

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun tanaman seledri (*Apium graveolens L.*) yang berada di daerah Tawangmangu Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pomade ekstrak daun seledri dengan variasi konsentrasi *beeswax* yang berbeda yaitu 7%, 8%, dan 9%

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi Variabel Utama**

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah serbuk daun seledri yang dikstraksi dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96%.

Variabel utama kedua adalah variasi konsentrasi *beeswax* sediaan pomade dari ekstrak daun seledri yang akan dibuat sediaan uji.

Variabel utama ketiga adalah hewan uji yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci Jantan usia 2-3 bulan dan berat 1,5-2kg.

#### **2. Klasifikasi Variabel**

Variabel utama yang telah diidentifikasi lebih dahulu dapat diidentifikasi ke dalam berbagai macam variabel yaitu 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 konsentrasi pomade ekstrak daun seledri dengan berbagai macam konsentrasi *beeswax*.

Variabel tergantung adalah variabel yang faktornya diamati dan diukur untuk menentukan pengaruh yang disebabkan oleh variabel bebas. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas pertumbuhan rambut kelinci dari sediaan pomade ekstrak daun seledri.

Variabel terkontrol adalah variabel yang dianggap berpengaruh selain variabel bebas, sehingga perlu ditetapkan klasifikasinya agar dapat diulang dalam penelitian lain secara tepat. Variabel terkontrol dalam penelitian ini, peralatan yang digunakan, lingkungan, proses pembuatan sediaan pomade, pemilihan hewan uji dan peneliti atau manusia.

### 3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun seledri adalah bagian dari tanaman seledri (*Apium graveolens L.*) yang berupa daun segar, sehat, bersih, yang diperoleh dari kebun pertanian di daerah Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun seledri adalah serbuk yang diperoleh dari daun seledri yang dicuci bersih dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel setelah itu dikeringkan menggunakan alat pengering (oven) pada suhu 40-50°C, kemudian disortir dan ditimbang. Lalu diblender dan diayak dengan pengayak no.40.

Ketiga, ekstrak daun seledri adalah hasil maserasi serbuk dengan menggunakan pelarut etanol 96% dan dipekatkan dengan evaporator sampai bebas etanol

Keempat, sediaan pomade ekstrak daun seledri adalah sediaan pomade yang diformulasikan dengan berbagai konsentrasi *beeswax* dalam pembuatan pomade.

Kelima, hewan uji yang digunakan pada penelitian adalah jenis kelinci putih *New Zealand*

Keenam, Sediaan pomade adalah sediaan yang digunakan untuk merangsang pertumbuhan rambut pada kebotakan atau kerontokan sehingga pada sediaan dapat diuji mutu fisik dan uji stabilitas adalah pengamatan yang dilakukan terhadap stabilitas sediaan pomade yang meliputi uji organoleptis, uji pH, uji homogenitas, uji daya sebar, uji daya lekat, uji iritasi kulit, uji viskositas, dan uji stabilitas

Ketujuh, aktivitas sediaan pomade adalah kemampuan sediaan ekstrak daun seledri untuk pertumbuhan rambut kelinci.

### C. Alat dan Bahan

#### 1. Alat

Bejana maserasi, rotary evaporator, timbangan analitik, waterbath, cawan penguap, beaker glass, gelas ukur, batang pengaduk, lemari pendingin, kaca arloji, Erlenmeyer, corong bucher, spatel, tempat pomade.

#### 2. Bahan

**2.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan adalah daun seledri yang segar, yang diperoleh dari pertanian di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

**2.2 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan adalah etanol 96, vaselin alba, *beeswax*, lanolin, span 80, nipagin, vitamin e, oleum tea, dan gliserin.

