# BAB III

# METODE PENELITIAN

## **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini adalah penelitian eksperimental. Rancangan penelitian ini meliputi pengumpulan dan pengolahan sampel, karakterisasi simplisia, pembuatan ekstrak etanol daun jarak cina *(Jatropha multifida* L*.)* dengan menggunakan metode ekstraksi maserasi dan *microwave-assisted extractions*, skrining fitokimia, penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun jarak cina *(Jatropha multifida* L*.)* dengan metode Spektrofotometri UV-Vis, dan pengujian aktivitas antijamur ekstrak etanol daun jarak cina *(Jatropha multifida* L*.)* terhadap jamur *Candida albicans* metode difusi cakram konsentrasi 25%, 50%, dan 75%.

### 3.1.1 Variabel Penelitian

variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun jarak cina *(Jatropha multifida* L*. ).* sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun jarak cina dan jamur *Candida albicans.*

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter yang digunakan pada penelitian ini meliputi metabolit sekunder seperti alkaloid, tanin, saponin, flavonoid, glikosida, steroid/triterpenoid dengan melakukan skrining fitokimia dan penentuan aktivitas flavonoid total ekstrak etanol daun jarak cina (*Jatropha multifida* L.) secara Spektrofotometri UV-Vis dan aktivitas antijamur melipuli diameter zona hambat.

## **3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian**

### 3.2.1 Jadwal Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Februari 2024 - Juni 2024.

### 3.2.2 Lokasi Penelitian

## Lokasi penelitian dilaksanakan di beberapa lokasi. Ekstraksi *Microwave-Assisted Extraction* (MAE) dilaksanakan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Sumatera Utara. Ekstraksi Maserasi, Pengujian aktivitas flavonoid total dan Pengujian aktivitas antijamur dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Fakultas Farmasi Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah Medan.

## **3.3 Bahan dan Peralatan**

### 3.3.1 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan meliputi : daun jarak cina *(Jatropha multifida L. )*, Aquadest, etanol 96%, asam asetat anhidrida, asam nitrat, asam sulfat, amil alkohol, besi (III) klorida, bismut (III) nitrat, iodium, kalium iodida, serbuk magnesium, raksa (II) klorida, alfa-nafthol, timbal (II) asetat, toluene, kloroform, *n*-heksana, asam klorida, kuersetin, aluminium klorida, dan natrium asetat, media PDA *(Potato Dextrose Agar), Candida albicans,* dan antijamur ketoconazole.

### 3.3.2 Peralatan Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu seperangkat alat destilasi, *rotary evaporator*, *microwave-assisted extractions,* Corong Pisah, spatel, cawan petri, jarum ose, kasa steril, kapas, tisu, botol berwarna gelap, aluminium foil, timbangan analitik, pipet tetes, gelas ukur, erlenmeyer, seperangkat alat spektrofotometri UV-Vis, *hot plate*, Autoklaf, Inkubator, Vorteks, *Laminar air flow,*  oven, dan peralatan gelas yang umum digunakan di laboratorium.

## **3.4 Persiapan Sampel**

### 3.4.1 Determinasi Sampel

Determinasi tumbuhan dilakukan oleh Herbarium Medanense (MEDA) Universitas Sumatera Utara terhadap Daun Jarak Cina *(Jatropha multifida* L*.)* yang diteliti.

### 3.4.2 Pengumpulan Sampel

Sampel daun jarak cina yang digunakan pada penelitian ini diperoleh dari Tanjung Morawa Kabupaten Deli serdang, Sumatera Utara. Metode pengambilan dilakukan dengan cara *purposive*. Sampel diambil pada satu tempat atau daerah saja tidak membandingkannya dengan daerah lain.

### 3.4.3 Pengolahan Sampel

Sampel Daun Jarak Cina *(Jatropha multifida* L.*)* yang masih segar dikumpulkan disortasi basah untuk memisahkan cemaran (kotoran dan bahan asing lain) dari bahan simplisia dan ditimbang berat basahnya 5 kg. Kemudian dikeringkan di dalam lemari pengering pada suhu 40°C-50°C dan dilakukan sortasi kering yaitu membuang benda-benda asing yang tertinggal pada simplisia. Kemudian ditimbang berat keringnya, dihaluskan dengan blender dan disimpan di dalam wadah yang tertutup rapat.

