

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun randu yang diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun randu yang diambil secara acak. Diambil dari pohon yang masih segar dipilih daun yang hijau dan tidak layu atau kering serta terbebas dari hama dan penyakit pada saat musim hujan dan tidak terlalu panas. Pengambilan daun randu dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol, dan fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun randu.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah aktivitas sediaan hair tonik ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air dari daun randu terhadap pertumbuhan rambut kelinci.

2. Klasifikasi variabel utama

Variabel utama yang telah diidentifikasi dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yaitu : variabel bebas, variabel terkendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang bisa diubah-ubah untuk mengetahui pengaruhnya terhadap variabel yang diteliti. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air dari daun randu yang diujikan pada punggung kelinci.

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung, sehingga perlu dinetralisir atau ditetapkan kualifikasinya, hasil yang didapatkan tidak menyebar dan dapat dilakukan peneliti lain secara tepat. Variabel

tergantung dalam penelitian ini adalah variabel yang diukur untuk mengetahui besarnya efek atau pengaruh terhadap variabel lain.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah proses pembuatan hair tonik, hewan uji kelinci, kondisi peneliti, kondisi laboratorium yang digunakan termasuk alat-alat, bahan, dan hewan yang digunakan.

Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah aktivitas sediaan hair tonik ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun randu terhadap panjang rambut kelinci.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun randu adalah bagian dari tanaman randu yang masih segar berwarna hijau dan tidak layu atau kering serta terbebas dari hama dan penyakit yang diambil dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

Kedua, serbuk daun randu yaitu diperoleh dari pohon randu yang sudah dicuci bersih dengan air mengalir dimaksudkan agar kotoran yang menempel dapat hilang kemudian dipotong kecil-kecil dan dikeringkan dengan menggunakan alat pengering (*oven*) pada suhu 40⁰C-50⁰C selanjutnya dihaluskan dengan blender dan diayak dengan pengayak nomor 40.

Ketiga, ekstrak daun randu adalah hasil ekstraksi serbuk daun randu dengan cara maserasi menggunakan pelarut etanol 96% lalu dipekatkan dengan *rotary evaporator*.

Keempat, fraksi *n*-heksan adalah ekstrak daun randu yang ditambah pelarut air kemudian difraksinasi dengan pelarut *n*-heksan.

Kelima, fraksi etil asetat adalah residu dari fraksi *n*-heksan daun randu difraksinasi dengan pelarut etil asetat.

Keenam, fraksi air dari daun randu adalah residu dari hasil fraksinasi fraksi etil asetat.

Ketujuh, aktivitas hair tonik adalah kemampuan ekstrak etanol fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat dan fraksi air dari daun randu untuk pertumbuhan rambut pada punggung kelinci.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, mesh no.40, timbangan analitik, *Sterling-Bidwel*, corong *Buchner*, oven, rotary evaporator, alat-alat gelas dan botol maserasi, jangka sorong, alat pencukur rambut, pinset, lemari pendingin, *Iscotester* VT-03F.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah serbuk daun randu, aqua destilata, etanol 96%, kertas saring, kelinci yang sudah diadaptasi di Universitas Setia Budi, propilenglikol, tween 80, nipagin, nipasol, menthol, natrium metabisulfit, pelarut etil asetat, pelarut *n*-heksan, asam klorida, amil alkohol, asam klorida, serbuk Mg, FeCl₃, *dragendrof*, *mayer*, *steasny*, Regrou® (minoksidil 2%).

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi tanaman

Tahapan pertama penelitian ini adalah dengan melakukan identifikasi tanaman daun randu yang bertujuan untuk memastikan ciri makroskopis dan mikroskopis selain itu juga untuk mencocokkan morfologi daun randu sesuai dengan literatur. Identifikasi tanaman dilakukan di unit Laboratorium Sistematika Tumbuhan Fakultas Biologi, Universitas Gadjah Mada.

2. Pengumpulan bahan

Daun randu yang digunakan diperoleh dari dari Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun randu yang diambil adalah daun yang hijau, bersih, segar, bebas dari penyakit.

3. Pembuatan serbuk daun randu

Daun randu yang telah diambil dari pohonnya dicuci dengan air mengalir bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, setelah itu dikeringkan dengan alat pengering (*oven*) pada suhu 40⁰C-50⁰C selama beberapa hari hingga kering, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan no. 40.

4. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun randu

Penetapan susut pengeringan ekstrak daun randu dapat dilakukan menggunakan alat *moisture balance*. Prosedur dilakukan dengan menimbang seksama sebanyak 2 gram ekstrak daun randu, kemudian dimasukkan ke alat *moisture balance* dengan suhu 105⁰ C sampai bobot konstan (Kemenkes 2011).

5. Penetapan kadar air daun randu

Penetapan kadar air serbuk daun randu menggunakan metode destilasi. Prosedur dilakukan dengan menimbang sebanyak 20 gram serbuk daun randu sebanyak 3 kali masing-masing dimasukkan kedalam labu takar yang berisi batu didih, kemudian ditambahkan yang sudah dijenuhkan. Labu takar dididihkan sampai didapatkan tetesan air yang kemudian ditampung pada tabung (Kemenkes 2011).

6. Pembuatan ekstrak daun randu

Serbuk daun randu dilakukan maserasi dengan perbandingan 1 bagian simplisia dimasukkan dalam 10 bagian cairan penyari 1:10. Serbuk daun randu ditimbang sebanyak 500 gram dimasukkan ke dalam botol kaca gelap dengan menambahkan etanol 96% sebanyak 3750 ml. Kemudian maserasi dilakukan dengan cara didiamkan selama 5 hari sambil sesekali digojog dalam keadaan tertutup. Maserasi yang telah didiamkan selama 5 hari disaring dengan kain flanel, kemudian ampas dibilas sampai diperoleh 100 bagian atau dengan penambahan sisa pelarut 1250 ml hingga diperoleh filtrat 5000 ml. Hasil ekstraksi digabungkan, kemudian dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40⁰C sampai didapatkan ekstrak kental. Kemudian dilakukan penetapan persen randemen diperoleh dengan cara menimbang hasil ekstrak pekat kemudian hasil ekstrak dibagi dengan berat serbuk kemudian dikalikan 100% (Simaremare 2014).

7. Fraksinasi ekstrak daun randu

Fraksinasi *n*-heksan, etil asetat, dan air dilakukan pembuatan dengan cara ditimbang ekstrak etanol daun randu 10 gram disuspensikan dengan etanol:aquades (1:1) sebanyak 75 ml kemudian dimasukkan ke dalam corong pisah difraksinasi dengan *n*-heksan 75 ml dengan replikasi 3 kali. Hasil fraksi *n*-heksan yang didapat

dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hasil fraksinasi ini disebut fraksi *n*-heksan.

Residu dari fraksinasi *n*-heksan kemudian ditambah dengan pelarut etil asetat 75 ml. Fraksinasi etil asetat sebanyak tiga kali. Hasil fraksi etil asetat yang didapat dipekatkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 40°C hasil fraksinasi ini disebut fraksi etil asetat.

Residu hasil etil asetat kemudian dipekatkan dengan cara diuapkan di atas *water bath*, hasil fraksinasi ini disebut fraksi air.

8. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk ekstrak dan fraksi daun randu

Identifikasi kandungan kimia dimaksudkan untuk mengetahui kandungan kimia yang terdapat dalam daun randu. Identifikasi senyawa flavonoid, alkaloid, tanin, polifenol, dan saponin dibuktikan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

8.1 Identifikasi flavonoid. Ekstrak daun randu ditimbang sebanyak 0,1 g dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan 10 ml aquades, dipanaskan sampai mendidih selama 5 menit. Setelah itu, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan serbuk Mg, 1 ml HCl pekat, dan 1 ml amilalkohol kemudian dikocok dengan kuat. Uji positif flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol (Nugrahani 2016).

8.2 Identifikasi saponin. Ekstrak daun randu ditimbang sebanyak 0,1 gram dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian ditambah dengan air panas 10 ml dan dididihkan selama 5 menit. Didinginkan, disaring dan filtratnya digunakan sebagai larutan uji. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi tertutup kemudian dikocok selama kurang lebih 10 detik dan dibiarkan selama 10 menit, ditambahkan 1 ml HCl 2N. Hasil positif saponin ditandai dengan terbentuknya buih yang stabil (Nugrahani 2016).

8.3 Identifikasi alkaloid. Ekstrak daun randu ditimbang sebanyak 0,1 gram dilarutkan dalam 10 ml CHCl₃ dan 4 tetes NH₄OH kemudian disaring dan filtratnya

dimasukkan kedalam tabung reaksi tertutup. Ekstrak CHCl_3 dalam tabung reaksi dikocok dengan ditambah 10 tetes H_2SO_4 2 N sampai terbentuk 2 lapisan. Lapisan asam yang berada di atas lapisan dipisahkan ke dalam tabung reaksi yang lain dan ditambahkan pereaksi *mayer* yang menghasilkan endapan putih sedangkan penambahan pereaksi *dragendroff* yang akan menimbulkan endapan warna merah jingga (Nugrahani 2016).

