

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi pada penelitian ini adalah daun pletekan yang berasal dari tanaman pletekan yang tumbuh di daerah Desa Tirtomani Kalasan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

Sampel yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah daun pletekan yang diambil dengan memilih daun yang masih segar, tidak terlalu muda dan juga tidak terlalu tua, diambil pada pagi hari. Sampel di dapatkan dari daerah Desa Tirtomani Kalasan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini yang pertama adalah, fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun pletekan.

Variabel utama yang kedua adalah aktivitas antijamur dari fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari ekstrak etanol daun pletekan terhadap *Candida albicans* ATCC 10231.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat digolongkan dalam berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel terkendali dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang direncanakan untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari ekstrak etanol daun pletekan.

Variabel terkendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh penelitian lain secara tepat. Variabel terkendali dalam

penelitian ini adalah jamur *Candida albicans* ATCC 10231, media, suhu inkubasi, waktu inkubasi, sterillisasi dan kondisi laboratorium.

Variabel tergantung adalah titik pusat persoalan yang merupakan kriteria dalam penelitian. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah diameter zona hambat yang terbentuk dari pemberian fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, fraksi air dari ekstrak etanol daun pletekan, Konsentrasi Hambat Minimum (KHM), dan Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM).

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun pletekan adalah daun segar pada saat tanaman belum berbunga, daun tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua di dapat dari Desa Tirtomani Kalasan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta.

Kedua, serbuk daun pletekan adalah daun pletekan yang dikeringkan dengan oven pada suhu 45°C sampai kering lalu dihaluskan, kemudian serbuk diayak dengan ayakan ukuran mess 40.

Ketiga, ekstrak daun pletekan adalah hasil ekstraksi daun pletekan dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Keempat, fraksi *n*-heksana adalah ekstrak daun pletekan yang kemudian difraksinasi dengan menggunakan pelarut *n*-heksana.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu fraksi *n*-heksana dari daun pletekan yang kemudian difraksinasi menggunakan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air dari ekstrak etanol daun pletekan adalah residu dari fraksi etil asetat.

Ketujuh, *Candida albicans* ATCC 10231 adalah *Candida albicans* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Setia Budi Surakarta.

Kedelapan, uji aktivitas antijamur adalah metode difusi dan dilusi.

Kesembilan, metode difusi adalah metode difusi cakram, konsentrasi yang digunakan adalah 40, 20, dan 10%. Kontrol positif yang digunakan adalah flukonazole dan kontrol negatif adalah DMSO 5%.

Kesepuluh, metode dilusi adalah metode untuk menentukan KHM dan KBM. Konsentrasi yang digunakan 40, 20, 10, 5, 2,5; 1,25; 0,63; 0,32 dan 0,16%. Kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa ada pertumbuhan mikroba uji ditetapkan

sebagai KHM sedangkan KBM ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan *Candida albicans* ATCC 10231.

C. Bahan dan Alat

1. Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah serbuk daun pletekan, *Candida albicans* ATCC 10231, etanol 96%, *n*-heksana, etil asetat, flukonazole, DMSO 5%, aquadest, HCl 2N, Mg, Anhidrida asetat, asam asetat, kloroform, *n*-butanol, metanol, asam sulfat pekat, anisaldehyd, FeCl₃ 1%, *Lieberman bouchard*, *Sitroborat*, Dragendorf, Mayer, Wagner, *Lactofenol Cotton Blue*, *fenol red* 1% sudan III, lempeng KLT dengan fase diam silica Gel₂₅₄. Media yang digunakan adalah *Sabouroud Glucose Agar* (SGA), *Sabouroud Glucose Cair* (SGC), glukosa, laktosa, maltosa, dan sukrosa.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah pisau, oven, mesin giling, botol maserasi, gelas ukur, erlenmeyer, batang pengaduk, tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, *beaker glass*, corong pisah, kertas saring, evaporator, autoklaf, inkubator, kotak aseptis (inkas), jarum ose, tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, lampu spiritus, korek api, *beaker glass*, kain lap, pipet ukur, dan spuit.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahap pertama penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) berdasarkan ciri-ciri morfologis yang ada pada daun pletekan. Determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu. Determinasi ini bertujuan untuk memastikan bahwa memang benar tanaman yang digunakan adalah *Ruellia tuberosa* L.