**2.3 Hewan uji.** Hewan uji yang digunakan untuk penelitian ini adalah kelinci putih *New Zealand* dengan berat 1,5-2kg dan berumur 2-3 bulan yang diperoleh dari laboratorium Farmakologi Universitas Setia Budi Surakarta.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. Determinasi Tanaman Seledri

Sebelum memulai penelitian, penting untuk memastikan identitas tumbuhan dengan tujuan mencegah kesalahan dalam pengambilan tanaman untuk penelitian sehingga jenis tumbuhan yang diambil tepat dan dapat diverifikasi kebenaran spesies yang digunakan. Di Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Obat Tradisional (B2P2TOOT) di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah. Determinasi dilakukan untuk menetapkan kebenaran sampel daun seledri (*Apium graveolens* L.) yang akan digunakan dalam penelitian ini yang kemudian dicocokkan dengan morfologi tanaman.

### 2. Pengambilan Bahan

Sampel daun seledri yang segar diambil dari pertanian yang ada di Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

### 3. Pembuatan Serbuk Daun Seledri

Daun seledri yang digunakan yaitu daun segar yang akan dibuat simplisia dengan cara dicuci bersih bertujuan untuk menghindari kotoran pada daun, kemudian daun seledri dikeringkan dengan cara dioven bertujuan untuk mengurangi kadar air untuk mencegah pertumbuhan jamur dan bakteri. Serbuk diayak menggunakan kehalusan serbuk simplisia untuk menghasilkan ekstrak saringan nomor 40 (Depkes RI, 2008). Kemudian disimpan dalam wadah kering, tertutup rapat, dan terhindar dari cahaya secara langsung.



Gambar 4. Pembuatan serbuk daun seledri

#### **4. Susut Pengeringan Serbuk**

Pengujian susut pengeringan dilakukan menggunakan *moisture balance* pada suhu 150°C dengan menimbang 2 gram serbuk daun seledri, kemudian dimasukkan kedalam lempeng alat selama kurang lebih 15 menit hingga muncul hasil pengukurannya. Pengujian susut pengeringan dilakukan sebanyak 3 kali ditandai dengan diperolehnya bobot konstan. Syarat susut pengeringan simplisia daun seledri yaitu tidak > 10% (FHI, 2017).

#### **5. Pembuatan Ekstrak Etanol 96% Daun Seledri Secara Maserasi**

Serbuk simplisia daun seledri diekstraksi menggunakan metode maserasi, menurut Formularium Herbal Indonesia perbandingan serbuk simplisia dengan etanol adalah 1:10. Sebanyak 750 gram simplisia daun seledri direndam dalam etanol 96% sebanyak 7.500 ml dalam wadah tertutup rapat selama 24 jam, dengan 6 jam perendaman pertama dilakukan pengadukkan sesekali kemudian didiamkan selama 18 jam. Setelah maserasi selama 24 jam, langkah berikutnya dilakukan penyaringan yang bertujuan untuk mendapatkan filtrat menggunakan kain flannel yang ditampung dalam wadah kaca. Hasil penyaringan ampas kemudian dilakukan proses maserasi lagi dengan etanol 96% sebanyak 3.750 ml untuk mendapatkan filtrat 2. Hasil filtrat digabungkan untuk dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 40-60°C dengan putaran 65 rpm hingga dihasilkan ekstrak daun seledri yang kental (Susanty dan Bachmid, 2020).

#### **6. Pengujian Kadar Air**

Penetapan kadar air dilakukan dengan metode destilasi toluen. Toluena yang digunakan dijenuhkan dengan air terlebih dahulu, setelah dikocok didiamkan. Lalu kedua lapisan air dan toluena akan memisah, lapisan air dibuang. Kemudian timbang 20 gram serbuk daun seledri dan dimasukkan kedalam labu alas bulat dan ditambahkan kurang lebih 200 ml toluena yang telah dijenuhkan. Labu dipanaskan selama 15 menit. Setelah semuanya tersuling dilanjutkan penyulingan selama 5 menit. Tabung didinginkan sampai suhu ruangan. Volume air dibaca setelah toluena dan air memisah sempurna. Kadar air dinyatakan dalam % v/b, dengan syarat hasilnya kurang dari 10% (FHI, 2017).

