

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) yang ditanam di Desa Ngadisono, Banjarsari, Surakarta.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kembang sepatu diambil secara acak dan dipilih daun yang berwarna hijau muda sampai hijau tua, utuh, dan segar, bebas penyakit, serta bersih yang diperoleh di Desa Ngadisono, Banjarsari, Surakarta.

B. Variasi Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol yang akan diuji aktivitas sediaan *creambath* ekstrak etanol daun kembang sepatu terhadap pertumbuhan rambut kelinci.

2. Klasifikasi variabel

Variabel utama yang telah diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel kendali, dan variabel tergantung.

Variabel bebas adalah variabel yang dengan sengaja diubah-ubah untuk dipelajari pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel yang sengaja diteliti pengaruhnya terhadap variabel tergantung. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah ekstrak etanol daun kembang sepatu yang diujikan pada punggung kelinci dalam berbagai konsentrasi.

Variabel terkendali dalam penelitian ini adalah variabel yang mempengaruhi variabel tergantung sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah suhu pembuatan *creambath*,

hewan uji kelinci *New Zealand White*, kondisi peneliti, kondisi laboratorium yang digunakan termasuk alat-alat, bahan, dan media yang digunakan.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian ini. Variabel tergantung dalam penelitian ini adalah mutu fisik sediaan *creambath* (organoleptis, pH, homogenitas, daya sebar, daya lekat, viskositas, proteksi, stabilitas, tipe cream), aktivitas sediaan *creambath* ekstrak etanol daun kembang sepatu terhadap panjang rambut, bobot rambut, dan kelebatan rambut kelinci dan uji iritasi kulit dan mata dengan melihat ada tidak warna merah pada kulit dan mata.

3. Definisi opsional variabel utama

Pertama, daun kembang sepatu adalah bagian dari tanaman kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) yang berupa daun berwarna hijau muda sampai hijau tua yang segar, bersih, sehat, dan diambil dari desa Ngadisono, Banjarsari, Surakarta.

Kedua, ekstrak daun kembang sepatu adalah ekstrak kental yang diperoleh dari proses maserasi dan remaserasi serbuk daun kembang sepatu selama 5 hari dan 2 hari menggunakan cairan penyari etanol 70%.

Ketiga, suhu pembuatan *creambath* adalah suhu yang diperlukan untuk membuat sediaan *creambath* yaitu 75 – 80 °C.

Keempat, variasi konsentrasi ekstrak etanol daun kembang sepatu dalam formula *creambath* adalah konsentrasi ekstrak etanol daun kembang sepatu yang ditambahkan ke dalam formula *creambath* dan diasumsikan dengan konsentrasi 10%; 15%; 20%.

Kelima, konsentrasi efektif adalah konsentrasi yang memiliki efek dapat mempercepat pertumbuhan rambut dengan hasil paling tinggi dari konsentrasi yang lainnya.

Keenam, hewan uji yang digunakan adalah kelinci dengan jenis *New Zealand White* yang mana memiliki respon yang sama sebagaimana manusia pada penyakit dan pengobatannya.

Ketujuh, mutu fisik sediaan *creambath* adalah sediaan *creambath* yang dilakukan pengujian terhadap sediaan *creambath*. Uji organoleptis yaitu pengujian

yang dilihat dari warna, bau, dan bentuk sediaan *creambath*. Uji pH dilakukan untuk mengetahui pH sediaan dengan menggunakan pH meter. Uji homogenitas yaitu dengan mengamati sediaan *creambath* ada partikel atau tidak pada objek glass. Uji daya sebar yaitu dengan cara sejumlah zat tertentu di letakkan di atas kaca yang berskala. Kemudian bagian atasnya di beri kaca yang sama, dan di tingkatan bebanya, dan di beri rentang waktu 1 – 2 menit. kemudian diameter penyebaran diukur pada setiap penambahan beban, saat sediaan berhenti menyebar (dengan waktu tertentu secara teratur). Uji daya lekat yaitu diletakkan sediaan *creambath* pada diantara 2 objek glass pada alat uji daya lekat. Ditambah beban 500gram. Diamkan 5 menit. Setelah 5 menit beban diturunkan, catat waktu ketika objek glass terlepas. Uji viskositas yaitu dengan menguji sediaan *creambath* menggunakan alat viscometer. Uji proteksi yaitu dengan mengamati adanya warna merah pada kertas saring yang diberi sediaan *creambath*, KOH, paraffin cair, dan larutan PP pada waktu tertentu. Uji tipe cream dengan menggunakan larutan metilen blue dan sudan III dan dilihat dibawah mikroskop. Uji stabilitas yaitu didapat dengan uji sentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm dan uji cycling test dengan cara meletakkan sediaan *creambath* kedalam suhu 4°C selama 24 jam, lalu keluarkan dan ditempatkan pada suhu 40°C selama 24 jam.

