, Selain spesies *Candida albicans* pada mukosa saluran pernafasan sebesar 20%⁶ terdapat pula jenis *Candida* yang lain yaitu pula *Candida glabrata* dan *C. tropicalis*, demikian pula pada penelitian sampel sputum yang diperiksa selain *Candida albicans* terdapat pula *C. glabrata* namun tidak ditemukan *C. tropicalis*.

C. albicans memiliki kemampuan morfogenesis karena sifat dimorfik yang dimiliki oleh jamur, perubahan morfologi dari sel ragi (yeast) yang bersifat uniseluler dapat berubah ke bentuk sel serabut yaitu pseudohifa dan hifa tergantung pada media pertumbuhan, suhu dan pH lingkungan bertumbuh. Pada penelitian ini isolasi *C. albicans* menggunakan beberapa macam media yaitu media sabouraud dextrose agar, agar darah dan media selektif Chromogenic *Candida* agar. Pada media SDA dan Chrome agar menunjukkan morfologi menyerupai koloni bakteri diameter lebih besar dibandingkan dengan koloni pada chrome agar dan warna koloni yang berbeda yaitu warna putih kekuningan pada media SDA dan hijau pada media chrome agar dan ini merupakan ciri spesifik spesies *C. albicans* pada media selektif chrome agar dan pada pemeriksaan mikroskopis menunjukkan bentuk bulat dengan tampak adanya sel budding, sedangkan pada media agar darah bentuk sel ragi secara mikroskopis nampak lebih besar dan lonjong dan sel budding tampak lebih banyak dan ditemukan pula multibudding. Hal ini disebabkan media agar darah mengandung serum dan ini memicu terbentuknya budding, selaras dengan penelitian Sayyada dkk

menunjukkan bahwa media serum kuda, pada suhu 37⁰C, pH 7,4 secara nyata meningkatkan pembentukan germinasi *C albicans* membentuk sel berbentuk filamen.³⁵ Dengan demikian media Chromogenic adalah media yang sangat sensitive dalam mengidentifikasi spesies Candida, namun untuk pertumbuhan sel Candida akan lebih baik dan optimum pada media mengandung serum ditandai dengan pertumbuhan budding yang lebih banyak.

Kitinase merupakan enzim yang mendegradasi kitin pada ikatan β -1,4-asetamido-2-deoksi-D-glikosida menjadi produk turunannya yaitu kitin oligosakarida atau monomer N-asetilglukosamin (NAG). Enzim kitinase dihasilkan oleh mikroorganisme kitinolitik yang sebagian besar terdapat di lingkungan tanah dan air. Kitinase dalam penelitian ini diperoleh dari isolat actinomycetes yaitu *Streptomyces albus* subspecies albus InaCC A490. *Streptomyces albus* diketahui secara morfologi, fisiologi dan sifat biokimia merupakan actinomycetes kitinolitik³³ sehingga pada penelitian ini isolat yang digunakan untuk produksi enzim kitinase adalah *Streptomyces albus* dari InaCC dan isolate berasal dari pemandian air panas Ciseeng Jawa Barat. Untuk mengetahui aktivitas enzim kitinase telah dilakukan skrining produksi kitinase menggunakan medium mengandung kitin koloidal 1% b/v setelah diinkubasi selama 7 hari didapatkan Enzim indeks kitinolitik 0,524. Apabila mengamati hasil yang diperoleh apabila dibandingkan dengan aktivitas kitinolitik beberapa jurnal yang mempelajari aktivitas enzim kitinase misalnya penelitian Halimatussahdiah dkk mempelajari aktivitas kitinolitik bakteri di sungai Pohara Sulawesi Tenggara mendapatkan rata-rata indeks kitinolitik sebesar 8-22³⁴, Indeks kitinolitik menunjukkan kemampuan degradasi isolat actinomycetes terhadap kitin. Semakin banyak enzim yang dihasilkan maka zona jernih juga akan semakin luas karena kitin yang terdegradasi semakin banyak. Dengan Enzim Indeks 0,524 kitinase isolate Actinomycetes telah dapat menghambat pertumbuhan *Candida albicans* secara in vitro. Aktivitas kitinolitik yang diketahui dari oleh isolat *Streptomyces albus* subspecies albus InaCC A490 menambah daftar spesies *Streptomyces* penghasil enzim kitinolitik berdasarkan beberapa penelitian terdahulu, enzim kitinolitik telah teridentifikasi dihasilkan beberapa *Streptomyces*

spp, diantaranya *S. antibioticus*, *S. griseus*, *S. plicatus*, *S. lividans*, *S. aureofaciens*, *Streptomyces albidoflavus*, *S. olivaceoviridis*, *S. thermidolromus*, *S. viridochromogenes* dan *S. halstedii*.¹⁵

Secara umum, aktivitas optimum enzim kitinase berada pada kisaran suhu 30-40°C dan pH 5-7 serta kestabilan enzim kitinase berada pada kisaran suhu 30-45°C dan pH 4-8. Pada penelitian ini aktivitas kitinase dalam menghambat pertumbuhan dilakukan pada suhu inkubasi 37°C, untuk mencapai kondisi optimum aktivitas kitinase dengan pH 7. Kitinase mampu menghidrolisis senyawa polimer kitin menjadi kitinolisakarida atau monomer NAG dengan menghidrolisis kitin secara acak pada ikatan glikosidik. Secara umum jenis kitinase dibedakan menjadi 3 berdasarkan cara kerjanya dalam mendegradasi kitin, yaitu eksokitinase, endokitinase dan N-asetil-glukosaminidase. Eksokitinase memotong polimer kitin hanya dari ujung nonreduksi. Endokitinase memotong polimer kitin secara acak dan menghasilkan dimer, trimer, tetramer, dan oligomer gula. N-asetil-glukosaminidase yang memutuskan diasetilkitobiosa dan menghasilkan NAG, berdasar studi literatur tersebut aktivitas kitinase pada penelitian ini telah terdeteksi dengan adanya daya hambat pertumbuhan *Candida* sebesar lebih dari 50%, diketahui mekanisme aktivitas kitinasenya melalui aktivitas N-asetil-glukosaminidase dengan menghasilkan NAG³⁶

Enzim kasar (*crude concentrated*) yang diisolasi dari strain *Actinomycetes* yaitu *Streptomyces sp* melalui penelitian R Soares dkk, menggunakan kitin koloid yang diuji menggunakan miselia jamur dari *Aspergillus parasiticus* menunjukkan aktivitas yang lebih tinggi dibandingkan dengan kitinase komersial melalui pengamatan yang ditentukan pada pH 7,5 dan 50 ° C. Aktivitas endokitinase dideteksi menggunakan MU-triacetyl-chitotrioses. Aktivitas eksokitinase dan chitobiase dideteksi masing-masing menggunakan pNP-diacetyl-chitobiose dan pNP-N-acetyl-glucosaminide, apabila menggunakan kitinase komersial, ketiga aktivitas tersebut tidak dapat terdeteksi.¹⁸ Pada penelitian tersebut menunjukkan kitinase yang diisolasi dari produk metabolit sekunder *Actinomycetes* memiliki aktivitas antifungal miselia yang sangat baik dibandingkan dengan kitinase komersial, dan dengan penelitian ini diketahui selain efektif sebagai antifungal

golongan jamur filamen/kapang, kitinase juga memiliki kemampuan antifungi terhadap jamur yeast/khamir.

