

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan keseluruhan individu atau unit dalam ruang lingkup yang akan diteliti. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah mengkudu yang ditanam di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sampel merupakan sebagian dari jumlah dan karakteristik dari populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah mengkudu yang diambil secara acak dengan pemilihan buah yang berumur kurang lebih 2 bulan dan memiliki kulit buah berwarna hijau.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) yang dihasilkan dari serbuk maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang diidentifikasi dapat diklasifikasikan dalam berbagai variabel seperti variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkontrol.

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel terikat. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak buah mengkudu.

Variabel terikat adalah variabel yang tergantung pada variabel lain. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah karakteristik fisik kimia, alat dan bahan, serta kondisi laboratorium.

Variabel tergantung adalah variabel yang faktornya diamati dan diukur untuk menentukan pengaruh yang disebabkan oleh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah pertumbuhan rambut pada kelinci putih *New Zealand*.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, tanaman mengkudu adalah tanaman monokotil dan termasuk dalam keluarga kopi-kopian (*rubiaceae*).

Kedua, buah mengkudu adalah salah satu bagian dari tanaman mengkudu yang digunakan yaitu buah yang memiliki kulit berwarna hijau diambil dari Tawangmangu.

Ketiga, ekstrak etanol buah mengkudu adalah serbuk yang diekstraksi dengan etanol 96% dengan metode maserasi kemudian hasil ekstraksi diuapkan menggunakan rotary evaporator sampai didapatkan ekstrak kental.

Keempat, variasi konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu adalah konsentrasi yang dibuat dengan variasi 2,5%, 5%, 7,5%, 10%, dan 12,5%.

Kelima, hewan uji yang digunakan pada penelitian adalah kelinci putih *New Zealand* yang diperoleh dari peternakan Abimanyu Surakarta.

Keenam, efektivitas penumbuh rambut ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) adalah kemampuan ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) menumbuhkan rambut kelinci dengan parameter panjang rambut dan bobot rambut.

Ketujuh, konsentrasi efektif adalah konsentrasi terkecil yang sebanding dengan kontrol positif dan berbeda makna dengan kontrol negatif.

Kedelapan, aktivitas antioksidan adalah proses senyawa yang menghambat radikal bebas.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi serangkaian alat maserasi, timbangan analitik, waterbath, alat penghalus, oven, *rotary evaporation*, alat penyaring vakum, spektrofotometer UV-Vis, vial, botol kaca, ayakan 60 mesh, corong kaca, tabung reaksi, rak tabung reaksi, *beaker glass*, toples kaca, stirer, batang pengaduk, kertas saring, pipet tetes, kain hitam, *sput injection* tanpa jarum, pinset, pisau cukur, gunting, jangka sorong, selotip, dan kandang kelinci.

2. Bahan

2.1. Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

2.2. Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan pada penelitian ini antara lain Kirkland minoxidil, etanol 96%, aqua destilata, tween 80, bubuk Mg, amil alkohol, larutan Mayer LP, reagen Dragendroff, reagen Bouchardat, HCl 2N, HCl pekat, methanol pro analisis, vitamin C, dan serbuk DPPH.

2.3. Hewan uji. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci putih New Zealand dengan umur lebih dari 1 tahun dengan bobot kurang lebih 3 kg, diadaptasi selama 1 minggu kemudian diberi perlakuan.