#### **7. Pengujian Bebas Etanol Ekstrak Daun Seledri**

Pemeriksaan bebas etanol pada ekstrak bertujuan untuk memastikan bahwa ekstrak pekat bebas dari etanol dengan reaksi esterifikasi. Prosedur dilakukan dengan menambahkan asam asetat dan

asam sulfat pekat ke dalam tabung reaksi yang berisi ekstrak kemudian dipanaskan. Jika tercium bau ester khas dari etanol maka ekstrak masih mengandung etanol.

## 8. Identifikasi Kandungan Kimia Serbuk Dari Ekstrak Daun Seledri

Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun seledri dilakukan untuk mengetahui apakah dalam ekstrak mengandung alkaloid, saponin, flavonoid, tannin, triterpenoid yang terkandung dalam ekstrak daun seledri. Identifikasi kandungan kimia ekstrak daun seledri adalah sebagai berikut :

**8.1 Alkaloid.** Sebanyak 0,5 gr ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambah 1 ml asam klorida 2N dan tambahkan sebanyak 9 ml air suling 31 kemudian sekitar 2 menit dipanaskan diatas tangas setelah itu disaring. Hasil filtrat kemudian dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi dengan masing-masing tabung sebanyak 3 tetes. Kedalam tabung pertama dimasukkan 3 tetes filtrat dan ditambahkan 2 tetes pereaksi *dragendrof*, positif alkaloid jika terbentuk endapan warna jingga atau merah bata. Tabung yang kedua diambil 3 tetes filtrat ditambahkan pereaksi *mayer* sebanyak 2 tetes dan jika positif ditandai dengan adanya endapan berwarna kuning atau putih. Tabung ketiga diambil 3 tetes filtrat ditambahkan 2 tetes pereaksi *bouchardat* dan hasil positif ditandai dengan endapan coklat-hitam (Karisma, 2016).

**8.2 Saponin.** Sebanyak 0,5 gr ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambah 10 ml aquadest lalu dikocok, dipanaskan hingga 2-3 menit lalu didinginkan dan dikocok dengan kuat, uji positif jika terbentuk busa yang kuat (Karisma, 2016).

**8.3 Flavonoid.** Metode yang digunakan adalah uji sianidin/Shibata atau sering disebut uji Willstatter. Sebanyak 5 ml filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan serbuk magnesium, asam hidroklorida pekat, dan amil alkohol. Campuran dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Hasil positif flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning, atau jingga pada lapisan amil alkohol (Karisma, 2016).

**8.4 Tanin.** Sebanyak 1 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan dengan besi (III) klorida. Hasil positif tannin ditunjukkan dengan larutan menjadi biru kehitaman atau hijau kehitaman (Karisma, 2016).

**8.5 Steroid/Triterpenoid.** Sebanyak 1 ml ekstrak diuapkan dalam cawan penguap. Residu ditambahkan beberapa tetes pereaksi Liberman-Burchard yang berisi anhidra asetat dan asam sulfat pekat (2:1). Hasil positif triterpenoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna biru sampai hijau. Terbentuknya warna merah sampai ungu menunjukkan positif triterpenoid (Karisma, 2016).

## 9. Formula Pomade Ekstrak Daun Seledri

Pembuatan pomade daun seledri dimulai dengan membersihkan dan menyiapkan semua alat yang digunakan dalam penelitian. Pembuatan pomade ekstrak daun seledri. Formula pomade :

**Tabel 1. Formula pomade penumbuh rambut**

Bahan	Formula %						Fungsi
	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)	F4 (%)	F5 (%)	F6 (%)	
Ekstrak daun seledri	-	-	-	2	2	2	Zat aktif
Vaselin alba	40	40	40	40	40	40	Basis
<i>Beeswax</i>	7	8	9	7	8	9	Basis
Lanolin	9	9	9	9	9	9	Pelembab
Span 80	8	8	8	8	8	8	Emulgator
Nipagin	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengawet
Vitamin E	2	2	2	2	2	2	Antioksidan
Oleum tea	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	Pewangi
Gliserin ad	100	100	100	100	100	100	Humektan