8.4 Identifikasi tanin. Identifikasi tanin dilakukan dengan melarutkan 80 mg ekstrak pada 50 mL air panas, disaring filtrat pada tabung reaksi ditambahkan dengan pereaksi FeCl_3 dan *Steasny*. Filtrat yang terbentuk berwarna biru tinta atau hitam menunjukkan positif tanin galat, jika filtrat ditambahkan dengan pereaksi *Steasny* dan asam klorida (2:1) dipanaskan 30 menit terbentuk endapan merah berarti menunjukkan hasil positif tannin katekol (Desinta 2015).

8.5 Identifikasi fenol. Identifikasi fenol dilakukan dengan mereaksikan sampel dengan larutan FeCl_3 1%, reaksi positif terjadi jika terdapat perubahan warna hijau, ungu, biru, dan hitam (Agustina *et al.* 2017).

8.6 Identifikasi triterpenoid dan steroid. Sampel sebanyak 0,1 gram dilarutkan dengan metanol kemudian diuapkan diatas waterbath. Filtrat digerus kemudian dilarutkan dengan 2 ml kloroform dalam tabung reaksi, lalu ditambah dengan anhidrat asetat sebanyak 10 tetes, selanjutnya larutan ditetesi dengan dengan H_2SO_4 pekat kurang lebih 3 tetes melalui dinding tabung reaksi. Hasil positif triterpenoid ditunjukkan berupa cincin kecoklatan atau *violet* pada perbatasan dua pelarut sedangkan munculnya warna hijau menunjukkan adanya steroid (Nugrahani 2016).

9. Rancangan formulasi hair tonik ekstrak dan fraksi daun randu

Formula hair tonik ekstrak etanol, fraksi *n-heksan*, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun randu dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Formula hair tonik ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun randu

Bahan	Konsentrasi bahan %				Kontrol negatif
	Formula 1	Formula 2	Formula 3	Formula 4	
Ekstrak daun randu	5	-	-	-	-
Fraksi <i>n</i> -heksan	-	2	-	-	-
Fraksi etil asetat	-	-	2	-	-
Fraksi air	-	-	-	2	-
Etanol 96%	30	30	30	30	30
Na metabissulfit	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
Propilenglikol	15	15	15	15	15
Tween 80	2	2	2	2	2
Nipagin	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Nipasol	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
Menthol	0,10	0,10	0,10	0,10	0,10
<i>Aquadest ad</i>	100	100	100	100	100

Keterangan:

Kontrol negatif : hair tonik tanpa penambahan ekstrak dan fraksi

Formula 1 : hair tonik dengan penambahan ekstrak etanol daun randu 5%

Formula 2 : hair tonik dengan penambahan fraksi *n*-heksan 2%

Formula 3 : hair tonik dengan penambahan fraksi etil asetat 2%

Formula 4 : hair tonik dengan penambahan fraksi air 2%

10. Pembuatan sediaan hair tonik

10.1. Pembuatan sediaan hair tonik ekstrak etanol daun randu.

Pembuatan hair tonik ekstrak etanol daun randu dimulai dengan melarutkan tween 80 dengan sebagian *aquadest* dalam *beaker glass* kemudian melarutkan ekstrak dalam larutan tween 80 diaduk sampai homogen. Selanjutnya melarutkan natrium metabissulfit dalam *aquadest* kemudian dicampurkan ke dalam *beaker glass* yang berisi ekstrak etanol daun randu yang telah larut dalam tween 80. Kemudian dalam *beaker glass* yang lain dibuat campuran nipagin, nipasol, menthol, dalam etanol kemudian diaduk sampai homogen. Kemudian menambahkan propilenglikol sedikit demi sedikit. Setelah itu dicampurkan dengan larutan ekstrak. Larutan hair tonik yang dihasilkan dikemas dalam wadah dan disimpan di tempat yang sejuk.