D. Konsentrasi Ekstrak

Konsentrasi ekstrak etanol buah mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) ditunjukkan pada tabel ini :

Tabel 1. Konsentrasi Ekstrak Etanol

Bahan	Kontrol	Komposisi (%)					Fungsi
	Negatif	K I	K II	K III	K IV	K V	
Ekstrak etanol buah mengkudu	-	2,5	5	7,5	10	12,5	Zat aktif
Tween 80	2	2	2	2	2	2	Pelarut
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Pelarut

Keterangan :

K I : ekstrak buah mengkudu 2,5%

K II : ekstrak buah mengkudu 5%

K III : ekstrak buah mengkudu 7,5%

K IV : ekstrak buah mengkudu 10%

K V : ekstrak buah mengkudu 12,5%

E. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Buah Dari Tanaman Mengkudu

Penelitian ini dimulai dengan melakukan determinasi buah mengkudu. Proses determinasi dilakukan di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2T02T) Tawangmangu, Jawa Tengah. Determinasi dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel buah mengkudu yang akan digunakan dalam penelitian ini yang kemudian dicocokkan dengan morfologi tanaman.

2. Pengambilan Bahan

Buah mengkudu diambil dari Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2T02T) Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah. Buah mengkudu yang digunakan pada penelitian ini dipanen saat buah berumur kurang lebih 2 bulan dan memiliki kulit buah yang berwarna putih kekuningan.

3. Pengeringan dan Pembuatan Serbuk

Buah mengkudu yang telah dikumpulkan kemudian dibersihkan diiris kecil-kecil, dikeringkan di atas kain hitam di bawah sinar matahari, diayak menggunakan ayakan dengan nomor mesh 60 (Depkes, 2008) kemudian disimpan dalam wadah kering, tertutup rapat, dan terhindar dari cahaya secara langsung.

4. Susut Pengeringan Serbuk

Pengujian susut pengeringan dilakukan menggunakan *moisture balance* pada suhu 105°C dengan menimbang 2 g serbuk kemudian dimasukkan dalam lempeng alat selama kurang lebih 15 menit hingga muncul hasil pengukurannya. Pengujian susut pengeringan dilakukan sebanyak 3 kali ditandai dengan diperolehnya bobot konstan. Hasil susut pengeringan yang baik tidak lebih dari 10%.

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100 \%$$

5. Identifikasi Kandungan Kimia Serbuk dan Ekstrak Buah Mengkudu

5.1. Preparasi larutan uji. Larutan uji dibuat dengan perbandingan ekstrak dengan etanol sebesar 1:10 (Fitriani *et al.*, 2015). Larutan uji yang digunakan untuk identifikasi kandungan kimia baik serbuk maupun ekstrak buah mengkudu dibuat dengan cara melarutkan 500 mg serbuk atau ekstrak ke dalam 5 mL etanol lalu diaduk hingga homogen. Hasil preparasi serbuk simplisia campuran disaring terlebih dahulu sebelum digunakan untuk pengujian identifikasi.

5.2. Alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan cara 0,5 mL masing-masing ditambah dengan 1 mL HCl 2N dan air suling 9 mL kemudian dipanaskan di atas penangas air selama 2 menit lalu didinginkan dan disaring. Filtrat yang dihasilkan dibagi dalam 3 tabung reaksi yang berbeda. Tabung reaksi pertama ditambah dengan 3 tetes reagen Bouchardat, tabung kedua ditambah 3 tetes reagen Dragendorff, dan pada 3 tetes reagen Mayer. Hasil positif ditunjukkan dengan adanya endapan coklat pada tabung pertama, endapan jingga pada tabung kedua, dan endapan putih hingga kekuningan pada tabung ketiga (Depkes RI, 1995).

5.3. Saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan cara 0,5 mL masing-masing ditambahkan air suling panas lalu didinginkan kemudian dikocok kuat selama 10 detik. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya busa selama 10 detik dengan tinggi 1 sampai 10 cm, kemudian saat ditambah dengan HCl 2N 1 tetes busa tidak menghilang (Depkes RI, 1995).

5.4. Flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara 0,5 mL masing-masing dimasukkan dalam tabung reaksi lalu ditambah dengan 5 mL etanol kemudian dipanaskan selama 5 menit. Larutan ekstrak dipipet kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang lain lalu ditambah beberapa tetes HCl pekat, amil alkohol, dan bubuk Mg 0,2 gram. Hasil positif ditandai dengan terbentuknya warna merah-coklat (Depkes RI, 1995).

