

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan dari subjek penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kecombrang (*Etlingera elatior*) yang didapatkan dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah dan Kelinci *New Zealand White* yang berasal dari Universitas Setia Budi, Surakarta.

Sampel adalah bagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kecombrang (*Etlingera elatior*) yang masih segar, bersih, bebas dari hama dan daun berwarna hijau muda sampai tua yang didapatkan di daerah Tawangmangu, Jawa Tengah dan menggunakan hewan uji Kelinci *New Zealand White* yang berdasarkan rumus Federer:

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan :

n : Besar sampel setiap kelompok

t : Jumlah kelompok

15: Konstanta

Dengan jumlah perlakuan 5 kelompok

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 15/4$$

$$n-1 \geq 3,75$$

$$n \geq 4,75$$

Jumlah hewan uji yang digunakan harus lebih besar atau sama dengan 4,75, sehingga penelitian ini akan digunakan hewan uji kelinci *New Zealand White* berjumlah 5 ekor.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama pada penelitian ini adalah ekstrak daun kecombrang (*Etlingera elatior*) sebagai pertumbuhan rambut yang diformulasikan pada sediaan *hair tonic* dan uji aktivitas pertumbuhan rambut pada 5 ekor kelinci *New Zealand White*.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah stabilitas dan mutu fisik sediaan *hair tonic*.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan dengan beberapa jenis variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang mempengaruhi atau memberikan dampak dan timbulnya variabel dependen (terikat). Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi ekstrak daun kecombrang (*Etlingera elatior*) terhadap pertumbuhan rambut.

Variabel tergantung adalah variabel yang diukur dan diamati untuk mengetahui sebuah pengaruh yang ditimbulkan dari variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas sediaan *hair tonic* ekstrak daun kecombrang terhadap pertumbuhan rambut kelinci dan mutu fisik sediaan *hair tonic*.

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah kondisi peneliti, hewan uji kelinci, alat dan bahan, pembuatan *hair tonic* dan kondisi laboratorium.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun kecombrang adalah tanaman herbal yang mempunyai efek penumbuh rambut dan dapat dijadikan bahan alami karena terdapat senyawa yang poten untuk mempercepat pertumbuhan rambut, bagian dari tanaman kecombrang yang masih segar dan berwarna hijau muda sampai tua diambil dari daerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun kecombrang adalah proses pada daun yang masih segar dilakukan dengan sortasi basah, dicuci dan dipilah sesuai kriteria daun yang sehat, lalu ditiriskan kemudian dikeringkan dengan cara meletakkan daun di tempat terbuka lalu ditutup dengan kain hitam agar tidak terkena paparan matahari langsung, kemudian daun disortasi kering dan dihaluskan memakai blender setelah itu diayak memakai ayakan nomor 60.

Ketiga, ekstrak daun kecombrang adalah serbuk daun kecombrang yang diekstraksi dengan memakai metode maserasi dan menggunakan etanol 96 % hingga didapatkan filtrate kemudian diuapkan memakai *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental.

Keempat, variasi konsentrasi adalah pada formula ini terdapat pada bahan aktif yang digunakan yakni ekstrak daun kecombrang dan dibuat dengan berbagai konsentrasi yang berbeda untuk mendapatkan efek pertumbuhan rambut yang optimal.

Kelima, formula optimal adalah formula yang menghasilkan aktivitas pertumbuhan rambut pada kelinci *New Zealand White*, pengujian mutu fisik dan stabilitas yang paling baik.

Kelima, hewan uji yang digunakan adalah kelinci *New Zealand White* karena respon yang dimilikinya sama seperti manusia pada penyakit dan pengobatannya.

Keenam, sediaan *hair tonic* adalah sediaan yang mempunyai kandungan pada bahan formula untuk merawat dan melindungi kesehatan rambut serta menguatkan batang rambut pada kondisi yang optimal untuk dapat merangsang pertumbuhan rambut dan terhindar dari kerontokan serta kebotakan sehingga pada sediaan dapat di uji mutu fisik dan stabilitas adalah pengamatan yang dilakukan terhadap stabilitas sediaan *hair tonic* yang meliputi uji organoleptis, uji pH, uji bobot jenis, uji viskositas dan uji kesukaan.