10.2. Pembuatan sediaan hair tonik fraksi *n*-heksan, etil asetat, dan air daun randu.

Pembuatan hair tonik masing-masing fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun randu dimulai dengan melarutkan tween 80 dengan sebagian *aquadest* dalam *beaker glass* kemudian melarutkan fraksi *n*-heksan dalam

larutan tween 80 diaduk sampai homogen. Selanjutnya melarutkan natrium metabisulfit dalam *aquadest* kemudian dicampurkan ke dalam *beaker glass* yang berisi fraksi *n*-heksan daun randu yang telah larut dalam tween 80. Kemudian dalam *beaker glass* yang lain dibuat campuran nipagin, nipasol, menthol, dalam etanol kemudian diaduk sampai homogen. Kemudian menambahkan propilenglikol sedikit demi sedikit. Setelah itu dicampurkan dengan larutan fraksi. Larutan hair tonik yang dihasilkan dikemas dalam wadah dan disimpan di tempat yang sejuk.

11. Pengujian sifat fisik hair tonik

11.1. Uji organoleptis. Uji organoleptis meliputi pemeriksaan bau, warna, dan timbulnya endapan selama 3 minggu penyimpanan. Ketiga parameter tersebut merupakan ciri visual dan karakteristik fisik yang dapat diamati secara langsung (Jubaidah *et al.* 2018).

11.2. Uji pH. Pengukuran pH dilakukan dengan cara mencelupkan pH meter ke dalam sediaan hair tonik dari ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun randu daun randu. Pengukuran dengan pH meter dimulai dengan kalibrasi alat. Kalibrasi alat menggunakan dapar standart pH 4 dan pH 7, kemudian elektroda dicelupkan dalam sediaan dan nilai pH, pengukuran dilakukan pada suhu ruangan. pH sediaan hair tonik sebaiknya berkisar antara 4,5 – 6,5 sesuai dengan pH untuk sediaan yang digunakan pada pH kulit kepala, jika terlalu basa maka akan menyebabkan gatal – gatal dan kulit kepala merah – merah (Jubaidah *et al.* 2018).

11.3. Uji viskositas. Uji viskositas sediaan hair tonik menggunakan alat *Iscotester* VT-03F dengan spindle yang terendam dalam hair tonik. Dengan mengamati jarum petunjuk pada *iscotester* (Jubaidah *et al.* 2018).

11.4. Freeze Thaw. Stabilitas fisik hair tonik dilakukan dengan metode *freeze thaw* yaitu sediaan hair tonik disimpan pada suhu rendah selama 48 jam, kemudian dipindahkan ke suhu tinggi selama 48 jam (1 siklus) lakukan sebanyak 3 siklus (21 hari). Setiap satu siklus dilakukan evaluasi fisik (Jusnita dan Riska 2017).

12. Uji aktivitas pertumbuhan rambut

Hair tonik ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun randu diuji aktivitas pertumbuhan rambut menggunakan 3 kelinci jantan galur

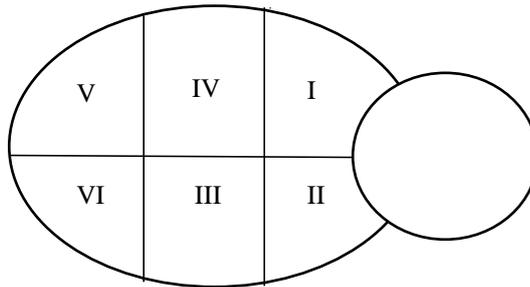
New Zealand berumur 4-5 bulan dengan bobot 2,7 – 3,6 kg kelinci yang sudah diadaptasi selama 1 minggu. Bulu pada bagian punggung kelinci dicukur untuk membersihkan rambut kelinci yang tersisa membentuk persegi panjang. Sebelum dioleskan dengan kontrol negatif, hair tonik ekstrak etanol, fraksi *n-heksan*, fraksi etil asetat, fraksi air daun randu, dan kontrol minoksidil 2% kulit punggung kelinci dibersihkan dengan kapas yang dibasahi air. Sediaan uji dioleskan ke punggung kelinci sebanyak 2 kali sehari pada waktu pagi dan sore selama 28 hari. Pengamatan pertumbuhan rambut kelinci dilakukan pada hari ke 7, 14, 21, 28 dengan cara mencabut 5 helai rambut kelinci secara acak kemudian diukur menggunakan jangka sorong. Pada hari ke 28 rambut kelinci dicukur dan ditimbang bobot rambut kelinci dengan timbangan analitik.

