

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu & Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Januari sampai Mei 2025 di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi. Waktu yang digunakan peneliti untuk yaitu sejak tanggal dikeluarkan ijin penelitian dalam kurun waktu kurang lebih 4 bulan.

3.2 Alat & Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian adalah autoklaf (GEA), inkubator (Memmert), laminar air flow (Robust), lampu spirtus (Bunsen), cawan petri (pyrex), jarum ose (Rofa), water bath (Faithful), gelas ukur (pyrex), beaker glass (pyrex), pipet tetes (Onemed), tabung reaksi (pyrex), mortir (Onemed), stamper (Onemed), pH meter (Mquant), blender (Miyako), ayakan (ABM), erlenmeyer (pyrex) dan batang pengaduk (Alfa Omega).

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian adalah daun pacar air (*Impatiens balsamina* L.), PVP, titanium dioksida, minyak jarak, alkohol 96%, methyl paraben, Hcl 1%, Hcl 2N, H₂SO₄, asam asetat pekat, Hcl pekat, aquadest, PDA, dextrosa tween 80%, kloramfenikol dan jamur *Candida albicans*.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Teknik Pengambilan Bahan

Daun pacar air didapatkan di Desa Karanganyar Kecamatan Kedungbanteng, Kabupaten Tegal. Sampel berupa daun dari tanaman

pacar air (*Impatiens balsamina* L.) segar, tidak rusak dan diambil secara acak.

3.3.2 Persiapan Sampel

Dipilih daun pacar air (*Impatiens balsamina* L.) yang segar dan tidak rusak, kemudian dicuci hingga bersih. Setelah itu daun pacar air (*Impatiens balsamina* L.) dikeringkan di bawah sinar matahari kemudian dihancurkan menggunakan blender hingga menjadi serbuk.

3.3.3 Variabel Penelitian

1. Variabel bebas

Variabel bebas yaitu variabel yang memengaruhi variabel lain yang sifatnya berdiri sendiri (Sugiyono, 2020). Variabel bebasnya adalah konsentrasi ekstrak daun pacar air (*Impatiens balsamina* L.) (6,5%, 12,5%, dan 18,5%).

2. Variabel Terikat

Variabel terikat yaitu variabel yang dipengaruhi oleh variabel lain yang sifatnya tidak dapat berdiri sendiri (Sugiyono, 2020). Variabel terikatnya yaitu stabilitas fisik cat kuku yaitu uji organoleptis, uji homogenitas, uji pH, uji daya lekat, uji kesukaan dan uji stabilitas.

3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol yaitu variabel yang sengaja dikendalikan oleh peneliti sebagai usaha untuk meminimalisir pengaruh lain selain variabel bebas yang dikemungkinan mempengaruhi hasil variabel terikat (Sugiyono, 2020). Variabel terkontrolnya ada metode maserasi ekstrak

daun pacar air (*Impatiens balsamina* L.), cara pembuatan sediaan pewarna kuku, dan uji aktivitas antijamur.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Pacar Air

Sampel daun pacar air yang telah halus, diekstraksi dengan teknik maserasi menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Maserasi dilakukan selama 5 hari, kemudian ekstrak disaring dan diambil filtratnya. Setelah itu ekstrak diuapkan menggunakan waterbath hingga menghasilkan ekstrak kental. Ekstrak kental yang telah diperoleh dihitung rendemennya dengan rumus (Saad et al., 2018).

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak yang didapat (g)}}{\text{berat simplisia awal (g)}} \times 100\%$$

Setelah dilakukan pembuatan ekstrak dilanjutkan evaluasi parameter ekstrak, meliputi:

1. Uji Organoleptis

Uji organoleptik merupakan pengujian dengan menggunakan alat indra berupa mata, hidung, dan lidah untuk mengetahui karakteristik fisik dari suatu bahan yang diuji meliputi bau, bentuk, dan warna. Organoleptik bau dinyatakan “tidak berbau”, “praktis tidak berbau”, “bau khas lemah”, “bau khas” atau lainnya (FI edisi IV, 1995)

2. Uji Penetapan susut pengeringan

Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang dalam cawan yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit dan ditimbang.

