

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi adalah keseluruhan unit atau individu dalam ruang lingkup yang ingin diteliti. Populasi dalam penelitian ini adalah sediaan gel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) yang dibuat di laboratorium Teknologi Farmasi, Universitas Setia Budi.

2. Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sediaan gel ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) yang diambil secara acak.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) pada sediaan gel.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah mutu fisik sediaan gel ekstrak pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban).

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah aktivitas antijamur sediaan gel ekstrak pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) terhadap jamur *Candida albicans*.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sediaan gel ekstrak daun pegagan (*Centella asiatica*) dengan berbagai konsentrasi.

Variabel terikat karakteristik mutu fisik dan aktivitas anti jamur terhadap *Candida albicans*.

Variabel kendali adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat, sehingga kualifikasi harus ditentukan agar hasil yang diperoleh berbeda-beda dan tidak dapat terulang Kembali. Variabel kontrol dalam penelitian adalah kondisi laboratorium, jamur *Candida albicans*, cara pembuatan, suhu inkubasi, media yang digunakan, kondisi penelitian, waktu inkubasi.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, ekstrak Pegagan adalah ekstrak yang di dapat dari CV. Eternal Nature dengan kemurnian 98% dalam pelarut 1,2 Hexanediol 2%.

Kedua, formula sediaan setengah padat berbentuk gel yang dibuat dari ekstrak pegagan.

Ketiga, jamur uji dalam penelitian ini adalah *Candida albicans* yang diperoleh dari Laboratorium Uji Mikrobiologi, Jakarta Pusat.

Keempat, diameter zona hambat adalah zona atau area bening yang terbentuk pada sekitar lubang yang berisi sediaan gel ekstrak pegagan.

Kelima, evaluasi mutu fisik merupakan parameter yang digunakan untuk mengetahui stabilitas sediaan gel melalui uji organoleptik, homogenitas, daya sebar, daya lekat, *pH*, dan viskositas.

Keenam, metode uji aktivitas antijamur yang digunakan dalam penelitian adalah metode sumuran.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan digital, gelas ukur, tabung reaksi, kaca arloji, *beaker glass*, batang pengaduk, pot salep, alat uji daya sebar, mikropipet, *paper disk* (kertas cakram), jarum *ose*, bunsen, kasa, spuit, *pH* meter, viskometer, kertas perkamen, pinset, *cotton swab* steril, mikroskop, objek glass tabung durham, sarung tangan, lemari pendingin, oven, inkubator.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban), carbomer 940, TEA, sorbitol, menthol, natrium benzoate, *peppermint oil*, etanol 96%, jamur *Candida albicans*, flukonazol, SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*), kloroform, aquadestillata, NaCl, *meat extract*, pepton, *phenol red* 1%, glukosa, maltosa, laktosa, sukrosa.

D. Jalannya Penelitian

1. Penyiapan Sampel Ekstrak Daun Pegagan

Sesuai dengan *Certificate of Analysis* dan *Composition Sheet* dari Eternal Nature dengan item code C9012 dengan INCI Name *Centella Asiatica Extract*, 1,2-Hexanediol. Ekstrak pegagan yang digunakan dalam penelitian ini memiliki uji organoleptik meliputi bentuk, warna, bau, dan rasa. Identifikasi ini dilakukan untuk mengetahui sifat fisik dari ekstrak daun pegagan.

Berdasarkan hasil pengamatan dan data dari *Certificate of Analysis* dan *Composition Sheet* dari Eternal Nature (item code C9012), ekstrak ini mengandung *Centella Asiatica Extract* dengan

pelarut 1,2-Hexanediol, dan menunjukkan hasil organoleptik berupa cairan bening, berwarna tidak berwarna hingga kuning muda, memiliki bau khas pegagan, serta tidak berasa.

Centella asiatica extract secara bentuk cairan bening menunjukkan kestabilan ekstrak yang umum ditemukan dalam sediaan kosmetik cair. Hal ini didukung oleh laporan dari Typology (2024) dan Lotioncrafter (2024) yang menyebutkan bahwa ekstrak *Centella asiatica* berkualitas biasanya tampil sebagai cairan transparan hingga sedikit kekuningan. Warna kekuningan ini berasal dari senyawa bioaktif seperti *madecassoside* dan *asiaticoside* yang terlarut dalam medium pelarut.