Perlakuan hewan uji terhadap 3 kelinci dengan 6 perlakuan pada punggung kelinci :

Keterangan :

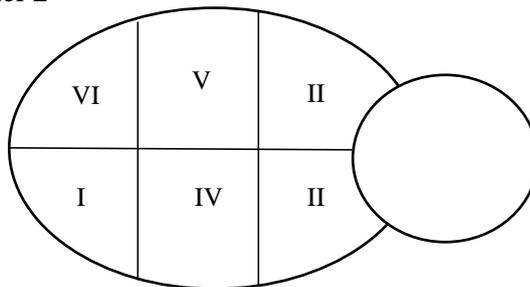
- Daerah I : diolesi kontrol minoksidil 2%
- Daerah II : diolesi hair tonik ekstrak daun randu 5%
- Daerah III : diolesi hair tonik fraksi *n-heksan* 2%
- Daerah IV : diolesi hair tonik fraksi etil asetat 2%
- Daerah V : diolesi hair tonik fraksi air 2%
- Daerah VI : diolesi kontrol negatif

1. Perlakuan kelinci 1



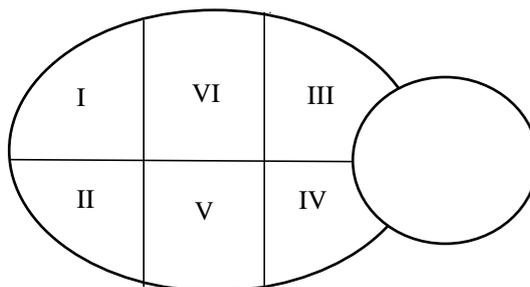
Gambar 1. Model lokasi pengujian aktivitas pertumbuhan rambut pada kelinci 1.

2. Perlakuan kelinci 2



Gambar 2. Model lokasi pengujian aktivitas pertumbuhan rambut pada kelinci 2.

3. Perlakuan kelinci 3



Gambar 3. Model lokasi pengujian aktivitas pertumbuhan rambut pada kelinci 3.

13. Uji iritasi pada kulit kelinci

Uji iritasi kulit dilakukan dengan metode *patch test*. Sediaan uji kontrol negatif, hair tonik ekstrak etanol 5%, fraksi *n*-heksan 2%, fraksi etil asetat 2%, fraksi air 2% daun randu, dan kontrol minoksidil 2% dioleskan pada kulit punggung kelinci bagian atas yang telah diberi tanda. Reaksi kulit dievaluasi setelah 30 menit, 24 jam, dan 48 jam, diamati perubahannya sebagai reaksi kulit terhadap bahan uji dan dinilai dengan cara memberi skor 0 sampai 4 tergantung tingkat keparahan

reaksi kulit yang dilihat pada tabel kategori nilai keadaan kulit (Febriani *et al.* 2016).

Tabel 2. Kategori nilai keadaan kulit

Eritema	
Jenis	Nilai
Tidak ada eritema	0
Sedikit eritema (hampir tidak tampak)	1
Eritema tampak jelas	2
Eritema sedang sampai kuat	3
Eritema parah (ada luka)	4

Data yang diperoleh dianalisis untuk memperoleh indeks iritasi primer kulit berdasarkan *Primary Irritation Index* (PII) kemudian nilai PII digunakan untuk menentukan tingkat iritasi (Kuncari ES *et al.* 2015).

$$PII = \frac{\text{jumlah semua nilai eritema pada waktu pengamatan}}{\text{jumlah waktu pengamatan}}$$