6. Pembuatan Ekstrak Etanol Buah Mengkudu Secara Maserasi

Serbuk simplisia buah mengkudu diekstraksi menggunakan metode maserasi, menurut Formularium Herbal Indonesia perbandingan serbuk simplisia dengan etanol adalah 1:10. Sebanyak 500 gram simplisia buah mengkudu direndam dalam etanol 96% sebanyak 5.000 mL

dalam wadah tertutup rapat selama 24 jam dan dilakukan pengadukan sesekali. Langkah berikutnya dilakukan penyaringan yang bertujuan untuk mendapatkan filtrat menggunakan kain flanel yang ditampung dalam wadah kaca kemudian dilakukan proses remaserasi dengan etanol 96% sebanyak 2.500 mL dalam wadah tertutup rapat selama 48 jam lalu disaring menggunakan kain flanel yang ditampung dalam wadah kaca. Hasil filtrat dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 120 rpm hingga dihasilkan ekstrak buah mengkudu yang kental (Susanty dan Bachmid, F., 2020).

Hasil ekstrak yang diperoleh kemudian dilakukan perhitungan rendemen :

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{e}{e} \frac{i}{i} \times 100\%$$

7. Uji Organoleptik

Uji organoleptik merupakan pengenalan awal yang sederhana dan objektif. Uji organoleptik dilakukan dengan pengamatan terhadap bentuk, warna, bau, dan rasa (Depkes RI, 2000)

8. Pengujian Antioksidan Metode DPPH (1,1- difenil-2-pikrilhidrazil)

8.1. Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM. Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM dilakukan dengan mencampurkan 15,8 mg serbuk DPPH ke dalam 100 mL methanol Pro Analisis (PA) kemudian campuran diinkubasi dalam ruangan yang gelap selama kurang lebih 30 menit (Najihudin et al., 2017)

8.2. Penentuan lamda maksimum. Lamda maksimum ditentukan dengan cara larutan DPPH 1 mL diencerkan dengan methanol Pro Analisis (PA) sampai dengan 5mL kemudian disimpan selama 30 menit, lalu dilakukan pengukuran panjang gelombang pada 500-600 nm untuk mendapatkan nilai absorbansi (Najihudin et al., 2017).

8.3. Penentuan *Operating Time* (OT). *Operating Time* (OT) ditentukan dengan mereaksikan 50 µg/mL larutan pembanding vitamin C yang ditambah 4 mL larutan DPPH kemudian dicampur dengan stirer selama kurang lebih 1 menit lalu mengukur absorbansi pada menit ke 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 pada panjang gelombang maksimum yang sudah ditentukan (Nugraheni, 2007).

8.4. Pembuatan larutan standar vitamin C metode DPPH. Membuat larutan stok 1000 ppm dengan cara 50 mg vitamin C dilarutkan dengan 50 mL aquades hingga larut sempurna kemudian dipipet masing-masing sebanyak 100, 200, 300, 400, dan 500 µL kemudian dicukupkan volumenya hingga 5 mL sehingga didapatkan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm (Salampe et al., 2019).

8.5. Pengujian aktivitas antioksidan vitamin C dengan DPPH. Pengujian dilakukan dengan memipet 4 mL dari berbagai konsentrasi larutan vitamin C (2,4, 6, 8, dan 10 ppm) lalu ditambah dengan 1 mL larutan DPPH hingga tercampur sempurna kemudian campuran disimpan selama 30 menit di ruangan gelap. Langkah berikutnya yaitu absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (Salampe *et al.*, 2019).

8.6. Pembuatan larutan stok ekstrak buah mengkudu metode DPPH. Pembuatan larutan stok 1000 ppm dengan cara melarutkan 50 mg ekstrak buah mengkudu dengan etanol pro analisis hingga 50 mL dalam labu erlenmeyer hingga larut kemudian masing-masing dipipet sebanyak 100, 200, 300, 400, dan 500 μ L kemudian dicukupkan hingga 5 mL sehingga didapatkan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm (Salampe *et al.*, 2019).

