

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi ialah seluruh objek yang menjadi subjek penelitian. Populasi yang akan dipergunakan pada penelitian ini ialah serum ekstrak etanol daun bidara (*Ziziphus nummularia*).

2. Sampel

Sampel ialah sebagian kecil dari populasi yang diambil pada penelitian, yang harus dipilih secara acak dan mewakili populasi secara keseluruhan. Pada penelitian ini, sampel yang hendak dipergunakan ialah daun bidara yang segar dan muda yang tersebar di daerah perkebunan di Tawangmangu, Jawa Tengah yang akan diformulasikan menjadi serum ekstrak etanol daun bidara yang mempunyai variasi konsentrasi HEC 0,5%, 1,5%, juga 2,5%.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel

Variabel utama adalah variabel yang terdiri dari variabel bebas, variabel terkendali serta variabel langsung. Variabel pokok pada penelitian ini ialah mutu fisik serta aktivitas pertumbuhan rambut sediaan serum gel ekstrak etanol daun bidara dengan variasi HEC sebagai *gelling agent*.

2. Klasifikasi variabel

Tiga jenis variabel utama tersusun atas variabel bebas, variabel terkendali, beserta variabel tergantung.

Variabel bebas ialah faktor yang sengaja diubah dalam rangka memahami dampaknya pada variabel tergantung. Dalam konteks penelitian ini, variabel bebas ialah variasi konsentrasi HEC yang digunakan menjadi *gelling agent* pada formulasi serum gel ekstrak etanol daun bidara.

Variabel terkendali ialah faktor-faktor yang memiliki potensi memberi pengaruh pada variabel tergantung dan perlu diatur atau dinetralisir supaya hasil penelitian dapat konsisten serta mampu direproduksi oleh peneliti lain. Dalam penelitian ini, variabel terkendali mencakup prosedur pembuatan serum gel ekstrak etanol daun bidara dan kondisi eksperimental.

Variabel tergantung merupakan fokus utama dalam penelitian dan melibatkan kriteria tertentu. Pada penelitian ini, variabel tergantung tersusun atas mutu fisik serta aktivitas pertumbuhan rambut pada serum gel ekstrak etanol daun bidara yang mempergunakan HEC sebagai gelling agent.

3. Definisi operasional variabel

Pertama, daun bidara ialah daun yang didapat dari tanaman daun Bidara (*Ziziphus nummularia*) yang memiliki ciri daun berbentuk bulat telur, daun bersih dari penyakit, dan diperoleh dari daerah di daerah perkebunan di Tawangmangu, Jawa Tengah

Kedua, ekstrak etanol daun bidara ialah hasil maserasi serbuk daun bidara dengan pelarut etanol 96% selama 3x24 jam kemudian disaring dan dipekatkan.

Ketiga, variasi HEC adalah variasi bahan *gelling agent* dan variasi konsentrasi 0,5% ; 1,5% ; 2,5%.

Keempat, uji mutu fisik sediaan serum gel ekstrak etanol daun bidara yakni melalui homogenitas, organoleptis, daya sebar, viskositas, *pH* juga stabilitas.

Kelima, kegiatan pertumbuhan rambut sediaan serum gel ialah aktivitas pertumbuhan rambut sediaan serum gel pada kelinci dengan produk pasaran selaku pembanding.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang dipergunakan pada penelitian ini yaitu peralatan ekstraksi serta uji identifikasi simplisia yang terdiri dari timbangan, blender, *oven*, ayakan mesh 40, kertas saring, kain flanel, corong, bejana gelap, *evaporator*, rak tabung reaksi, tabung reaksi, pipet, cawan porselen, kurs porselen dan spatula. Peralatan pembuatan serum seperti mortir, stemper, *beaker glass pyrex* 100 ml, *beaker glass pyrex* 250 ml, gelas ukur *pyrex* 10 ml, batang pengaduk, sudip, *magnetic stirrer*, timbangan analitik, *pH* meter, viskometer *brookfield* DV2T, alat uji daya sebar, alat uji daya lekat, beserta kaca arloji. Peralatan pemeliharaan kelinci, seperti kandang, wadah untuk pakan, juga wadah minum kelinci. Selain itu, juga termasuk peralatan umum seperti jangka sorong, pisau cukur, gunting, selotip bening, spidol, juga kamera.