Aktivitas kitinase dari isolate actinomycetes *Streptomyces albus* subspecies *albus* InaCC A490 telah diketahui memiliki kemampuan menghambat pertumbuhan *Candida albicans* dengan MIC 0.390 mg/mL dengan hambatan pertumbuhan sebesar 58.15% adalah pengenceran terendah yang masih mampu menghambat minimal 50% suspensi *Candida albicans*, namun keterbatasan penelitian ini belum dapat menunjukkan konsentrasi bunuh minimum (KBM) sehingga masih dapat dikembangkan penelitian dengan MIC lebih rendah untuk mengetahui seberapa optimal inhibisi yang diperoleh sampai mendekati kontrol negatif dan uji KBM. Keterbatasan dalam penelitian ini uji konsentrasi hambat minimum yang dilakukan pada kitinase belum disertai kontrol antifungi Amphotericin B disebabkan kendala ketersediaan antifungi dan keterbatasan waktu penelitian. Sehingga MIC Amphotericin B digunakan sebagai kontrol pembandingan eksternal yaitu ≤ 1 mg/L, apabila dilihat dari MIC kontrol eksternal, kitinase merupakan produk metabolit sekunder yang memiliki prospek untuk dikembangkan lebih lanjut dengan penelitian dan kajian lebih mendalam untuk pemanfaatan kitinase sebagai alternatif antifungi khususnya penyebab infeksi, karena seiring dengan penelitian sebelumnya metabolit sekunder antijamur yang diproduksi oleh diisolasi pada tahun 2011 dari *Streptomyces sp.* *Sceliphrolactam* menunjukkan aktivitas antijamur yang kuat dengan MIC 4 ug/ ml. *Streptomyces lavenduligriseus* dengan Glikidilfilipin III yang menunjukkan penghambatan kuat pertumbuhan *C. albicans* dengan nilai MIC 6,25 μ g/ ml dibandingkan dengan MIC = 3,13 μ g / ml untuk kontrol, nistatin. Pada 2017, *Streptomyces sp.* strain diisolasi dari sampel tanah yang dikumpulkan dari tambang batu bara pada kedalaman 20 cm di Nanchang, Jiangxi, Republik Rakyat Cina. Aktivitas anti jamur paling ampuh melawan *C. glabrata* ATCC 90030.¹⁶

BAB V

KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. KESIMPULAN

1. Daya hambat isolat Actinomycetes terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans* yang diisolasi dari penderita tuberkulosis paru sebesar 58,15%.
2. Konsentrasi Hambat Minimum kitinase isolat Actinomycetes *Streptomyces albus* subspecies *albus* InaCC A490 adalah sebesar 0.390 mg/mL yang merupakan konsentrasi terendah yang digunakan dalam penelitian ini.

5.2 SARAN

1. Dilakukan penelitian lanjutan aktivitas kitinase dengan serial konsentrasi kitinase lebih kecil dari MIC pada penelitian ini disertai dengan dengan pengujian serial konsentrasi antifungi Amphotericin B untuk mengetahui MIC *Candida albicans* dari penderita tuberkulosis terhadap antifungi Amphotericin B dan menjadi rujukan pembanding aktivitas antifungi kitinase.
2. Diperlukan pengembangan penelitian lebih lanjut untuk potensi pemanfaatan kitinase sebagai antifungi misalnya dengan penelitian *in vivo*.

Daftar Pustaka

1. Astekar M, Bhatiya PS, Sowmya G V. Prevalence and characterization of opportunistic candidal infections among patients with pulmonary tuberculosis. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2016;20(2):183-189. doi:10.4103/0973-029X.185913
2. Amiri MRJ, Siami R, Khaledi A. Tuberculosis Status and Coinfection of Pulmonary Fungal Infections in Patients Referred to Reference Laboratory of Health Centers Ghaemshahr City during 2007-2017. *Ethiop J Health Sci.* 2018;28(6):683-690. doi:10.4314/ejhs.v28i6.2
3. Main S, Lestari T, Triasih R, et al. Training for Tuberculosis Elimination in Indonesia: Achievements, Reflections, and Potential for Impact. *Trop Med Infect Dis.* 2019;4(3):107. doi:10.3390/tropicalmed4030107
4. Paulo S. Case Report Tuberculosis Infection Might Increase the Risk of Invasive Candidiasis in an Immunocompetent Patient. 2015;57(3):273-275.
5. Kali A, Charles MP, Joseph NM, Umadevi S, Kumar S, Easow JM. Prevalence of Candida co-infection in patients with pulmonary tuberculosis. *Australas Med J.* 2013;6(8):387-391. doi:10.4066/AMJ.2013.1709
6. Fontalvo DM, Jiménez Borré G, Gómez Camargo D, et al. Tuberculosis and pulmonary candidiasis co-infection present in a previously healthy patient. *Colomb medica (Cali, Colomb.* 2016;47(2):105-108. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27546933> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4975131>
7. Salaria N, Sharma S, Sharma S, Pradesh H, States U, States U. Actinomycetes : Potential and Applications. 2017;IV(44557):32-44.
8. K NB, Chandrashekhara S, Ali M, Goudanavar PS, Manvi F V. Isolation and Morphological Characterization of Antibiotic Producing Actinomycetes. 2010;9(April):231-236.
9. Agadagba SK, Bash E, Chitte RR, et al. Isolation of Actinomycetes from Soil. *J Microbiol Res.* 2014;2014(3):136-140. doi:10.5923/j.microbiology.20140403.02
10. Das P, Kumar P, Kumar M, Solanki R, Kapur MK. Purification and molecular characterization of chitinases from soil actinomycetes. 2017;11(27):1086-1102. doi:10.5897/AJMR2017.8612
11. Praveen Kumar P, Preetam Raj JP, Nimal Christudas IVS, et al. Screening of Actinomycetes for Enzyme and Antimicrobial Activities from the Soil

- Sediments of Northern Tamil Nadu, South India. *J Biol Act Prod from Nat.* 2015;5(1):58-70. doi:10.1080/22311866.2015.1009385
12. Lacombe-Harvey MÈ, Brzezinski R, Beaulieu C. Chitinolytic functions in actinobacteria: ecology, enzymes, and evolution. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018;102(17):7219-7230. doi:10.1007/s00253-018-9149-4
 13. Chamikara P. Advanced Study on selected taxonomic groups of Bacteria and Archaea. *BSc(UG) Microbiol (Sp), Univ Kelaniya, Sri Lanka.* 2016;(October):3.
 14. Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, et al. Correction for Barka et al., Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2016;80(4):iii-iii. doi:10.1128/membr.00044-16
 15. Dommes J, Van D. Study in an Actinomycetes Producing Chitinase and Chitin Deacetylase. :439-448.
 16. Jakubiec-Krzesniak K, Rajniesz-Mateusiak A, Guspiel A, Ziemska J, Solecka J. Secondary metabolites of actinomycetes and their antibacterial, antifungal and antiviral properties. *Polish J Microbiol.* 2018;67(3):259-272. doi:10.21307/pjm-2018-048
 17. Muharni EN. 168320-ID-pengujian-aktivitas-kitinase-dari-bacill.pdf. Published online 2007.
 18. Soares RMA, Alviano CS, Linhares LF, Coelho RRR. Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. Published online 2000:146-150.
 19. Bhatariwala RA, Jha SC, Jain NK, Modi HA. Enzyme profiling of selected chitinase producing Actinomycetes. *Eur J Biotechnol Biosci.* 2017;5(1):39-43.
 20. Rathore AS, Gupta RD. Chitinases from Bacteria to Human: Properties, Applications, and Future Perspectives. *Enzyme Res.* 2015;2015:1-9. doi:10.1155/2015/791907
 21. Global Tuberculosis Report. *WHO.* Published online 2016.
 22. Delogu G, Sali M, Fadda G. The biology of mycobacterium tuberculosis infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 2013;5(1). doi:10.4084/mjhid.2013.070