2. Pembuatan Formula

Formula standar yang digunakan dalam penelitian ini dimodifikasi dari formula Ayuningtyas *et al.*, (2021), pada formula tersebut konsentrasi Carbomer 940 yang paling berpengaruh sifat fisiknya adalah Carbomer 940 0,6% menghasilkan sediaan gel dengan daya sebar yang paling baik, sedangkan Carbomer 940 1,8% menghasilkan sediaan gel dengan daya lekat yang paling lama.

Berdasarkan formula akan dibuat 4 formula sediaan gel ekstrak pegagan dengan carbomer 940 sebagai *gelling agent*. Konsentrasi carbomer 940 yang digunakan adalah 1,8%. Hal ini dimaksudkan untuk melihat pengaruh stabilitas sediaan gel ekstrak pegagan. Formula sediaan gel tersebut dibuat sebanyak 100 gr.

Tabel 1. Formula Modifikasi sediaan Gel Ekstrak Pegagan (Ayuningtyas *et al.*, 2021)

Bahan	F1	F2	F3	F4	Kegunaan
Ekstrak Pegagan	3%	6%	9%	-	Zat aktif
Carbomer 940	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%	<i>Gelling Agent</i>
Thriethanolamin	0,81%	0,81%	0,81%	0,81%	<i>Alkali Agent</i>
Sorbitol	20%	20%	20%	20%	<i>Humectan</i> dan pemanis
Menthol	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	Pengaroma
Natrium Benzoate	0,5%	0,5%	0,5%	0,5%	Pengawet
Peppermint oil	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	Pengaroma
Etanol 95%	3%	3%	3%	3%	Pelarut
Aquadest ad	100	100	100	100	pelarut

Cara pembuatan sediaan gel adalah sebagai berikut (Ayuningtyas *et al.*, 2021):

1. Larutkan *gelling agent* Carbomer 940 pada air tunggu beberapa saat hingga terdispersi, tambahkan triethanolamin lalu diaduk sampai terbentuk fase gel.

2. Menthol dilarutkan dalam etanol, natrium benzoate dilarutkan dengan air suling, ekstrak diencerkan dengan sorbitol dan larutan menthol yang sudah dilarutkan dengan etanol.
3. Ditambahkan disperse Carbomer 940 dan triethanolamine dan larutan natrium benzoate, aduk homogen, dan ditambahkan *peppermint oil*.

3. Evaluasi Mutu Fisik Sediaan Gel

Evaluasi mutu fisik meliputi hal-hal berikut:

3.1. Uji organoleptik. Sediaan gel ekstrak pegagan diperiksa secara visual untuk bau, warna, dan bentuk

3.2. Uji homogenitas. Sediaan gel yang akan diuji dioleskan pada sekeping kaca atau bahan lain yang cocok dan menunjukkan susunan yang homogen dan tidak terdapat butiran kasar.

3.3. Uji daya sebar. Timbang sediaan gel 0,5 gr, letakkan di atas benda kaca, lalu tambahkan beban 50 gr setiap 1 menit hingga total beban 200 gram, lalu ukur diameter yang terbentuk. Lakukan uji daya sebar sediaan gel sebanyak 3 kali.

3.4. Uji daya lekat. Sebanyak 0,1 gr sediaan dioleskan di atas objek glass yang sudah ditentukan luasnya (2x2 cm), di atas sediaan tersebut diletakkan objek glass yang lain dan ditindih dengan beban 1 kg selama 5 menit. Kemudian objek *glass* dipasang pada alat uji, seberat 80 gr dilepaskan dan dicatat waktunya hingga kedua objek *glass* tersebut lepas.

3.5. Uji pH. Siapkan sediaan yang akan diuji, celupkan elektroda pada sediaan yang akan diuji aduk perlahan dan tunggu hingga pembacaan stabil.

3.6. Uji viskositas. Pengukuran viskositas dengan viskometer Brookfield merupakan alat ukur viskositas yang menggunakan spin atau putaran untuk mengetahui nilai viskositas dari cairan yang ingin diketahui. Masukkan sediaan gel kedalam wadah tabung, pilih spindle nomor 7 dan pasang pada viskometer Brookfield. Tempatkan tabung dibawah viskometer, turunkan spindle kedalam sampel gel hingga mencapai batas yang ditandai, atur kecepatan putaran (40 RPM), nyalakan viskometer dan biarkan sampai menunjukkan pembacaan yang stabil.