Ratakan dengan menggoyangkan hingga merupakan lapisan setebal (5-10mm). Lalu, dikeringkan pada suhu penetapan hingga bobot tetap. Buka tutupnya dan biarkan cawan dalam desikator hingga suhu kamar. Kemudian dicatat bobot tetap yang diperoleh penetapan susut pengeringan yang baik adalah pada kadar kurang dari 10% (Pandapotan Marpaung & Septiyani, 2020). Persentase susut pengeringan dihitung dengan rumus:

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{berat sari air (g)}}{\text{berat ekstrak (g)}} \times 100\%$$

3. Penetapan kadar air

Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang dalam cawan yang telah ditara. Lalu dikeringkan pada suhu 45°C selama ± 24 jam di dalam oven. Kemudian masukan cawan dalam desikator hingga suhu kamar dan dicatat bobot tetap yang diperoleh penetapan kadar air yang baik pada ekstrak adalah tidak melebihi 10% (Pandapotan Marpaung & Septiyani, 2020). Rumus dalam menentukan penetapan kadar air yaitu:

$$\text{Kadar air} = \frac{A - B}{A} \times 100\%$$

Keterangan:

A : bobot sampel sebelum dipanaskan

B : bobot sampel setelah dipanaskan

4. Penetapan kadar abu total

Sebanyak 1 gram ekstrak ditimbang dan dimasukkan dalam krus silikat yang sebelumnya telah dipijarkan dan ditimbang. Kemudian ekstrak dipijar dengan menggunakan tanur secara perlahan-lahan

hingga arang habis. Kemudian dinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga bobot tetap, penetapan kadar abu total yang baik untuk ekstrak adalah tidak lebih dari 14% (Pandapotan Marpaung & Septiyani, 2020). Lalu dihitung kadar abu total yang dinyatakan dalam % (b/b) dalam rumus:

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{bobot abu (g)}}{\text{bobot ekstrak (g)}} \times 100\%$$

3.4.2 Uji Evaluasi Ekstrak Daun Pacar Air

a) Uji Organoleptis ekstrak

Uji organoleptis ekstrak bertujuan untuk mengetahui bentuk, bau dan warna dari ekstrak.

b) Uji Bebas Etanol

Uji bebas etanol dilakukan dengan menggunakan ekstrak kental yang ditambahkan 2 tetes H_2SO_4 dan 2 tetes asam asetat, setelah itu dipanaskan dan diamati baunya. Tujuan pengujian ini untuk memastikan ada atau tidaknya kandungan etanol dalam ekstrak sehingga didapatkan ekstrak murni. Ekstak dikatakan bebas etanol apabila tidak menimbulkan bau etil asetat (Lestariningsih *et al.*, 2020).

c) Uji Flavonoid

Uji senyawa flavonoid dilakukan dengan cara ekstrak daun pacar air ditambahkan etanol 96% 1 ml, HCl 2N 1 ml dan 10 tetes

HCl pekat. Uji positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga (Lestariningsih *et al.*, 2020).

3.4.3 Formulasi

Berikut merupakan tabel formulasi sediaan pewarna kuku alami dari ekstrak daun pacar air (*Impatiens balsamina* L.)

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan Pewarna Kuku Alami

Bahan	Jumlah (%)				Kegunaan
	(-)	FI	FII	FIII	
Ekstrak daun pacar air	6,5	6,5	12,5	18,5	Pewarna dan antijamur
PVP	15	15	15	15	Zat pelekat & pengkilap (02-15% Hermanto, 2019)
Aquadest	q.s	q.s	q.s	q.s	Pelarut PVP
Minyak Jarak	7	7	7	7	Zat Pelentur (5-12,5% Rowe, Sheskey, and Owen 2020)
Methyl Paraben	0,3	0,3	0,3	0,3	Pengawet (0,4% BPOM, 2019)
Titanium Dioksida	-	22	22	22	Zat Pengisi untuk Pewarnaan (25% BPOM, 2019)
Asam Sulfat Pekat	-	q.s	q.s	q.s	Pelarut Titanium Dioksid
Alkohol	ad 15mL	ad 15mL	ad 15mL	ad 15mL	Zat untuk memperbaiki viskositas

3.4.4 Pembuatan Sediaan Pewarna Kuku Alami

Tahap pembuatan diawali dengan menyiapkan alat dan bahan. Menimbang semua komponen bahan, selanjutnya memasukan polivinil polidon (PVP) ke dalam mortir dengan penambahan pelarut aquades, aduk sampai mengembang (campuran 1). Memasukan titanium dioksida kedalam mortir dilarutkan dengan menggunakan asam asetat pekat panas

aduk sampai larut kemudian tambahkan ekstrak daun pacar air aduk sampai homogen (campuran 2). Memasukkan campuran 1 kedalam campuran 2 aduk sampai homogen, kemudian ditambahkan dengan minyak jarak aduk sampai homogen, tambahkan methyl paraben aduk samaai homogen, tambahkan alkohol 96% aduk sampai homogen.