23. Gyawali N, Gurung R, Poudyal N, et al. Prevalence of tuberculosis in household contacts of sputum smears positive cases and associated demographic risk factors. *Nepal Med Coll ege J.* 2012;14(4):303-307.
24. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence.* 2013;4(2):119-128.
25. Kabir MA, Hussain MA, Ahmad Z. *Candida albicans* : A Model Organism for Studying Fungal Pathogens . *ISRN Microbiol.* 2012;2012:1-15. doi:10.5402/2012/538694
26. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell.* 2011;10(9):1173-1182. doi:10.1128/EC.05085-11
27. Hardi J, Jusman J, Razak AR, Silva S. Produksi Dan Uji Aktivitas Enzim Kitinase Dari Isolat Bakteri Termofilik B1211 Asal Air Panas Bora. *Kovalen.* 2016;2(3). doi:10.22487/j24775398.2016.v2.i3.7537
28. Kavanagh A, Ramu S, Gong Y, Cooper MA, Blaskovich MAT. Effects of microplate type and broth additives on microdilution MIC susceptibility assays. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(1). doi:10.1128/AAC.01760-18
29. Sanguinetti M, Posteraro B. Susceptibility Testing of Fungi to Antifungal Drugs. Published online 2018:1-16. doi:10.3390/jof4030110
30. Tsukatani T, Suenaga H, Shiga M, Matsumoto K. A rapid microplate method for the proliferation assay of fungi and the antifungal susceptibility testing using the colorimetric microbial viability assay. *Lett Appl Microbiol.* 2014;59(2):184-192. doi:10.1111/lam.12264
31. Arendrup MC. Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight and Associated Tentative. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6):1-10. doi:10.1128/AAC.00485-17CE
32. Yati Sudaryati Soeka ET. Pemanfaatan Limbah Kulit Udang untuk Menghasilkan Enzim Kitinase dari *Streptomyces macrosporeus* InaCC A454 Utilization of Shrimp Shell Wastes to Produce Chitinase from *Streptomyces macrosporeus* InaCC A454 banyak diketahui baik jumlah , diversitas macrospo. *J Kim Terap Indones.* 2016;18(June):91-101.
33. Santhi R. Isolation of chitinase producing *Streptomyces albus* FS12, production and optimization of extracellular chitinase. *Int J Adv Res Biol Sci.*2016;3(4):229–237<http://www.ijarbs.com/pdfcopy/apr2016/ijarbs31.pdf>

34. Halimahtussadiyah R, Natsir M, Kurniawati D, Utamy SP. Isolation and identification of chitinolytic bacteria of pohara river of South East Sulawesi and the optimization production of chitinase enzyme. *AIP Conf Proc.* 2017;1823(2017). doi:10.1063/1.4978135
35. Nadeem SG, Shafiq A, Hakim ST, Anjum Y, U. Kazm S. Effect of Growth Media, pH and Temperature on Yeast to Hyphal Transition in *Candida albicans*. *Open J Med Microbiol.* 2013;03(03):185-192. doi:10.4236/ojmm.2013.33028
36. Wang Q, Duan B, Duan B, Yang R, Zhao Y, Zhang L. Screening and Identification of Chitinolytic Actinomycetes and Study on the Inhibitory Activity against Turfgrass Root Rot Disease Fungi. *J Biosci Med.* 2015;03(03):56-65. doi:10.4236/jbm.2015.33009

Lampiran 1: Persetujuan Kaji Etik



KOMISI ETIK PENELITIAN KESEHATAN
HEALTH RESEARCH ETHICS COMMITTEE
POLTEKKES KEMENKES BANDUNG
MINISTRY OF HEALTH, BANDUNG HEALTH POLYTECHNIC

KETERANGAN LAYAK ETIK
DESCRIPTION OF ETHICAL APPROVAL
"ETHICAL APPROVAL"

No. 14/KEPK/EC/X/2020

Protokol penelitian yang diusulkan oleh
The research protocol proposed by

Peneliti utama : Novi Utami Dewi, SKM., M.Kes
Principal In Investigator

Nama Institusi : Jurusan Teknologi Laboratorium Medik
Name of the Institution Poltekkes Kemenkes Bandung

Dengan judul:
Title

"UJI AKTIVITAS KITINASE ACTINOMYCETES TERHADAP *Candida albicans*"

*"ENZIME ACTIVITY TEST OF ACTINOMYCETES CITINASE AGAINST *Candida albicans*"*

Dinyatakan layak etik sesuai 7 (tujuh) Standar WHO 2011, yaitu 1) Nilai Sosial, 2) Nilai Ilmiah, 3) Pemerataan Beban dan, 4) Risiko, 5) Bujukan/Eksploitasi, 6) Kerahasiaan dan Privacy, dan 7) Persetujuan Setelah Penjelasan, yang menujuk pada Pedoman CIOMS 2016. Hal ini seperti yang ditunjukkan oleh terpenuhinya indikator setiap standar.

Declared to be ethically appropriate in accordance to 7 (seven) WHO 2011 Standards, 1) Social Values, 2) Scientific Values, 3) Equitable Assessment and Benefits, 4) Risks, 5) Persuasion/Exploitation, 6) Confidentiality and Privacy, and 7) Informed Consent, referring to the 2016 CIOMS Guidelines. This is as indicated by the fulfillment of the indicators of each standard.

Pernyataan Laik Etik ini berlaku selama kurun waktu tanggal 13 Oktober 2020 sampai dengan tanggal 13 Oktober 2021.
This declaration of ethics applies during the period October 13, 2020 until October 13, 2021.

October 13, 2020
Professor and Chairperson,

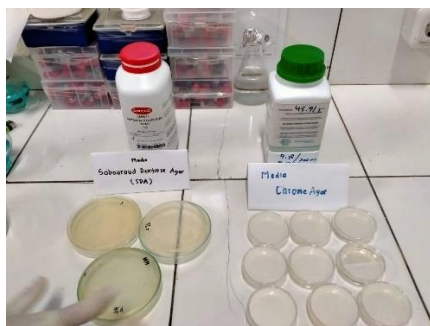
Dr. Supriaman, SKM., M.Sc



Lampiran 2. Log Book Penelitian

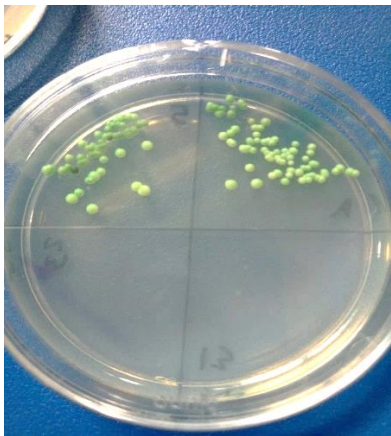
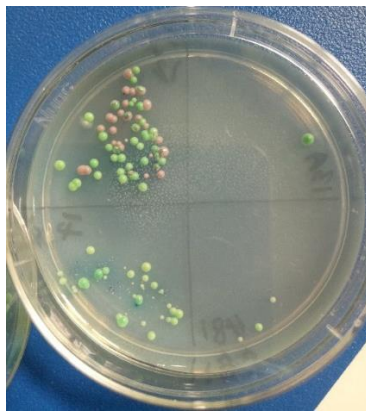
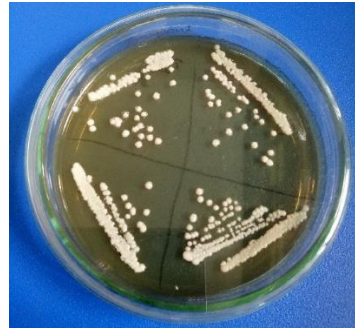
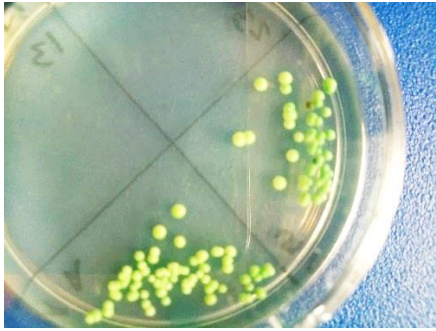
1. Isolasi Candida Dari Sputum TBC