2. Bahan

Bahan-bahan yang dipergunakan bagi pembuatan serum rambut ialah ekstrak daun bidara, *Hydroxy Ethyl Cellulose* (HEC), etanol 96%,

, etanol 70%, gliserin, DMDM Hydantoin, *Ethoxydiglycol*, Propilenglikol, aquadest, HCI pekat, pereaksi dragendorff, FeCl₃ 1% , krim *veet*, magnesium stearat.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman bidara

Maksud dari determinasi tanaman bahan uji yakni guna memverifikasi keakuratan identifikasi bahan yang dipergunakan pada penelitian. Proses determinasi ini melibatkan perbandingan ciri-ciri morfologi tanaman dengan informasi referensi yang terdapat pada literatur. Determinasi daun bidara (*Ziziphus nummularia*) dalam penelitian ini akan dilakukan di UPT Laboratorium Universitas Setia Budi, Surakarta.

2. Pengambilan dan pemilihan sampel

Pengambilan bahan daun bidara dilakukan di daerah perkebunan Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun diambil dari tanaman yang berusia 3-4 tahun. Daun yang diambil memiliki warna hijau tua serta terletak di posisi ketiga hingga keempat dari pucuk tanaman.

3. Pembuatan serbuk simplisia

Daun bidara yang sebelumnya didapatkan dari daerah perkebunan tawangmangu selanjutnya dilakukan pengeringan dengan cara dipanaskan dibawah sinar matahari hingga kering. Simplisia kering kemudian digiling dengan grinder ataupun blender, kemudian hasil gilingan diayak dengan ayakan 40 mesh.

4. Identifikasi serbuk daun bidara

4.1 Pengujian organoleptik serbuk daun bidara. Pemeriksaan organoleptis serbuk daun bidara dilangsungkan melalui mengamati dari segi bentuk, bau, warna, juga rasa serbuk daun bidara.

4.2 Penetapan susut pengeringan serbuk simplisia. Penentuan susut pengeringan dengan metode gravimetri, 2 gram serbuk dimasukkan ke dalam wadah yang sebelumnya sudah ditimbang. Setelah itu, serbuk dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam serta diukur bobotnya. Proses pengeringan dan pengukuran berlanjut setiap 1 jam hingga mencapai bobot yang konstan (Depkes, 2000).

5. Pembuatan ekstrak

Proses ekstraksi dimulai dengan pengambilan daun bidara yang sudah diserbuk serta diayak, yang kemudian ditimbang lalu dimasukkan

ke dalam bejana maserasi. Pelarut etanol 96% ditambahkan ke dalam bejana dengan perbandingan 1:10 terhadap berat daun. Campuran tersebut dibiarkan selama 24 jam di tempat yang terhindar dari sinar matahari langsung sambil diaduk secara berkala. Sesudah 24 jam, campuran disaring menggunakan kain flanel untuk memisahkan cairan ekstraksi dari ampas. Ampas yang tersisa lalu dicuci mempergunakan etanol 96% sebanyak 2,5 liter atau setengah bagian dari jumlah pelarut awal, dan kemudian disaring kembali menggunakan kain flanel. Maserasi dikumpulkan dalam bejana, ditutup, lalu dibiarkan selama 24 jam di tempat yang sejuk serta terlindung dari cahaya. Filtrat yang terkumpul dipisahkan dari endapan, lalu filtrat tersebut dikumpulkan. Selanjutnya, filtrat dikonsentrasikan dengan mempergunakan rotary evaporator di suhu 60°C, serta diuapkan mempergunakan water bath sampai didapat ekstrak yang kental.

6. Identifikasi ekstrak daun bidara

6.1 Pengujian organoleptik ekstrak daun bidara. Pemeriksaan organoleptis ekstrak daun bidara dilangsungkan melalui mengamati dari segi warna, bau, bentuk, juga rasa ekstrak daun bidara.