3.4.4 Uji Evaluasi Sediaan Pewarna Kuku Alami

a) Uji Organoleptis

Uji organoleptis dimaksudkan untuk melihat tampilan fisik suatu sediaan. Pemeriksaan meliputi bentuk, warna, dan bau sediaan. Sediaan dinyatakan stabil apabila bentuk, warna dan bau secara visual sama setelah selesai pembuatan dan berdasarkan pengamatan secara visual tidak adanya pertumbuhan jamur (FI IV, 1995).

b) Uji Homogenitas

Uji homogenitas adalah salah satu uji fisik sediaan yang penting dalam sediaan farmasetika, adanya uji homogenitas pada sediaan cat kuku yaitu untuk mengetahui apakah bahan-bahan dalam formulasi tersebut tercampur merata atau tidak (FI IV, 1995).

Menurut Depkes RI (2013), hasil pengamatan homogenitas dapat dilakukan dengan mengoleskan sediaan pada kaca, lalu diratakan, jika tidak ada butiran kasar maka sediaan dapat dikatakan homogen.

c) Uji pH

Uji pH bertujuan untuk mengetahui keamanan sediaan sehingga tidak mengiritasi kulit. Sediaan topikal harus memenuhi persyaratan, karena apabila pH terlalu basa akan berakibat kulit akan menjadi bersisik, sebaliknya jika pH terlalu asam dapat memicu terjadinya iritasi kulit. uji pH dilakukan dengan menggunakan pH universal yang dimasukkan ke dalam sampel. Sediaan topikal harus memenuhi persyaratan, standar pH normal kulit yaitu 4,5-6,5 (FI IV, 1995).

d) Uji Daya Lekat

Uji daya lekat bertujuan untuk mengetahui kekuatan melekatnya sediaan pada kuku. Tidak ada persyaratan khusus mengenai daya lekat pada sediaan semi padat, namun sebaiknya daya lekat sediaan semi padat adalah lebih dari 1 detik. Sebanyak 0,5 gram sediaan cat kuku diambil dan diletakkan pada kaca objek dan tutup dengan kaca objek lainnya. Kemudian diberikan beban 1 kg selama 5 menit, angkat beban dan pasang kaca objek pada alat uji daya lekat. Tambahkan beban 80 gram pada alat uji dan catat waktu pelepasan dari gelas objek (FI IV, 1995).

e) Uji Viskositas

Kekentalan suatu zat berhubungan dengan viskositas, dimana suatu besaran yang menyatakan tahanan dari cairan untuk mengalir. Semakin besar viskositas maka cairan akan sukar mengalir, hal ini

dapat mempengaruhi kemudahan cat kuku ketika akan di aplikasikan. Uji ini dilakukan menggunakan viskometer Brookfield dengan spindle nomor 4 dan kecepatan 60 rpm. Viskositas yang baik untuk sediaan topikal adalah 2.000-50.000 (FI IV, 1995).

f) Uji Kesukaan

Uji kesukaan ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kesukaan panelis terhadap sediaan cat kuku dari ekstrak daun Pacar Air (*Impatiens balsamina L.*) sebagai pewarna alami. Uji kesukaan dilakukan secara visual terhadap 30 orang panelis, setiap panelis diminta memberikan penilaian 1- 4 dimana angka 4 menunjukkan kriteria penilaian sangat suka, angka 3 suka, angka 2 kurang suka, dan angka 1 tidak suka. Penilaian dilakukan terhadap warna sediaan, aroma sediaan, homogenitas sediaan, dan kemudahan cat kuku ketika dihilangkan.

g) Uji stabilitas

Uji stabilitas dilakukan dengan metode cycling test. Satu siklus meliputi penyimpanan pada suhu 40° selama 24 jam dilanjutkan suhu 4° selama 24 jam. Percobaan ini dilakukan sebanyak enam siklus (FI IV, 1995).

h) Uji Waktu mengering

Uji waktu mengering dilakukan untuk mengetahui kemampuan mengering sediaan dengan mengamati waktu

mengering menggunakan stopwatch dari saat mulai dioleskannya suatu sediaan pada kaca hingga benar benar mengering. Waktu mengering sediaan cat kuku yang baik yaitu antara 10-15 m3nit (Megawati et al., 2022).

