

UJI AKTIVITAS ANTIFUNGI KOMBINASI EKSTRAK KUNYIT (*Curcuma longa* Linn.) DAN BUAH ADAS (*Foeniculum vulgare* Mill.) TERHADAP *Candida albicans*



NUR FADHILAH
N011201095



PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024

UJI AKTIVITAS ANTIFUNGI KOMBINASI EKSTRAK KUNYIT (*Curcuma longa* Linn.) DAN BUAH ADAS (*Foeniculum vulgare* Mill.) TERHADAP *Candida albicans*

**NUR FADHILAH
N011201095**



**PROGRAM STUDI FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

UJI AKTIVITAS ANTIFUNGI KOMBINASI EKSTRAK KUNYIT (*Curcuma longa* Linn.) DAN BUAH ADAS (*Foeniculum vulgare* Mill.) TERHADAP *Candida albicans*

NUR FADHILAH
N011201095

Skripsi

sebagai salah satu syarat untuk mencapai gelar sarjana

Program Studi Farmasi

pada

**PROGRAM STUDI FARMASI
DEPARTEMEN FARMASI
FAKULTAS FARMASI
UNIVERSITAS HASANUDDIN
MAKASSAR
2024**

SKRIPSI

UJI AKTIVITAS ANTIFUNGI KOMBINASI EKSTRAK KUNYIT (*Curcuma longa* Linn.) DAN BUAH ADAS (*Foeniculum vulgare* Mill.) TERHADAP *Candida albicans*

NUR FADHILAH
N011201095

Skripsi,

telah dipertahankan di depan Panitia Ujian Sarjana Farmasi pada
4 Desember 2024 dan dinyatakan telah memenuhi syarat kelulusan
pada

Program Studi Farmasi
Departemen Farmasi Sains dan Teknologi
Fakultas Farmasi
Universitas Hasanuddin
Makassar

Mengesahkan:

Pembimbing Tugas Akhir



Nana Juniarti Natsir Djide,
S.Si., M.Si., Apt
NIP. 19900602 201504 2 002

Mengetahui

Ketua Program Studi,



Nurhasni Hasan, S.Si., M.Si.,
M.Pharm.Sc, Ph.D., Apt.
NIP. 19860116 201012 2 009

PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI DAN PELIMPAHAN HAK CIPTA

Dengan ini saya menyatakan bahwa, skripsi berjudul "Uji Aktivitas Antifungi Kombinasi Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa* Linn.) dan Buah Adas (*Foeniculum vulgare* Mill.) terhadap *Candida albicans*" adalah benar karya saya dengan arahan dari pembimbing (Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt.). Karya ilmiah ini belum diajukan dan tidak sedang diajukan dalam bentuk apapun kepada perguruan tinggi manapun. Sumber informasi yang berasal atau dikutip dari karya yang diterbitkan maupun tidak diterbitkan dari penulis lain telah disebutkan dalam teks dan dicantumkan dalam Daftar Pustaka skripsi ini. Apabila di kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan bahwa sebagian atau keseluruhan skripsi ini adalah karya orang lain, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut berdasarkan aturan yang berlaku.

Dengan ini saya melimpahkan hak cipta (hak ekonomis) dari karya tulis saya berupa skripsi ini kepada Universitas Hasanuddin.