Kedelapan, aktivitas *creambath* adalah kemampuan ekstrak etanol kembang sepatu atau sediaan *creambath* ekstrak etanol daun kembang sepatu untuk pertumbuhan rambut pada punggung kelinci.

Kesembilan, iritasi kulit yaitu didapat dengan cara mengamati kulit hewan uji setelah diberi sediaan *creambath* ada warna kemerahan atau tidak.

Kesepuluh, uji iritasi mata adalah pengujian iritasi mata dengan mengoleskan sediaan *creambath* pada mata kelinci dan diamati dalam interval waktu ada tidak cedera pada mata kelinci setelah dioleskan sediaan *creambath*.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat penyari terdiri atas blender, mesh no 60, timbangan, timbangan analitik, sterling-bidwel, corong *Buchner*, oven, evaporator, moisture balance, alat-alat gelas, viskometer *Brookfield*, kertas saring, pipet tetes, alat uji daya lekat, alat uji daya sebar, stick pH, dan botol maserasi.

2. Bahan

Bahan sampel yang digunakan meliputi serbuk daun kembang sepatu, reagent yaitu etanol, es batu, air suling, etanol 70%, kertas saring. Bahan kimia yang digunakan setil alkohol, steareth-20, isopropil miristat, setrimonium klorida, natrium metabisulfit, metil paraben, propil paraben, dan parfum. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi sampel daun kembang sepatu

Tahap pertama dalam penelitian ini adalah menetapkan kebenaran sampel daun kembang sepatu dengan ciri-ciri morfologi daun kembang sepatu terhadap kepustakaan dan dibuktikan dengan dilakukan determinasi di Laboratorium Universitas Setia Budi Surakarta.

2. Pengumpulan bahan

Daun kembang sepatu yang digunakan diperoleh dari Desa Ngadisono, Jawa Tengah. Daun kembang sepatu yang diambil adalah daun yang hijau muda sampai hijau tua, bersih, segar, dan bebas dari penyakit.

3. Pembuatan serbuk daun kembang sepatu

Daun kembang sepatu 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 40°C-50°C selama beberapa hari hingga kering, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan no. 40.

4. Penetapan kadar kelembapan serbuk daun kembang sepatu

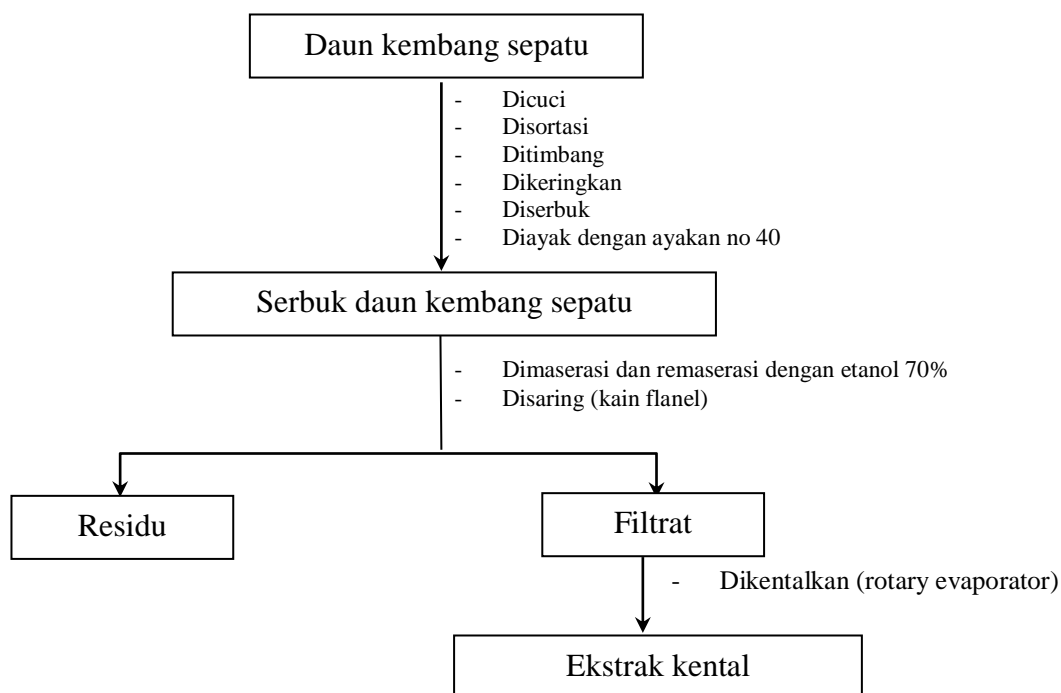
Penetapan kadar kelembapan dapat dilakukan dengan berbagai cara. Penetapan kadar air *Hibiscus rosa-sinensis* L. dilakukan dengan menggunakan alat *moisture balance*, dengan cara menimbang serbuk ± 2 gram. Kemudian ditunggu sampai kadarnya konstan, kadar air dalam persen (%).