## **3.5 Karakterisasi Simplisia**

### 3.5.1 Pemeriksaan Makroskopis

Pemeriksaan makroskopik dilakukan terhadap tumbuhan segar Daun Jarak Cina *(Jatropha multifida* L.*)* dengan cara memperhatikan warna, bentuk, bau dan ukuran.

### 3.5.2 Pemeriksaan Mikroskopis

Pemeriksaan mikroskopis dilakukan terhadap serbuk simplisia daun jarak cina *(Jatropha multifida* L.*)* dengan cara serbuk simplisia ditaburkan diatas objek glass yang telah ditetesi dengan kloral hidrat sebanyak 1 tetes dan ditutup dengan deck glass, kemudian diamati di bawah mikroskop.

### 3.5.3 Pemeriksaan Kadar Air

Kedalam labu alas bulat dimasukkan 200 ml toluene dan 2 ml air suling, lalu didestilasi selama 2 jam, biarkan mendingin selama 30 menit didinginkan dan volume air dalam tabung penampung dibaca. Selanjutnya ke dalam labu alas bulat dimasukkan 5 g serbuk simplisia yang telah ditimbang seksama, lalu dipanaskan hati – hati selama 15 menit. Setelah toluene mulai mendidih, kecepatan tetesan diatur 2 tetes tiap detik hingga sebagian air suling, kemudia kecepatan penyulingan dinaikkan hingga 4 tetes tiap detik. Setelah semua air suling, bagian dalam pendinginan dibilas dengan toluene. Destilasi dilanjutkan selama 5 menit, kemudian tabung penerima dibiarkan mendingin sampai suhu kamar, setelah air dan toluen memisah sempurna volume dibaca dengan ketelitian 0,05 ml. selisih kedua volume air yang dibaca sesuai dengan kandungan air yang terdapat dalam bahan yang diperiksa. Kadar air dihitung dalam persen (Depkes, RI, 1979).

### 3.5.4 Pemeriksaan Kadar Sari Larut Air

Sebanyak 5 g serbuk simplisia yang telah di timbang, kemudian dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml air-klorofom (2,5 kloroform dalam air suling sampai 1 liter ) dalam labu bersumbat sambil di kocok sesekali selama 6 jam pertama, kemudian dibiarkan selama 18 jam kemudian disaring, sejumlah 20 ml filtrate pertama diuapkan sampai kering dalam cawan penguap yang berdasar rata yang telah dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar dalam persen sari yang larut dalam air dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

### 3.5.5 Penetapan Kadar Sari Larut Etanol

Sebanyak 5 g serbuk simplisia yang telah dikeringkan di udara dimaserasi selama 24 jam dalam 100 ml etanol 96% dalam labu bersumbat sambil di kocok berkali-kali selama 6 jam pertama dan kemudian dibiarkan selama 18 jam. kemudian disaring, 20 ml filtrat diuapkan sampai kering dalam cawan dangkal berdasar rata yang telah ditara dan sisanya dipanaskan pada suhu 105°C sampai bobot tetap. Kadar sari yang larut dalam etanol dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1989).

### 3.5.6 Penetapan Abu Total

Sebanyak 2 g serbuk simplisia yang telah digerus dan ditimbang seksama dimasukkan dalam krus porselen yang telah dipijarkan dan ditara, diratakan. Krus dipijarkan perlahan-lahan hingga arang habis, pijaran dilakukan pada suhu 600°C selama 3 jam kemudian didinginkan dan ditimbang sampai diperoleh bobot tetap. Kadar abu dihitung terhadap bahan yang dikeringkan di udara. Jika cara ini arang tidak dapat dihilangkan, ditambahkan air panas, saring melalui kertas saring bebas abu. Pijarkan sisa kertas dan kertas saring dalam krus yang sama, masukka filtrate ke dalam krus, diuapkan. Pijarkan hingga bobot tetap, ditimbang dan dihitung (Depkes RI, 1979).

### 3.5.7 Penetapan Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang diperoleh pada penetapan kadar abu total ditambahkan dengan 25 ml asam klorida encerdan didihkan selama 5 menit, bagian yang tidak larut dalam asam dikumpulkan, disaring melalui kertas saring bebas abu, kemudian dicuci dengan air panas. Residu dan kertas saring dipijarkan pada suhu 600°C sampai bobot tetap, kemudian didinginkan dan ditimbang. Kadar abu yang tidak larut dalam asam dihitung terhadap bahan yang telah dikeringkan di udara (Depkes RI, 1979).