Makassar, 5 Desember 2024



UCAPAN TERIMA KASIH

Alhamdulillah Rabbil 'Alamin, puji syukur penulis panjatkan kepada Allah Subhanahu wata'ala, atas segala rahmat, karunia dan nikmat-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Uji Aktivitas Antifungi Kombinasi Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa* Linn.) dan Buah Adas (*Foeniculum viulgare* Mill.) terhadap *Candida albicans*". Shalawat serta salam selalu tercurahkan pada junjungan Nabi Muhammad Shallallahu 'alaihi wassalam yang telah menuntun umat manusia dari zaman kebodohan menuju zaman penuh peradaban dan keberkahan.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini tidak mungkin dapat terselesaikan dengan baik tanpa adanya bantuan, arahan, dan bimbingan dari berbagai pihak. Oleh karena itu penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada ibu Nana Juniarti Natsir Djide, S.Si., M.Si., Apt. selaku pembimbing utama yang telah meluangkan waktu dan mencurahkan tenaganya dalam membimbing penulisan skripsi ini. Penulis juga mengucapkan terima kasih kepada Bapak Abdul Rahim, S.Si., M.Si., Ph.D., Apt. dan Bapak Aminullah, S.Si., M.Pharm.,Sc., Apt. selaku dosen penguji yang telah memberikan arahan, kritik, dan saran yang bermanfaat bagi penulis.

Terima kasih sebesar-besarnya kepada kedua orang tua dan nenek penulis, Ayahanda Anwar, Ibunda Sitti Sumrah, dan nenek tersayang Hj. Sakira yang telah memberikan dukungan moril maupun materil serta telah mendidik, mendampingi, dan senantiasa mengirimkan doa dan berkah pada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini. Penulis juga dengan tulus mengucapkan terima kasih kepada adinda Fajar, Arinil, Ahmad, Zahra, dan Hilmi yang selalu mendoakan, menghibur, meluangkan waktu dan tenaga, serta memberikan motivasi kepada penulis dalam menyelesaikan skripsi ini.

Tidak lupa pula, penulis ucapkan terima kasih banyak kepada Rahma, Muti'ah, Tobing, Novi, Zahra, Husnul, Ica, Nurhaq, Cece, Amel, Isti, Kak Lia, Kak Sri, dan kak Rifka selaku teman dan kakak seperjuangan yang telah memberikan bantuan baik secara langsung maupun tidak langsung dalam menyelesaikan penelitian ini. Kepada teman-teman Korps. Asisten Farmasetika dan teman-teman angkatan 2020 dan 2021 yang telah memberikan pengalaman berharga pada penulis selama masa kuliah. Serta terima kasih kepada seluruh pihak yang telah membantu penulis yang tidak bisa disebutkan satu persatu.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan masukan dan saran dari berbagai pihak yang bersifat membangun. Penulis juga berharap semoga hasil penelitian ini dapat bermanfaat untuk perkembangan ilmu pengetahuan dan masyarakat.

Penulis,

Nur Fadhilah

ABSTRAK

NUR FADHILAH. **Uji Aktivitas Antifungi Kombinasi Ekstrak Kunyit (*Curcuma longa* Linn.) dan Buah Adas (*Foeniculum viulgare* Mill.) terhadap *Candida albicans*** (dibimbing oleh Nana Juniarti Natsir Djide).

Latar belakang. *Candida albicans* merupakan penyebab utama kandidiasis dengan tingkat kematian dan kasus resistensi yang tinggi. Kunyit dan buah adas memiliki kandungan senyawa aktif yang bersifat antifungi, namun efek antifungi kombinasi kedua ekstrak ini belum diketahui. **Tujuan.** Untuk mengetahui efek antifungi kombinasi ekstrak kunyit dan buah adas dan kombinasi paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *C. albicans*. **Metode.** Ekstrak diperoleh dengan maserasi berbantu ultrasonik. Nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) ditentukan dengan metode mikrodilusi *checkerboard assay*. Klasifikasi *Fractional Inhibitory Concentration Index* (FICI) dianalisis menggunakan nilai KHM. Uji daya hambat menggunakan metode uji difusi cakram. **Hasil.** Nilai KHM ekstrak tunggal buah adas, ekstrak tunggal kunyit, dan ekstrak kombinasi berturut-turut adalah >5 mg/mL, 5 mg/mL, dan ≤0,3125 mg/mL dengan nilai FICI <0,125. Ekstrak tunggal buah adas tidak menunjukkan diameter zona hambat sedangkan ekstrak tunggal kunyit, kombinasi ekstrak buah adas dan kunyit 1:1, 1:2, dan 2:1 menunjukkan diameter zona hambat berturut-turut sebesar $10,20 \pm 1,35$, $10,08 \pm 1,04$, dan $9,11 \pm 1,66$ mm. **Kesimpulan.** Kombinasi ekstrak buah adas dan kunyit bersifat sinergis dengan konsentrasi kombinasi yang paling efektif dalam menghambat *C. albicans* secara signifikan ialah perbandingan 2:1 ($p < 0,05$).