4. Pembuatan Media SDA (*Sabouraud Dextrose Agar*)

Media SDA dilarutkan dalam erlenmeyer dengan aquadestillata. Dipanaskan diatas *hot plate* sambil diaduk hingga larutan homogen.

Media yang telah homogen kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Media dalam erlenmeyer disimpan di dalam *refrigerator* sebagai stok medium (Mozer, 2015).

5. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi digunakan untuk mensterilkan alat dan bahan agar tidak ada kontaminasi dengan mikroba asing saat dilakukan uji aktivitas antijamur. Sterilisasi menggunakan oven dan *autoclave*. Alat-alat gelas yang tidak memiliki presisi skala disterilkan menggunakan oven pada suhu 160°C selama 2 jam, sedangkan alat-alat gelas yang memiliki presisi, kapas, serta media disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dan tekanan 2 atm.

6. Peremajaan dan Pembuatan Suspensi Jamur *Candida albicans*

Peremajaan jamur dilakukan dengan cara mengambil indukan jamur *Candida albicans* dengan jarum *ose* yang sudah disterilkan, kemudian menginokulasi pada tabung media secara zig-zag, panaskan mulut tabung dan tutup menggunakan kapas. Inokulasi dilakukan pada suhu 32-35°C selama 48 jam. Setelah itu tambahkan 5 ml larutan NaCl 0,95% steril kedalam tabung dan disuspensikan (Zuniarto dan Tanujaya, 2019).

7. Identifikasi Jamur *Candida albicans*

7.1 Pengamatan Makroskopis . *Sabouraud's dextrose agar plate/SDA plate* direkomendasikan untuk sampel atau bahan klinis yang berasal dari kuku dan kulit. Media ini selektif untuk fungi dan *yeast* melihat pertumbuhan dan identifikasi *C. albicans* yang mempunyai pH asam/pH 5,6. Penambahan antibiotika membuat media ini lebih selektif yang bertujuan untuk menekan bakteri yang tumbuh bersama jamur di dalam bahan klinis. Pertumbuhan pada *SDA plate* terlihat jamur yang menunjukkan tipikal kumpulan mikroorganisme yang tampak seperti krim putih dan licin disertai bau khas/*yeast odour*.