6.2 Penetapan kadar air ekstrak daun bidara. Penentuan kadar air ekstrak dilangsungkan melalui metode gravimetri, 10 gram ekstrak dimasukkan ke dalam wadah yang sudah ditimbang sebelumnya. Selanjutnya, ekstrak dikeringkan di suhu 105°C selama 5 jam lalu diukur bobotnya. Proses pengeringan beserta pengukuran dilanjutkan setiap 1 jam hingga mencapai bobot yang konstan (Depkes, 2000).

6.3 Penetapan rendemen ekstrak. Penetapan persen rendemen guna mencari tahu persentase ekstrak yang didapat dari proses ekstraksi, rumus menghitung rendemen :

$$\% \text{ Rendemen} : \frac{\text{□□□□□ □□□□□□□}}{\text{□□□□□ □□□□□□}} \times 100\%$$

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia ekstrak

7.1 Identifikasi senyawa flavonoid. Sebanyak 0,5 mL ekstrak dicampurkan dengan 0,5 g serbuk Magnesium lalu ditambahkan 5 mL HCl pekat. Pada saat penambahan HCl pekat, sampel berubah warna menjadi merah atau kuning dengan adanya busa yang muncul, menandakan bahwa ekstrak tersebut mengandung flavonoid (Putriana, 2018).

7.2 Identifikasi senyawa alkaloid. Sejumlah 5 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 2 mL HCl pekat, kemudian tambahkan 1 mL larutan Dragendorff. Perubahan warna

larutan menjadi merah atau jingga menandakan keberadaan senyawa alkaloid (Usman & Adi, 2017).

7.3 Identifikasi senyawa saponin. 0,5 g sampel diambil dan dicampur dengan 10 mL aquadestilata, kemudian dipanaskan. Setelah didinginkan, campuran dikocok selama 10 menit. Terbentuknya busa yang stabil dianggap sebagai tanda positif keberadaan saponin.(Harborne, 2006).

7.4 Identifikasi steroid dan triterpenoid. Uji triterpenoid dilangsungkan melalui cara menguapkan 2 ml larutan sampel pada cawan penguap. Residu yang dihasilkan kemudian dilarutkan dengan 0,5 ml kloroform. Selanjutnya, ke dalam larutan tersebut ditambahkan 0,5 ml asam asetat anhidrat serta 2 ml asam sulfat pekat secara perlahan-lahan melewati dinding tabung. Terciptanya cincin berwarna ungu atau kecoklatan pada perbatasan larutan mengindikasikan keberadaan triterpenoid, sementara munculnya cincin berwarna hijau kebiruan mengindikasikan adanya senyawa steroid (Ciulei, 1984).

7.5 Identifikasi senyawa tanin. Sejumlah 2 g sampel dicampur dengan etanol hingga sampel tertutup oleh pelarut. Setelah itu, 1 mL larutan sampel ditambahkan ke dalam tabung reaksi serta dicampurkan dengan dua hingga tiga tetes larutan FeCl_3 1%. Hasil positif akan diindikasikan oleh terbentuknya warna kehijauan atau hitam kebiruan (Harborne, 2006).

8. Formula serum gel rambut

Tabel 1. Rancangan formula serum gel ekstrak etanol daun bidara

Bahan	Formula (%)			
	K-	F1	F2	F3
Ekstrak Daun Bidara	-	6	6	6
HEC	1,5	0,5	1,5	2,5
Gliserin	5	5	5	5
Propilen Glikol	5	5	5	5
DMDM Hydantoin	0,3	0,3	0,3	0,3
Ethoxydiglycol	2	2	2	2
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Keterangan :

K- : sediaan serum gel tanpa Ekstrak Etanol Daun Bidara

F1 : sediaan serum gel dengan konsentrasi HEC 0,5%

F2 : sediaan serum gel dengan konsentrasi HEC 1,5%

F3 : sediaan serum gel dengan konsentrasi HEC 2,5%

9. Pembuatan sediaan serum gel rambut

Persiapkan peralatan dan bahan yang diperlukan, kemudian timbang setiap bahan. Lakukan kalibrasi pada botol berukuran 100 ml.

