

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

1. Populasi

Populasi dalam penelitian ini yaitu daun pare segar dan muda yang diformulasikan menjadi serum.

2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu serum ekstrak etanol daun pare dengan variasi konsentrasi xanthan gum : CMC-Na yaitu (0,5% : 0,5%), (0,8% : 0,2%) dan (0,2% : 0,8%).

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama terdiri dari variabel bebas, variabel terkontrol dan variabel terikat. Variabel utama dalam penelitian ini yaitu mutu fisik dan stabilitas sediaan serum ekstrak daun pare dengan variasi Xanthan gum dan CMC-Na sebagai *gelling agent*.

2. Klasifikasi variabel utama

2.1 Variabel Bebas. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi Xanthan gum dan CMC-Na pada sediaan serum ekstrak etanol daun pare.

2.2 Variabel Terkontrol. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah Kelinci. Kondisi fisik hewan uji yang meliputi; berat badan, usia, jenis kelamin, makan dan minum, proses pembuatan serum, formulasi serum, tempat tumbuh tanaman, bahan bahan yang digunakan, penelitian dan kondisi laboratorium.

2.3 Variabel Terikat. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah mutu fisik dari sediaan serum yang meliputi organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, daya lekat, dan stabilitas.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun pare adalah daun yang diperoleh dari tanaman Pare (*Momordica charantia* Linn) yang diperoleh dari Tawangmangu Jawa Tengah.

Kedua, ekstrak etanol daun pare adalah hasil maserasi serbuk daun pare dengan pelarut etanol 96%.

Ketiga, variasi Xanthan gum dan CMC-Na adalah variasi bahan *gelling agent* dengan variasi konsentrasi Xanthan gum : CMC-Na (0,5% : 0,5%), (0,8% : 0,2%) dan (0,2% : 0,8%).

Keempat, uji mutu fisik sediaan serum ekstrak etanol daun pare adalah dengan melihat organoleptis, homogenitas, viskositas, pH, daya sebar, daya lekat, dan stabilitas.

Kelima, aktivitas pertumbuhan rambut sediaan serum adalah aktivitas pertumbuhan rambut sediaan serum pada kelinci dengan produk pasaran sebagai pembandingan. Parameter yang diamati yaitu panjang bulu dan berat bulu kelinci.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah kandang, wadah pakan, wadah minum, jangka sorong, neraca analitik, gunting, pisau cukur, spidol, pH meter *Ohaus Starter* 3100, viskometer *Brookfield DV2T*, *stopwatch*, *beaker glass*, erlenmeyer, gelas ukur, batang pengaduk, cawan petri, pipet tetes, spatula, aluminium foil, plastik *wrap*, blender, oven, kertas saring, mortir, stamper, corong evaporator, ayakan *mesh* 40, moisture balance, labu alas bulat, kain flanel, botol kaca gelap, tabung reaksi, kamera.

2. Bahan

2.1 Bahan Sampel. Daun pare (*Momordica charantia* Linn) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Jawa tengah.

2.2 Bahan Kimia. Xanthan gum, CMC-Na, propilenglikol, metil paraben, *aquadest*, minoxidil, etanol 96%, serbuk magnesium, HCL pekat, asam sulfat 2 N, pereaksi *Dragendorff*, pereaksi *Mayer*, pereaksi *bouchardat*, FeCl₃, kloroform, asam asetat anhidrat dan asam sulfat pekat.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan Bahan

Pengambilan daun pare dilakukan di daerah Tawangmangu Jawa Tengah. Kriteria daun yang diambil yaitu daun berwarna hijau tua, yang memiliki panjang 3,5 cm dan lebar 1,5- 2,5 cm dengan masa panen berumur kurang lebih 40 hari (Dalimartha, 1999).