2. Pengambilan bahan dan pembuatan serbuk daun pletekan

Daun pletekan diperoleh dari tanaman pletekan yang tumbuh di Desa Tirtomani Kalasan, Kabupaten Sleman, Daerah Istimewa Yogyakarta. Daun pletekan diambil pada saat tanaman belum berbunga dengan memilih daun yang masih segar, tidak terlalu muda dan juga tidak terlalu tua. Daun kemudian dikumpulkan dan ditimbang, setelah itu dicuci bersih dengan air mengalir hingga bersih dan terbebas dari kotoran. Daun yang sudah dibersihkan dengan air mengalir dan ditiriskan, kemudian dikeringkan dengan cara dioven pada suhu 45° hingga didapat daun pletekan yang kering. Daun pletekan yang sudah kering dihaluskan, dibuat serbuk dan diayak dengan menggunakan ayakan No.40, kemudian serbuk ditimbang (Kemenkes 2013).

3. Pembuatan ekstrak etanol daun pletekan

Ekstrak daun pletekan dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Serbuk daun pletekan sebanyak 1Kg dimasukkan ke dalam botol coklat bermulut lebar, dengan ditambahkan pelarut etanol 96% sebanyak 10L kemudian direndam selama 6 jam pertama sambil sekali-kali diaduk, lalu didiamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara disaring menggunakan kain flanel, proses penyarian diulangi sebanyak satu kali menggunakan pelarut etanol 96% dengan jumlah volume pelarut sebanyak 5L, setelah itu semua maserat dikumpulkan kemudian dipekatkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hingga diperoleh ekstrak pekat (Kemenkes 2013). Pembuatan ekstrak dapat dilihat pada gambar 2.

4. Penetapan persen rendemen

Persen rendemen diperoleh dari menimbang hasil dari ekstrak kemudian dibagi berat serbuk daun pletekan dan dikalikan 100%

$$\% \text{ rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak (g)}}{\text{bobot sampel (g)}} \times 100\%$$

5. Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak etanol daun pletekan

Penetapan kadar air serbuk dan ekstrak etanol daun pletekan dilakukan menggunakan alat *Sterling-Bidwell*. Metode ini dilakukan dengan cara menimbang sampel sebanyak 20 gram kemudian dimasukkan ke dalam labu

destilasi dan ditambahkan pelarut toluen jenuh air 200 ml sampai sampel terendam kemudian memasang alat *Sterling-Bidwell*. Labu dipanaskan dengan api kecil (dilakukan secara hati-hati). Pemanasan dihentikan sampai tidak ada lagi air yang menetes. Ukur volume air yang tertampung pada alat *Sterling-Bidwell*, kadar air dihitung dalam %v/b (Kemenkes 2013).

6. Penetapan persen kadar air serbuk dan ekstrak etanol daun pletekan

Penetapan persen kadar air diperoleh dengan mengukur volume air dari sampel pada skala alat *Sterling-Bidwell* kemudian dibagi dengan berat awal sediaan uji kemudian dikalikan 100%.

$$\% \text{ kadar air} = \frac{\text{volume air (ml)}}{\text{bobot sampel (g)}} \times 100\%$$

7. Fraksinasi

7.1. Fraksinasi *n*-heksan ekstrak daun pletekan. Fraksinasi *n*-heksan ekstrak daun pletekan dibuat dengan cara ekstrak etanol daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) dilarutkan dengan 75 ml aquadest kemudian difraksinasi dengan pelarut non polar *n*-heksana sebanyak 75 ml dalam corong pisah. Filtrat yang dibagian atas adalah fraksi *n*-heksana dipisahkan dari filtrat yang dibagian bawah yaitu air sehingga didapat fraksi *n*-heksana, apabila masih terdapat residu yang tidak larut dalam *n*-heksana pada fraksinasi pertama maka residu dapat dilakukan fraksinasi kedua dengan pelarut dan volume pelarut yang sama yaitu *n*-heksana sebanyak 75 ml begitu seterusnya sampai fraksinasi yang ketiga. Hasil fraksinasi dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator*.