Ketujuh, aktivitas sediaan *hair tonic* adalah kemampuan sediaan ekstrak daun kecombrang terhadap pertumbuhan rambut kelinci.

C. Alat & Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini adalah timbangan analitik, batang pengaduk, kertas saring, kapas, blender, *beaker glass*, botol maserasi, *rotary evaporator*, oven, pH meter, piknometer, kain flannel, viskometer *Ostwald*, plat tetes untuk pengujian fitokimia, alat cukur, kandang kelinci.

2. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kecombrang, hewan uji kelinci *New Zealand White*, etanol 96 %, propilen glikol, gliserin, metil paraben, methol, natrium metabisisulfat, *aquades*, kontrol positif, Lieberman-Burchard, Mollisch, serbuk magnesium, ammonia encer, kloroform, pereaksi Bouchardat, Mayer, Dragendorf, HCL 2N, amil alkohol, gelatin 10 %, anisaldehid-asam sulfat, NaOH, krim pencukur.

D. Jalanya Penelitian

1. Determinasi sampel daun kecombrang

Penelitian ini dilakukan tahapan determinasi sampel untuk mengetahui keaslian sampel daun kecombrang serta mengetahui klasifikasi dan morfologinya yang dibuktikan di B2P2TOOT Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan bahan tanaman

Daun kecombrang yang digunakan merupakan daun yang masih segar, utuh, terhindar dari hama, berwarna hijau muda sampai hijau tua yang diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

3. Pembuatan serbuk daun kecombrang

Daun kecombrang diproses menjadi simplisia melalui beberapa tahapan yaitu dilakukan sortasi basah dengan cara dicuci bersih yang bertujuan untuk memisahkan kotoran atau bahan-bahan asing yang tidak diperlukan, kemudian ditiriskan untuk mencegah bertambahnya kandungan air dan pembusukan, setelah itu daun kecombrang dikeringkan di bawah sinar matahari dengan ditutup kain hitam yang bertujuan untuk mengurangi sinar UV yang dapat merusak senyawa tanamannya, setelah itu dilakukan penghalusan dengan memakai blender dan diperoleh serbuk kasar lalu untuk mendapatkan ukuran serbuk yang seragam maka dilakukan pengayakan dengan no mesh 60.

4. Susut pengeringan serbuk daun kecombrang

Susut pengeringan dilakukan pada penelitian ini dengan tujuan memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang dan mengetahui berapa kandungan air serta senyawa yang menguap saat proses pengeringan. Penetapan susut pengeringan serbuk daun kecombrang menggunakan alat *moisture balance* yang memiliki prinsip kerjanya yaitu mengukur jumlah air yang hilang dengan pemanasan suhu 100°C - 105°C. Dilakukan dengan cara memakai serbuk dengan bobot 2 gram yang dimasukkan kedalam alat *moisture balance* hingga alat berbunyi, diperoleh angka yang muncul pada alat dalam satuan persen lalu dicatat sebagai kadar susut pengeringan. Pengujian susut pengeringan serbuk daun kecombrang dilakukan sebanyak tiga replikasi.

5. Pembuatan ekstrak daun kecombrang

Proses pembuatan ekstrak daun kecombrang memakai metode maserasi yang dilakukan selama 3 kali 24 jam dengan cara serbuk simplisia daun kecombrang direndam dengan pelarut etanol 96 % dan sesekali dilakukan penggojokan kemudian di remeserasi dengan setengah bagian pelarut (5 L) etanol 96% selama 1 kali 24 jam sambil sesekali dilakukan penggojokan, setelah itu dilakukan penyaringan agar filtrat dan residu terpisah lalu ditampung filtratnya kemudian diuapkan memakai *rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental daun kecombrang.