2. Determinasi Tanaman Pare

Tujuan dari determinasi tanaman bahan uji adalah untuk memastikan bahwa bahan yang akan digunakan dalam penelitian itu

benar. Determinasi dilakukan dengan cara mencocokkan karakteristik morfologi tanaman dengan referensi yang ditemukan dalam literatur. Determinasi daun pare (*Momordica charantia* Linn) pada penelitian ini akan dilakukan di laboratorium Balai Besar Penelitian Dan Pengembangan Tanaman Obat Dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu.

3. Pembuatan Serbuk Daun Pare

Daun pare yang sebelumnya didapatkan di daerah Tawangmangu Jawa Tengah dicuci menggunakan air mengalir hingga bersih kemudian dikeringkan cara diangin-anginkan sampai mongering selanjutnya daun pare dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50°C. Daun pare yang telah dikeringkan tahap berikutnya yaitu dibuat menjadi serbuk menggunakan mesin penyerbuk yang terdapat di Universitas Setia Budi Surakarta. Serbuk kemudian diayak menggunakan ayakan nomor 40.

4. Pemeriksaan Organoleptik Serbuk Daun Pare

Pemeriksaan organoleptik serbuk daun pare dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, bau, dan rasa serbuk daun pare.

5. Penetapan Susut Pengerinan Serbuk Daun Pare

Penetapan susut pengerinan serbuk daun pare dengan metode gravimetri menggunakan oven. Serbuk daun pare ditimbang sebanyak 1-2 g lalu dimasukkan ke dalam botol timbang tertutup yang telah ditara dan sebelumnya telah dilakukan pada suhu 105°C untuk mengetahui susut pengeringannya. Serbuk yang berada pada botol timbang kemudian diratakan dengan cara botol timbang digoyangkan hingga tebal lapisan sekitar 5-10 mm. Botol timbang yang berisi serbuk kemudian dimasukkan ke oven pada suhu 105°C hingga bobot tetap dalam keadaan tutup terbuka. Sebelum melakukan pengeringan, botol timbang dibiarkan dingin hingga suhu ruang dalam eksikator dengan keadaan tertutup. Dilakukan sebanyak tiga kali replikasi lalu dihitung persentasenya (KemenKes RI, 2017).

6. Pembuatan Ekstrak Daun Pare

Pembuatan ekstrak etanol daun pare dilakukan menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1 : 10. Sebanyak 750 g serbuk simplisia diekstraksi dengan pelarut etanol 96% 7500 ml, kemudian direndam selama 6 jam pertama sambil diaduk sesekali, lalu didiamkan selama 18 jam. Maserat dipisahkan dengan cara penyaringan, selanjutnya diremaserasi sebanyak dua kali menggunakan pelarut yang

sama. Tujuan dilakukan remaserasi adalah untuk memaksimalkan proses ekstraksi yang telah dilakukan pada tahap maserasi. Ekstrak kemudian disaring, kemudian dipekatkan menggunakan rotary evaporator dengan suhu 50°C sehingga diperoleh ekstrak kental kemudian dihitung nilai rendemennya (DepKes RI, 2017).

7. Pemeriksaan Organoleptik Ekstrak Daun Pare

Pemeriksaan organoleptik serbuk daun pare dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, bau, dan rasa serbuk daun pare.

8. Penetapan Persen Rendemen

Penetapan persen rendemen dilakukan untuk mengetahui presentase ekstrak yang diperoleh dari mulai proses ekstraksi, perhitungan dilakukan dengan cara menghitung bobot ekstrak kemudian dibagi dengan bobot serbuk dan dikali 100%.

$$\% \text{ Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot serbuk}} \times 100\%$$

9. Penetapan Kadar Air Ekstrak Daun Pare

Penetapan kadar air ekstrak daun pare dilakukan dengan menggunakan metode gravimetri. Sampel ditimbang kurang lebih 10 gram kemudian dimasukkan ke dalam wadah yang telah ditara. Dikeringkan pada suhu 105°C selama 5 jam kemudian ditimbang. Setelah dikeringkan selama lima jam pada suhu 105°C, ditimbang. Setelah pengeringan selesai, timbangan dilakukan setiap satu jam sampai perbedaan antara dua penimbangan tidak lebih dari 0,25% (DepKes RI, 2017).