Media yang digunakan untuk isolasi



Isolasi dilakukan di biosafety cabinet level II



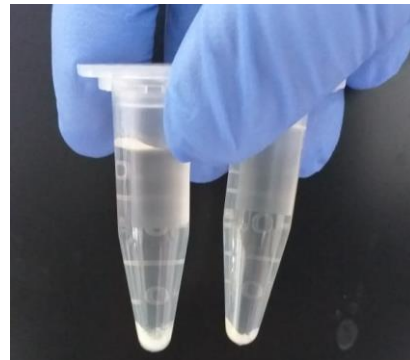


Produksi Kitinase

Kitin kulit udang



Pembuatan buffer phosphate pH 7 dan produksi enzim kitinase



Date: 8 February 2021

UJI MINIMUM INHIBITORY CONCENTRATION (MIC)

1. Alat, Bahan, dan Consumable

a. Bahan

- 1) *Potato Dextrose Agar* (PDA) (Himedia, M096-500G)
- 2) *Potato Dextrose Broth* (PDB) (Himedia, M403-500G)
- 3) ddH₂O
- 4) Enzim Kitinase (0290121-C002)
- 5) Kultur Isolat *Candida albicans* (0290121-C002)

b. Alat dan Consumable

- 1) Microwave (Shivaki, SMW 103)
- 2) Autoclave (HiClave, H-50)
- 3) *Biosafety Cabinet* (Thermo Scientific 1300 Series A2 Class II)
- 4) *CO₂ Incubator* (Thermo IH3543)
- 5) *Spektrofotometer* (Multiskan GO Thermo Scientific 51119300)
- 6) Gelas Ukur (Iwaki)
- 7) Gelas Beaker (Herma)
- 8) Vortex (WiseMix VM-10)
- 9) *Falcon tube* 15 mL (SPL 50015)
- 10) *Disposable petri dish* (Thermo Scientific)
- 11) *Microtube* 1,5 mL (SPL, 62015)
- 12) *96 well plate* (Costar, 3596)
- 13) *Tips Blue, yellow, white* (Borosil)

2. Konsentrasi Uji

- c. *Working solution* : 25 mg/mL; 12.5 mg/mL; 6.25 mg/mL; 3.13 mg/mL; 1.63 mg/mL; 0.78 mg/mL
- d. *Final concentration* : 12.5 mg/mL; 6.25 mg/mL; 3.13 mg/mL; 1.63 mg/mL; 0.78 mg/mL; 0.39 mg/mL

3. Prosedur

d. Pembuatan Media Tumbuh *C. albicans*

- 1) Medium PDA, 38 gram medium PDA dilarutkan dalam 1 liter ddH₂O
- 2) Medium PDB, 21 gram medium PDB dilarutkan dalam 1 liter ddH₂O
- 3) Medium dipanaskan menggunakan microwave hingga mendidih dan homogen.
- 4) Medium disterilisasi menggunakan autoclave suhu 121°C, selama 25 menit.

e. **Preparasi Kitinase**

3) Larutan Stok

Larutan stok enzim kitinase yang digunakan memiliki konsentrasi 25 mg/mL.

4) Pembuatan Seri *Working Solution* (WS)

Pengenceran stok enzim kitinase dilakukan dengan menggunakan media *Potato Dextrose Broth* (PDB) sebagai media tumbuh dari *C. albicans*. Seri konsentrasi kitinase yang digunakan adalah sebagai berikut:

K 25 mg/mL : 1000 μ L larutan stok (Larutan A)

K 12.5 mg/mL : 500 μ L larutan A + 500 μ L PDB (Larutan B)

K 6.25 mg/mL : 500 μ L larutan B + 500 μ L PDB (Larutan C)

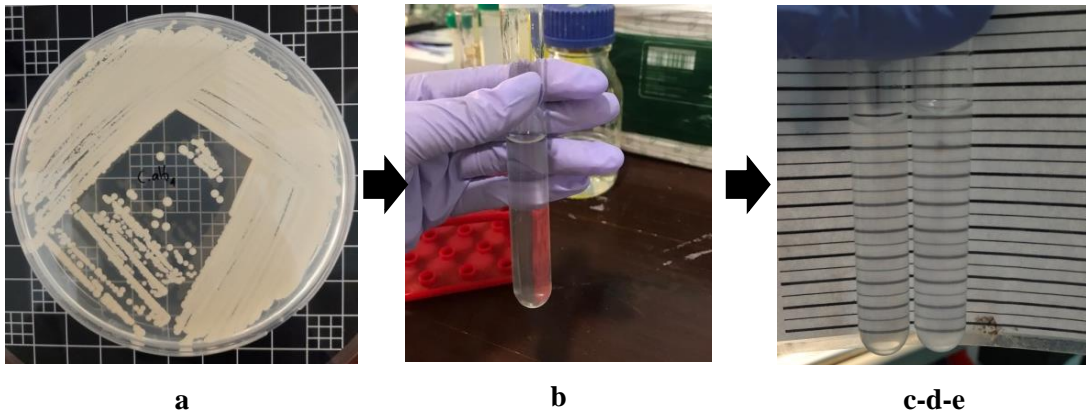
K 3.125 mg/mL: 500 μ L larutan C + 500 μ L PDB (Larutan D)

K 1.625 mg/mL: 500 μ L larutan D + 500 μ L PDB (Larutan E)

K 0.781 mg/mL: 500 μ L larutan D + 500 μ L PDB (Larutan E)

f. **Uji MIC**

1. Persiapan inoculum *Candida albicans*



f) Dilakukan sub kultur isolat *C. albicans* pada media PDA selama 24 jam dengan suhu 28°C.

g) Sejumlah koloni *C. albicans* diinokulasikan pada 10 mL larutan fisiologis (NaCl 0.85%).

h) Kekeruhan dari larutan tersebut kemudian disesuaikan dengan kekeruhan larutan standar McFarland 0.5 untuk mendapatkan inokulum dengan jumlah *Candida* pada rentang $1-5 \times 10^6$ CFU/mL.

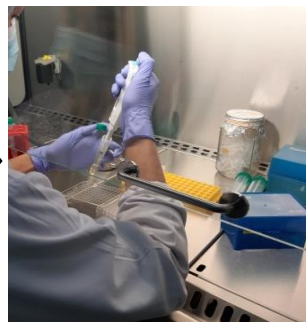
i) Dilakukan pengenceran pada larutan tersebut menggunakan larutan fisiologis dengan perbandingan 1:50 untuk menghasilkan inokulum dengan jumlah *Candida* pada rentang $2 \times 10^4 - 1 \times 10^5$ CFU/mL.

- j) Kemudian dilakukan pengenceran menggunakan media PDB dengan perbandingan 1:20 untuk menghasilkan inokulum dengan jumlah *Candida* pada rentang $1-5 \times 10^3$ CFU/mL.