Lakukan pengembangan Hydroxyethyl Cellulose (HEC) sebanyak 0,5 gram dalam 15 ml aquadest pada suhu 50°C dengan mempergunakan *magnetic stirrer* hingga membentuk massa gel. Setelah itu, tambahkan *ethoxydiglycol* sebanyak 2 ml, aduk sampai homogen. Tambahkan gliserin sejumlah 5 ml lalu aduk hingga homogen. Siapkan *beaker glass* tambahan, lalu masukkan ekstrak etanol daun bidara dengan konsentrasi 6%, dan tambahkan propilenglikol sebanyak 5 ml, aduk hingga ekstrak larut. Campurkan ekstrak daun bidara ke dalam masing-masing formulasi basis yang telah disiapkan, dan giling hingga homogen. Tambahkan DMDM hydantoin sebanyak 0,3 gram, aduk hingga homogen. Selanjutnya, tambahkan aquades hingga mencapai volume 100 mL, dan aduk hingga homogen. Transfer campuran ke dalam botol serum yang sudah disiapkan.

10. Evaluasi mutu fisik sediaan serum gel rambut

10.1 Pengujian organoleptik. Pengamatan organoleptik termasuk warna, bentuk, rasa dan bau dilakukan secara visual pada sediaan serum.

10.2 Pengujian homogenitas. Dilangsungkan melalui pengolesan sampel serum pada kaca arloji atau bahan transparan lain yang cocok (Ditjen POM. 1985).

10.3 Pengujian pH serum. Dilakukan kalibrasi pH meter pada pH 4-6 dan pH meter dicelupkan kedalam sediaan. pH yang tertera dicatat. Syarat pH sediaan serum rambut sesuai dengan pH kulit kepala, yakni sekitar pH 4,5-6,5.

10.4 Pengujian viskositas serum. Dilakukan pengukuran viskositas menggunakan alat *Viscometer Brookfield*. Sampel dimasukkan di wadah lalu spindel di pasang ke alat ukur *Viscometer Brookfield*, hidupkan rotor dan hasilnya dicatat. (Naiu dan Yusuf, 2018).

10.5 Pengujian daya sebar serum. Sampel sejumlah 0,5 g ditempatkan di atas kaca arloji serta diamati dengan stopwatch selama 1 menit. Diameter sebar sampel diukur. Berikutnya, tambahkan beban sebesar 100 g, 150 g, dan 200 g, lalu biarkan diam selama 1 menit sebelum mengukur diameter yang konstan (Warnida et al., 2016).

10.6 Pengujian daya lekat serum. Sejumlah 0,5 gram serum dioleskan pada pelat kaca dan diberi beban 1 kg selama 5 menit. Angkat beban lalu lepaskan kedua pelat kaca yang terpasang, dan catat waktu yang diperlukan guna memisahkan pelat tersebut. Kriteria daya lekat

sediaan topikal yang baik yakni lebih dari 1 detik (Tambunan & Sulaiman, 2018).

10.7 Pengujian stabilitas serum. Salah satu metode pengujian stabilitas fisik ialah *cycling test*, yakni mempercepat evaluasi kestabilan sediaan pada penyimpanan suhu ekstrim selama beberapa periode. Pengujian ini dilaksanakan sejumlah 6 siklus sepanjang 12 hari. 24 jam pertama sediaan serum disimpan pada suhu rendah $\pm 4^{\circ}\text{C}$ lalu dipindahkan selama 24 jam pada tinggi suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$. Perlakuan ini ialah satu siklus serta diulangi hingga 3 siklus (Tampoliu *et al.*, 2021)

E. Uji Aktivitas Pertumbuhan Rambut

1. Perlakuan hewan uji

Pada pengujian ini dipergunakan 4 kelinci dan diadaptasikan selama 7 hari, pada hari ke-8 dilaksanakan pemotongan bulu. Selama pengujian hewan uji diberi makan dan minum secukupnya.