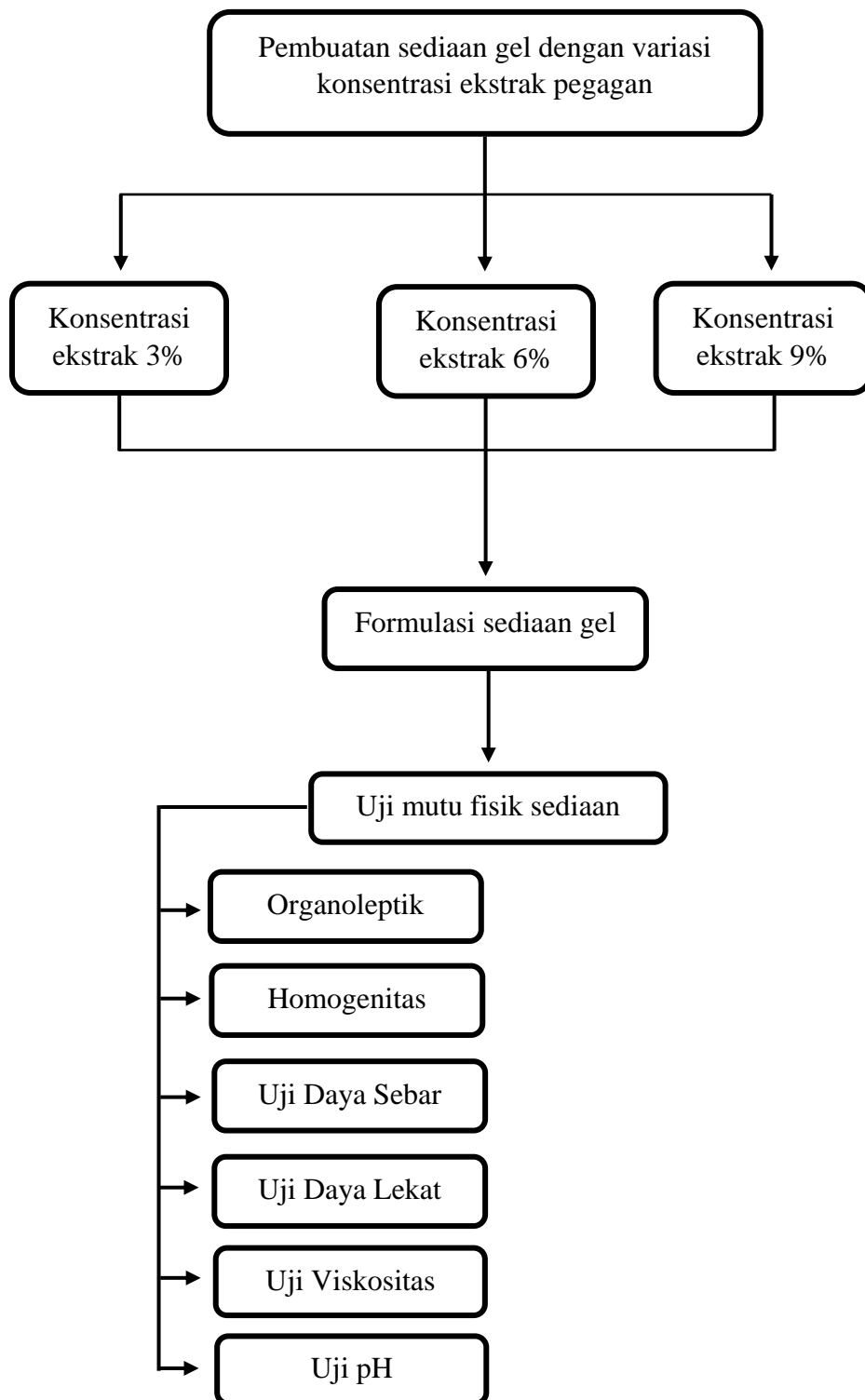
7.2 Pengamatan Mikroskopis. *Germinating blastospores/germ tube* terlihat berbentuk bulat lonjong seperti tabung memanjang dari *yeast cells* (*Reynolds-Braude phenomenon*) pada serum manusia yang ke dalamnya disuntikkan koloni yang diduga sebagai *strain* *Kandida* ke dalam tabung kecil dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 2-3 jam. *Germ tube* terbentuk dalam dua jam setelah proses inkubasi. Bagian ujung yang menempel pada *yeast cells* terlihat adanya pengerutan/pengecilan (tidak ada konstiksi).

7.3 Pengujian Gula-gula. Uji biokimiawi dilakukan dengan pemeriksaan asimilasi karbohidrat untuk konfirmasi spesies *Candida*. Larutkan *meet extract* dan pepton menggunakan aquadest. Siapkan tabung reaksi sebanyak 4 buah yang sebelumnya dimasukkan tabung durham, masukkan larutan yang sebelumnya dibuat. *Ose* jamur *Candida albicans* sebanyak 1 atau 2 *ose* masukkan dalam tabung reaksi aduk hingga jamur larut dalam cairan dan tetapkan *phenol red* 0,1 ml, dan inkubasi. Hasil reaksi positif mengindikasikan adanya pertumbuhan/ perubahan *pH* yang terjadi pada media yang diuji dengan memanfaatkan gula sebagai bahan dasar. Pemeriksaan ini membutuhkan waktu inkubasi selama 24-48 jam pada suhu 37°C. Hasil produksi berupa gas dibandingkan *pH* standar merupakan indikasi adanya proses fermentasi.