2. Broth Microdilution



a-b



c-d



e



f

- i) Sebanyak 100 μ l inokulum ditambahkan pada *well* sejumlah seri konsentrasi enzim kitinase yang digunakan.
- j) Sebanyak 100 μ l dari *working solution* setiap konsentrasi enzim kitinase ditambahkan pada *well* yang telah berisi inokulum sehingga konsentrasi enzim mencapai konsentrasi akhir (*final concentration*).
- k) Sebanyak 200 μ l inokulum ditambahkan pada *well* sebagai kontrol tumbuh dan kontrol negatif aktivitas penghambatan
- l) Sebanyak 100 μ l PDB dan 100 μ l dari *working solution* setiap konsentrasi enzim kitinase ditambahkan pada *well* sebagai *blank*
- m) Plate diinkubasi selama 24 jam pada inkubator bersuhu 28°C
- n) Dilakukan pengukuran OD pada panjang gelombang 405 nm
- o) Pertumbuhan *Candida* ditentukan dengan cara membandingkan nilai OD perlakuan dengan OD *blank*-nya masing-masing

- p) Nilai MIC ditentukan pada konsentrasi enzim kitinase terendah yang mampu memberikan efek penghambatan pertumbuhan *Candida*.

Hasil Analisis

a. Mapping

Mapping uji MIC *C. albicans* pada 96 Well Plate.

Sample	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A		KT	K6	K5	K4	K3	K2	K1				
B		KT	K6	K5	K4	K3	K2	K1				
C		KT	K6	K5	K4	K3	K2	K1				
D		BKT	BK6	BK5	BK4	BK3	BK2	BK1				
E												
F												
G												
H												

Keterangan:

KT (Kontrol tumbuh)	: Inokulum <i>C. albicans</i> + medium
K1	: Inokulum <i>C. albicans</i> + Kitinase 12.5 mg/mL
K2	: Inokulum <i>C. albicans</i> + Kitinase 6.25 mg/mL
K3	: Inokulum <i>C. albicans</i> + Kitinase 3.125 mg/mL
K4	: Inokulum <i>C. albicans</i> + Kitinase 1.625 mg/mL
K5	: Inokulum <i>C. albicans</i> + Kitinase 0.781 mg/mL
K6	: Inokulum <i>C. albicans</i> + Kitinase 0.390 mg/mL
Blank	: Medium + perlakuan

Hasil Penelitian

Tabel 1. Hasil Pengukuran *Optical Density* (OD) pengaruh Kitinase terhadap *C albicans*.

Sample	Working Solution	Final Conc.	Absorbance			Blank	Corrected Absorbance			Average
			1	2	3		1	2	3	
K 12.5 mg/mL	25 mg/mL	12.5 mg/mL	0.3839	0.3850	0.3873	0.3623	0.0216	0.0227	0.0250	0.0231
K 6.25 mg/mL	12.5 mg/mL	6.25 mg/mL	0.4113	0.4126	0.4136	0.3812	0.0301	0.0314	0.0324	0.0313
K 3.25 mg/mL	6.25 mg/mL	3.25 mg/mL	0.4494	0.4569	0.4618	0.3934	0.0560	0.0635	0.0684	0.0626
K 1.562 mg/mL	3.25 mg/mL	1.562 mg/mL	0.4758	0.4703	0.4687	0.3977	0.0781	0.0726	0.0710	0.0739
K 0.781 mg/mL	1.562 mg/mL	0,781 mg/mL	0.4906	0.5113	0.4836	0.4007	0.0899	0.1106	0.0829	0.0945
K 0.390 mg/mL	0,781 mg/mL	0,390 mg/mL	0.5034	0.5318	0.4964	0.4027	0.1007	0.1291	0.0937	0.1078
Kontrol Tumbuh			0.6390	0.6444	0.6659	0.3921	0.2469	0.2523	0.2738	0.2577

Tabel 2. Viabilitas dan Inhibisi pengaruh Kitinase terhadap *C albicans*

Sample	Viabilitas (%)			Average	STD	RSD	Inhibisi (%)			Average	STD	RSD
	1	2	3				1	2	3			
K 12.5 mg/mL	8.38	8.81	9.70	8.97	0.67	7.51	91.62	91.19	90.30	91.03	0.67	0.74
K 6.25 mg/mL	11.68	12.19	12.57	12.15	0.45	3.68	88.32	87.81	87.43	87.85	0.45	0.51
K 3.25 mg/mL	21.73	24.64	26.55	24.31	2.42	9.97	78.27	75.36	73.45	75.69	2.42	3.20
K 1.562 mg/mL	30.31	28.18	27.55	28.68	1.45	5.04	69.69	71.82	72.45	71.32	1.45	2.03
K 0.781 mg/mL	34.89	42.92	32.17	36.66	5.59	15.25	65.11	57.08	67.83	63.34	5.59	8.83
K 0.390 mg/mL	39.08	50.10	36.36	41.85	7.28	17.39	60.92	49.90	63.64	58.15	7.28	12.51
Kontrol Tumbuh	95.82	97.92	106.26	100.00	5.52	5.52	4.18	2.08	-6.26	0.00	5.52	0.00

Lampiran 3. Hasil Uji Statistik

UJI NORMALITAS

Tests of Normality

Treatment		Kolmogorov-Smirnov ^a			Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.	Statistic	df	Sig.
Viability	K 12,5 mg/mL	0.258	3		0.960	3	0.616
	K 6,25 mg/mL	0.201	3		0.994	3	0.856
	K 3,125 mg/mL	0.222	3		0.986	3	0.770
	K 1,56 mg/mL	0.303	3		0.909	3	0.413
	K 0,78 mg/mL	0.291	3		0.925	3	0.469
	K 0,39 mg/mL	0.315	3		0.891	3	0.359
	Negative Control	0.314	3		0.893	3	0.365
Inhibition	K 12,5 mg/mL	0.258	3		0.960	3	0.616
	K 6,25 mg/mL	0.201	3		0.994	3	0.856
	K 3,125 mg/mL	0.222	3		0.986	3	0.770
	K 1,56 mg/mL	0.303	3		0.909	3	0.413
	K 0,78 mg/mL	0.291	3		0.925	3	0.469
	K 0,39 mg/mL	0.315	3		0.891	3	0.359
	Negative Control	0.314	3		0.893	3	0.365

a. Lilliefors Significance Correction

Kesimpulan: Semua data perlakuan normal, maka dapat dilanjutkan ke uji one-way ANOVA

UJI ONE WAY ANOVA

ANOVA						
		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Viability	Between Groups	16862.154	6	2810.359	159.546	0.000
	Within Groups	246.606	14	17.615		
	Total	17108.759	20			
Inhibition	Between Groups	16862.154	6	2810.359	159.546	0.000
	Within Groups	246.606	14	17.615		
	Total	17108.759	20			

Kesimpulan : Kedua data signifikan, terdapat perbedaan antar perlakuan, dilanjutkan ke uji Post Hoc

UJI HOMOGENITAS

Test of Homogeneity of Variances

		Levene Statistic	df 1	df2	Sig.
Viability	Based on Mean	4.821	6	14	0.007
	Based on Median	0.868	6	14	0.542
	Based on Median and with adjusted df	0.868	6	6.031	0.566
	Based on trimmed mean	4.303	6	14	0.011
Inhibition	Based on Mean	4.821	6	14	0.007
	Based on Median	0.868	6	14	0.542
	Based on Median and with adjusted df	0.868	6	6.031	0.566
	Based on trimmed mean	4.303	6	14	0.011

Kesimpulan tidak homogen ($p < 0,05$), maka keduanya dilanjutkan dengan uji Dunnett T3