## **3.6 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Jarak Cina**

**3.6.1 Pembuatan Ekstrak Etanol Metode Maserasi**

Pembuatan ekstrak daun jarak cina *(Jatropha multifida L. )* dilakukan dengan cara maserasi. Sebanyak 500 g serbuk simplisia dimasukkan ke dalam bejana, dituangkan dengan 75 bagian pelarut etanol 96% sebanyak 3750 ml dalam wadah tertutup didiamkan selama 5 hari terlindungi dari cahaya sambil sesekali diaduk, diserkai, peras, cuci ampas dengan etanol 96% secukupnya hingga diperoleh 100 bagian (5000 ml). dipindahkan kedalam wadah tertutup rapat, dibiarkan ditempat sejuk dan terlindung dari cahaya selama 2 hari, dienap tuangkan atau disaring. Dipekatkan dengan cara diuapkan pada *rotary evaporator*  dengan suhu tidak lebih dari 50°C hingga diperoleh ekstrak kental (Depkes RI, 1979).

**3.6.2 Pembuatan Ekstrak Etanol Metode *Microwave-Assisted Extraction***

Proses ekstraksi daun jarak cina dengan metode *Microwave-assisted extraction.* Serbuk dau jarak cina ditimbang sebanyak 15 g dan ditambahkan pelarut etanol sebanyak 150 ml sesuai perlakuan. Perbandingan sampel dengan pelarut adalah 1 : 10. Selanjutnya sampel diletakkan didalam *microwave* dengan daya 450 Watt selama 8 menit. Sampel yang sudah diekstraksi disaring menggunakan alat penyaring vakum dengan kertas whatman no.1 sampai diperoleh filtrate daun jarak cina, kemudian fitrat diuapkan dalam *rotary evaporator* vakum pada suhu 50°C dengan kecepatan 80 rpm dengan tekanan 100 mbar sampai diperoleh ekstrak daun jarak cina (Yasa et al., 2019).

## **3.7 Pembuatan Larutan Pereaksi**

### 3.7.1 Larutan Pereaksi Bouchardat

Sebanyak 4 g kalium iodida dilarutkan dalam 20 ml aquadest, kemudian ditambahkan sedikit demi sedikit 2 g iodium dan dicukupkan dengan aquadesthingga 100 ml (Depkes RI, 1979).

### 3.7.2 Larutan Pereaksi Mayer

Sebanyak 1,36 g raksa (II) klorida, dilarutkan dalam 60 ml aquadest, kemudian pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 5 g kalium iodida lalu dilarutkan dalam 10 ml air suling. Kedua larutan dicampurkan dan ditambahkan air suling hingga diperoleh larutan 100 ml (Depkes RI, 1979).

### 3.7.3 Larutan Pereaksi Dragendorff

Sebanyak 0,85 g bismut (III) nitrat ditimbang, dilarutkan dalam 100 ml asam asetat glacial ditambahkan 4 ml air suling. Pada wadah yang lain ditimbang sebanyak 8g kalium iodide dilarutkan dalam 20 ml air suling, kemudian kedua larutan dicampurkan sama banyak, lalu ditambahkan 20 ml asam asetat glasial dan diencerkan dengan air suling sampai 100 ml (Depkes RI, 1979).

### 3.7.4 Larutan Pereaksi Molish

Sebanyak 3 g alfa-naftol dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml lalu dilarutkan dalam asam nitrat 0,5 N sampai garis tanda (Depkes RI, 1979).

### 3.7.5 Larutan Pereaksi Asam Klorida 2N

Sebanyak 17 ml asam klorida pekat dimasukkan dama beaker glass yang telah berisi 25 ml air aquades, ditunggu sampai dingin dan diencerkan dengan aquadest hingga 100 ml (Depkes RI, 2020).

### 3.7.6 Larutan Pereaksi Asam Sulfat 2N

Sebanyak 5,4 ml asam sulfat pekat diencerkan dengan air suling hingga 100 ml (Depkes RI, 1979).

### 3.7.7 Larutan Pereaksi Natrium Hidroksida 2N

Sebanyak 8,002 g pellet natrium hidroksida dilarutkan dalam air hingga 100 ml (Depkes RI, 1979).

### 3.7.8 Larutan Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4 M

Pereaksi Timbal (II) Asetat 0,4M Timbal (II) asetat sebanyak 15,17 g dilarutkan dalam air suling bebas CO2 hingga 100 ml (Depkes RI, 2020).