7.2. Fraksinasi etil asetat ekstrak daun pletekan. Fraksinasi etil asetat ekstrak daun pletekan dibuat dengan cara fraksinasi dari residu *n*-heksan difraksinasi kembali dengan menggunakan pelarut etil asetat sebanyak 75 ml sebagai pelarut semi polar dalam corong pisah. Fraksi yang dibagian atas adalah fraksi etil asetat, apabila masih terdapat residu yang tidak larut dalam etil asetat pada fraksinasi pertama maka residu dapat dilakukan fraksinasi kedua dengan pelarut dan volume pelarut yang sama yaitu etil asetat sebanyak 75 ml begitu seterusnya sampai fraksinasi yang ketiga. Hasil fraksinasi dipekatkan dengan alat *Rotary evaporator*.

7.3. Fraksinasi air ekstrak daun pletekan. Fraksinasi air ekstrak daun pletekan dibuat dengan cara mengambil hasil fraksinasi dari residu etil asetat. Kemudian didapatkanlah fraksi air. Hasil fraksinasi dipekatkan menggunakan *Waterbath*. Pembuatan fraksi dapat dilihat pada gambar 2.

8. Uji bebas etanol

Uji bebas etanol dilakukan untuk meyakinkan bahwa ekstrak daun pletekan sudah tidak mengandung etanol. Uji bebas etanol dilakukan dengan cara esterifikasi etanol, ekstrak ditambah asam asetat dan asam sulfat kemudian dipanaskan. Hasil uji bebas etanol dari ekstrak tersebut ditandai dengan tidak adanya bau ester yang khas dari etanol.

9. Pengujian kandungan senyawa kimia serbuk, dan ekstrak daun pletekan

9.1. Saponin. 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan air panas dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Reaksi positif apabila terbentuk buih yang mantap setinggi 1-10 cm, pada penambahan setetes asam klorida 2N buih tidak hilang (Depkes 1980).

9.2. Tanin. 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian dilarutkan dengan 10 ml air dipanaskan selama 15 menit di atas penangas air, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambah besi (III) klorida, diamkan beberapa saat. Reaksi positif jika terbentuk warna biru kehitaman atau hijau kehitaman (Depkes RI 1987).

9.3. Flavonoid. 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan aquadest dipanaskan selama 1 menit, diambil filtratnya. Filtrat ditambah larutan magnesium dan amil alkohol. Campuran dikocok kuat-kuat, kemudian dibiarkan memisah. Reaksi positif ditunjukkan dengan warna merah atau kuning atau jingga pada lapisan amil alkohol. (Depkes 1980).

9.4. Alkaloid. 0,5 gram sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan HCl 2N kemudian dipanaskan selama ± 2 menit, dinginkan dan disaring. Filtrat dibagi menjadi 3 bagian, tiap filtrat diberi pereaksi Mayer, Bouchardat dan Dragendorff (Depkes 1987).

9.5. Triterpenoid/steroid. Identifikasi Triterpenoid/Steroid dilakukan dengan cara sampel dilarutkan dalam 0,5 ml asam asetat anhidrida, lalu ditambah

0,5 ml kloroform, lalu dituang dalam tabung yang kering, melalui dinding tabung teteskan 1-2 ml asam sulfat dengan pipet (reaksi *Lieberman Burchard*). Steroid atau triterpenoid ditunjukkan dengan adanya batas kedua larutan cincin merah kecoklatan atau ungu, sedangkan larutan bagian atas menjadi hijau atau ungu. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru sampai hijau, terbentuknya warana merah sampai ungu menunjukkan positif terpenoid (Farnsworth 1966).

10. Sterilisasi

Media yang digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Alat-alat seperti gelas ukur dan beaker glass disterilkan dengan oven pada suhu 160°C-180°C selama 1-2 jam, sedangkan alat-alat seperti jarum ose disterilkan dengan pemakaian api langsung, dan inkas disterilisasi menggunakan formalin cair.

11. Pembuatan suspensi jamur *Candida albicans*

Candida albicans ATCC 10231 diambil dari suatu biakan murni sebanyak 2 ose, kemudian digoreskan pada media SGA kemudian diinkubasi 24-48 jam pada suhu 37°C. Hasil inkubasi digunakan sebagai stok jamur uji *Candida albicans* ATCC 10231. Biakan *Candida albicans* ATCC 10231 diambil 3 ose kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 ml SGC, campuran dikocok sampai homogen, kemudian diinkubasi sampai kekeruhan sesuai dengan standart dari Mc Farland 0,5 yang dianggap setara dengan $1-5 \times 10^6$ CFU/ml. Suspensi yang didapat diencerkan dengan perbandingan 1:100 pada sebuah tabung menggunakan SGC (CLSI 2002). Pengenceran dilakukan dengan mengambil 1 ml suspensi jamur kemudian dimasukkan kedalam media SGC sebanyak 100 ml. Pengenceran digunakan untuk metode dilusi, sedangkan pada metode difusi tidak perlu dilakukan pengenceran.