UJI POST HOC



Multiple Comparisons								
Dependent Variable		(I) Treatment	(J) Treatment	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
							Lower Bound	Upper Bound
Viability	Dunnett T3	K 12,5 mg/mL	K 6,25 mg/mL	-3.18241*	0.46679	0.033	-5.9576	-0.4072
			K 3,125 mg/mL	-15.34282*	1.45236	0.030	-27.5282	-3.1574
			K 1,56 mg/mL	-19.71539*	0.92059	0.002	-26.1038	-13.3270
			K 0,78 mg/mL	-27.69728	3.25072	0.062	-58.6324	3.2378
			K 0,39 mg/mL	-32.88486	4.21858	0.076	-73.5851	7.8154
			Negative Control	-91.03493*	3.21219	0.005	-121.5786	-60.4913
		K 6,25 mg/mL	K 12,5 mg/mL	3.18241*	0.46679	0.033	0.4072	5.9576
			K 3,125 mg/mL	-12.16041	1.42303	0.057	-25.1338	0.8129
			K 1,56 mg/mL	-16.53299*	0.87358	0.007	-23.6327	-9.4332
			K 0,78 mg/mL	-24.51488	3.23772	0.081	-55.9103	6.8805
			K 0,39 mg/mL	-29.70246	4.20858	0.093	-70.7669	11.3620
			Negative Control	-87.85252*	3.19903	0.006	-118.8613	-56.8438
		K 3,125 mg/mL	K 12,5 mg/mL	15.34282*	1.45236	0.030	3.1574	27.5282
			K 6,25 mg/mL	12.16041	1.42303	0.057	-0.8129	25.1338
			K 1,56 mg/mL	-4.37257	1.62929	0.413	-14.4989	5.7538
			K 0,78 mg/mL	-12.35446	3.51771	0.264	-37.5438	12.8349
	K 0,39 mg/mL	-17.54204	4.42759	0.226	-52.6730	17.5889		
	Negative	-75.69211*	3.48214	0.003	-	-		

			Control				100.4969	50.8873
	K 1,56 mg/mL	K 12,5 mg/mL	19.71539*	0.92059	0.002	13.3270	26.1038	
		K 6,25 mg/mL	16.53299*	0.87358	0.007	9.4332	23.6327	
		K 3,125 mg/mL	4.37257	1.62929	0.413	-5.7538	14.4989	
		K 0,78 mg/mL	-7.98189	3.33353	0.541	-36.4755	20.5117	
		K 0,39 mg/mL	-13.16947	4.28272	0.383	-51.7807	25.4417	
		Negative Control	-71.31953*	3.29597	0.006	-99.4076	-	43.2315
	K 0,78 mg/mL	K 12,5 mg/mL	27.69728	3.25072	0.062	-3.2378	58.6324	
		K 6,25 mg/mL	24.51488	3.23772	0.081	-6.8805	55.9103	
		K 3,125 mg/mL	12.35446	3.51771	0.264	-12.8349	37.5438	
		K 1,56 mg/mL	7.98189	3.33353	0.541	-20.5117	36.4755	
		K 0,39 mg/mL	-5.18758	5.29730	0.989	-35.1883	24.8131	
		Negative Control	-63.33765*	4.53686	0.001	-88.0625	-	38.6128
	K 0,39 mg/mL	K 12,5 mg/mL	32.88486	4.21858	0.076	-7.8154	73.5851	
		K 6,25 mg/mL	29.70246	4.20858	0.093	-11.3620	70.7669	
		K 3,125 mg/mL	17.54204	4.42759	0.226	-17.5889	52.6730	
		K 1,56 mg/mL	13.16947	4.28272	0.383	-25.4417	51.7807	
		K 0,78 mg/mL	5.18758	5.29730	0.989	-24.8131	35.1883	
		Negative Control	-58.15006*	5.27374	0.005	-88.1204	-	28.1797
	Negative Control	K 12,5 mg/mL	91.03493*	3.21219	0.005	60.4913	121.5786	
		K 6,25 mg/mL	87.85252*	3.19903	0.006	56.8438	118.8613	
		K 3,125 mg/mL	75.69211*	3.48214	0.003	50.8873	100.4969	
		K 1,56 mg/mL	71.31953*	3.29597	0.006	43.2315	99.4076	
		K 0,78 mg/mL	63.33765*	4.53686	0.001	38.6128	88.0625	
		K 0,39 mg/mL	58.15006*	5.27374	0.005	28.1797	88.1204	
Inhibition	Dunnett T3	K 12,5 mg/mL	K 6,25 mg/mL	3.18241*	0.46679	0.033	0.4072	5.9576
			K 3,125 mg/mL	15.34282*	1.45236	0.030	3.1574	27.5282
			K 1,56 mg/mL	19.71539*	0.92059	0.002	13.3270	26.1038
			K 0,78 mg/mL	27.69728	3.25072	0.062	-3.2378	58.6324
			K 0,39 mg/mL	32.88486	4.21858	0.076	-7.8154	73.5851
			Negative Control	91.03493*	3.21219	0.005	60.4913	121.5786
		K 6,25 mg/mL	K 12,5 mg/mL	-3.18241*	0.46679	0.033	-5.9576	-0.4072
			K 3,125 mg/mL	12.16041	1.42303	0.057	-0.8129	25.1338
			K 1,56 mg/mL	16.53299*	0.87358	0.007	9.4332	23.6327
			K 0,78 mg/mL	24.51488	3.23772	0.081	-6.8805	55.9103
			K 0,39 mg/mL	29.70246	4.20858	0.093	-11.3620	70.7669
			Negative Control	87.85252*	3.19903	0.006	56.8438	118.8613

	K 3,125 mg/mL	K 12,5 mg/mL	-15.34282*	1.45236	0.030	-27.5282	-3.1574
		K 6,25 mg/mL	-12.16041	1.42303	0.057	-25.1338	0.8129
		K 1,56 mg/mL	4.37257	1.62929	0.413	-5.7538	14.4989
		K 0,78 mg/mL	12.35446	3.51771	0.264	-12.8349	37.5438
		K 0,39 mg/mL	17.54204	4.42759	0.226	-17.5889	52.6730
		Negative Control	75.69211*	3.48214	0.003	50.8873	100.4969
K 1,56 mg/mL	K 12,5 mg/mL		-19.71539*	0.92059	0.002	-26.1038	-13.3270
		K 6,25 mg/mL	-16.53299*	0.87358	0.007	-23.6327	-9.4332
		K 3,125 mg/mL	-4.37257	1.62929	0.413	-14.4989	5.7538
		K 0,78 mg/mL	7.98189	3.33353	0.541	-20.5117	36.4755
		K 0,39 mg/mL	13.16947	4.28272	0.383	-25.4417	51.7807
		Negative Control	71.31953*	3.29597	0.006	43.2315	99.4076
K 0,78 mg/mL	K 12,5 mg/mL		-27.69728	3.25072	0.062	-58.6324	3.2378
		K 6,25 mg/mL	-24.51488	3.23772	0.081	-55.9103	6.8805
		K 3,125 mg/mL	-12.35446	3.51771	0.264	-37.5438	12.8349
		K 1,56 mg/mL	-7.98189	3.33353	0.541	-36.4755	20.5117
		K 0,39 mg/mL	5.18758	5.29730	0.989	-24.8131	35.1883
		Negative Control	63.33765*	4.53686	0.001	38.6128	88.0625
K 0,39 mg/mL	K 12,5 mg/mL		-32.88486	4.21858	0.076	-73.5851	7.8154
		K 6,25 mg/mL	-29.70246	4.20858	0.093	-70.7669	11.3620
		K 3,125 mg/mL	-17.54204	4.42759	0.226	-52.6730	17.5889
		K 1,56 mg/mL	-13.16947	4.28272	0.383	-51.7807	25.4417
		K 0,78 mg/mL	-5.18758	5.29730	0.989	-35.1883	24.8131
		Negative Control	58.15006*	5.27374	0.005	28.1797	88.1204
Negative Control	K 12,5 mg/mL		-91.03493*	3.21219	0.005	-121.5786	-60.4913
		K 6,25 mg/mL	-87.85252*	3.19903	0.006	-118.8613	-56.8438
		K 3,125 mg/mL	-75.69211*	3.48214	0.003	-100.4969	-50.8873
		K 1,56 mg/mL	-71.31953*	3.29597	0.006	-99.4076	-43.2315
		K 0,78 mg/mL	-63.33765*	4.53686	0.001	-88.0625	-38.6128
		K 0,39 mg/mL	-58.15006*	5.27374	0.005	-88.1204	-28.1797