5. Pembuatan ekstrak daun kembang sepatu

Pembuatan ekstrak etanol dengan cara 500 gram serbuk daun kembang sepatu, kemudian dimasukkan ke dalam botol coklat yang terhindar dari cahaya, lalu ditambah dengan etanol 70% sebanyak 3750 mL, kemudian tutup. Maserasi dilakukan kurang lebih selama 5 hari dengan penggojogan atau dengan sering diaduk. Setelah 5 hari, disaring dengan kain flanel dan diperas. Maserat dimasukkan ke dalam botol coklat yang bersih. Kemudian ampas diremaserasi selama 2 hari dengan ditambahkan etanol 70% sebanyak 1250 mL. Kemudian disaring dengan kain flanel, maserat dijadikan satu dengan maserat yang pertama. Maserat yang didapat dipekatkan dengan *rotary evaporator* (suhu tetap dijaga pada 40°C-50°C) sampai diperoleh ekstrak kental. Hasil inilah yang selanjutnya disebut sebagai ekstrak etanol daun kembang sepatu (*Hibiscus rosa-sinensis* L.).

6. Penetapan kadar kelembapan ekstrak daun kembang sepatu

Penetapan kadar kelembapan dilakukan dengan menggunakan *moisture balance* dengan cara menimbang ekstrak ± 2 gram. Kemudian ditunggu sampai kadarnya konstan, kadar air dalam persen (%).



Gambar 1. Skema pembuatan serbuk dan ekstrak daun kembang sepatu

7. Identifikasi golongan senyawa kimia ekstrak etanol daun kembang sepatu secara kualitatif

Pendekatan fitokimia meliputi analisis kualitatif kandungan kimia dalam tumbuhan atau bagian tumbuhan (akar, batang, daun, bunga), terutama kandungan metabolit sekunder yang bioaktif seperti alkaloid, antrakuinon, flavonoid, glikosida jantung, kumarin, saponin (steroid dan triterpenoid), tanin (polifenolat), minyak atsiri (terpenoid), dan sebagainya. Tujuan pendekatan fitokimia adalah untuk mengidentifikasi tumbuhan mendapatkan kandungan yang berguna untuk pengobatan (Farnsworth 1996).

Golongan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak daun kembang sepatu diidentifikasi dengan uji warna menggunakan pereaksi warna yang spesifik untuk golongan senyawa masing-masing. Skrining fitokimia dilakukan uji reagen dan dilakukan di laboratorium fisika Fakultas Farmasi, Universitas Setia Budi.

7.1 Identifikasi saponin. Sampel ekstrak dilarutkan dengan pelarut secukupnya lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 10 mL air suling panas, didinginkan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Jika

terbentuk buih atau busa yang selama tidak kurang dari 10 menit setinggi 1 cm sampai 10 cm. Pada penambahan 1 tetes HCL 2N, apabila buih tidak hilang menunjukkan adanya saponin (Robinson 1995).

7.2 Identifikasi flavonoid. Sampel ekstrak dilarutkan dengan pelarut secukupnya diambil 5 mL lalu ditambahkan 0,1 gram serbuk Mg dan 1 mL HCL pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok, dan dibiarkan memisah. Flavonoid positif jika terjadi warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol (Robinson 1995).

7.3 Identifikasi polifenol. Sampel ekstrak diambil 1 mL lalu ditambahkan 5 tetes larutan FeCl_3 5%. Polifenol positif jika terjadi perubahan warna menjadi biru hingga hitam (Yuswantina *et al.* 2012).