Kata kunci: Antifungi; *Candida albicans*; kombinasi; sinergis; kunyit; buah adas

ABSTRACT

NUR FADHILAH. **Antifungal Activity Test of Combination of Turmeric Extract (*Curcuma longa* Linn.) and Fennel Fruit (*Foeniculum viulgare* Mill.) against *Candida albicans*** (supervised by Nana Juniarti Natsir Djide).

Background. *Candida albicans* is the main cause of candidiasis with high mortality and resistance cases. Turmeric and fennel fruit contain active compounds that are antifungal, but the antifungal effect of the combination of these two extracts is not yet determine. **Aim.** To determine the antifungal effect of a combination of turmeric and fennel fruit extracts and the most effective combination in inhibiting the growth of *C. albicans*. **Methods.** Extracts were obtained by Ultrasonic Assisted Maceration (UAM). Minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined using checkerboard assay microdilution method. Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) classification was analyzed using MIC values. Antimicrobial activity assay was carried out using disc diffusion test. **Results.** The MIC values of fennel fruit extract, turmeric extract, and combination extract were >5 mg/mL, 5 mg/mL, and ≤ 0.3125 mg/mL respectively, with FICI value < 0.125 . Fennel fruit extract did not show any activity while turmeric, the combination of fennel fruit extract and turmeric 1:1, 1:2, and 2:1 displayed antifungal activity with inhibition zone diameter of $10,20 \pm 1,35$, $10,08 \pm 1,04$ and $9,11 \pm 1,66$ mm respectively. **Conclusion.** The combination of fennel fruit and turmeric extracts showed a synergy effect against *C. albicans* significantly with the most effective combination concentration is the 2: 1 ratio ($p < 0.05$).

Keywords: Antifungal; *Candida albicans*; combination; synergistic; turmeric; fennel fruit

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
PERNYATAAN PENGAJUAN	ii
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN KEASLIAN SKRIPSI.....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH	v
ABSTRAK	vi
ABSTRACT.....	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
BAB I. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan dan Manfaat	2
BAB II. METODE PENELITIAN	3
2.1 Alat dan Bahan	3
2.2 Metode Penelitian	3
BAB III. HASIL DAN PEMBAHASAN	8
3.1 Hasil.....	8
3.2 Pembahasan.....	10
BAB IV. KESIMPULAN	16

4.1 Kesimpulan.....	16
4.2 Saran	16
DAFTAR PUSTAKA	17
LAMPIRAN	22

DAFTAR TABEL

Nomor urut	Halaman
1. Karakteristik kombinasi berdasarkan nilai FICI	6
2. Hasil ekstraksi sampel	8
3. Hasil uji bebas etanol ekstrak	8
4. Nilai KHM dan FICI	9
5. Diameter daya hambat.....	9
6. Komposisi medium <i>Potato Dextrose Agar</i> (Himedia®)	25
7. Komposisi medium <i>Potato Dextrose Broth</i> (Himedia®)	25
8. Hasil uji KHM ekstrak tunggal	26
9. Hasil uji KHM ekstrak kombinasi.....	26
10. Hasil uji normalitas <i>Saphiro-Wilk</i> dan homogenitas <i>Levene</i>	28
11. Hasil uji <i>Kruskal-Wallis</i>	28
12. Hasil uji <i>Mann-Whitney</i>	28