### 3.7.9 Larutan Pereaksi Besi (III) Klorida 1%

Sebanyak 1 g besi (III) klorida dimasukkan ke dalabeaker glass yang berisi 25 ml a quades, diencerkan dengan aquadest sampai 100 ml (Depkes RI,2020).

## **3.8 Skrining Fitokimia**

Skrining fitokimia simplisia daun jarak cina *(Jatropha multifida L. )* meliputi pemeriksaan golongan senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, tanin, triterpenoid/steroid.

### 3.8.1 Pemeriksaan Alkaloid

Serbuk dan ekstrak etanol daun jarak cina ditimbang sebanyak 0,5 gram kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida dan 9 ml aquadest, dipanaskan di atas penangas air selama 5 menit, didinginkan lalu disaring. Filtrat dipakai untuk percobaan berikut :

1. Diambil 1 ml filtrat, ditambahkan 2 tetes pereaksi Mayer, akan terbentuk endapan berwarna putih atau kuning jika mengandung alkaloid.
2. Diambil 1 ml filtrat, ditambahkan 2 tetes pereaksi Bourchardat, akan terbentuk endapan berwarna kuning sampai coklat jika mengandung alkaloid.
3. Diambil 1 ml filtrate, ditambahkan 2 tetes pereaksi Dragendrof, akan terbentuk endapan berwarna merah sampai coklat jika mengandung alkaloid.

Alkaloid dianggap positif jika terjadi endapan atau paling sedikit dua atau tiga dari pecobaan di atas (Depkes RI, 1979).

### 3.8.2 Pemeriksaan Flavonoid

Serbuk dan ekstrak etanol daun jarak cina ditimbang sebanyak 0,5 g kemudian ditambahkan 100 ml air panas, dididihkan selama 5 menit dan disaring dalam keadaan panas, filtrat yang diperoleh kemudian diambil 5 ml lalu ditambahkan 0,1 g serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat dan 2 ml amil alkohol, dikocok, dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol (Depkes RI, 1989).

### 3.8.3 Pemeriksaan Saponin

Serbuk dan ekstrak etanol daun jarak cina ditimbang sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun jarak cina dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan aquadest panas sebanyak 10 ml, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik, timbul busa yang menetap tidak kurang dari 10 menit setinggi 1-10 cm. Ditambahkan 1 tetes larutan asam klorida 2 N, bila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Depkes RI, 1989).

### 3.8.4 Pemeriksaan Tanin

Serbuk dan ekstrak etanol daun jarak cina ditimbang 0,5 g ditambahkan 10 ml air suling lalu disaring, lalu filtratnya diencerkan dengan air sampai tidak berwarna. Larutan di ambil sebayak 2 ml dan ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%. Terjadi warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin (Depkes RI, 1989).

### 3.8.5 Pemeriksaan Steroid/Terpenoid

Serbuk dan ekstrak etanol daun jarak cina ditimbang sebanyak 1 g sampel di maserasi dengan N- heksan selama 2 jam, lalu disaring. Filtrat diuapkan diatas penangas air menggunakan cawan penguap hingga kering. Ke dalam residu ditambahkan 2-3 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat (pereaksi Libermann-Bouchard). Terbentuk warna ungu dan merah atau berubah menjadi hijau biru menunjukkan adanya triterpenoida (Depkes RI, 1979).

### 3.8.6 Pemeriksaan Glikosida

Serbuk dan ekstrak etanol daun jarak cina ditimbang sebanyak 3 gram, disari dengan 30 ml campuran etanol 96% dengan aquadest (7:3) ditambahkan dengan 10 ml HCL 2N, direfluks selama 10 menit, didinginkan dan disaring. Diambil 20 ml filtrate ditambahkan 25 ml aquadest dan 25 ml timbal (II) asetat 0,4 M, dikocok dan didiamkan selama 5 menit dan disaring. Filtrate dimasukkan ke dalam corong pisah dan disari dengan 20 ml campuran kloroform dan isopropanolol (3:2) dilakukan sebanyak 3 kali. Kumpulan sari air di uapkan pada suhu tidak lebih dari 50°C. sisanya dilarutkan dalam 2 ml methanol. Diambil 0,1 ml dimasukkan dalam tabung reaksi diuapkan di atas penangas air, ditambahkan 2 ml air dan 5 tetes pereaksi Molish. Ditambahkan 2 ml asam sulfat pekat perlahan lahan melalui dinding tabung, terbentuknya cincin berwarna ungu pada batas kedua cairan menunjukkan adanya komponen gula (glikon) (Depkes RI, 1979).