8. Formulasi *creambath* ekstrak etanol daun kembang sepatu

Formula *creambath* ekstrak etanol daun kembang sepatu dapat dilihat pada tabel 1

Tabel 1. Formula *creambath* ekstrak etanol daun kembang sepatu dengan berbagai konsentrasi ekstrak kental(Teti *et al.* 2018)

Bahan	Konsentrasi bahan (%)			
	F1	F2	F3	F4
Ekstrak daun kembang sepatu	10	15	20	-
Setil alkohol	5	5	5	5
Isopropil miristat	5	5	5	5
Propil paraben	0,05	0,05	0,05	0,05
Metil paraben	0,15	0,15	0,15	0,15
Setrimonium klorida	4	4	4	4
Steareth-20	2	2	2	2
Natrium metabisulfit	0,10	0,10	0,10	0,10
Parfum	qs	Qs	Qs	Qs
Air suling	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g	ad 100 g

9. Pembuatan sediaan *creambath* ekstrak etanol daun kembang sepatu

Pembuatan *creambath* ekstrak daun kembang sepatu dimulai dari semua komponen minyak (setil alkohol, isopropil miristat, propil paraben) dicampur ke dalam cawan penguap kemudian dileburkan di atas penangas air pada suhu 75-80°C (fase minyak). Semua komponen air (metil paraben, setrimonium klorida, dan steareth-20) dimasukkan ke dalam bekkor glass kemudian dipanaskan dengan air pada suhu 75°C (fase air). Kemudian fase minyak dimasukkan kedalam fase air sedikit demi sedikit sambil diaduk dalam mortir sambil digerus dengan

pengadukan konstan hingga didapatkan basis *creambath* yang homogen. Kemudian didinginkan hingga suhu kamar. Kemudian ditambahkan ekstrak daun kembang sepatu yang sudah dilarutkan dengan aquadest aduk hingga homogen. Setelah itu tambahkan parfum qs aduk hingga homogen.

10. Pengujian sifat fisik *creambath* ekstrak etanol daun kembang sepatu

10.1 Uji organoleptis. Uji organoleptis meliputi pemeriksaan bentuk, bau dan warna selama penyimpanan untuk mengetahui kondisi fisik dari *creambath* (Amelia *et al* 2016).

10.2 Uji pH. Pengukuran pH dilakukan dengan cara mencelupkan pH meter ke dalam sediaan *creambath* dari ekstrak etanol daun kembang sepatu (Amelia *et al* 2016).

10.3 Uji homogenitas. Hasil evaluasi homogenitas *creambath* formula 1, formula 2, formula 3, dan formula 4 menunjukkan hasil yang homogen karena tidak terlihat adanya sebaran partikel kasar pada kaca objek.

10.4 Uji viskositas. Uji viskositas sediaan *creambath* menggunakan alat *Viscotester VT-03F* dengan spindle yang terendam dalam larutan uji.

10.5 Uji daya lekat. Uji daya lekat diharapkan memiliki waktu daya lekat yang lama sehingga sediaan *creambath* memiliki waktu kontak pada kulit punggung kelinci lama.

10.6 Uji daya sebar. Dengan cara sejumlah 0,5 gram *creambath* di letakkan di atas kaca yang berskala. Kemudian bagian atasnya di beri kaca yang sama, dan di tingkatkan bebanya, dan di beri rentang waktu 1 – 2 menit. Kemudian diameter penyebaran diukur pada setiap penambahan beban, saat sediaan berhenti menyebar (dengan waktu tertentu secara teratur).

10.7 Uji kemampuan proteksi. Ambillah 2 potong kertas saring. Kertas yang pertama basahilah dengan larutan fenolftalein untuk indikator. Setelah itu kertas saring dikeringkan. Kemudian oleskan sediaan *creambath*. Kertas yang kedua, buat suatu areal dengan parafin padat yang telah dilelehkan. Setelah kering akan didapat areal yang dibatasi dengan parafin padat. Tempelkan kertas yang pertama dibawah kertas yang kedua dengan bagian areal parafin padat diatas. Kemudian tetesi areal parafin dengan sedikit larutan KOH 0,1N. Lihatlah sebalik

kertas yang dibasahi dengan larutan fenolftalein pada waktu 15:30:45:60 detik:3: dan 5 menit. Apakah ada noda warna merah atau kemerahan pada kertas saring tersebut?

10.8 Uji tipecream. Uji tipe cream dilakukan dengan 3 metode yaitu :

Metode pengenceran, metode pewarnaan, konduktibilitas elektrik. Metode pengenceran dilakukan dengan cara sediaan *creambath* diberi sedikit air dan aduk, jika diperoleh cream yang homogen lagi maka tipe cream o/w dan sebaliknya.