6. Susut pengeringan ekstrak daun kecombrang

Susut pengeringan dilakukan pada penelitian ini dengan tujuan memberikan batasan maksimal besarnya senyawa yang hilang pada proses pengeringan, dilakukan dengan cara memakai ekstrak dengan bobot satu sampai dua gram dan dimasukkan ke botol timbang dangkal tertutup yang sudah ditara serta dipanaskan pada suhu 105°C selama waktu 30 menit. Serbuk yang ada pada botol timbang digoyang-goyangkan agar serbuk simplisia merata kemudian ditimbang, lalu serbuk simplisia dimasukkan pada oven dengan suhu 105°C selama waktu 5 jam dengan keadaan tutupnya dibuka, sebelum dilakukan proses pengeringan atau setiap pengeringan, botol timbang didinginkan dengan posisi botol ditutup dan dimasukkan ke dalam eksikator (Pendingin) hingga mencapai suhu ruang. Proses pengeringan dilakukan berlanjut dan timbang kembali selama 1 jam hingga adanya perbedaan antara penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25 % (Depkes RI, 2000). Pengujian susut pengeringan ekstrak daun kecombrang dilakukan sebanyak tiga replikasi.

7. Identifikasi kandungan kimia serbuk dan ekstrak daun kecombrang

Dilakukan identifikasi kandungan kimia dengan tujuan untuk mengetahui senyawa yang terkandung dalam ekstrak yang dihasilkan dari ekstraksi memakai pelarut etanol 96 %. Identifikasi kandungannya meliputi senyawa flavonoid, saponin, tannin dan alkaloid.

7.1 Uji flavonoid. Sampel ekstrak sebanyak 0,1 gram dimasukkan dalam tabung reaksi dan ditambahkan air kemudian didihkan, selanjutnya disaring dan filtratnya digunakan untuk pengujian. Filtrat yang didapatkan dibagi menjadi dua bagian, bagian pertama dibuat sebagai blanko, bagian kedua ditambahkan 0,05 g serbuk Mg, 1 mL larutan asam klorida dan beberapa tetes larutan amil alkohol, lalu dikocok kuat. Positif flavonoid ditunjukkan dengan hasil berwarna kuning atau jingga yang tertarik oleh amil alkohol (Febriyanti *et al.*, 2014).

7.2 Uji saponin. Sampel ekstrak sebanyak 0,1 gram dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan air kemudian dipanaskan, setelah ekstrak dingin kemudian dikocok selama 1 menit. Saponin yang ada pada ekstrak akan membentuk busa sekurang-kurangnya selama 1 menit kemudian ditambahkan asam klorida 1 N, jika busa yang terbentuk stabil maka sampel ekstrak positif mengandung saponin (Gangga *et al.*, 2017).

7.3 Uji tanin. Sampel ekstrak sebanyak 0,1 gram ditambahkan aquadest panas sambil diaduk lalu dinginkan, lalu ditambahkan 5 tetes NaCl 10 % dan disaring. Filtrat yang didapatkan dibagi menjadi dua bagian tabung reaksi. Tabung reaksi pertama berisi filtrat digunakan sebagai blanko. Tabung reaksi kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi FeCl₃ 1%, jika terbentuk warna hijau kehitaman maka sampel ekstrak positif mengandung tanin terhidrolisis dan jika terbentuk warna hijau kecoklatan maka positif mengandung tannin terkondensasi (Endarini, 2016).

7.4 Uji alkaloid. Sampel ekstrak sebanyak 0,1 gram dibasakan dengan ammonia encer 10 % lalu digerus dalam mortir, kemudian ditambahkan kloroform sambil terus digerus. Lapisan kloroform dipipet sambil disaring, kemudian ditambahkan HCl 2 N. Filtrat dibagi menjadi tiga bagian, pada bagian pertama digunakan sebagai blanko, bagian kedua ditetesi dengan larutan pereaksi Mayer yang terbentuk endapan menggumpal berwarna putih atau kuning, bagian ketiga ditetesi dengan larutan pereaksi Dragendorff, hasil positif alkaloid ditandai dengan terbentuknya endapan putih pada pereaksi mayer dan endapan warna merah atau jingga pada pereaksi Dragendorff (Febriyanti *et al.*, 2014).