Punggung kelinci dicukur secara menyeluruh, lalu diolesi dengan krim *Veet* untuk menghilangkan rambut halus yang mungkin masih tersisa. Selanjutnya, punggung kelinci dibagi menjadi enam bagian dengan bentuk segi empat berukuran 2x2 cm dan jarak antara setiap daerah adalah 1 cm. Sebelum pengukuran serta sebelum pengolesan zat uji, punggung kelinci yang sudah dibagi-bagi tersebut diberi lapisan etanol 70% sebagai tindakan antiseptik.

2. Pengujian aktivitas sediaan serum gel rambut

Metode yang dipergunakan guna uji pertumbuhan rambut (Tanaka *et al.*, 1980) hewan uji yang telah diadaptasikan dicukur bulunya dan ditetesi sediaan serum yang telah dibuat 1 kali sehari dengan volume 1 mL pada tiap bagian. Hari pertama pengolesan dianggap hari ke-1. Pemberian serum dilaksanakan selama 21 hari. Tiap hewan uji mendapatkan semua perlakuan antara lain:

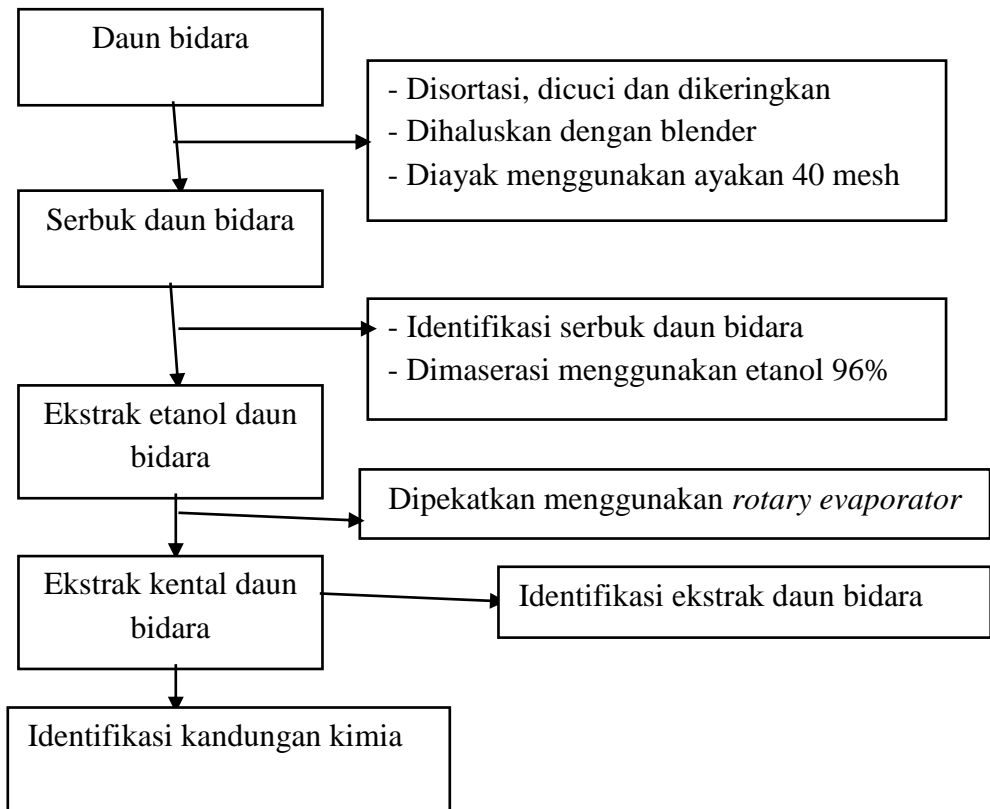
- Daerah I : tanpa perlakuan
- Daerah II : diolesi serum rambut F1
- Daerah III : diolesi serum rambut F2
- Daerah IV : diolesi serum rambut F3
- Daerah V : diolesi kontrol negatif
- Daerah VI : diolesi kontrol positif (Sediaan Kirkland)

Kelinci 2, 3 dan 4 mendapatkan pengolesan yang berbeda pada setiap bagian secara memutar (Gambar 7). Pengamatan dilangsungkan do hari ke-7, 14, dan 21 pada panjang bulu kelinci. Sebelum diukur, rambut kelinci dicabut sejumlah 10 helai yang paling panjang lalu diletakkan pada kertas hitam. Agar pengukuran lebih mudah dilakukan, rambut kelinci ditempel pada selotip bening, lalu panjangnya diukur menggunakan jangka sorong.