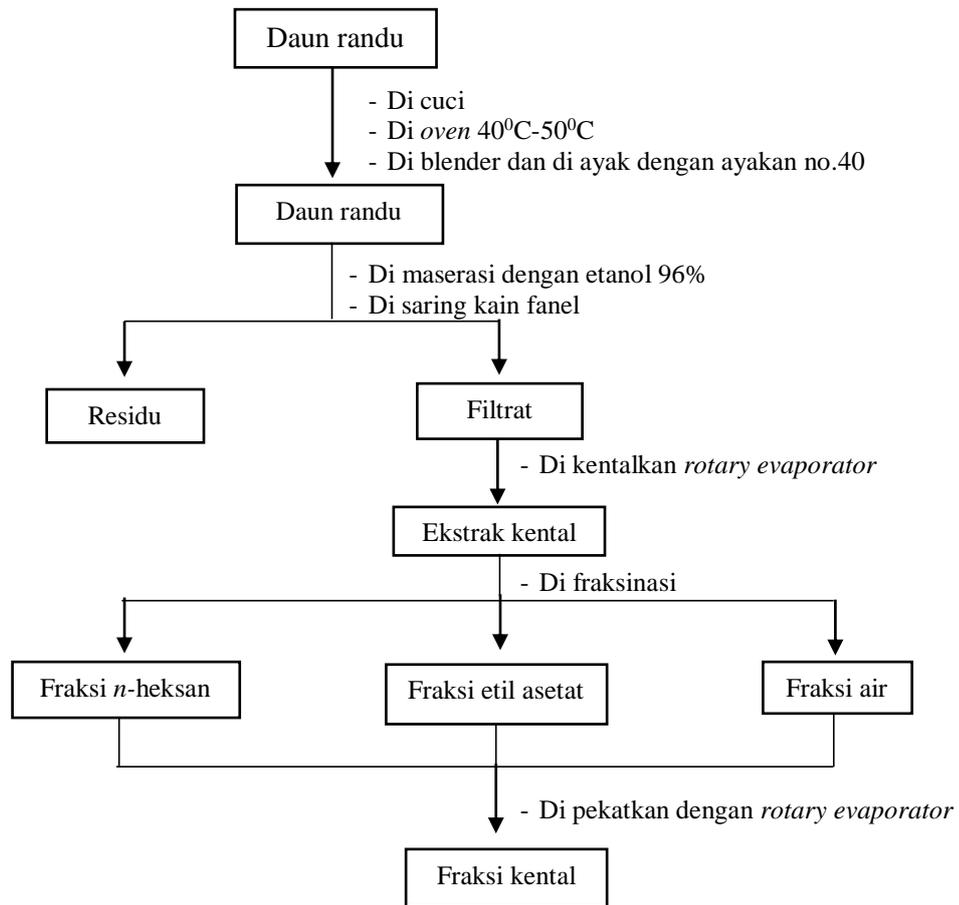
Tabel 3. Kategori respon dan iritasi

Kategori	Indeks Iritasi Primer
Tidak berarti	0 – 0,4
Iritasi berarti	0,5 – 1,9
Iritasi sedang	2 – 4,9
Iritasi parah	5,0 – 8,0