8. Formulasi sediaan *hair tonic* ekstrak daun kecombrang

Tabel 1. Rancangan formula *hair tonic* ekstrak daun kecombrang dengan berbagai konsentrasi ekstrak kental (Desriani *et al.*, 2018)

| Bahan | Kontrol negatif (%) | Komposisi (%) | | |
|-------------------------|------------------------|---------------|-----------|-----------|
| | | Formula 1 | Formula 2 | Formula 3 |
| Ekstrak daun kecombrang | - | 7,5 | 10 | 12,5 |
| Gliserin | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Etanol 96 % | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Propilen glikol | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Metil paraben | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Menthol | 0,1 | 0,1 | 0,1 | 0,1 |
| Natrium metabisulfit | 0,075 | 0,075 | 0,075 | 0,075 |
| Aquadest | Ad 100 mL | Ad 100 mL | Ad 100 mL | Ad 100 mL |

Keterangan :

- Formula 1 : menggunakan konsentrasi ekstrak daun kecombrang 7,5 %
- Formula 2 : menggunakan konsentrasi ekstrak daun kecombrang 10 %
- Formula 3 : menggunakan konsentrasi ekstrak daun kecombrang 12,5 %
- Kontrol negatif : menggunakan basis *hair tonic* tanpa memakai konsentrasi ekstrak daun kecombrang
- Kontrol positif : menggunakan sediaan komersil

9. Pembuatan sediaan *hair tonic* ekstrak daun kecombrang

Pembuatan sediaan *hair tonic* ekstrak daun kecombrang dibuat menjadi 3 formula yang dibedakan pada variasi konsentrasi ekstrak

daun kecombrang sebesar 7,5 %, 10 % dan 12,5 %. Pembuatan dilakukan ekstrak daun kecombrang dilarutkan dalam etanol 96 %, lalu dilarutkan metil paraben dan menthol kedalam etanol secukupnya, ditambahkan propilen glikol secara bertahap, dan ditambahkan natrium metabisulfit, lalu dicampur sampai homogen. Larutan ekstrak daun kecombrang dicampur dengan larutan metil paraben dan mentol, kemudian dilarutkan hingga homogen dan ditambahkan aquades sebanyak 100 mL.

10. Pengujian mutu fisik sediaan *hair tonic* ekstrak daun kecombrang

10.1 Uji organoleptis. Pengujian organoleptis dilakukan untuk mengamati tampilan fisik sediaan yang meliputi warna, bentuk dan bau. Sediaan *hair tonic* disimpan pada suhu ruang dan kemudian diamati. Syarat mutu fisik yang baik yaitu uji organoleptis dengan bentuk yang homogen dan berwarna seperti warna ekstrak. Sediaan di uji organoleptis dengan menggunakan tiga replikasi pada masing-masing formula.

10.2 Uji pH. Uji pH dilakukan untuk mengetahui tingkat asam dan basa pada sediaan, memiliki pH pada rentang 3-7 yang sesuai dengan pH kulit kepala. Uji pH jika pH terlalu asam dapat menyebabkan iritasi pada kulit dan jika terlalu basa dapat menyebabkan kulit bersisik (Rowe *et al*, 2009). Pengujian pH dilakukan menggunakan alat pH meter untuk menentukan nilainya. Pengujian diawali dengan alat pH meter yang sudah dikalibrasi dengan larutan kalibrator pH 4 dan 7, lalu elektroda dicuci serta dikeringkan dengan air demineralisasi dan dengan kertas tisu. Bagian elektroda dicelupkan pada sampel hingga pH meter menunjukkan pembacaan stabil. Diperhatikan pembacaan angka pada pH meter lalu catat suhu pada pengukuran pH dan cuci kembali bagian elektroda memakai air demineralisasi setelah selesai pengukuran. Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan tiga replikasi pada masing-masing formula sediaan.