DAFTAR GAMBAR

Nomor urut	Halaman
1. Hasil uji KHM ekstrak tunggal dan ekstrak kombinasi	8
2. Hasil uji daya hambat (A) replikasi 1; (B) replikasi 2; (C) replikasi 3	9
3. Struktur kurkumin dan trans-anetol	13
4. Skema uji KHM ekstrak tunggal dan kombinasi ekstrak replikasi 1	23
5. Skema uji KHM kombinasi ekstrak replikasi 2 dan 3	23
6. Hasil uji penegasan KHM ekstrak tunggal dan kombinasi replikasi 1	27
7. Hasil uji penegasan KHM ekstrak kombinasi replikasi 2 dan 3	27
8. Sampel buah adas dan kunyit	29
9. Sampel halus	29
10. Ultrasonikasi sampel	29
11. Maserasi sampel	29
12. Penyaringan sampel	29
13. Penguapan pelarut dengan <i>rotary evaporator</i>	29
14. Hasil ekstraksi sampel	30
15. Uji bebas etanol	30
16. Pembuatan larutan uji	30
17. Uji KHM	30
18. Uji daya hambat	30
19. Pengukuran diameter zona hambat	30

DAFTAR LAMPIRAN

Nomor urut	Halaman
1. Skema kerja penelitian.....	22
2. Skema kerja penentuan nilai KHM ekstrak	23
3. Perhitungan persen rendemen	24
4. Perhitungan suspensi fungi.....	24
5. Perhitungan pembuatan larutan uji	24
6. Perhitungan nilai FICI	25
7. Komposisi Medium	25
8. Hasil pengujian KHM ekstrak tunggal dan kombinasi adas dan kunyit terhadap <i>Candida albicans</i>	26
9. Hasil penelitian	27
10. Hasil uji statistik	28
11. Dokumentasi	29
12. Surat determinasi tanaman.....	31
13. Daftar riwayat hidup	33

BAB I PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Candida albicans merupakan fungi komensal yang dapat bersifat patogen pada manusia. Fungi ini merupakan penyebab utama penyakit kandidiasis dengan tingkat kematian yang tinggi yaitu sekitar 750.000 kasus per tahun sehingga termasuk *critical priority group* dalam WHO *Fungal Priority Pathogens List* (Macias-Paz et al., 2023; WHO, 2022). Di Indonesia, prevalensi kandidiasis termasuk tinggi yaitu 25% karena Indonesia memiliki iklim tropis dengan tingkat kelembaban yang tinggi sehingga menjadi lingkungan yang baik untuk pertumbuhan fungi (Puspitasari et al., 2019). Antifungi yang paling banyak digunakan ialah flukonazol (Macias-Paz et al., 2023), namun, laporan CDC USA tahun 2019 menunjukkan terdapat lebih dari 1.700 kasus kematian setiap tahun yang disebabkan oleh *Candida spp.*, yang menunjukkan sifat resisten *Candida spp.*, terhadap antifungi (Bhattacharya et al., 2020). Oleh karena itu penemuan agen antifungi alternatif menjadi sangat penting seperti penggunaan bahan tanaman obat dengan toksisitas dan efek samping yang lebih sedikit dan kecil kemungkinan terjadinya resistensi (Gerald et al., 2022; Jeong et al., 2023).