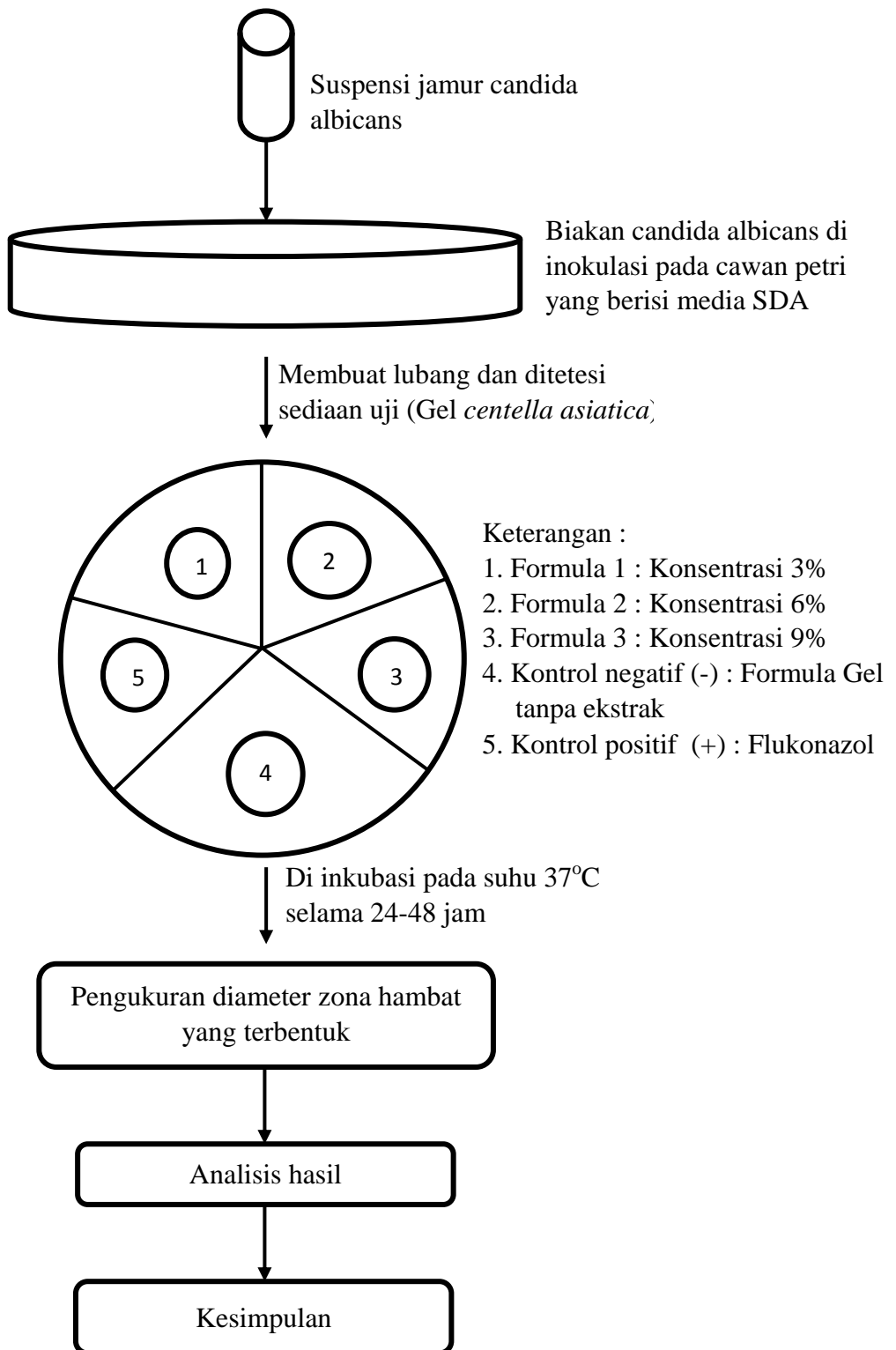
8. Pengujian Aktivitas Antijamur Metode Sumuran

Suspensi *Candida albicans* disiapkan dengan penyesuaian kekeruhan sesuai standar McFarland 0,5 dan disebarkan secara merata pada permukaan media *Sabouraud Dextrose Agar* (SDA) dalam cawan petri steril. Setelah media memadat, dibuat sumuran berdiameter sekitar 6 mm menggunakan alat pelubang steril. Pembuatan larutan uji sediaan ekstrak pegagan dengan menimbang sediaan gel sebanyak 0,5 gr, sediaan gel dilarutkan dengan larutan NaCl 0,9% steril sebanyak 0,1 ml. Masukkan sediaan gel yang sudah dilarutkan kedalam lubang sumuran untuk F1 dengan konsentrasi 3%, F2 dengan konsentrasi 6%, F3 dengan konsentrasi 9%, dan F4 dengan sediaan gel tanpa ekstrak pegagan (control negative). Pembuatan uji kontrol positif dengan larutan infus flukonazol 2 mg/ml dalam bentuk sediaan cair sebanyak 0,1 mL. Inkubasi pada suhu 35–37°C selama 24 hingga 48 jam. Zona hambat yang terbentuk di sekitar sumuran diukur dalam milimeter untuk menilai efektivitas antijamur dari sampel uji (Elshafie *et al.*, 2022).

E. Alur Penelitian



Gambar 10. Bagan pembuatan sediaan gel dan uji mutu fisik



Gambar 11. Alur pengukuran diameter zona hambat