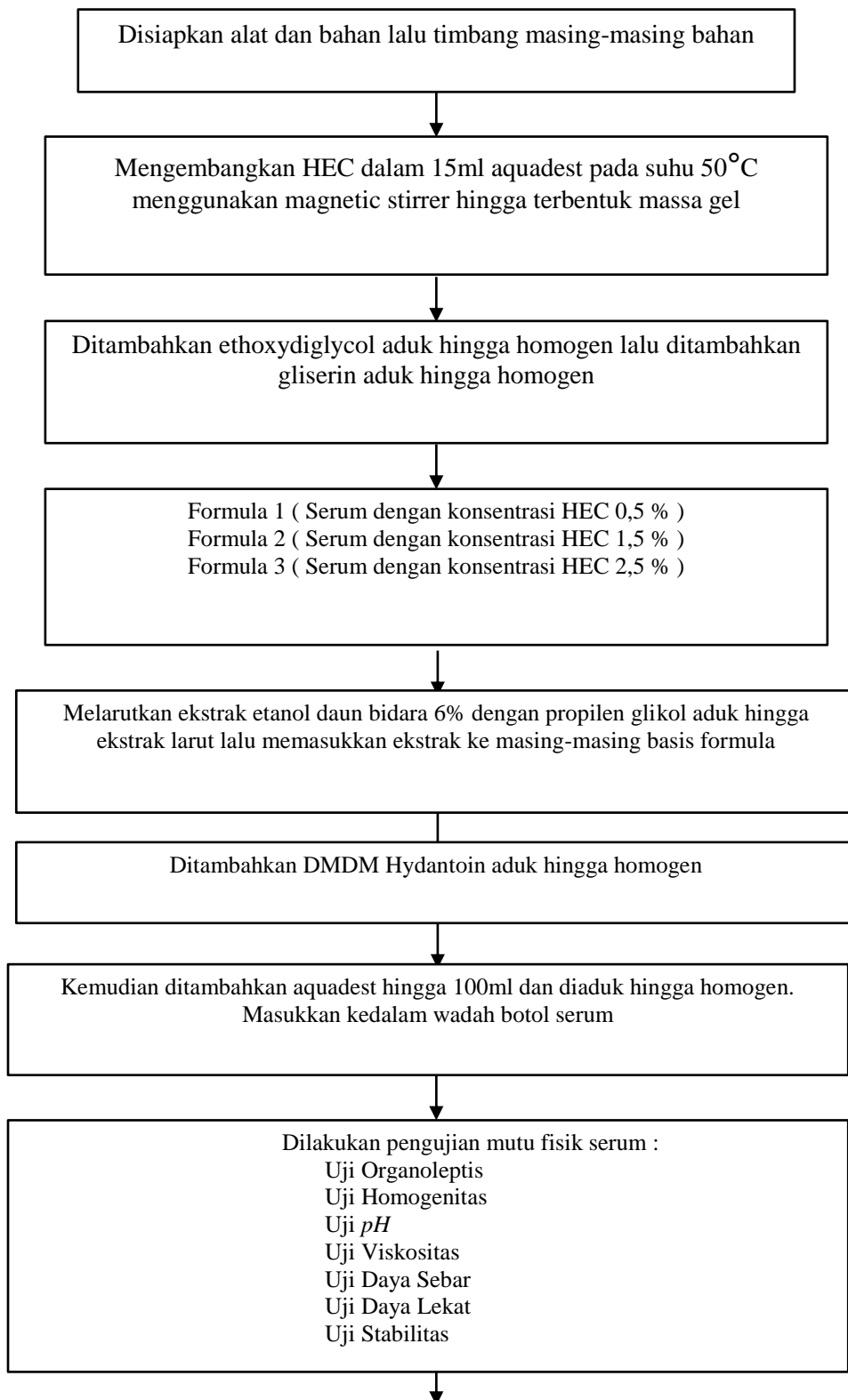
F. Analisis Hasil

Data mengenai mutu fisik sediaan dievaluasi melalui serangkaian uji, termasuk aspek organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan stabilitas serum penumbuh rambut. Analisis statistik menggunakan pendekatan *One Way* Anova dan uji lanjutan dengan metode *Tukey*. Sementara itu, data potensi