Keterangan :

F1 = Tanpa ekstrak seledri dengan variasi *beeswax* 7%

F2 = Tanpa ekstrak seledri dengan variasi *beeswax* 8%

F3 = Tanpa ekstrak seledri dengan variasi *beeswax* 9%

F4 = Ekstrak daun seledri 2% dengan variasi *beeswax* 7%

F5 = Ekstrak daun seledri 2% dengan variasi *beeswax* 8%

F6 = Ekstrak daun seledri 2% dengan variasi *beeswax* 9%

## 10. Pembuatan Sediaan Pomade Ekstrak Daun Seledri

Siapkan alat dan bahan, timbang sesuai yang dibutuhkan. Kemudian masukkan vaselin alba, lanolin, cera alba, ke dalam beaker glass, lalu dipanaskan sampai mencair, setelah itu dimasukkan nipagin, vitamin e, oleum tea dan gliserin sambil diaduk kemudian dimasukkan span 80 dan ekstrak daun seledri secara perlahan diaduk sampai homogen, setelah itu dituangkan ke dalam wadah dan ditunggu sampai dingin.

## 11. Pengujian sifat fisik pomade ekstrak daun seledri

**11.1 Uji Organoleptis.** Uji organoleptis dilakukan dengan mengamati warna, bentuk, dan bau sediaan. Uji organoleptis dilakukan dengan menggunakan indra visual (Syafitri *et al.*, 2024).

**11.2 Uji pH.** Pengujian nilai pH merupakan karakteristik yang perlu diperhatikan dalam suatu formulasi sediaan topical. Uji pH bertujuan untuk mengetahui nilai pH suatu sediaan apakah dapat diterima oleh kulit. Nilai pH yang dianjurkan pada suatu sediaan topical adalah pada rentang 4,5-6,5. Kondisi sediaan yang terlalu asam akan mengakibatkan kulit menjadi iritasi, sedangkan kondisi yang terlalu basa dapat membuat kulit menjadi bersisik. Nilai pH menurut standar (SNI No. 06-2588) yaitu 4,5-6,5 (Syafitri *et al.*, 2024).

**11.3 Uji Homogenitas.** Pengujian homogenitas dilakukan dengan melihat tidak ada butiran kasar atau bahan yang tidak tercampur rata dan membentuk gumpalan (Syafitri *et al.*, 2024).

**11.4 Uji Daya Sebar.** Cara pengujian daya sebar pomade dilakukan dengan cara menimbang sebanyak 0,5 gr sediaan, kemudian diletakkan diatas grafik dan ditutup. Diamkan selama 1 menit dan ukur diameter sediaan yang menyebar. Tentukan juga diameter yang menyebar jika pada kaca arloji diberi beban 50gr, 100gr, dan 150 gr (Syafitri *et al.*, 2024).

**11.5 Uji Daya Lekat.** Cara pengujian daya lekat dilakukan dengan cara menimbang 0,5 gram pomade diletakkan dibagian Tengah objek glass kemudian diletakkan lagi dengan objek glass yang lain. Kemudian beban sebesar 1 kg diletakkan diatasnya selama 5 menit. Kemudian menghitung waktu yang diperlukan 2 gelas objek tersebut sampai terlepas (Adriani *et al.*, 2024).

**11.6 Uji Viskositas.** Sediaan dimasukkan dalam beaker glass, lalu dipasang spindle no 7. Kemudian spindle diturunkan dalam sediaan hingga batas yang ditentukan. Pengukuran dilakukan dengan alat viscometer, selanjutnya celupkan ke dalam sediaan kemudian alat dihidupkan sampai alat menunjukkan nilai viskositas sediaan. Nilai viskositas dalam satuan mPas atau cP diperoleh dari hasil tampilan yang muncul. Nilai viskositas sediaan pomade yang baik menurut SNI yaitu 2.000 hingga 50.000 cP.