12. Identifikasi jamur *Candida albicans*

12.1. Identifikasi makroskopis. Identifikasi *Candida albicans* ATCC 10231 dilakukan pada media SGA (*Sabouraud Glucosa Agar*) yang di inokulasikan pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Hasil identifikasi makroskopis

pada media SGA terbentuk koloni-koloni lunak yang berwarna krem, dan berbentuk oval.

12.2. Identifikasi mikroskopis. Identifikasi mikroskopis dilakukan dengan metode *germ tube*, diambil 2 ose biakan murni *Candida albicans* ATCC 10231 pada media SGA kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi 0,5 ml serum dan diinkubasi selama 1-2 jam pada suhu 37°C. Sediaan tersebut diambil 1 tetes dan diletakkan pada *object glass*, kemudian diamati pada mikroskop. Hasil dikatakan positif apabila pada pemeriksaan secara mikroskopis ditemukan bentuk sel yang berkecambah (Indrayati & Reszki 2018)

12.3. Identifikasi fermentasi karbohidrat. Identifikasi dilakukan dengan cara diambil 1-2 ose koloni *Candida albicans* ATCC 10231 kemudian diinokulasikan ke dalam tabung yang masing-masing berisi *glucose*, *lactose*, *maltose* dan *sucrose broth* yang telah ditambahkan indikator *fenol red* 1% dan dimasukkan tabung durham dengan posisi terbalik, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam. Warna kuning pada medium menunjukkan terbentuknya asam pada reaksi fermentasi tersebut. Tabung durham digunakan untuk mengetahui pembentukan gas. Gas yang terbentuk akan tampak sebagai ruang kosong pada tabung durham, hasil identifikasi *Candida albicans* ATCC 10231 diambil berdasarkan reaksi fermentasi karbohidrat dan terbentuknya gas pada *glucose*, *maltose* dan *sucrose broth*. Tidak terjadi proses fermentasi pada *lactose broth* (Jawetz *et al.* 2007).

13. Pengujian aktivitas antijamur daun pletakan (*Ruellia tuberosa* L.)

13.1. Metode difusi. Metode difusi dilakukan untuk uji aktivitas antijamur pada ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat, dan air dari daun pletakan (*Ruellia tuberosa* L.) dengan dibuat masing-masing tiga konsentrasi yaitu 40%, 20% dan 10% menggunakan DMSO 5%. Jamur uji yang sudah disiapkan, kemudian diinokulasi merata pada media SGA 30 ml dengan menggunakan kapas lidi steril kemudian didiamkan selama 10 menit agar suspensi biakan terdifusi ke media. Ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air dari daun pletakan diambil 25 µl, kemudian diteteskan dalam cakram kosong yang telah disterilkan. Cakram dari semua konsentrasi kemudian diletakkan di atas media, sebagai

kontrol positif diletakkan pula cakram flukonazole dan sebagai kontrol negatif diletakkan pula cakram yang telah diteteskan DMSO 5% lalu diinkubasi suhu 37°C selama 24-48 jam kemudian dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat yang terbentuk. Diameter daya hambat terbesar dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksana, etil asetat dan air, dilanjutkan pengujian antijamur metode dilusi untuk fraksi teraktif yang memiliki diameter hambat paling besar. Skema kerja uji aktivitas antijamur daun pletekan terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 secara difusi dapat dilihat pada gambar 3.