8.7. Pengukuran aktivitas antioksidan buah mengkudu dengan DPPH. Pengukuran aktivitas antioksidan pada buah mengkudu dilakukan dengan sebanyak 4 mL ekstrak etanol buah mengkudu (20, 40, 60, 80, dan 100 ppm) ditambah dengan 1 mL larutan DPPH dicampur hingga larut lalu disimpan selama 30 menit. Pengukuran serapan dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Salampe *et al.*, 2019).

8.8. Penentuan persen inhibisi dan Nilai IC₅₀. Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam nilai presentase inhibisi yang dihitung dengan rumus (Hasanah *et al.*, 2017) :

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A - e}{A} \times 100\%$$

Keterangan :

A blanko ekstrak : absorbansi tidak mengandung sampel

A ekstrak : absorbansi ekstrak

Nilai IC₅₀ didapat dengan cara menghitung konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat radikal bebas sebesar 50% berdasarkan persamaan garis regresi linier menggunakan rumus :

$$y = ax + b$$

Keterangan:

$$y = 50$$

x = Konsentrasi larutan uji

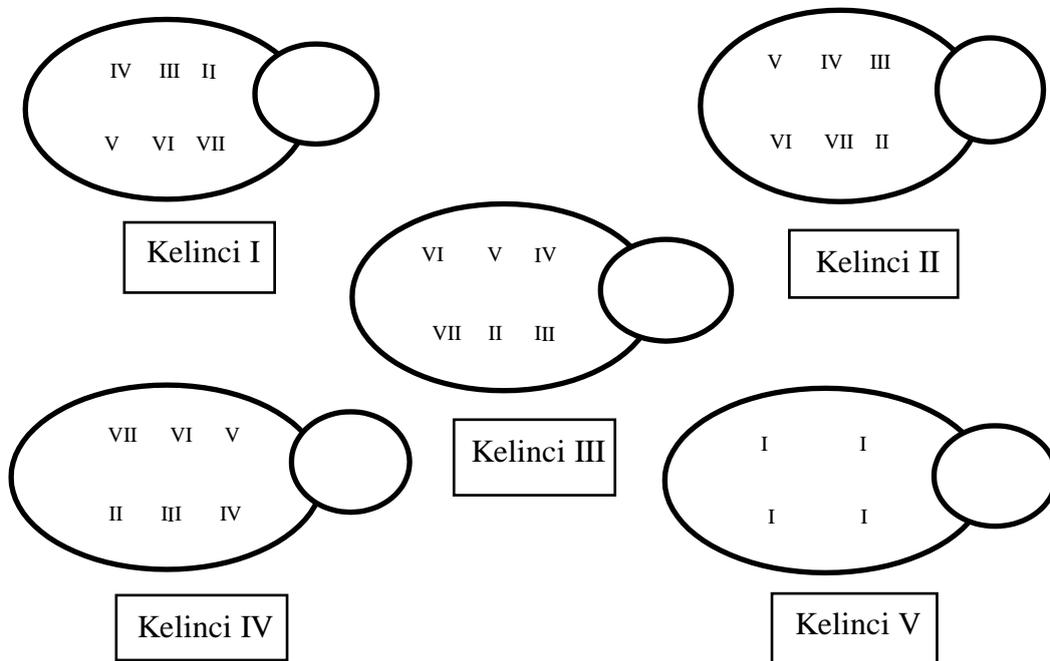
Pengujian antioksidan menggunakan parameter IC₅₀ sebagai konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50% yang artinya semakin kecil nilai IC₅₀ maka aktivitas antioksidan semakin kuat (Setiawan *et al.*, 2018).