**11.7 Uji Stabilitas.** Pemeriksaan stabilitas dengan metode freeze and thaw dilakukan dengan menyimpan sediaan dalam botol plastik bening pada suhu 4°C selama 24 jam kemudian dipindahkan kesuhu 40°C selama 24 jam (dihitung sebagai 1 siklus), dilanjutkan sampai 6 siklus. Kemudian diamati perubahan fisik yang terjadi, apakah terjadi perubahan pada sediaan pomade yang diamati secara visual (Syafitri *et al.*, 2024).

## 12. Uji Aktivitas Pertumbuhan Rambut

Pomade ekstrak daun seledri diuji aktivitas pertumbuhan rambut menggunakan 5 kelinci putih New Zealand yang sehat dengan berat badan 1,5-2 kg. sebelum digunakan untuk percobaan, kelinci diadaptasi selama 1 minggu. Hewan uji dinyatakan sehat bila tidak menunjukkan penurunan berat badan yang berarti dan secara visual tidak menunjukkan gejala penyakit. Punggung kelinci dibersihkan dari rambut dengan cara dicukur hingga bersih sampai rambut-rambut halus juga terbangun, kemudian dibagi menjadi 6 bagian yang masing-masing berbentuk segi empat 4x4 cm dan jarak antar daerah 1 cm. setelah pengukuran dan sebelum dilakukan pengolesan. Pemberian pomade ekstrak daun seledri dilakukan 1 kali sehari. Hari pertama pengolesan dianggap hari ke-1, pemberian pomade ekstrak daun seledri dilakukan selama 21 hari. Pengamatan panjang rambut pada tiap daerah dilakukan pada hari ke-7, ke-14, ke-21. Sebanyak 10 rambut kelinci terpanjang diukur panjangnya dengan jangka sorong, selain panjang rambut pengukuran bobot rambut juga dilakukan untuk mengetahui kelembatan rambut. Pengukuran bobot dilakukan pada hari ke-21 dengan cara mengukur rambut kelinci yang tumbuh pada daerah uji kemudian ditimbang menggunakan timbangan analitik.

Daerah 1 : Kontrol negatif (Basis sediaan pomade tanpa ekstrak daun seledri)  
Daerah 2 : Menggunakan konsentrasi ekstrak daun seledri 2% dengan variasi beeswax 7%

Daerah 3 : Menggunakan konsentrasi ekstrak daun seledri 2% dengan variasi beeswax 8%

Daerah 4 : Menggunakan konsentrasi ekstrak daun seledri 2% dengan variasi beeswax 9%

Daerah 5 : Kontrol positif (Sediaan pomade najpra®)

Daerah 6 : Tanpa perlakuan apapun

Bagian-bagian tersebut adalah :

1	2
3	4
5	6

**Gambar 5. Daerah perlakuan hewan uji**



### E. Analisis Data

Dari hasil pengujian efek sediaan pomade ekstrak daun seledri (*Apium graveolens* L) dengan variasi konsentrasi *beeswax* diperoleh data pertumbuhan rambut kelinci yang terdiri atas Panjang rambut dan bobot rambut dianalisa data menggunakan 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,