13.2. Metode dilusi. Fraksi teraktif dilakukan dengan metode dilusi menggunakan 1 deretan tabung reaksi yang terdiri atas 11 tabung dengan pengembang interval pengenceran 2 kali. Konsentrasi yang diuji adalah 40, 20, 10, 5, 2,5; 1,25; 0,63; 0,32; 0,16% kontrol positif dan kontrol negatif. *Sabouraud Glucose cair* (SGC) yang digunakan dimasukkan pada tiap tabung sebanyak 0,5 ml kecuali tabung 1. Tabung 1 hanya diisi larutan fraksi teraktif sebanyak 1ml. Tabung 2 ditambah sediaan yang akan diperiksa, sebanyak 0,5 ml dari tabung 2 dipindahkan ke tabung 3, perlakuan yang sama juga dikerjakan untuk masing-masing tabung berikutnya sampai dengan tabung 10, kemudian 0,5 ml dari tabung 10 dibuang. Suspensi jamur 0,5 ml yang telah disesuaikan dengan kekeruhan standar Mc Farland 0,5 dianggap setara dengan $1-5 \times 10^6$ CFU/ml *Candida albicans* ATCC 10231. Suspensi yang didapat diencerkan dengan perbandingan 1:100 kemudian ditambahkan pada semua tabung kecuali tabung 1, tabung 1 sebagai kontrol negatif yang berisi larutan fraksi teraktif, sedangkan tabung 11 sebagai kontrol positif biakan. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) ditentukan dengan mengamati adanya kekeruhan pada seri pengenceran dari sejumlah tabung yang telah diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam, tabung