Tanaman obat yang sering dimanfaatkan di Indonesia di antaranya kunyit (*Curcuma longa* Linn.) dan adas (*Foeniculum vulgare* Mill.). Kunyit diketahui mengandung senyawa yang bersifat antifungi seperti kurkumin, minyak atsiri, dan flavonoid (Nadifah et al., 2018). Berdasarkan hasil penelitian yang dilakukan oleh Mubarak et al., (2019), ekstrak etanol kunyit dengan konsentrasi 12,5%, 25%, 50%, 75%, dan 100% memiliki respon daya hambat sedang (6-10 mm) terhadap *C. albicans* dengan kandungan kurkumin yang ditemukan lebih banyak pada kunyit daripada rimpang lainnya (Yustinianus et al., 2019). Adapun buah adas memiliki kandungan senyawa seperti trans-anetol, estragol, fenkon, dan limonen yang dapat berfungsi sebagai antifungi (Belabdelli et al., 2020). Hasil penelitian oleh Roby et al., (2013) menunjukkan ekstrak etanol buah adas konsentrasi 20 µg/disc memiliki zona hambat 17 mm (potensi kuat) dengan KHM 10 µg/mL yang menunjukkan sensitivitas yang tinggi dalam penghambatan *C. albicans*.

Efek antifungi kombinasi dapat bersifat sinergis, aditif, indifferen, atau antagonis (Brooks et al., 2013). Efek sinergis memiliki keuntungan dapat bekerja pada beberapa target secara bersamaan, meningkatkan efektivitas farmakologis, mengurangi dosis ekstrak tunggal, dan meminimalkan efek samping sehingga memungkinkan pengembangan antifungi alternatif lebih lanjut (Jeong et al., 2023). Oleh karena itu, berdasarkan senyawa yang terkandung pada kunyit dan buah adas serta kemampuannya dalam memberikan efek antifungi, penelitian ini berfokus pada efek antifungi kombinasi ekstrak kunyit dan buah adas terhadap pertumbuhan *C. albicans*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang di atas, maka rumusan masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Bagaimana efek antifungi kombinasi ekstrak kunyit dan buah adas dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* menurut klasifikasi FICI?
2. Berapakah perbandingan konsentrasi kombinasi ekstrak kunyit dan buah adas yang paling efektif dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans*?

1.3 Tujuan dan Manfaat

Berdasarkan latar belakang di atas, maka tujuan dan manfaat dari penelitian ini adalah sebagai berikut.

1. Untuk mengetahui efek antifungi kombinasi ekstrak kunyit dan buah adas dalam menghambat pertumbuhan *Candida albicans* menurut klasifikasi FICI.
2. Untuk mengetahui perbandingan konsentrasi kombinasi ekstrak kunyit dan buah adas yang paling efektif dalam menghambat *Candida albicans*.

BAB II

METODE PENELITIAN

2.1 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf (*All American*®), batang pengaduk, *Bio Safety Cabinet* (*ThermoScientific*®), blender, bunsen, cawan petri, cawan porselen, corong, densitometer, *food dehydrator*, gelas Beaker, gelas ukur, inkubator (*Memmert*®), kompor listrik (*Oxone*®), *Laminar Air Flow* (*Labolytic*®), labu Erlenmeyer, labu ukur, mikropipet (*Dragonlab*®), plat mikrotiter 96 sumuran (*Labselect*®), ose, oven (*Memmert*®), pipet tetes, pisau, rak tabung, *rotary evaporator* (*Heidolph*®), sendok tanduk, tabung reaksi, timbangan analitik (*Acis*®), *ultrasonic bath* (*Rio*®), *vortex*, dan *waterbath*.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *aquadest*, *aquadest* steril, asam asetat anhidrat, asam sulfat, buah adas, *cotton swab* steril, DMSO, fungi *Candida albicans*, kertas saring, larutan standar McFarland 0,5, NaCl 0,9%, *paper disc*, rimpang kunyit, serbuk *Potato Dextrose Agar* (PDA), serbuk *Potato Dextrose Broth* (PDB), dan mikrotip.