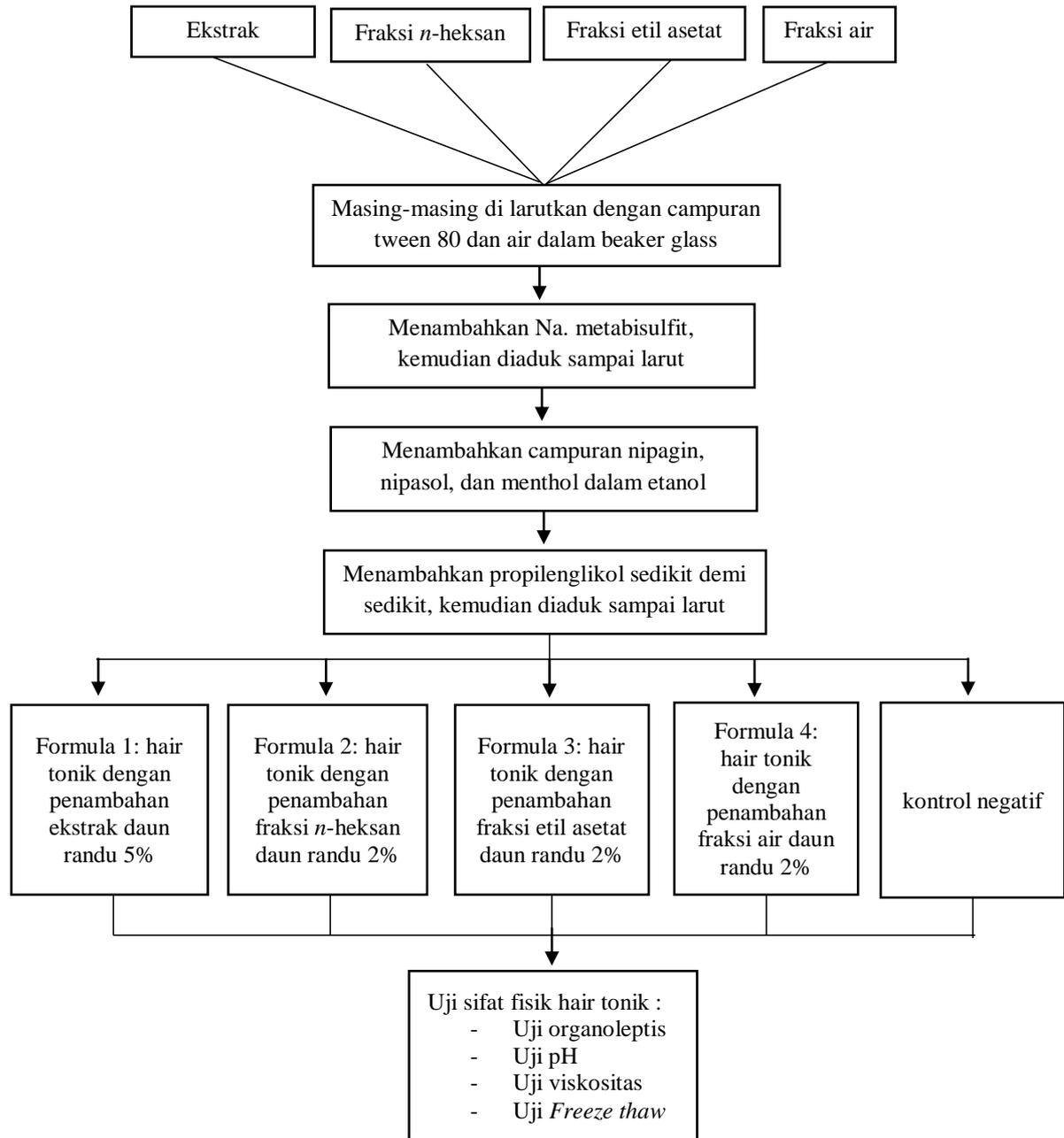
E. Analisis data

Data hasil pengujian aktivitas hair tonik ekstrak etanol, fraksi *n*-heksan, fraksi etil asetat, dan fraksi air daun randu dinyatakan dengan kecepatan pertumbuhan rambut kelinci *New Zealand*. Analisa data dalam penelitian ini menggunakan program SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Data uji aktivitas pertumbuhan rambut yang diperoleh dianalisis menggunakan *Saphiro Walk*. Hasil yang diperoleh jika nilai signifikan < 0,05 maka diuji *kruskal wallis* untuk mengetahui kebermaknaan lebih dari dua kelompok. Apabila nilai signifikan > 0,05 maka diuji *ANOVA* satu arah kemudian dilanjutkan uji *Post Hoc* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pada masing-masing perlakuan kemudian dilanjutkan dengan uji *Tukey*.