dengan larutan jernih setelah tabung keruh terakhir merupakan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM). KHM tersebut kemudian dikultur ulang pada media agar tanpa penambahan mikroba uji ataupun senyawa antimikroba dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media agar yang menunjukkan tidak adanya pertumbuhan jamur setelah inkubasi ditetapkan sebagai Konsentrasi Bunuh Minimum (KBM) (Pratiwi 2008). . Skema

kerja uji aktivitas antijamur daun pletekan terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 secara dilusi dapat dilihat pada gambar 3.

14. Identifikasi golongan senyawa pada fraksi teraktif secara kromatografi lapis tipis

Pengujian Kromatografi Lapis Tipis (KLT) dilakukan pada fraksi teraktif dengan tujuan untuk mengetahui kemungkinan senyawa yang berperan dalam memberikan aktivitas antijamur. Pengujian meliputi identifikasi tanin, flavonoid, dan triterpenoid/steroid.

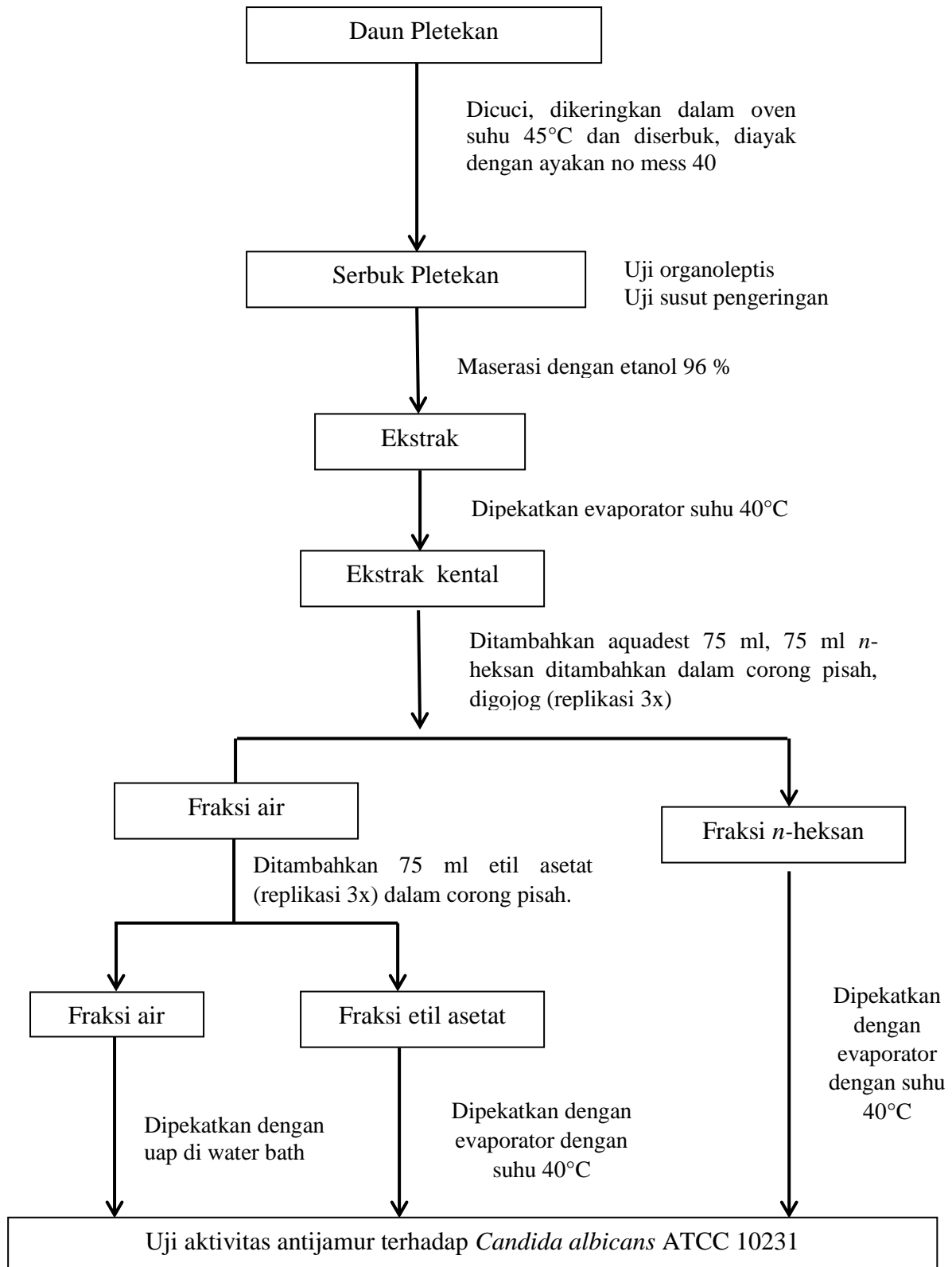
14.1. Identifikasi tanin. Identifikasi adanya senyawa tanin dilakukan menggunakan KLT, baku pembanding yang digunakan adalah asam galat. Fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak menggunakan *n*-butanol : asam asetat : air (3:1:1). Dideteksi dibawah sinar UV 366 nm berwarna hitam. Pereaksi semprot yang digunakan adalah FeCl₃ 1% (Harborne 2006).