10. Identifikasi Kandungan Senyawa

10.1. Identifikasi Flavonoid. Identifikasi flavonoid dilakukan dengan cara 5 ml larutan sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan serbuk magnesium dan 1 ml HCl pekat, ditambahkan amil alkohol dikocok dengan kuat dan dibiarkan hingga memisah. Terbentuknya warna merah, kuning atau jingga dalam larutan amilalkohol menunjukkan adanya senyawa golongan flavonoid (Septiningsih *et al.*, 2017).

10.2. Identifikasi Saponin. Identifikasi saponin dilakukan dengan memasukkan sebanyak 2 ml larutan sampel ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan air panas lalu tabung reaksi dikocok dengan kuat setelah itu ditambahkan beberapa tetes HCL. Hasil positif uji saponin ditunjukkan adanya busa yang stabil (Ilmiati *et al.*, 2017).

10.3. Identifikasi Alkaloid. Identifikasi alkaloid dilakukan dengan 3 pereaksi yaitu *mayer*, *dragendorff*, dan *bouchardat*.

Identifikasi alkaloid dilakukan dengan memasukkan ekstrak kental yang telah dilarutkan ke dalam empat tabung reaksi. Tabung 1 tidak diberi reagen (Sebagai pembanding). Tabung 2,3, dan 4 diberi beberapa tetes asam sulfat 2 N kemudian diuji dengan pereaksi *mayer*, *dragendorff*, dan *bouchardat*. Hasil positif senyawa alkaloid pereaksi *mayer* ditandai dengan terbentuknya endapan putih kekuningan. Hasil positif senyawa alkaloid pereaksi *dragendorff* ditandai dengan terbentuknya endapan merah bata. Hasil positif senyawa alkaloid pereaksi *bouchardat* ditandai dengan terbentuknya endapan coklat (Sulistyarini *et al.*, 2020).

10.4. Identifikasi Tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan memasukkan 5 ml larutan sampel ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 3 tetes FeCl_3 . Sampel yang mengandung senyawa tanin ditandai dengan adanya perubahan warna menjadi biru tua atau hijau kehitaman (Widiastuti *et al.*, 2016).

10.5. Identifikasi steroid dan tritepernoid. Identifikasi tritepernoid dilakukan dengan menguapkan 2 ml larutan sampel pada cawan penguap. Hasil residu dilarutkan menggunakan 0,5 ml kloroform kemudian ditambahkan 0,5 ml asam asetat anhidrat dan 2 ml asam sulfat pekat. Terbentuknya cincin kecoklatan atau violet pada perbatasan larutan menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan jika muncul cincin hijau kebiruan menunjukkan adanya steroid (Ciulei, 1984).

11. Rancangan Formula Serum

Tabel 1. Rancangan Formulasi Serum Ekstrak Etanol Daun Pare

Komposisi	Konsentrasi (%)			
	K-	F1	F2	F3
Ekstrak etanol daun pare	-	12	12	12
Xanthan gum	0,5	0,5	0,8	0,2
CMC-Na	0,5	0,5	0,2	0,8
Propilen glikol	15	15	15	15
Metil paraben	0,18	0,18	0,18	0,18
<i>Aquadest</i>	Ad	Ad	Ad	Ad
	100	100	100	100

Keterangan :

1. K- = Serum tanpa ekstrak etanol daun pare
2. F1 = Serum ekstrak etanol daun pare dengan kombinasi xanthan gum dan CMC-Na (0,5% ; 0,5%).
3. F2 = Serum ekstrak etanol daun pare dengan kombinasi xanthan gum dan CMC-Na (0,8% ; 0,2%).
4. F3 = Serum ekstrak etanol daun pare dengan kombinasi xanthan gum dan CMC-Na (0,2% ; 0,8%).