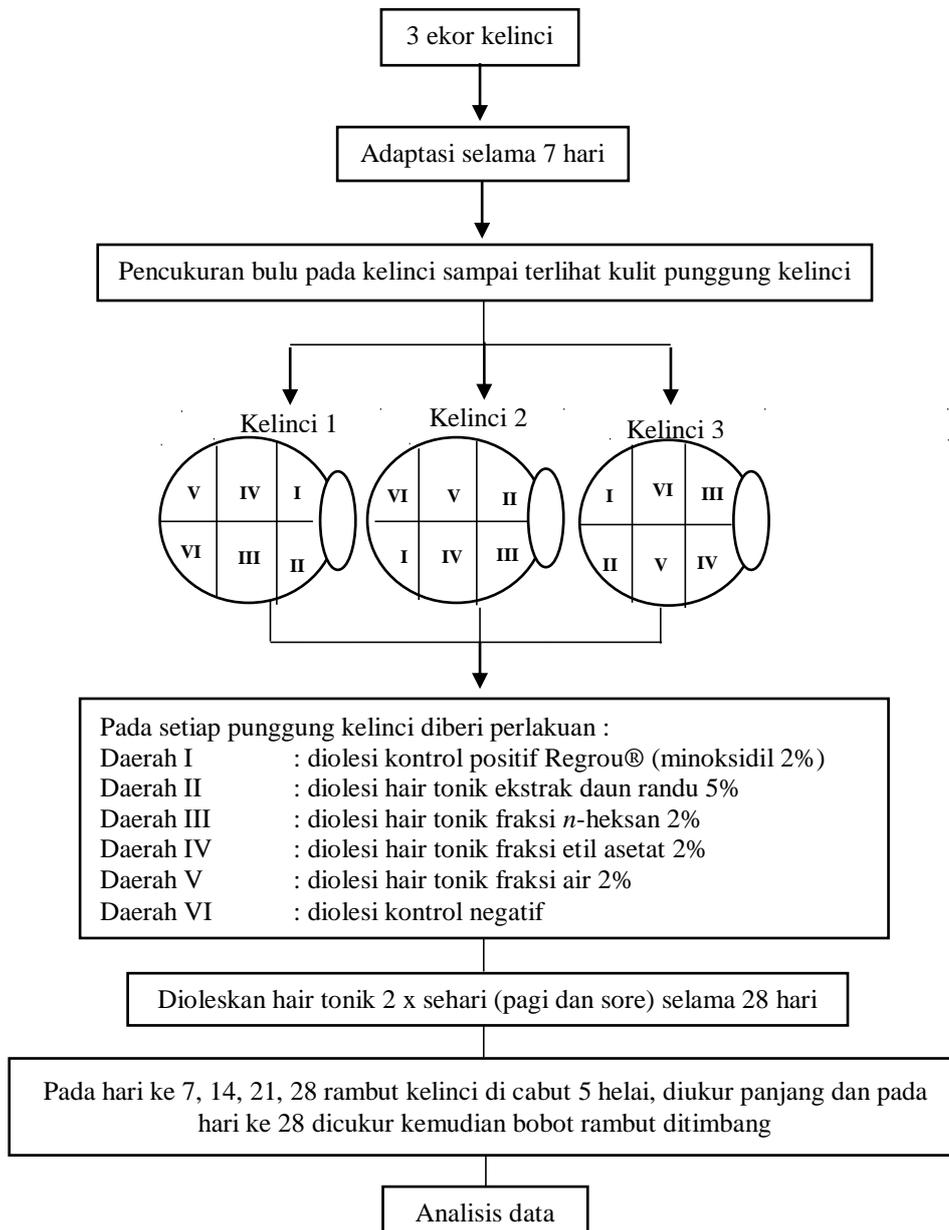
F. Skema Jalannya Penelitian



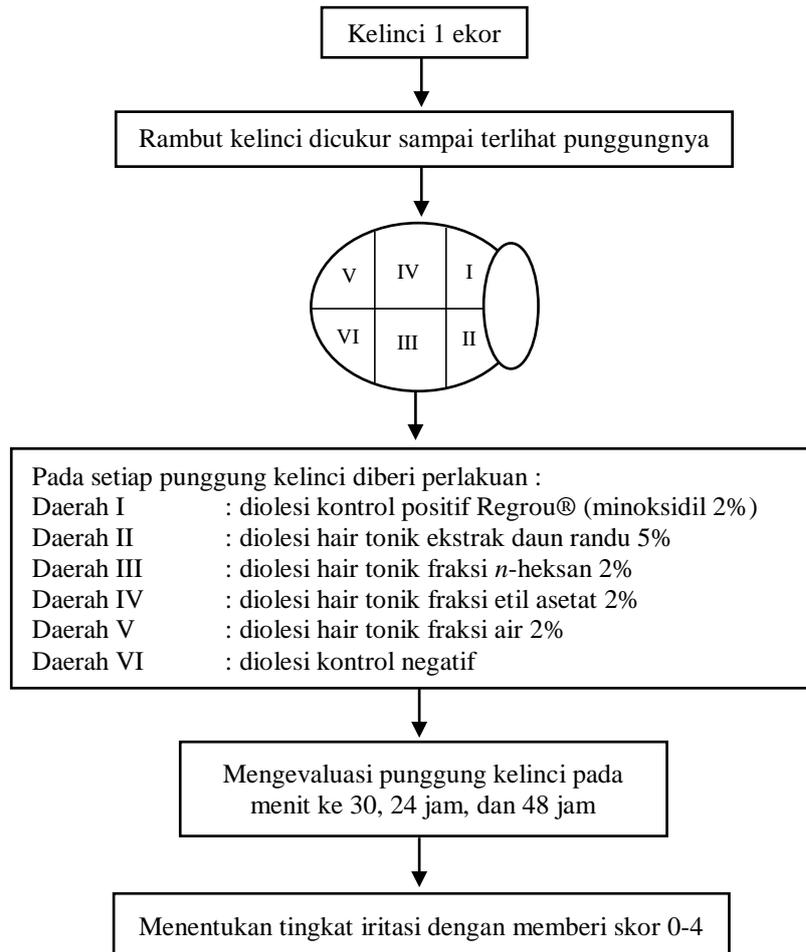
Gambar 4. Skema pembuatan serbuk, ekstrak, dan fraksi.



Gambar 5. Skema pembuatan hair tonik.



Gambar 6. Skema pengujian aktivitas pertumbuhan rambut.



Gambar 7. Skema uji iritasi pada kulit kelinci.