serum rambut ekstrak daun bidara terhadap panjang bulu kelinci dianalisis dengan mengaplikasikan uji statistik seperti *Shapiro-Wilk* dan *Levene* untuk menguji homogenitas, diikuti oleh uji ANOVA dan uji lanjutan dengan metode *Post Hoc Duncan*.

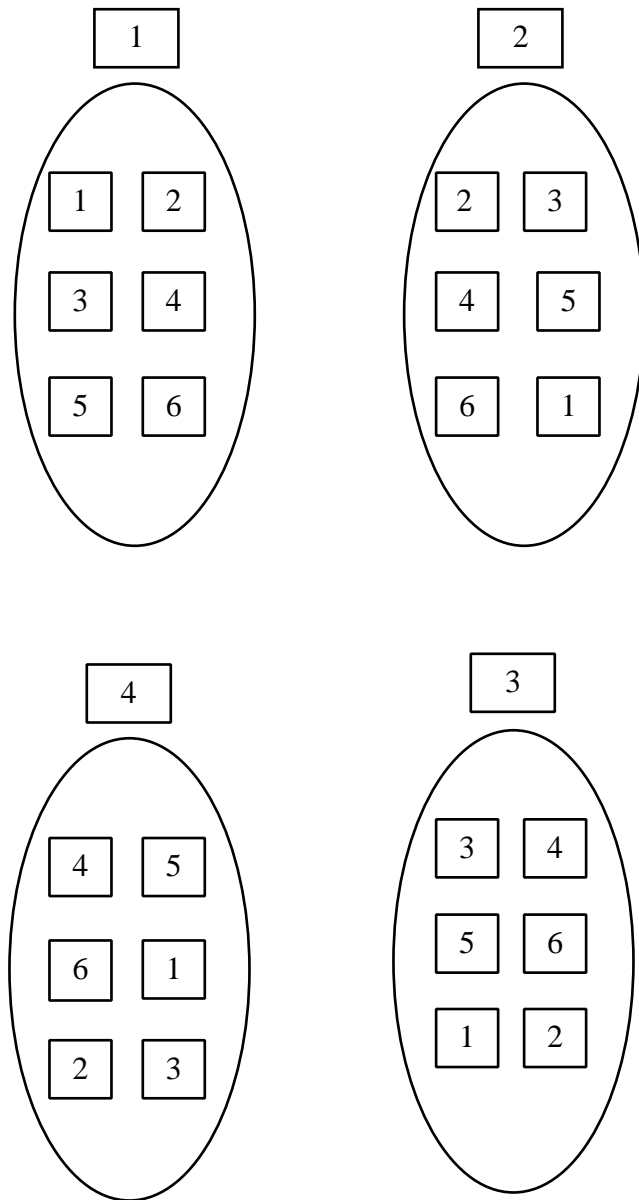
G. Skema Penelitian



Gambar 6. Skema Pembuatan ekstrak daun bidara.