12. Pembuatan Sediaan Serum

Disiapkan alat dan bahan kemudian timbang masing-masing bahan. Botol dikalibrasi 100 mL. Xanthan gum dikembangkan di dalam mortir stamper menggunakan *aquadest* sebanyak 20 kalinya kemudian diaduk. CMC-Na dikembangkan di dalam mortir stamper menggunakan air hangat sebanyak 20 kalinya. Kedua *gelling agent* kemudian dicampurkan. Setelah itu ditambahkan propilen glikol sedikit demi sedikit sambil terus diaduk. Metil paraben ditambahkan lalu aduk hingga homogen dan terbentuk massa serum. Setelah terbentuk massa serum kemudian tambahkan ekstrak etanol daun pare sebanyak 12 gram dan di tambahkan *aquadest* sambil diaduk hingga homogen. Serum yang sudah jadi dimasukkan ke dalam wadah lalu dikemas dengan rapi.

13. Pembuatan Kontrol Positif dan Kontrol Negatif

Kontrol positif pada penelitian kali ini yaitu minoxidil yang dipercaya mempunyai aktivitas penumbuh rambut.

Kontrol negatif dalam penelitian kali ini yaitu serum tanpa ekstrak etanol daun pare.

14. Evaluasi Mutu Fisik Sediaan Serum

14.1 Uji Organoleptis. Uji organoleptik dilakukan dengan melakukan pengamatan terhadap bentuk, warna, bau, dan rasa (DepKes RI, 2000).

14.2 Uji Homogenitas. Uji homogenitas dilakukan dengan meletakkan serum yang akan diamati homogenitasnya kemudian dioleskan pada objek glass bening atau transparan kemudian diamati. Sediaan yang baik harus mempunyai susunan yang homogen baik dan tanpa adanya butiran yang kasar (Ditjen POM, 1985).

14.3 Uji *pH* Serum. Uji *pH* serum diukur dengan menggunakan *pH* meter dengan mencelupkan cupkan ujung elektroda yang telah dikalibrasi pada sediaan serum. Selanjutnya elektroda dibiarkan beberapa saat hingga muncul angka yang menunjukkan *pH* serum.

14.4 Uji Viskositas Serum. Uji viskositas serum dilakukan dengan menggunakan Viskometer *Brookfield* DV2T. Serum diletakan dalam wadah kemudian spindel diturunkan sampai terendam. *Setting* nomor spindle, kecepatan putaran, dan lama waktu pengujian di display alat. Pastikan nilai torsi (*torque*) yang ditunjukkan berkisar antara 10-90%. Lakukan pengujian kemudian hasilnya dicatat.

14.5 Uji Daya Sebar Serum. Uji daya sebar dilakukan dengan cara menimbang sediaan serum sebanyak 0,5 gram dan diletakkan di atas kaca yang pada bagian sisi lainnya telah ditemplei milimeter blok. 50 sampai 250 gram pemberat ditempatkan di atas kaca. Tunggu 1 menit setiap kali pemberat ditambahkan dan amati diameter serum.

14.6 Uji Daya Lekat Serum. Uji daya lekat sediaan serum dilakukan dengan cara menimbang sediaan serum hingga 0,5 gram, kemudian meletakkannya di atas kaca objek yang dilekatkan pada kotak kaca dan diikat dengan tali, lalu ditutup dengan gelas objek lain, diberikan beban di atasnya sebesar 1 kg selama 5 menit, Setelah selesai, ambil beban dan ikat beban seberat 80 gram ke tali. Waktu yang diperlukan untuk melepaskan kedua kaca objek dicatat secara bersamaan dengan menyalakan *stopwatch*.

14.7 Uji Stabilitas Serum. Pengujian stabilitas sediaan serum dilakukan dengan metode *cycle test* dengan menyimpan sediaan serum pada suhu ($4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) kemudian dipindahkan ke dalam oven dengan suhu ($40^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$) selama 24 jam (1 siklus). Uji dilakukan dalam 6 siklus (Setyaningrum, 2013).