3.4.5 Uji Aktivitas Antijamur

a) Pembuatan media PDA (*Potato Dextrose Agar*)

3,9 gram media PDA instan dilarutkan dengan 100 mL aquadest diatas kompor. Kemudian media di sterilkan menggunakan autoklaf selama 20 menit dengan suhu 121°C tekanan 2 atm. Setelah proses sterilisasi selesai, media PDA dituangkan ke dalam cawan petri secara aseptis di dalam LAF (*Laminar Air Flow*) dan dibiarkan hingga memadat (Adfa et al., 2021).

b) Peremajaan isolat jamur *Candida albicans*

Media PDA yang sebelumnya ditambahkan kloramfenikol sebagai antijamur digunakan untuk proses peremajaan isolat jamur *Candida albicans*. Diambil isolat jamur pada botol isolat dengan jarum ose ukuran 0.5-1 cm. Isolat jamur dipindahkan dan diletakkan pada cawan petri yang berisi media PDA masih baru dan diinkubasi pada suhu ruang selama 7 hari (Sutanto, 2021).

c) Pembuatan Suspensi Spora Jamur *Candida albicans*

Koloni jamur *candida albicans* yang telah berumur 7 hari di dalam cawan petri berisi media PDA selanjutnya dibuat larutan suspensi sporanya. Pembuatan larutan suspensi spora dilakukan dengan cara

diberikan larutan tween 80% sebanyak 2 tetes pada permukaan koloni jamur yang bertujuan untuk membantu proses perontokan konidia. Miselium jamur kemudian ditambahkan 10 ml larutan aquades hingga permukaan koloni jamur terbanjiri. Kuas digunakan untuk proses pelepasan spora dengan cara digerus secara perlahan hingga spora tercabut dari permukaan media. Spora yang telah tercabut selanjutnya dipindahkan ke dalam tabung reaksi kemudian dikocok dengan vortex selama 1-3 menit hingga suspensi spora menjadi homogen (Sutanto, 2021).

d) Perhitungan Jumlah Spora

Uji aktivitas antijamur dilakukan dengan menggunakan metode difusi cakram . Metode ini dilakukan dengan cara media PDA yang masih cair dituangkan ke dalam cawan petri steril, kemudian 1 mL inokulum jamur uji *Candida albicans* dituang ke dalam cawan petri. Cawan petri digoyangkan dengan gerakan memutar secara perlahan, sehingga bahan jamur uji tercampur rata dalam media. Media didiamkan sampai memadat. Di atas medium PDA diletakkan kertas cakram steril yang telah direndam dengan sediaan cat kuku ekstrak daun pacar air dengan konsentrasi 6,5, 12,5%, dan 18,5,. Pada pengujian ini kontrol positif yang digunakan adalah ketokonazol dan untuk kontrol negatif menggunakan DMSO 5%. Kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Setelah 24 jam diamati ada tidaknya zona hambat disekitar kertas cakram. Adanya daerah zona bening di

sekeliling kertas cakram menunjukkan adanya aktivitas antijamur.

Zona hambat yang terbentuk diukur diameternya menggunakan jangka

sorong. Cara menghitung zona hambatnya yaitu:

$$\frac{(DV-DC) + (DH-DC)}{2}$$

Keterangan:

DV : Diameter Vertikal

DH : Diameter Horizintal

DC : Diameter Cakram

3.5 Analisis Data

Data persentase daya hambat pertumbuhan jamur dianalisis menggunakan uji *one way* ANOVA yang bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan signifikan antara pemberian ekstrak daun pacar air terhadap persentase daya hambat pertumbuhan jamur *candida albicans* (Adfa *et al.*, 2021).