9. Penyiapan dan Pengelompokan Hewan Uji

Kelinci putih *New Zealand* digunakan sebagai hewan percobaan, dengan rentan umur lebih dari 1 tahun dan bobot badan kurang lebih 3 kg. Kelinci diadaptasikan selama 1 minggu kemudian diamati dan ditimbang dalam kondisi umum. Hewan uji dibagi menjadi 7 kelompok.

Keterangan :

- a. Kelompok I : kontrol positif (Minoxidil)
- b. Kelompok II : dioleskan ekstrak buah mengkudu 2,5% (K I)
- c. Kelompok III : dioleskan ekstrak buah mengkudu 5% (K II)
- d. Kelompok IV : dioleskan ekstrak buah mengkudu 7,5% (K III)
- e. Kelompok V : dioleskan ekstrak buah mengkudu 10% (K IV)
- f. Kelompok VI : dioleskan ekstrak buah mengkudu 12,5% (K V)
- g. Kelompok VII : kontrol negatif (aquadest)
- h. Kontrol positif dioleskan pada punggung kelinci yang lain.



Gambar 9. Model Pembagian Lokasi Punggung Kelinci.

10. Perlakuan Hewan Uji

Sebanyak 5 ekor kelinci putih diacak kemudian ditempatkan pada kandang yang disediakan sesuai kelompok eksperimen. Kelinci diadaptasi selama 7 hari dan diberi perlakuan pada hari ke 8. Kelinci diberi pakan dan minum standar dalam jumlah sedang atau secukupnya. Rambut pada punggung kelinci dicukur hingga bersih menggunakan pisau cukur, berbentuk segi empat dengan luas ukuran masing-masing 2 x 2 cm sebanyak 6 bagian dengan jarak antar daerah 1 cm. Punggung kelinci sebelum diberi perlakuan, ditetesi dengan etanol 70% yang berfungsi sebagai antiseptik, setelah itu dilakukan penetasan sediaan dari ekstrak buah mengkudu dan kontrol positif kemudian diratakan. Perlakuan dilakukan 1 x sehari setiap sore pada masing-masing bagian dengan volume sediaan 1 mL.