E. Uji Aktivitas Pertumbuhan Rambut

Pengujian aktivitas sediaan serum terhadap pertumbuhan rambut kelinci dilakukan dengan menggunakan metode Tanaka *et al*(1980). Uji aktivitas pertumbuhan rambut pada kelinci dilakukan dengan cara membersihkan punggung kelinci dari rambut dengan cara dicukur hingga bersih. Setelah dicukur kemudian punggung kelinci dibagi menjadi 6. Masing masing berbentuk persegi dengan ukuran 2x2 cm dan jarak antara persegi satu dengan persegi lainnya yaitu 1 cm. Sebelum dilakukan pengolesan sediaan pada punggung kelinci, dioleskan terlebih dahulu etanol 70% sebagai antiseptik.

Bagian-bagian yang diolesi yaitu :

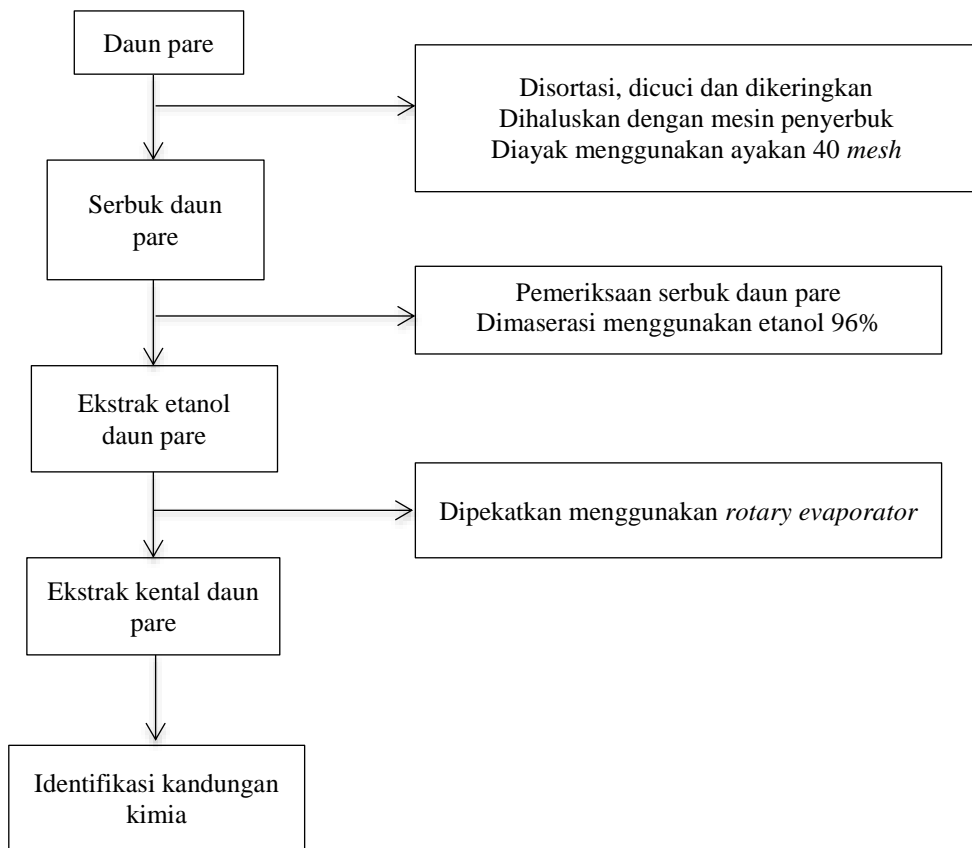
1. Daerah I diolesi serum tanpa ekstrak etanol daun pare (K-)
2. Daerah II diolesi serum ekstrak etanol daun pare dengan kombinasi Xanthan gum : CMC-Na (0,5% : 0,5%) (F1)
3. Daerah III diolesi serum ekstrak etanol daun pare dengan kombinasi Xanthan gum : CMC-Na (0,8% : 0,2%) (F2)
4. Daerah IV diolesi serum ekstrak etanol daun pare dengan kombinasi Xanthan gum : CMC-Na (0,2% : 0,8%) (F3)
5. Daerah V diolesi minoxidil sebagai kontrol positif
6. Daerah VI tanpa diberi perlakuan