10.3 Uji bobot jenis. Pengujian bobot jenis dilakukan menggunakan piknometer yang sudah bersih dan kering, pengujian dilakukan dengan memakai tiga replikasi pada masing masing formula sediaan. Ditimbang pikrometer kosong (A) pada suhu ruang. Timbang piknometer berisi air suling (B), lalu piknometer yang berisi sediaan ditimbang (C) dan dicari berat jenisnya memakai rumus berikut :

$$\text{Bj sampel} : \frac{B-C}{A-C} = \frac{m}{v}$$

Keterangan :

- A : Berat piknometer + air suling (g)
- B : Berat piknometer + sediaan (g)
- C : Berat piknometer kosong (g)

10.4 Uji viskositas. Pengujian viskositas menggunakan alat viskometer Ostwald untuk mengetahui tingkat kekentalan sediaan dengan cara menghitung waktu alir sediaan dalam melewati dua tanda batas. Syarat baku mutu (SNI) 16- 4955-1998 viskositas yaitu ($< 5 \text{ cPs}$). Pengujian viskositas dilakukan dengan menggunakan tiga replikasi pada masing-masing formula sediaan.

10.5 Uji stabilitas. Pengujian stabilitas dilakukan dengan metode *cycling test* untuk mempercepat evaluasi kestabilan. *Metode cycling test* dilakukan selama 6 siklus. Sediaan disimpan dengan suhu dingin kurang lebih 4°C selama waktu 24 jam lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu kurang lebih 40°C selama 24 jam, pada proses ini dihitung 1 siklus dan diulangi sebanyak 6 siklus (Rieger, 2000). Pengujian stabilitas dilakukan dengan tiga replikasi sediaan pada masing masing formula.

11. Uji kesukaan

Uji kesukaan atau *hedonic test* pada penelitian ini bertujuan untuk mengevaluasi daya terima atau tingkat kesukaan panelis terhadap produk sediaan yang dihasilkan. Sejumlah 20 orang panelis dipilih secara acak kemudian mengisi kuisioner yang telah disediakan, setiap orang memiliki kesempatan yang sama untuk melakukan penilaian terhadap penampilan, warna dan aroma dari ketiga formula sediaan hair tonic ekstrak daun kecombrang. Skala *hedonic* yang digunakan berkisar antara 1-4 dimana : (1) sangat tidak suka, (2) tidak suka, (3) suka, dan (4) sangat suka (Rahayu, 2016).

12. Uji aktivitas pertumbuhan rambut

Pengujian aktivitas sediaan *hair tonic* ekstrak daun kecombrang terhadap pertumbuhan rambut dilakukan menggunakan hewan uji kelinci *New Zealand White* sebanyak 5 ekor. Hewan uji diadaptasi selama 1 minggu dengan diberi pakan yang bernutrisi dengan jumlah yang sama. Pengujian aktivitas tumbuhnya bulu pada kelinci dilakukan beberapa tahapan yakni bulu kelinci dibersihkan terlebih dahulu dengan cara dicukur memakai krim pencukur pada bulu bulu halus hingga tidak ada bulu halus yang tersisa. Punggung kelinci yang sudah dicukur

bersih kemudian dibagi menjadi 5 bagian yang ukuran masing-masingnya 2x2 cm dengan jarak antar muka 1 cm. Sediaan *hair tonic* dioleskan sebanyak 1 mL pada tiap bagian kelompok yang sudah dibagi. Punggung kelinci dibersihkan terlebih dahulu dengan kapas yang dibasahi aquadest lalu dilakukan pengolesan.