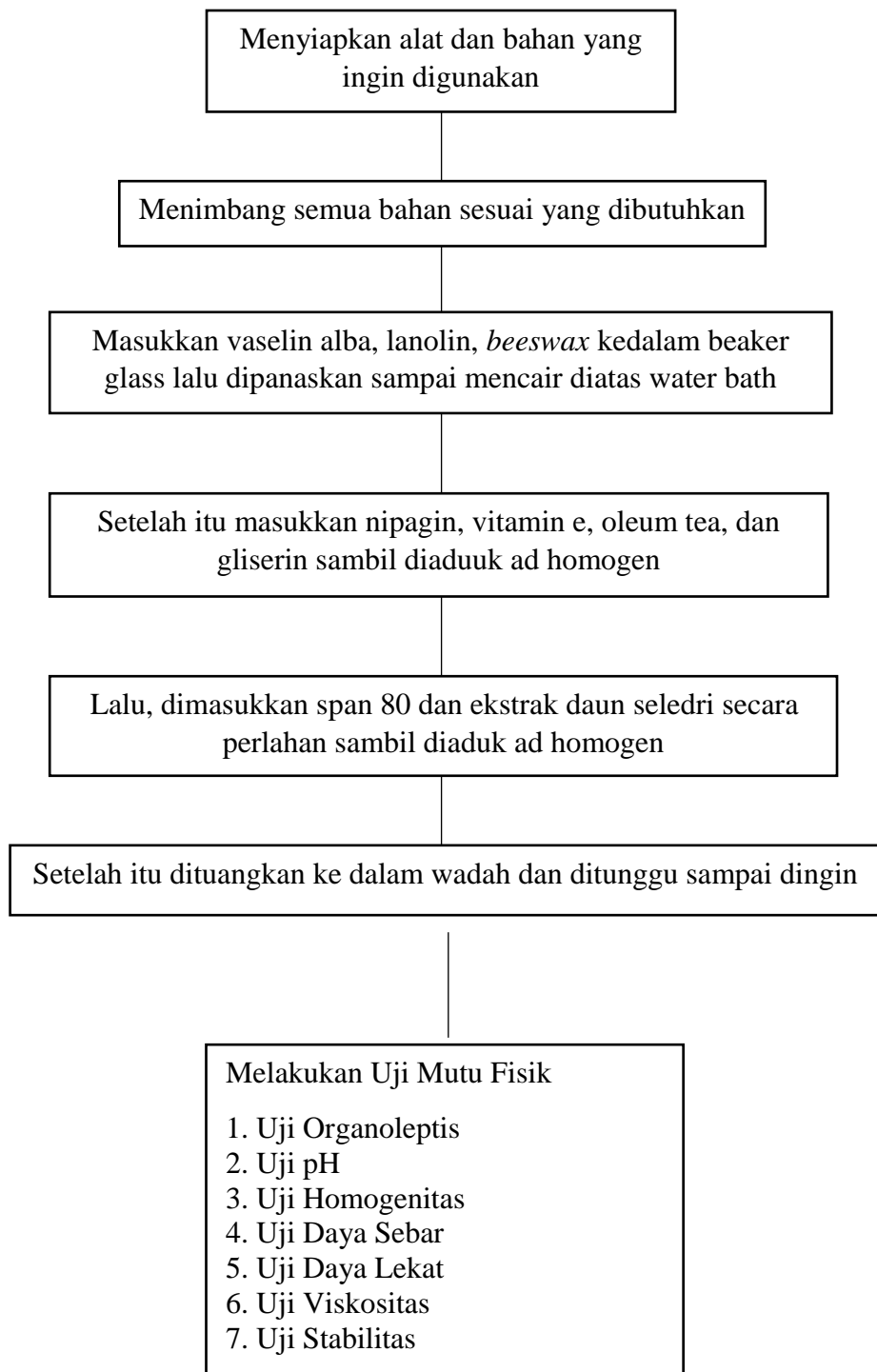
### F. Skema Jalannya Penelitian

#### 1. Pembuatan Ekstrak



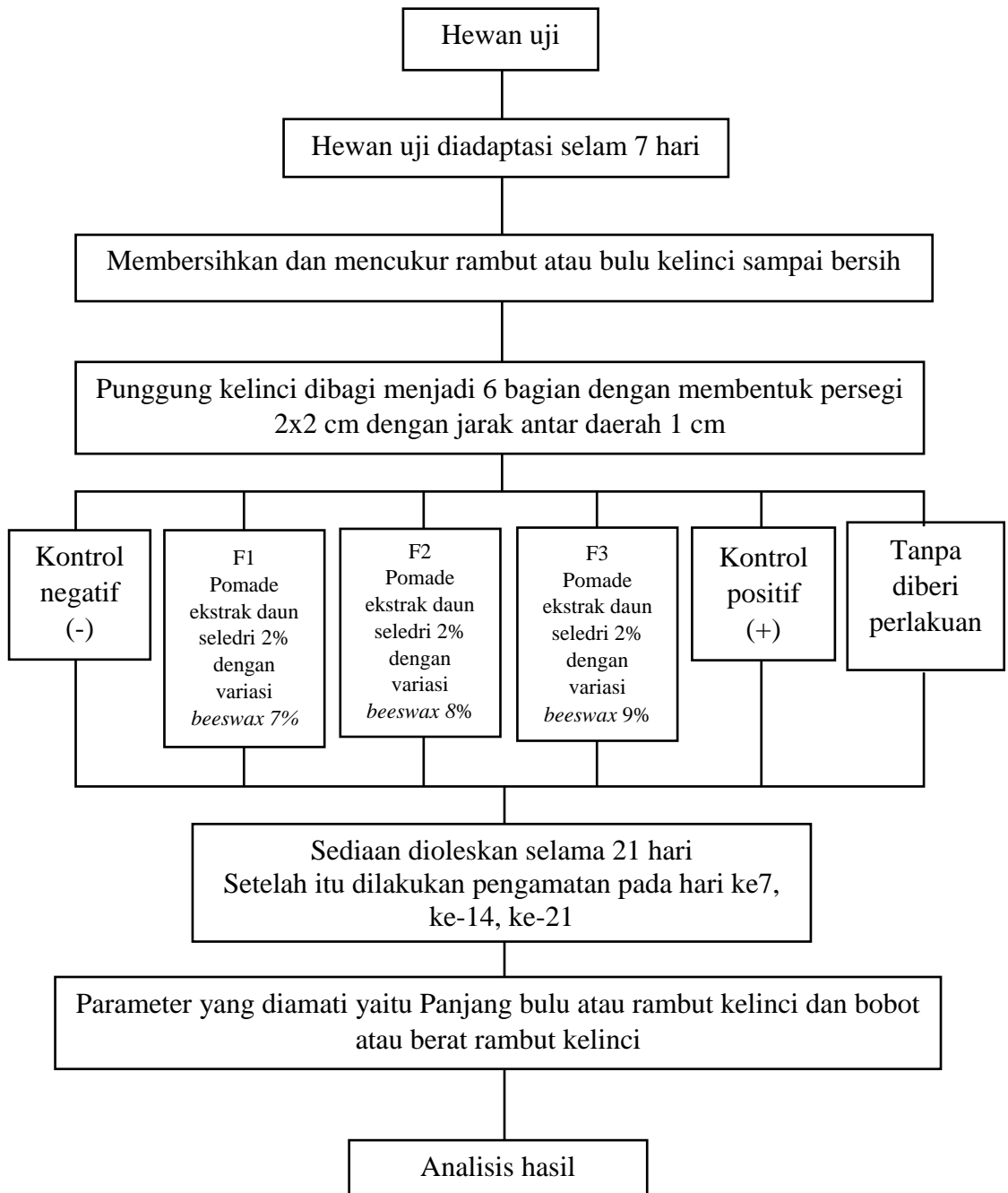
Gambar 6. Skema penelitian pembuatan ekstrak daun seledri

## 2. Pembuatan Sediaan Pomade



Gambar 7. Skema pembuatan sediaan pomade ekstrak daun seledri

### 3. Prosedur Pengujian Hewan Uji



Gambar 8. Prosedur pengujian hewan uji