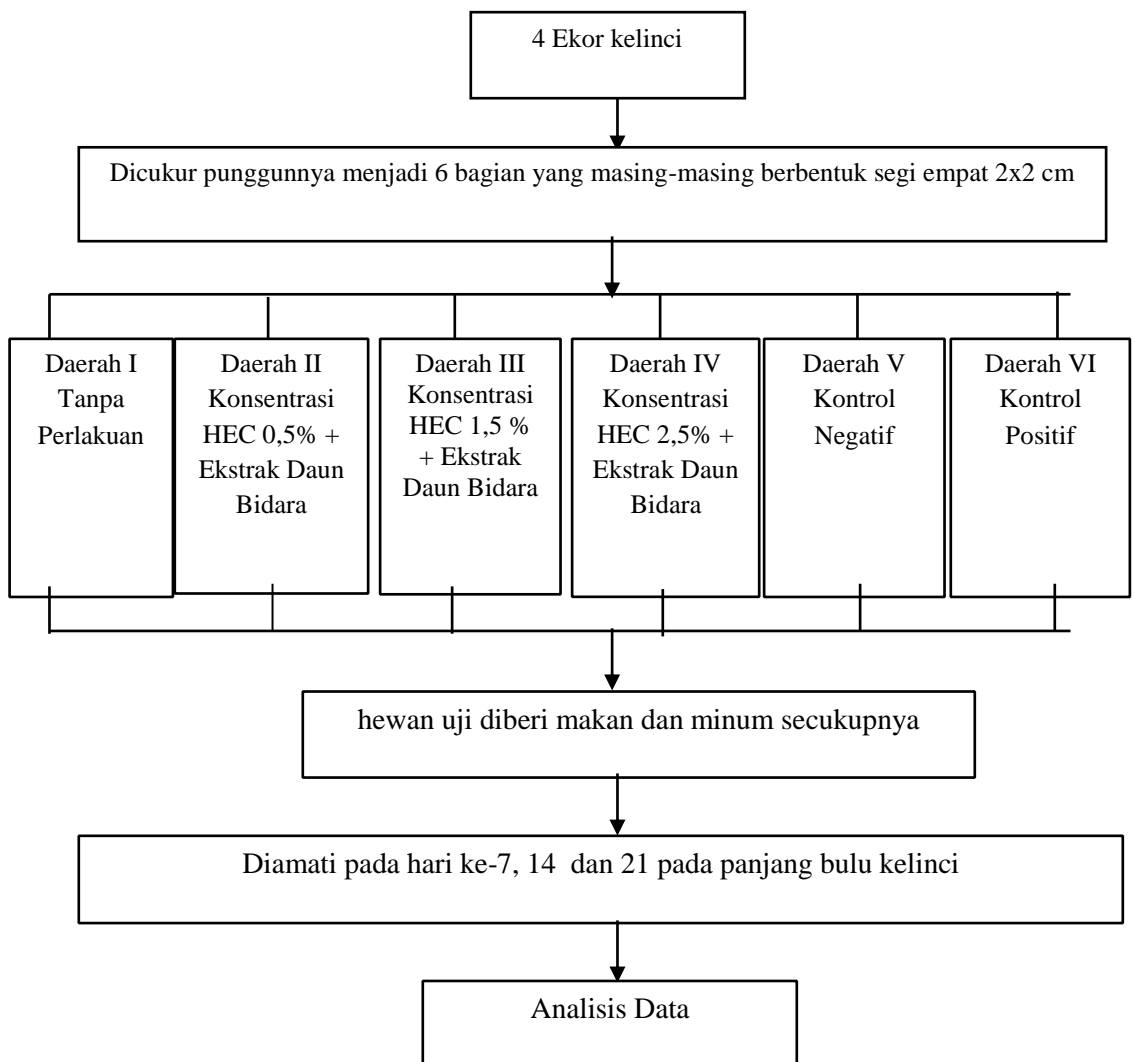
Gambar 7. Pembuatan serum gel ekstrak daun bidara (Ziziphus nummularia).



Gambar 8. Letak pengolesan sediaan pada kelinci.

Keterangan :

- Daerah 1 : tanpa perlakuan
- Daerah 2 : sediaan serum gel dengan konsentrasi HEC 0,5%
- Daerah 3 : sediaan serum gel dengan konsentrasi HEC 1,5 %
- Daerah 4 : sediaan serum gel dengan konsentrasi HEC 2,5%
- Daerah 5 : diolesi kontrol negatif
- Daerah 6 : diolesi kontrol positif (Sediaan Kirkland)



Gambar 9. Skema perlakuan hewan uji.