11. Pengamatan Pertumbuhan Rambut

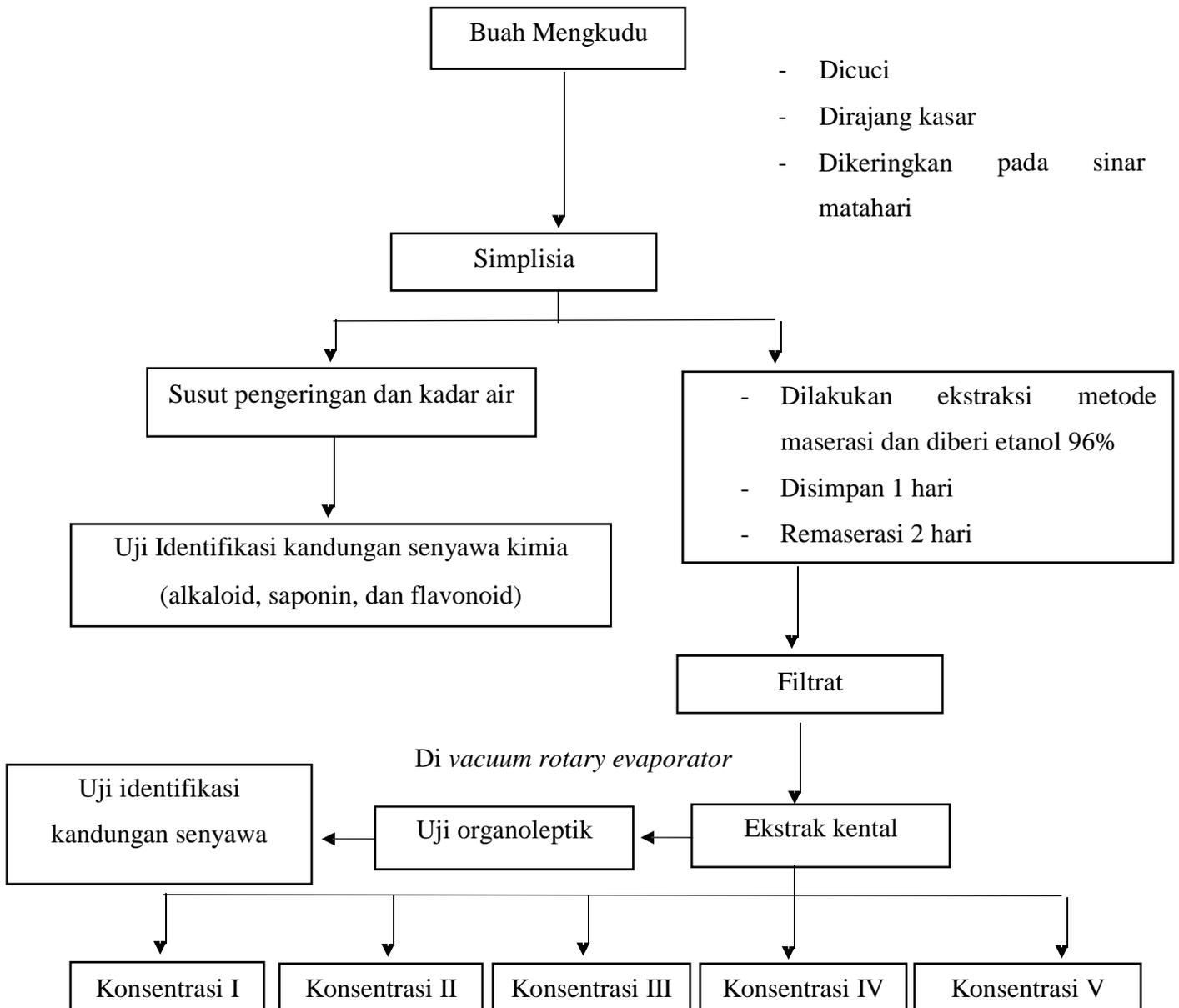
Pengamatan dilakukan dengan mengambil 10 helai rambut pada hari ke- 7, 14, dan 21 di setiap daerah kemudian ditempel pada selotip bening. Pengukuran panjang rambut dilakukan menggunakan jangka sorong, dilakukan pengukuran selama 21 hari. Pengamatan panjang rambut dilakukan pada hari ke 7, 14, dan 21 setelah perlakuan. Hari ke-21 dilakukan pengukuran bobot rambut dengan cara rambut yang tumbuh pada masing-masing kelompok dicukur kemudian ditimbang.

F. Analisis Data

Analisa yang digunakan pada penelitian ini adalah SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Data uji aktivitas pertumbuhan rambut yang diperoleh dilakukan analisa menggunakan metode *Shapiro Wilk*, jika data yang diperoleh terdistribusi normal dan homogen ($\text{sig} > 0,05$) dilakukan uji parametrik dengan metode ANOVA dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test* dengan uji Tukey. Apabila hasil data yang diperoleh terdistribusi tidak normal dan tidak homogen ($\text{sig} < 0,05$) maka dilanjutkan dengan uji non parametrik metode *Kruskal Wallis* apabila signifikansi $< 0,05$ dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan pada masing-masing perlakuan.