Sebelum diberi perlakuan, kelinci diadaptasikan terlebih dahulu selama seminggu agar kelinci tidak stress. Pemberian serum 1 kali sehari sebanyak 1 ml di setiap bagiannya. Pengamatan dilakukan pada hari ke-7, hari ke-14, dan hari ke-21. Parameter yang diamati yaitu panjang bulu dan berat bulu kelinci.

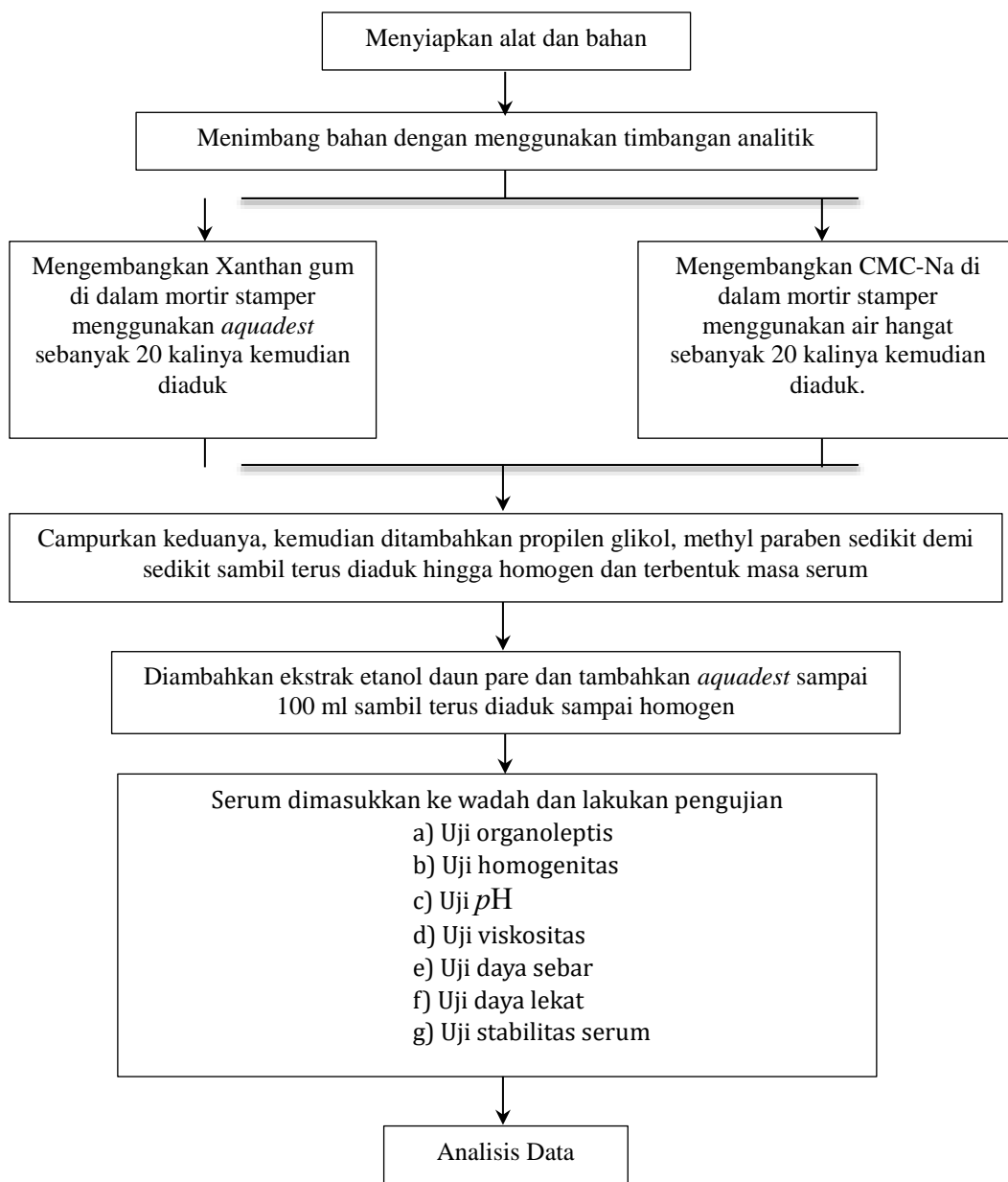
F. Analisis Hasil

Hasil data uji mutu fisik sediaan serum dilihat dari hasil pengujian uji mutu fisik yang meliputi: organoleptis, homogenitas, viskositas, *pH*, daya sebar, daya lekat, dan stabilitas. Sediaan serum penumbuh rambut kemudian dianalisis menggunakan statistik metode *One Way Anova* dan uji lanjutan metode *Tukey*. Hasil data uji potensi penyubur rambut serum ekstrak daun pare terhadap panjang, dan berat bulu kelinci dianalisis menggunakan uji statistik metode *Shapiro Wilk* dan *Levene* untuk melihat homogenitas, dilanjut dengan uji ANOVA dan uji lanjutan metode *Post Hoc Duncan*.