2.2 Metode Penelitian

2.2.1 Pembuatan Ekstrak

2.2.1.1 Penyiapan Sampel

Sampel buah adas dan rimpang kunyit yang diperoleh dari kota Makassar dideterminasi terlebih dahulu di laboratorium Farmakognosi, Fakultas Farmasi, Universitas Hasanuddin. Sampel rimpang kunyit yang diperoleh kemudian dicuci bersih dan dilakukan sortasi basah, setelah itu dirajang hingga menjadi potongan kecil dan dikeringkan selama 2 hari. Sampel yang diperoleh dikeringkan lagi di oven selama 24 jam pada suhu 50°C dan disortasi kering kemudian dihaluskan dengan blender hingga menjadi serbuk dan diayak menggunakan ayakan 20 *mesh* (Muruges et al., 2019). Adapun sampel buah adas dikeringkan menggunakan *food dehydrator* pada suhu 30°C selama 24 jam kemudian digiling menjadi bubuk halus menggunakan blender dan diayak menggunakan ayakan 20 *mesh* (Suganda et al., 2023).

2.2.1.2 Ekstraksi

Masing-masing serbuk kunyit dan buah adas sebanyak 200 gram dibasahi dengan etanol 96% hingga 1000 mL (1:5 b/v), kemudian diekstraksi dengan *ultrasonic bath* selama 4 x 15 menit dengan interval waktu 10 menit. Kemudian, ekstrak dimaserasi selama 24 jam. Selanjutnya ekstrak disaring dengan kertas saring dibantu pompa vakum sehingga diperoleh filtrat dan dipekatkan dengan *rotary evaporator* dengan tekanan rendah pada suhu 40 - 50°C dengan kecepatan 80 rpm. Selanjutnya sisa

pelarut etanol diuapkan dengan *waterbath* hingga diperoleh ekstrak kental (Kunarto et al., 2019; Sandika, 2016).

2.2.1.3 Uji Bebas Etanol

Untuk mengetahui ada tidaknya sisa etanol yang terkandung dalam ekstrak, uji bebas etanol dilakukan dengan cara 1 g ekstrak kental dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 2 tetes asam sulfat dan 2 tetes asam asetat lalu dipanaskan. Ekstrak dikatakan bebas etanol bila tidak ada bau ester (Tivani et al., 2021).

2.2.2 Penyiapan Alat dan Bahan

2.2.2.1 Sterilisasi

Alat yang terbuat dari gelas yang tidak berskala dan tahan pemanasan dibungkus dengan kertas kemudian disterilkan dalam oven pada suhu 160-180°C selama 2 jam. Adapun alat yang berskala dan tidak tahan pemanasan seperti alat berbahan karet dan plastik disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit. Adapun ose dipijarkan dengan nyala api bunsen. Untuk wadah yang bermulut ditutup dengan menggunakan kapas yang telah dibalut dengan kain kasa (Andriani, 2016).

2.2.2.2 Pembuatan Media

Media *Potato Dextrose Agar* (PDA) ditimbang sebanyak 39 g dan dilarutkan dalam labu Erlenmeyer dengan *aquadest* hingga volume media satu liter atau dapat dikonversi sesuai volume media yang dibutuhkan. Media kemudian dipanaskan di tangas air hingga larut sempurna dan disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

Media *Potato Dextrose Broth* (PDB) ditimbang sebanyak 24 g dan dilarutkan dalam satu liter *aquadest* atau dapat dikonversi sesuai dengan volume media yang diinginkan. Media kemudian dipanaskan di tangas air hingga larut sempurna. Selanjutnya media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

2.2.2.3 Peremajaan Fungi

Fungi uji *Candida albicans* diambil sebanyak satu ose dari kultur persediaan, kemudian diinokulasikan dengan metode gores zig-zag di permukaan media PDA miring, kemudian diinkubasi 24 jam pada suhu 37°C.

2.2.2.4 Pembuatan Suspensi Fungi

Sebanyak satu ose biakan *Candida albicans* yang telah diremajakan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi NaCl 0,9% steril, kemudian dihomogenkan dengan *vortex* hingga kekeruhan setara dengan larutan McFarland 0,5 ($1,5 \times 10^8$

CFU/mL). Untuk uji mikrodilusi cair dibutuhkan densitas biakan $1,5 \times 10^7$ CFU/mL sehingga larutan diencerkan dengan mencuplik 500 μ L suspensi fungi $1,5 \times 10^8$ CFU/mL ke dalam tabung berisi 4,5 mL NaCl 0,9% steril.