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

Lampiran 4 : Laporan Keuangan

	LEMBAGA ILMU PENGETAHUAN INDONESIA (INDONESIAN INSTITUTE OF SCIENCES) PUSAT PENELITIAN BIOLOGI (RESEARCH CENTER FOR BIOLOGY) Cibinong Science Center, Jl. Raya Jakarta - Bogor KM. 46 Cibinong 16911 Telp. (+62 21) 87907636 - 87907604, Fax. 87907612 Website : www.biologi.lipi.go.id	
---	---	---

Invoice No : 808 /IPH.1/IF/XI/2020
Tanggal : 11 November 2020
Yth. Novi Utami Dewi Poltekkes Kemenkes Bandung Jl/ Cibogo atas No 21 Rt 02/Rw 03Kec. Sukajadi Kel. Sukawarna Bandung. Di Tempat


INVOICE


Rincian biaya jasa penjualan isolat Aktinomisetes, sebagai berikut :

No.	Keterangan	Jumlah	Harga Satuan	Total
1.	Isolat Bakteri	1 plate	Rp. 600.000,-	Rp. 600.000,-
	Total			Rp. 600.000,-

Pembayaran penjualan isolat aktinomisetes dapat dilakukan secara tunai / transfer. Atas perhatian dan kerjasamanya kami ucapkan terima kasih.

A.n. Kepala Pusat Penelitian Biologi LIPI
Kepala Bidang Mikrobiologi


Dr. Iwan Sasakiawan

	PUSAT PENELITIAN BIOLOGI - LIPI	ID Dokumen : FR-7.5.1.KU.05-01
		Ed/Rev : 1/0
	FORMULIR	TglBerlaku : 07-10-2013
	KUITANSI PNPB	Halaman : 1dari 1

KUITANSI

Sudah terima dari : Novi Utami Dewi (Poltekkes Kemenkes Bandung)

Sebanyak Rp. : Rp. 1.170.000,-

Terbilang : *=Satu juta seratus tujuh puluh ribu rupiah=*

Untuk Pembayaran : Biaya Jasa Pembelian 1 Isolat aktinomisetes =Rp. 600.000,-
Media YSA 20 petri x @Rp. 20.000 =Rp. 400.000,-
Media Oatmeal agar 200gr =Rp. 70.000,-
Media cair 1 liter =Rp. 100.000,- +
=Rp. 1.170.000,-

Cibinong, Januari 2021
Mengetahui,
Kepala Bidang Mikrobiologi
Pusat Penelitian Biologi-LIPI



(Dr. Iwan Saskiawan)



ARETHA MEDIKA UTAMA
Biomolecular and Biomedical Research Center
Jl. Babakan Jeruk II No. 9, Bandung- 40163
Telp./fax. 022-2015097 / E-mail: info@amubbrcc.co.id / WhatsApp: +62 877 3060 2520

KUITANSI

Nomor : KW-8/AMU-BBRC/II/2021
Tanggal : 15 Februari 2021

Telah terima dari : Novi Utami Dewi, SKM., M.Kes
Uang sejumlah *#Tiga Belas Juta Tiga Ratus Sembilan Puluh Empat Ribu
Delapan Ratus Tiga Puluh Delapan Rupiah**
Untuk pembayaran Uji Aktivitas Kitnase Actynomyces Terhadap *Candida albicans*
Yang Diisolasi Dari Penderita Tuberkulosis Paru

Terbilang: **Rp13,394,838**

Hormat kami,
Staf Administrasi



Cahyaning Riski Wijayanti, S Si

RINCIAN BIAYA PENELITIAN
UNIT LABORATORIUM - LABORATORIUM TERPADU POLTEKKES BANDUNG

No. Id Peneliti :
 Nama : Novi Utami
 Institusi : Dosen TLM - Poltekkes Bandung
 Judul Penelitian : Uji Aktivitas Kitinase Actinomycetes terhadap *Candida albicans* yang diisolasi dari Penderita Tuberkulosis Paru

No	Parameter	Rincian Penggunaan	Total Penggunaan	Tarif (Rp)	Total Biaya	Keterangan
1	Sewa Laboratorium	Menggunakan Fasilitas penunjang laboratorium (Ruangan, listrik, air, kebersihan, lemari, alat gelas)	10 hari	15.000 / Hari (*8 Jam)	150.000	
2	Biaya Sewa Alat	Bio Safety Cabinet	2 jam	25.000 / jam	50.000	
		Magnetic Stirrer	4 jam	10.000 / jam	40.000	
		Neraca Analitik	5 pemakaian	5.000 / pemakaian	25.000	
		Fume Hood	4 jam	10.000 / jam	40.000	
		pH Meter	5 pemakaian	2.000 / hari	10.000	
		Refrigerated Centrifuge	1 jam	35.000 / jam	35.000	
		Spektrofotometer	3 jam	35.000 / jam	105.000	
3	Biaya Bahan	NaOH	80 gr	1.000 / gr	80.000	
4	Jasa	Jasa Bimbingan Penelitian	1	100.000 / penelitian	100.000	
TOTAL BIAYA					635.000	

Disetorkan ke Virtual Account Rekening Bank BNI 8093 1244 0000 0001 atas nama Laboratorium Terpadu Poltekkes Bandung

Diperiksa & Disahkan Oleh:
 Kepala Unit Laboratorium
 Poltekkes Kemenkes Bandung


 Dr. Nia Yuniarti Hasan, SST., MT
 NIP. 19740608 199803 2001

Cimahi, 16 Februari 2021
 Dibuat Oleh:
 Instruktur Laboratorium Terpadu

Aditya Juliantuti, S.Tr.Kes
 NIP. 19960709 201811 P127

Lampiran 5. Biodata Peneliti

BIODATA KETUA PENELITI

A. Identitas Diri

1.	Nama Lengkap (dengan gelar)	Novi Utami Dewi SKM., M.Kes
2.	Jenis Kelamin	Perempuan
3.	Jabatan Fungsional	Lektor
4.	N I P	197611022001122001
5.	NIDN	4002117601
6.	Tempat dan Tanggal Lahir	Rangkasbitung, 2 November 1976
7.	E-mail	noviutami@poltekkes-mks.ac.id
8.	Nomor Telepon/HP	082346757626
9.	Alamat Kantor	Jl. Babakan Loa Gunung Batu Cimahi
10.	Nomor Telepon/Faks	022-6628141/Faks 022-6628142
11.	Mata Kuliah yang Diampu	1. Parasitologi
		2. Mikologi
		3. IKM
		4. Biologi Molekuler

B. Riwayat Pendidikan

	D-3	S-1	S-2
Nama Perguruan Tinggi	AAK Bandung	UIT Makassar	UNPAD
Bidang Ilmu	Analisis Kesehatan	FKM	Ilmu Kedokteran Dasar
Tahun masuk – Lulus	1994-1997	2004-2006	2009-2012

C. Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir

No.	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber*	Jml (juta/Rp)
1	2015	Efektivitas Instalasi Pengolahan Air Limbah (IPAL) Dalam Menurunkan Kadar pH, BOD, COD, TSS Dan Fosfat Di Rumah Sakit Islam Faisal	Risbinakes	10
2	2016	Pemeriksaan Kesadahan Pada Air Yang Digunakan Oleh Ibu Rumah Tangga di Desa Lawallu Kabupaten Barru	Risbinakes	15