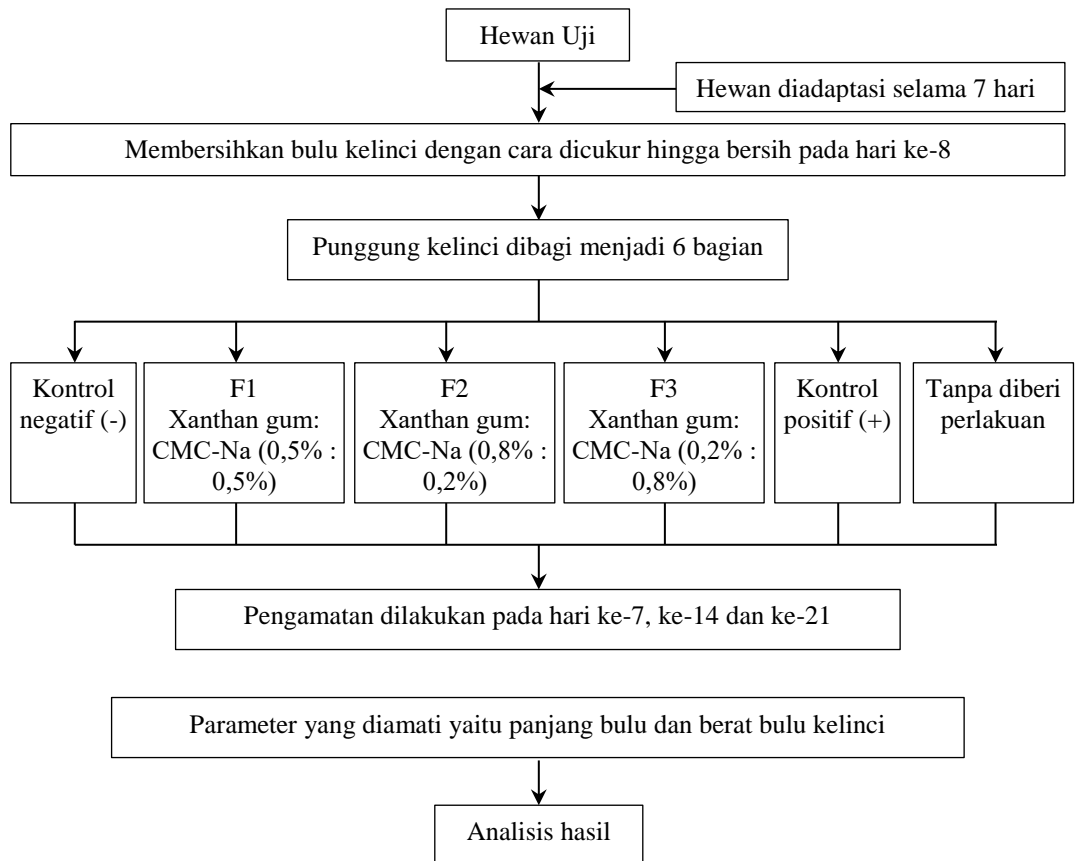
G. Skema Penelitian



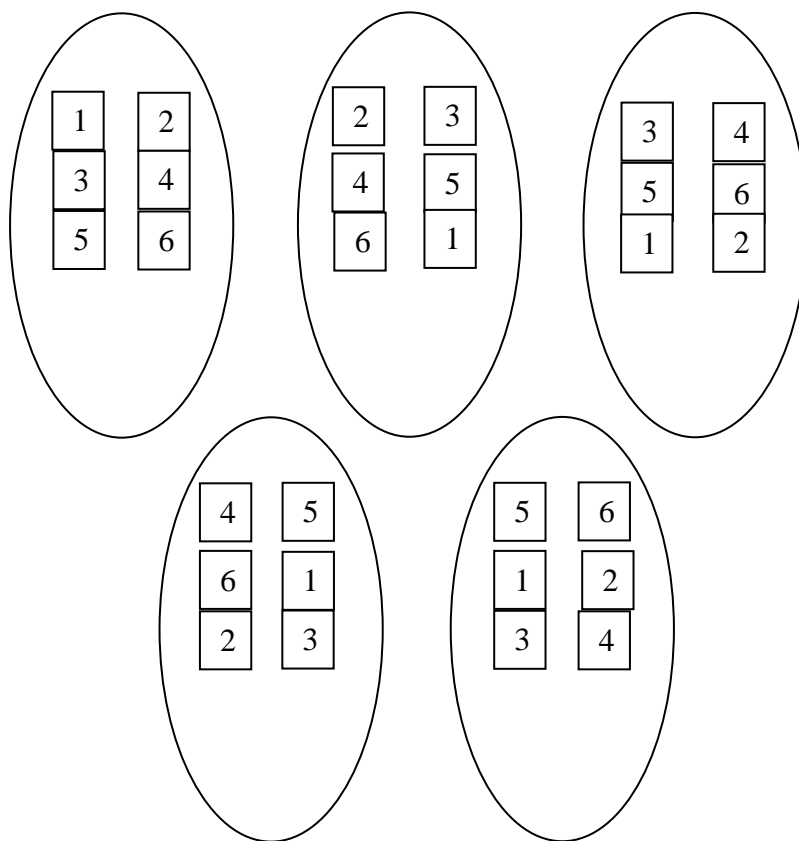
Gambar 7. Pembuatan Ekstrak Daun Pare



Gambar 8. Pembuatan Serum Ekstrak Etanol Daun Pare



Gambar 9. Perlakuan Hewan Uji



Gambar 10. Pemberian Perlakuan pada Punggung Kelinci

Keterangan :

1. Daerah I diolesi serum tanpa ekstrak etanol daun pare (K-)
2. Daerah II diolesi serum ekstrak etanol daun pare dengan kombinasi Xanthan gum : CMC-Na (0,5% : 0,5%) (F1)
3. Daerah III diolesi serum ekstrak etanol daun pare dengan kombinasi Xanthan gum : CMC-Na (0,8% : 0,2%) (F2)
4. Daerah IV diolesi serum ekstrak etanol daun pare dengan kombinasi Xanthan gum : CMC-Na (0,2% : 0,8%) (F3)
5. Daerah V diolesi minoxidil sebagai kontrol positif
6. Daerah VI tanpa diberi perlakuan