14.2. Identifikasi flavonoid. Identifikasi senyawa flavonoid dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Baku pembanding yang digunakan adalah quersetin. Fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak *n*-butanol : asam asetat : air (4:5:1) dengan pereaksi semprot sitoborat. Pengamatan dengan UV 254 nm akan memberikan peredaman, UV 366 nm berfluorosensi biru, kuning ungu gelap dan berwarna kuning setelah diuapi amonia (Harborne 2006).

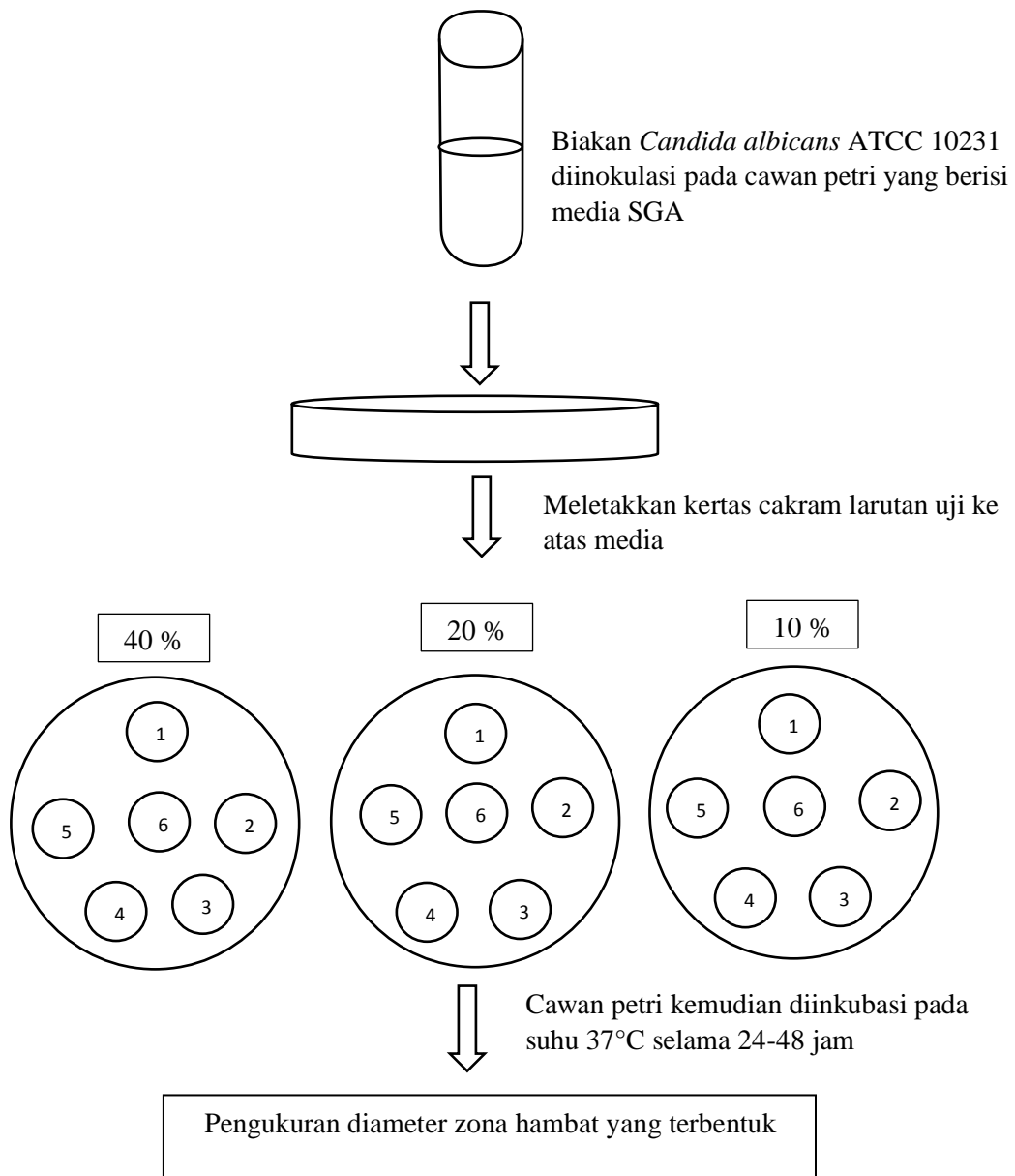
14.3. Triterpenoid/steroid. Identifikasi senyawa triterpenoid dengan menggunakan kromatografi lapis tipis. Baku pembanding yang digunakan adalah stigmasterol. Fase diam silika gel GF₂₅₄ diaktifkan pada suhu 105°C selama 3-5 menit. Fase gerak yang digunakan adalah *n*-heksana : etil asetat : (7:3). Simplisia dikatakan mengandung triterpenoid apabila ditambahkan dengan pereaksi *Lieberman Bourchardat* memberikan noda yang berwarna ungu atau biru dan beberapa senyawa berfluorosensi dibawa sinar UV 366 nm (Harborne 2006). Identifikasi senyawa steroid dengan menggunakan fase diam silika gel GF₂₅₄ dan fase gerak kloroform : metanol (9:1). Noda dapat terlihat dengan penyemprotan pada lempeng dengan pewarna noda *Lieberman Bourchardat* dan kemudian dipanaskan, steroid bebas ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah ungu atau ungu (Harborne 2006).

E. Analisa Data

Hasil uji aktivitas antijamur fraksi *n*-heksana, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun pletekan (*Ruellia tuberosa* L.) terhadap *Candida albicans* menggunakan metode difusi dinyatakan dengan nilai zona hambat yang terbentuk dan metode dilusi dinyatakan dengan konsentrasi terkecil suatu obat dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* ATCC 10231 dengan melihat kekeruhannya. Hasil data nilai zona hambat yang diperoleh pada metode difusi dianalisis menggunakan *Kolmogorov-Smirnov* untuk mengetahui apakah data sudah terdistribusi normal atau tidak. $P < 0,05$ maka data tidak terdistribusi normal, dan jika $P > 0,05$ maka data terdistribusi normal. Data yang terdistribusi normal dianalisis homogenitasnya dengan metode *Levene test*, jika data terdistribusi normal dan homogen maka data tersebut kemudian dianalisis dengan metode *two Way ANOVA* untuk mengetahui adanya perbedaan yang bermakna dan dilanjutkan uji *Post Hoc* untuk mengetahui pada kelompok mana terdapat perbedaan yang bermakna.