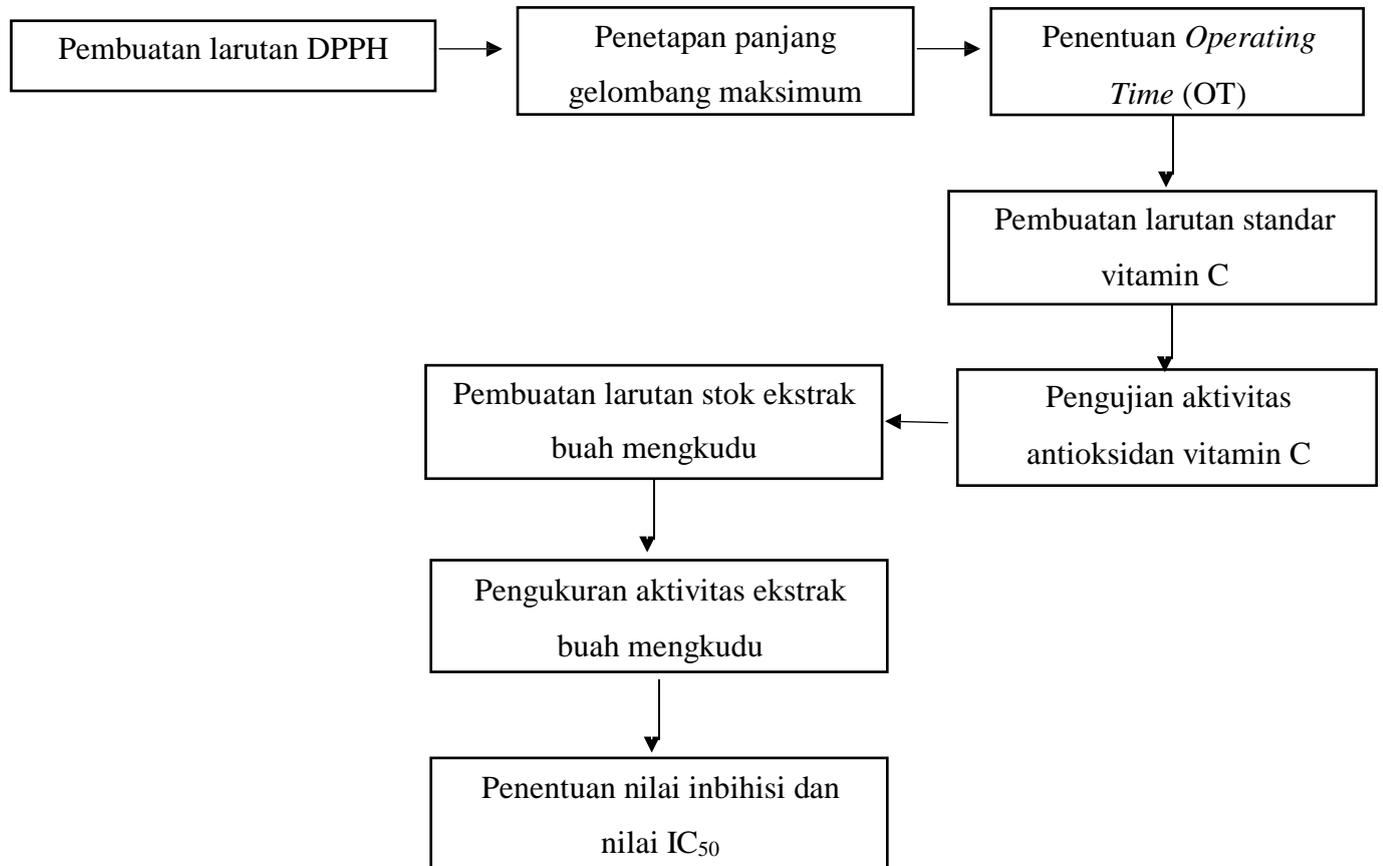
G. Skema Jalannya Penelitian

1. Pembuatan Ekstrak



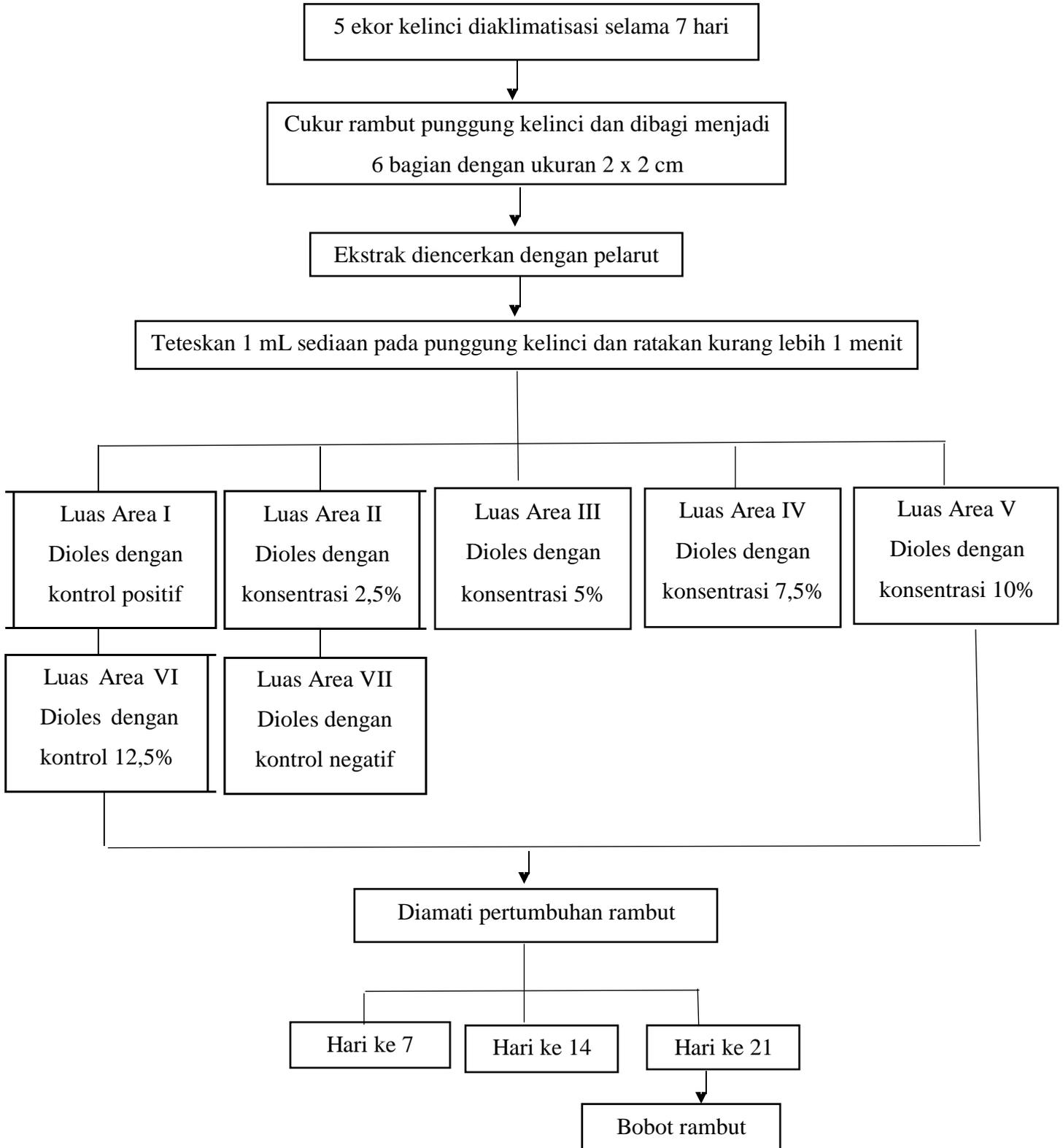
Gambar 10. Skema Pembuatan Konsentrasi Ekstrak.

2. Pengujian Antioksidan Metode DPPH



Gambar 11. Skema Pengujian Antioksidan Metode DPPH.

3. Pembuatan Uji Penumbuh Rambut



Gambar 12. Skema Perlakuan Hewan Uji