2.2.2.5 Pembuatan Larutan Uji

Masing-masing larutan uji ekstrak kunyit dan ekstrak buah adas dibuat dalam tujuh seri konsentrasi yaitu konsentrasi 20%, 10%, 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, dan 0,3125%. Larutan uji 20% dibuat dengan menimbang 1 g ekstrak dan dilarutkan dengan DMSO 65% dalam labu ukur 5 mL. Untuk pengenceran, larutan konsentrasi awal dicuplik sesuai hasil perhitungan dan dicukupkan dengan DMSO 65% hingga volume 5 mL untuk memperoleh konsentrasi yang diinginkan. Untuk konsentrasi 10% dibuat dengan mencuplik 2,5 mL larutan konsentrasi 20%, untuk konsentrasi 5% dibuat dengan mencuplik 2,5 mL larutan konsentrasi 10%, untuk konsentrasi 2,5% dibuat dengan mencuplik 2,5 mL larutan konsentrasi 5%, untuk konsentrasi 1,25% dibuat dengan mencuplik 2,5 mL dari larutan konsentrasi 2,5%, untuk konsentrasi 0,625% dibuat dengan mencuplik 2,5 mL dari larutan konsentrasi 1,25%, dan untuk konsentrasi 0,3125% dibuat dengan mencuplik 2,5 mL dari larutan konsentrasi 0,625%.

Untuk uji daya hambat, kombinasi ekstrak buah adas dan kunyit (1:1) dibuat dengan mencampurkan ekstrak buah adas 10% sebanyak 100 μ L dan ekstrak kunyit 10% sebanyak 100 μ L dan dihomogenkan. Untuk kombinasi ekstrak buah adas dan kunyit (1:2) dibuat dengan mencampurkan ekstrak buah adas 20% sebanyak 50 μ L dan ekstrak kunyit 20% sebanyak 100 μ L, kemudian ditambahkan 50 μ L DMSO 65% dan dihomogenkan. Untuk kombinasi ekstrak buah adas dan kunyit (2:1) dibuat dengan mencampurkan ekstrak buah adas 20% sebanyak 100 μ L dan ekstrak kunyit 20% sebanyak 50 μ L, kemudian ditambahkan 50 μ L DMSO 65% dan dihomogenkan.

2.2.3 Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM)

Uji KHM dilakukan dengan metode mikrodilusi *Checkerboard assay* menggunakan plat mikrotiter 96 sumuran bentuk U steril yang terdiri dari 12 kolom (1-12) dan 8 baris (A-H). Penentuan KHM terdiri dari kontrol negatif (media PDB 200 μ L), kontrol pertumbuhan fungi (media 180 μ L dan suspensi fungi 20 μ L), kontrol pelarut (media 160 μ L, DMSO 65% 20 μ L, dan suspensi fungi 20 μ L), kontrol ekstrak, dan larutan uji. Pengujian dilakukan secara aseptis dan *triplo* dengan setiap sumuran berisi total 200 μ L.

Uji KHM ekstrak tunggal dilakukan dengan mencuplik 160 μ L media PDB ke dalam sumuran, kemudian dimasukkan 20 μ L dari masing-masing konsentrasi larutan uji (5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, dan 0,3125%) serta 20 μ L suspensi fungi dan dihomogenkan. Konsentrasi akhir larutan uji dalam sumuran adalah 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, dan 0,3125 mg/mL sedangkan densitas akhir biakan dalam sumuran ialah $1,5 \times 10^6$ CFU/mL. Untuk kontrol ekstrak berisi media 180 μ L dan ekstrak masing-masing konsentrasi 20 μ L.