Setiap bagian diberi perlakuan yang berbeda yaitu :

Kelompok I : diolesi sediaan basis sebagai kontrol negatif

Kelompok II : diolesi sediaan komersil sebagai kontrol positif

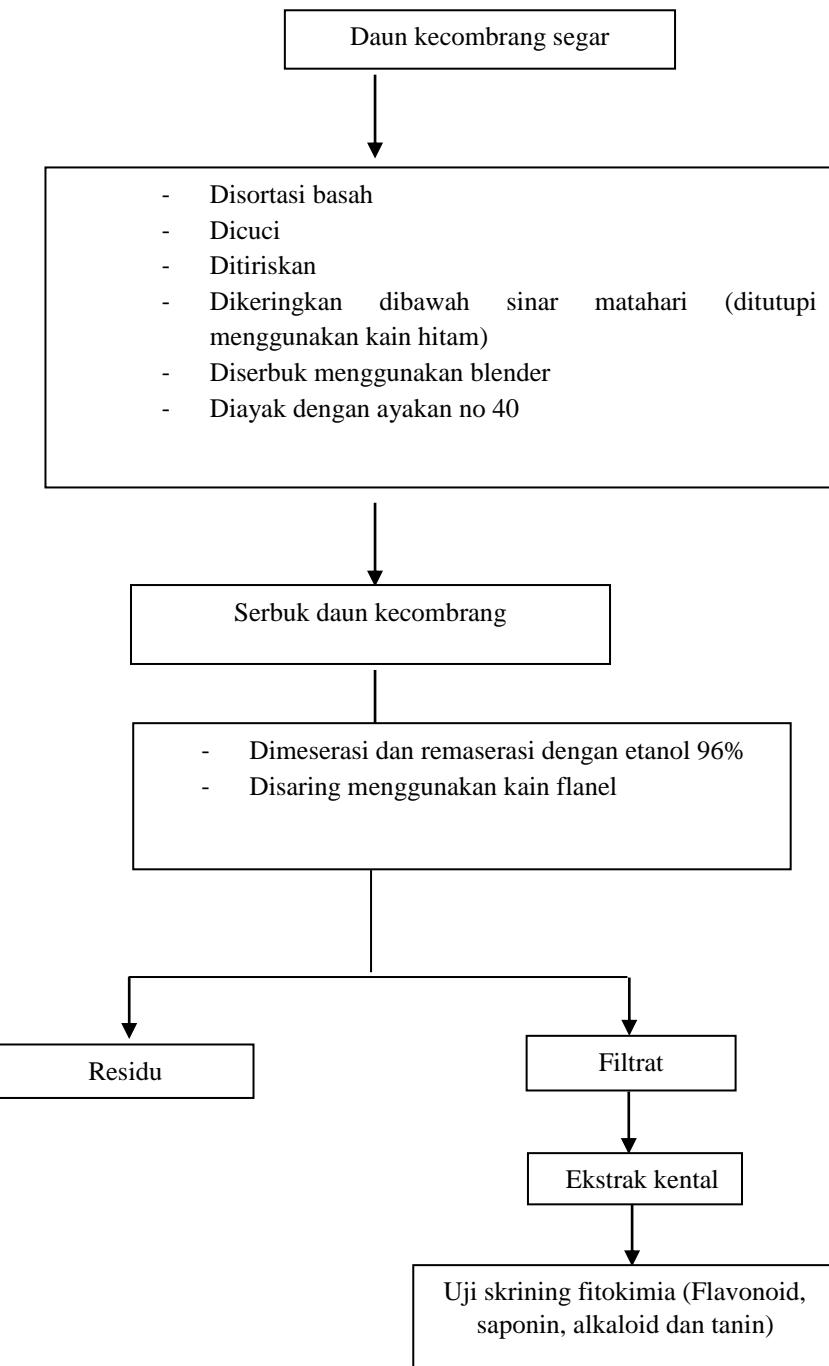
Kelompok III : diolesi sediaan *hair tonic* ekstrak daun kecombrang dengan konsentrasi 7,5 % (Formula 1)

Kelompok IV : diolesi sediaan *hair tonic* ekstrak daun kecombrang dengan konsentrasi 10 % (Formula 2)