## **3.9 Penetapan Kadar Flavonoid Total**

### 3.9.1 Pembuatan Larutan Kuersetin

Ditimbang 25 mg kuersetin, dilarutkan dalam labu terukur 25 ml ditambah etanol sampai tanda batas kedalam larutan Induk Baku (C= 1000 µg/ml) LIB I.. Lalu dipipet 2,5 ml dari LIB I dimasukan kedalam labu terukur 25 ml dicukupkan dengan etanol sampai tanda batas (C= 100 µg/ml) LIB II (Yeti & Yuniarti, 2021).

### 3.9.2 Pembuatan Panjang Gelombang Maksimum Kuersetin

Dipipet 0,6 ml dari larutan induk baku II (LIB II) masukan kedalam labu terukur 10 ml, lalu ditambahkan 0,1 ml AlCl3 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan tambahkan 2,8 ml aquadest, lalu ditambahkan etanol sampai tanda batas, dihomogenkan dan didiamkan selama 30 menit. Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 400-800 nm (Yeti & Yuniarti, 2021).

### 3.9.3 Pembuatan Operating Time

Dipipet 0,6 ml dari larutan induk baku II (LIB II) masukan kedalam labu terukur 10 ml (C= 6 µg/ml), ditambah 0,1 ml AlCl3 10%, 0,1 ml natrium asetat 1 M, dan tambahkan 2,8 ml aquadest, lalu ditambahkan metanol sampai tanda batas, lalu diukur operating time kuersetin selama 60 menit pada panjang gelombang 400-800 nm (Yeti & Yuniarti, 2021).

### 3.9.4 Pengukuran Kurva Kalibrasi Kuersetin

Ditimbang 25 mg kuersetin, dimasukan kedalam labu terukur 25 ml lalu ditambahkan etanol sampai tanda batas (C= 1000 µg/ml) (LIB I). Kemudian dipipet 2,5 ml dari larutan induk baku I kedalam labu terukur 25 ml dicukupkan dengan etanol sampai tanda batas (C= 100 µg/ml) (LIB II). Kemudian dibuat seri kadar lalu dimasukan kedalam labu ukur 10 ml masing-masing dipipet 0,3 ml, 0,4 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, dan 1 ml dari LIB II dengan konsentrasi 3 µg/ml, 4 µg/ml, 6 g/ml, 8 µg/ml dan 10 µg/ml lalu ditambahkan etanol sampai tanda batas. Sesuai konsentrasi tersebut dimasukan kedalam labu terukur 10 ml kemudian ditambahkan 1,5 ml etanol, 0,1 ml aluminium klorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest, dan etanol sampai tanda batas, dihomogenkan dan didiamkan selama waktu operating time . Diukur serapannya pada panjang gelombang maksimum 400-800 nm (Yeti & Yuniarti, 2021).

### 3.9.5 Penetapan Kadar Flavonoid Total dari Ekstrak Etanol Daun Jarak Cina *(Jatropha multifida* L*.)*

Ekstrak etanol Daun jarak cina secara maserasi dan *microwave assisted extraction* ditimbang 0,025g dilarutkan dengan etanol dalam labu ukur 25 ml ditambahkan etanol sampai tanda batas menjadi larutan 1000 ppm. dipipet sebanyak 1 ml dimasukan ke dalam labu ukur 10 ml. Kemudian ditambahkan 1,5 ml etanol, 0,1 ml aluminium klorida 10%, 0,1 ml natrium asetat 1M, dan ditambahkan 2,8 ml aquadest, dan etanol sampai tanda batas. Pengukuran serapan dilakukan menggunakan spektrofotometeri UV-Vis dengan panjang gelombang 431 nm. Dilakukan replikasi sebanyak 6x (Susiloningrum & Mugita Sari, 2021).

## **3.10 Perhitungan Kadar Flavonoid**

Rumus persamaan regresi linier dari baku standar kuarsetin (Susiloningrum & Mugita Sari, 2021).

Keterangan :

y = absorbansi atau garis regresi

a = slope

b = intersep

x = variabel bebas

Rumus menghitung kadar total flavonoid (Susiloningrum & Mugita Sari, 2021).