Uji KHM ekstrak kombinasi dilakukan dengan mencuplik 160 μL media PDB ke dalam sumuran, kemudian dimasukkan 10 μL dari masing-masing konsentrasi larutan uji (10%, 5%, 2,5%, 1,25%, dan 0,625%) serta 20 μL suspensi fungi dan homogenkan. Konsentrasi akhir larutan uji dalam sumuran adalah 5 mg/mL, 2,5 mg/mL, 1,25 mg/mL, 0,625 mg/mL, dan 0,3125 mg/mL. Untuk kontrol ekstrak berisi media 180 μL dan ekstrak masing-masing konsentrasi 10 μL .

Plat mikrotiter kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 x 24 jam dan diamati kekeruhannya. Untuk sumuran yang sulit diamati kekeruhannya, dilanjutkan dengan uji penegasan.

2.2.4 Uji Penegasan

Uji penegasan dilakukan untuk memastikan kembali ada tidaknya pertumbuhan fungi pada sumuran yang sulit diamati kekeruhannya. Uji penegasan dilakukan dengan mencuplik 5 μL masing-masing konsentrasi larutan uji ke permukaan media PDA padat. Kemudian cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 x 24 jam dan diamati ada tidaknya pertumbuhan fungi.

2.2.5 Penentuan Nilai FICI

Nilai FICI (*Fractional Inhibitory Concentration Index*) adalah indeks yang dapat menunjukkan karakteristik dari kombinasi antimikroba. Nilai FICI dapat dihitung menggunakan rumus di bawah ini (Apridamayanti et al., 2020) dengan nilai A yaitu ekstrak buah adas dan B yaitu ekstrak kunyit.

$$\sum \text{FICI} = \frac{\text{KHM A dalam kombinasi}}{\text{KHM A tunggal}} + \frac{\text{KHM B dalam kombinasi}}{\text{KHM B tunggal}}$$

Interpretasi nilai FICI dikategorikan sebagai berikut:

Tabel 1. Karakteristik kombinasi berdasarkan nilai FICI (Brooks et al., 2013)

Nilai FICI	Karakteristik
$\leq 0,5$	Sinergis
$0,5 > x \leq 1$	Aditif
$1 > x \leq 4$	Indiferen
> 4	Antagonis

2.2.6 Uji Daya Hambat Ekstrak

Uji daya hambat kombinasi ekstrak kunyit dan buah adas dilakukan dengan metode difusi cakram menggunakan *paper disc* (diameter 6 mm) dan dilakukan sebanyak 3 replikasi. Larutan uji yang terdiri dari DMSO 65%, larutan uji buah adas 5%, larutan uji kunyit 5%, serta kombinasi ekstrak buah adas dan kunyit dengan perbandingan 1:1, 1:2, dan 2:1 dicuplik sebanyak 20 μL ke *paper disc* steril dan dibiarkan hingga mengering. Kemudian, media PDA dituang ke dalam cawan petri dan dibiarkan hingga memadat. Suspensi fungi ($1,5 \times 10^8$ CFU/mL) digoreskan pada media

menggunakan *cotton swab* steril. Selanjutnya, *paper disc* yang telah kering diletakkan pada permukaan media dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 x 24 jam. Zona hambat yang terbentuk kemudian diukur diameternya menggunakan jangka sorong.

2.2.7 Analisis Data, Pembahasan, dan Penarikan Kesimpulan

Data hasil penelitian penelitian berupa diameter daya hambat diolah menggunakan *software SPSS*. Uji normalitas *Saphiro-Wilk* dan homogenitas *Levene* dilakukan untuk melihat distribusi dan homogenitas data ($p > 0,05$). Selanjutnya dilakukan uji *Kruskal-Wallis* dan uji *Mann-Whitney* ($p < 0,05$) untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang bermakna antar kelompok perlakuan maupun terhadap kontrol yang ada (Sari et al., 2021). Setelah itu dilakukan pembahasan dan penarikan kesimpulan.