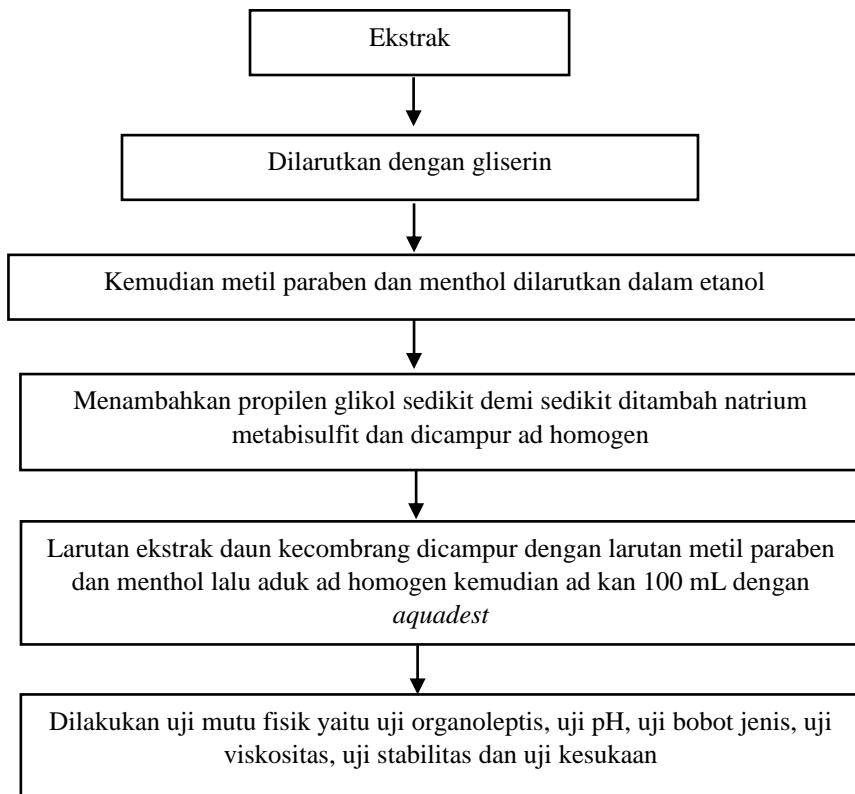
Kelompok V : diolesi sediaan *hair tonic* ekstrak daun kecombrang dengan konsentrasi 12,5 % (Formula 3)

Pengolesan dilakukan sebanyak 2 kali dalam sehari pada waktu pagi dan sore pada masing-masing kelompok. Pemberian *hair tonic* dilakukan selama 21 hari karena dapat memberikan aktivitas pertumbuhan pada rambut secara maksimal (Khesia, 2012). Pengukuran panjang rambut dilakukan terhadap masing-masing kelompok pada hari ke-7, ke-11 dan hari ke-21. Panjang rambut yang diukur memakai jangka sorong dengan cara tiap kelompok diambil sebanyak 10 helai rambut memakai pinset, lalu ditempelkan pada selotip bening dan diukur panjang rambutnya. Penimbangan dilakukan terhadap bobot rambut pada hari ke-21 dengan cara mencukur rambut yang telah tumbuh pada masing-masing kelompok perlakuan lalu timbang tambut pada tiap kelompok perlakuan.