5	2018	Performa Tes Cepat Molekuler Dalam Diagnosa Tuberkulosis Di Balai Besar Kesehatan Paru Masyarakat Makasar	Risbinakes	30
---	------	---	------------	----

D. Publikasi Artikel Ilmiah

No	Judul Artikel Ilmiah	Nama Jurnal	Vol/Nomor/Tahun
1	Meminimalisir Kadar Detergen Dengan Penambahan Koagulan Dan Filtrasi Media Saring Pada Limbah Kamar Mandi	Higiene Jurnal Kesehatan Lingkungan	Volume 1 No 1 Januari-April 2015 ISSN: 2443-1141
2	Perbandingan Hasil Hitung Jumlah Retikulosit Menggunakan Bahan Sediaan Yang Diinkubasi pada Suhu 37°C Dan Suhu Ruangan	Jurnal Media Analisis Kesehatan	Volume VI No. 2 November 2015
3	Faktor Penyebab Yang Berhubungan Dengan Penyakit Diare Pada Anak-anak di daerah Kerja Puskesmas Maccini Sawah Kota Makassar	Jurnal Media Analisis Kesehatan	Volume VII No. 1 November 2016
4	Identifikasi Telur Nematoda Usus Pada Murid SD Inpres Lae-Lae II Kecamatan Biringkanaya Kelurahan Untia	Jurnal Media Analisis Kesehatan	Volume VII No. 2 November 2016
5	Identifikasi Staphylococcus aureus Pada Kontak Lensa Pada Mahasiswa Analisis Kesehatan Politeknik Kesehatan Makassar	Jurnal Media Analisis Kesehatan	Volume VIII No. 1 Mei 2017
6	Pemeriksaan Kesadahan Pada Air yang digunakan Oleh Ibu Rumah Tangga Di Desa Lawallu Kabupaten barru	Prosiding Seminar Hasil Penelitian	Prosiding Unit Penelitian Poltekkes Makassar Tahun 2017 ISBN; 978-602-65682-4-3
7	Studi penerapan Kesehatan dan keselamatan kerja pada petugas laboratorium kesehatan terhadap pemeriksaan darah ibu hamil di beberapa laboratorium Rumah Sakit Umum Daerah di Sulawesi selatan	Prosiding Seminar Hasil Penelitian	Prosiding Tahun 2017 ISBN; 978-602-65682-4-3
8	Analisis teknik sentrifugasi metode cubica petroff terhadap peningkatan	Jurnal Sulolipu	Volume 17 Periode Juli – Desember 2017 ISSN:

	penemuan BTA dari sputum penderita Tuberkulosis menggunakan metode ziehl neelsen		0854-624x
9	<i>Effect of Tea Concocted from Bawang Dayak (Eleutherine Palmifolia) on Cholesterol of Type 2 Diabetes Mellitus: Pretest-Posttest Control Group Design</i>	Systematic Review Pharmacy	Sys Rev Pharm 2020; 11(4): 674 680 A multifaceted review journal in the field of pharmacy E-ISSN 0976-2779 P-ISSN 0975-8453
10	Perbandingan Hasil Pemeriksaan Mikroskopis Basil Tahan Asam Metode Dekontaminasi Dengan Metode Tes Cepat Molekuler	Jurnal Riset Kesehatan Poltekkes Depkes Bandung	Vol12 No2 Oktober 2020

E. Pemakalah Seminar Ilmiah (Oral presentation) dalam 5 Tahun Terakhir

No	Nama Pertemuan Ilmiah/Seminar	Tema Seminar	Waktu dan Tempat
1	Seminar Internasional ICER-PH	The 2nd International Conference On Environmental Risks And Public Health Global Environtmental Change And The Public Health Impact	Auditorium Prof. Amiruddin 1 FK UNHAS Makassar 10-12 April 2015
2	Seminar Internasional	The 1st International Conference for Interprofessional Collaboration on Global Challenge of Current and Future Infectious Disesase	Grand City Hotel Makassar 20-22 Mei 2016

G.Karya Buku dalam 5 Tahun terakhir

No	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit
1	Parasitologi	2019	Kontributor BAB 7 (hal.261-267)	EGC

H. Perolehan HKI dalam 5~10 Tahun Terakhir.

No	Judul/Tema HKI	Tahun	Jenis	Nomor P/ID
1	Identifikasi Telur Nematoda Usus Pada Feses Anak Jalanan Di Sepanjang Jalan AP Petarani Makassar	2019	Karya Tulis (Artikel)	EC00201932076

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggung jawabkan secara hukum. Apabila dikemudian hari ternyata dijumpai ketidak sesuaian dengan kenyataan saya sanggup menerima sanksi.

Bandung, Desember 2020

Yang menyatakan



Novi Utami Dewi, SKM., M.Kes
NIP: 197611022001122001

BIODATA ANGGOTA PENELITI

A. Identitas Diri

1	Nama Lengkap (dengan gelar)	Entuy Kurniawan, S.Si, MKM
2	Jenis Kelamin	Laki-laki
3	Jabatan Fungsional	Lektor
4	NIP/NIK/Identitas lainnya	196811111992031001
5	NIDN	4011116803
6	Tempat dan Tanggal Lahir	Tasikmalaya, 11-11-1968
7	E-mail	entuy@yahoo.com
8	Nomor Telepon/HP	081214920001
9	Alamat Kantor	Jl. Babakan Loa Gunung Batu Cimahi
10	Nomor Telepon/Faks	022-6628141/Faks 022-6628142
11	Lulusan yang Telah dihasilkan	S-1=...orang; S-2=... orang; S3=...orang
12	Mata Kuliah yang diampu	1 Parasitologi
		2 Mikologi
		3 IKM
		4 Etika Profesi
		5. Manajemen Laboratorium

B. Riwayat Pendidikan

	S-1	S-2	S-3
Nama Perguruan Tinggi	UNJANI Cimahi	UI	
Bidang Ilmu	Kimia	Kesehatan Masyarakat	
Tahun Masuk/Lulus	1998/2001	2006/2008	

C. Pengalaman Penelitian Dalam 5 Tahun Terakhir (Bukan Skripsi, Tesis, maupun Disertasi)

NO	Tahun	Judul Penelitian	Pendanaan	
			Sumber *	Jml (Juta Rp)
1				
2				
3				
4				

D. Publikasi Artikel Ilmiah Dalam Jurnal dalam 5 Tahun Terakhir

No	Judul Artkel Ilmiah	Nama Jurnal	Volume Nomor/Tahun
1	<i>In Silico Study on Antibacterial Activity and Brazilein ADME of Sappan Wood (Caesalpinia Sappan L.) Against Escherichia coli (Strain K12)</i>	<i>Systematic Review Pharmacy</i>	Sys Rev Pharm 2020;11(10):290-296 A multifaceted review journal in the field of pharmacy

F. Pemakalah Seminar Ilmiah (Oral Presentation) dalam 5 Tahun terakhir

No	Nama Pertemuan/Seminar	Judul Artikel Ilmiah	Waktu dan Tempat
1			

G. Karya Buku dalam 5 Tahun terakhir

No	Judul Buku	Tahun	Jumlah Halaman	Penerbit

H. Perolehan HKI dalam 5~10 Tahun Terakhir.

No	Judul/Tema HKI	Tahun	Jenis	Nomor P/ID
1				

Semua data yang saya isikan dan tercantum dalam biodata ini adalah benar dan dapat dipertanggung jawabkan secara hukum. Apabila dikemudian hari ternyata dijumpai ketidak sesuaian dengan kenyataan saya sanggup menerima sanksi.

Bandung, Desember 2020

Yang menyatakan



Entuy Kurniawan, S.Si, MKM
NIP: 196811111992031001