Keterangan :

## C = konsentrasi kuersentin (ppm atau mg/1000 ml)

## V = volume total ekstrak (ml)

## f = faktor pengenceran

## m = berat sampel (mg)

## **3.11 Pengujian Aktivitas Antijamur**

### 3.11.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat – alat yang digunakan dalam uji aktivitas antijamur ini, disterilkan terlebih dahulu sebelum dipakai. Alat – alat gelas disterilkan di oven pada suhu 170°C selama 1 jam. Media di sterilkan di autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Jarum ose dan pinset dengan lampu spriritus.

### 3.11.2 Sumber Isolat Jamur

Isolat jamur *Candida albicans* berasal dari biakan murni yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Farmasi Universiatas Sumatera Utara.

### 3.11.3 Pembuatan Media Potato Dextrosa Agar (PDA)

Pembuatan Media PDA dilakukan dengan memasukkan 3,9 gram media PDA kedalam Erlenmeyer, kemudian ditambahkan 100 ml aquadest kedalam Erlenmeyer dan dihomogenkan. Media dimasukkan kedalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit (Nur Safitri & Qurrohman, 2022).

### 3.11.4 Pembuatan Suspensi Standar Mc. Farland 0,5

Komposisi :

Larutan BaCl2 1 % 0,05 mL

Larutan H2SO4 1% 9,95 mL

Kedua larutan dicampurkan dalam tabung reaksi steril, dikocok sampai homogen dan ditutup. Apabila kekeruhan hasil suspensi jamur sama dengan kekeruhan suspensi standar berarti konsentrasi jamur 108 CFU/ml (Nur Safitri & Qurrohman, 2022).

### 3.11.5 Pembuatan Larutan Kontrol Positif dan Larutan Kontrol Negatif

Pembuatan larutan control akan dilakukan dengan cara pembuatan larutan control positif, yaitu larutan ketoconazole 2% dibuat dengan cara menimbang 0,02g ketokonazol kemudian dilarutkan dengan aquadest steril sebanyak 1 ml. serta control negatif menggunakan DMSO (Rieska Alfiah et al., 2015).

### 3.11.6 Pembuatan Larutan Nacl 0,9%

Timbang 0,9 gram natrium klorida lalu dilarutkan dalam air suling sedikit demi sedikit dalam labu takar 100 ml sampai larut sempurna. Ditambahkan air suling steril sampai garis tanda, dimasukkan dalam Erlenmeyer steril yang di tutup lalu disterilkan dalam autoklaf suhu 121°C (Maulana et al., 2020).

### 3.11.7 Pembiakan/Peremajaan Jamur

Sebanyak satu ose dari biakan murni jamur *Candida albicans* digoreskan pada permukaan media *Potato Dextrose Agar* (PDA) miring, ditutup mulut tabung reaksi dengan kapas. Di inkubasi selama 24 jam pada suhu 35°C (Listina et al., 2023).

### 3.11.8 Pembuatan Suspensi Jamur

Pembuatan suspense jamur dilakukan dengan mengambil jamur *Candida albicans* dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi larutan NaCl 0,9 % sebanyak 10 ml, kemudian dicampur hingga homogen ditandai dengan cairan berubah menjadi keruh sesuai standar kekeruhan Mc Farland (Sari N. K. Y. et al., 2019).

## **3.12 Uji Aktivitas Antijamur**

Dituang media PDA sebanyak 15 ml dalam cawan, selanjutnya cawan digoyang di atas permukaan meja, agar media rata. Setelah agar memadat, diusapkan katembat steril yang sudah di celupkan kedalam suspense jamur dan di goreskan secara merata di permukaan media, kemudian di tempelkan kertas cakram yang sudah di berikan ekstrak etanol daun darak cina metode maserasi dan *Microwave-assisted extraxtion* dengan konsentrasi 25%, 50% dan 75%, ketoconazol 2% (sebagai kontrol +), dan DMSO (sebagai kontrol-), dengan jarak yang sama. Lalu diinkubasi pada suhu kamar (25-28°C) selama 2x24 jam. Diamati dan diukur wilayah jernih di sekitar kertas cakram tempat bahan uji, sebagai ukuran diameter zona hambat pertumbuhan jamur dengan menggunakan jangka sorong. (Kinasih et al., 2021).

**3.13 Analisis Data**

Data yang diperoleh pada pengujian aktivitas antijamur diolah secara statistic dengan metode one way ANOVA pada taraf kepercayaan 95% dengan menggunakan program SPSS