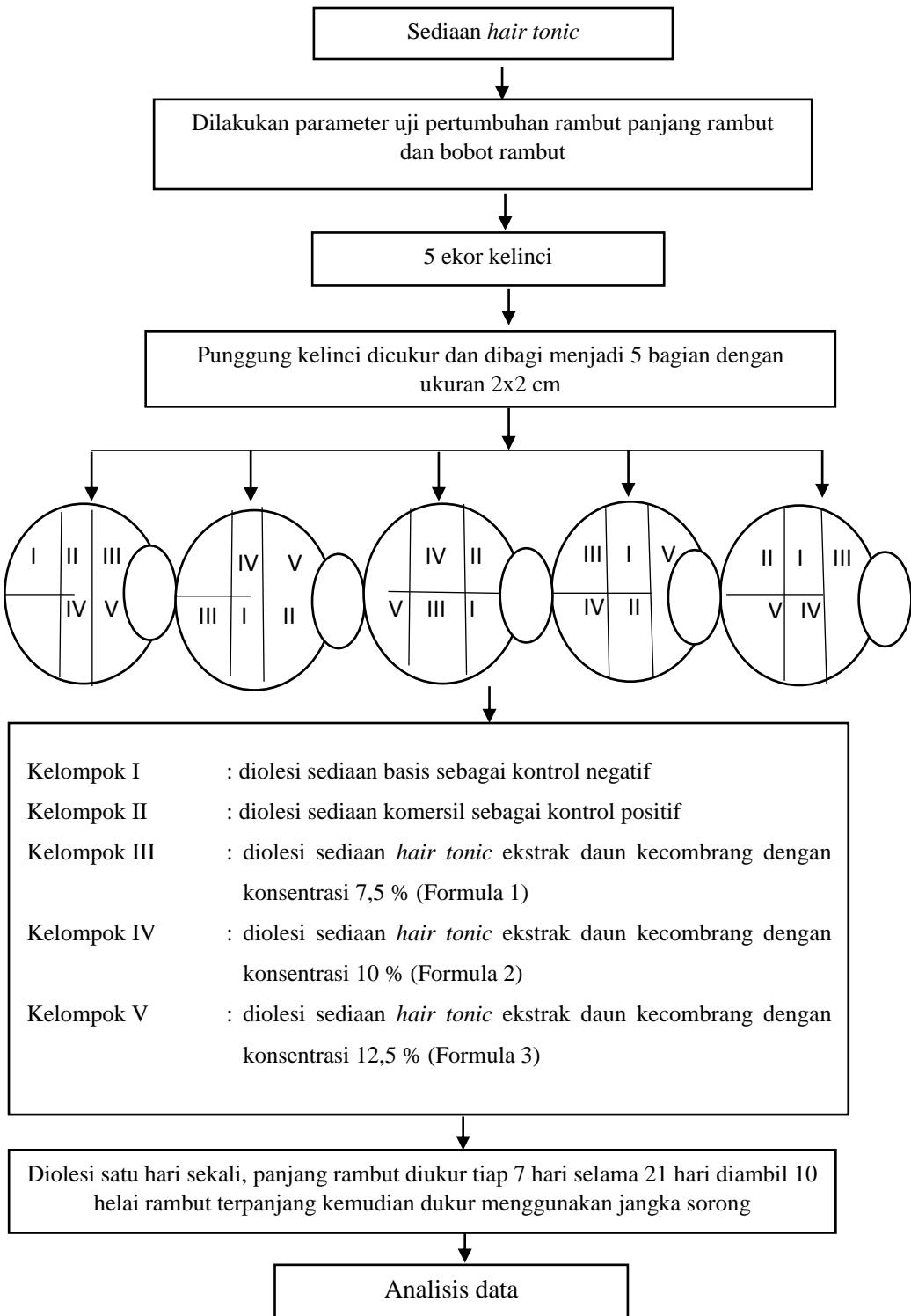
E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 10. Skema pembuatan ekstrak daun kecombrang



Gambar 11. Skema pembuatan sediaan *hair tonic* ekstrak daun kcombrang.



Gambar 12. Skema uji aktivitas pertumbuhan rambut *hair tonic* ekstrak daun kecombrang

F. Analisis Data

Dilakukan analisis data dalam penelitian ini menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Data yang diperoleh dari uji aktivitas pertumbuhan rambut dianalisis menggunakan *Saphiro - Wilk*. Hasil yang didapatkan jika nilai signifikan $< 0,05$ maka diuji dengan Kruskal walls untuk mengetahui kebermaknaan lebih dari dua kelompok, jika nilai signifikan $> 0,05$ maka selanjutnya dilakukan uji ANOVA dua arah kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pada masing-masing perlakuan lalu dilanjutkan dengan uji *Tukey*.