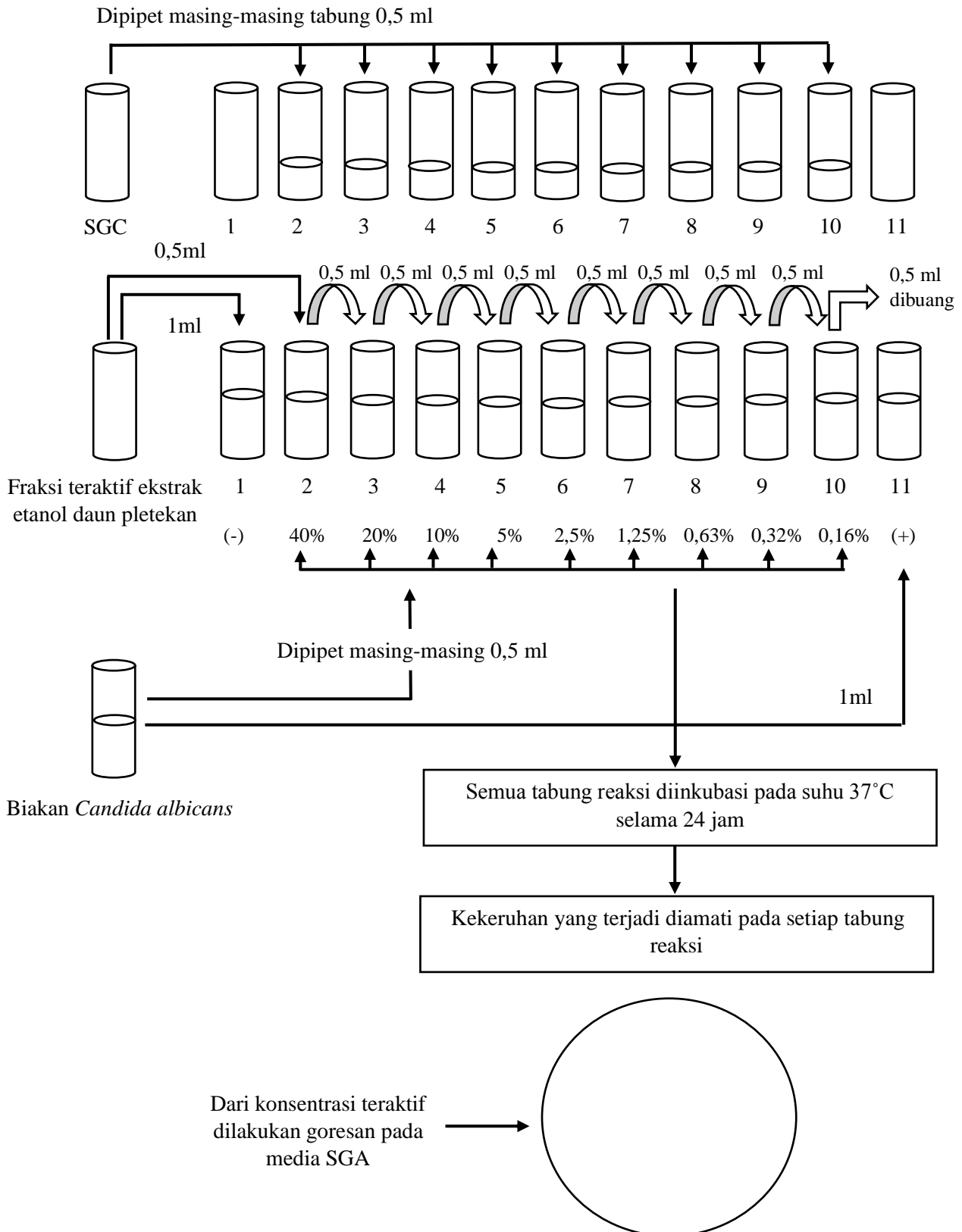
Gambar 2. Skema pembuatan fraksi *n*-heksan, etil asetat dan air dari daun pletekan



Keterangan :

1. Ekstrak (10%, 20%, 40%)
2. Fraksi *n*-heksana (10%, 20%, 40%)
3. Fraksi etil asetat (10%, 20%, 40%)
4. Fraksi air (10%, 20%, 40%)
5. Kontrol negatif (DMSO 5%)
6. Kontrol positif (flukonazole)

Gambar 3. Skema kerja uji aktivitas antijamur daun pletekan terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 secara difusi.



Keterangan: (+) : suspensi jamur
 (-) : fraksi teraktif (fraksi *n*-heksana)

Gambar 4. Skema kerja uji aktivitas antijamur daun pletekan terhadap *Candida albicans* ATCC 10231 secara dilusi.