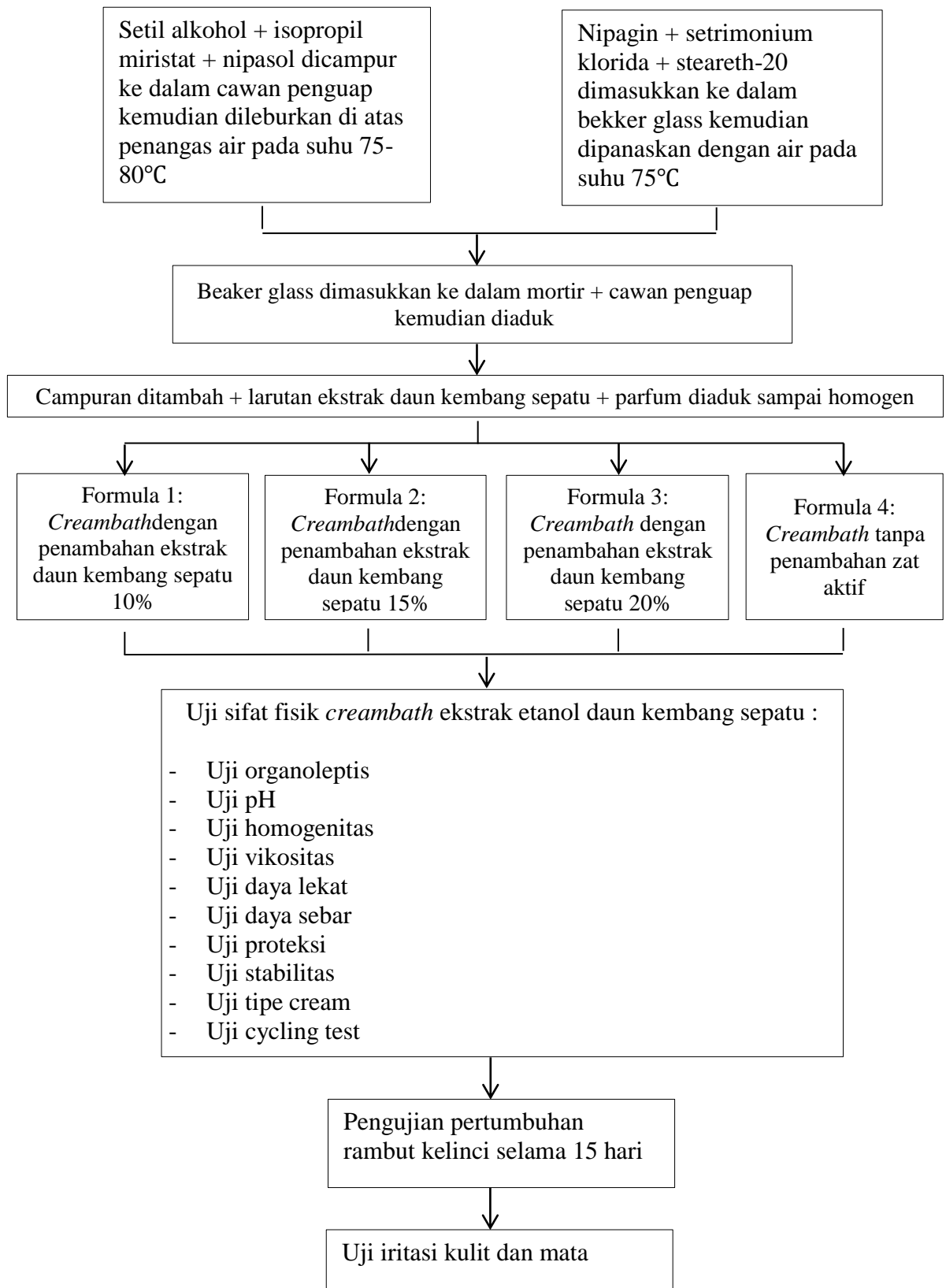
Metode pewarnaan dilakukan dengan cara cream tipe o/w akan terwarnai oleh zat warna yang larut dalam air. Demikian sebaliknya untuk cream yang bertipe w/o dapat diwarnai oleh zat warna yang larut dalam minyak.

Konduktibilitas elektrik dilakukan dengan cara mencelupkan jarum ke dalam *creambath* bila cream menghantarkan aliran listrik maka cream tersebut bertipe o/w, sebaliknya tidak menghantarkan listrik bertipe w/o.

10.9 Uji stabilitas. Uji stabilitas dilakukan sebagai berikut :

Uji sentrifugasi dan *cycling test*. Uji sentrifugasi dilakukan dengan cara sediaan *creambath* 2 ml dimasukkan kedalam tabung sentrifugasi. Dilakukan sentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 30 menit. Hasil sentrifugasi dapat diamati adanya pemisahan atau tidak.

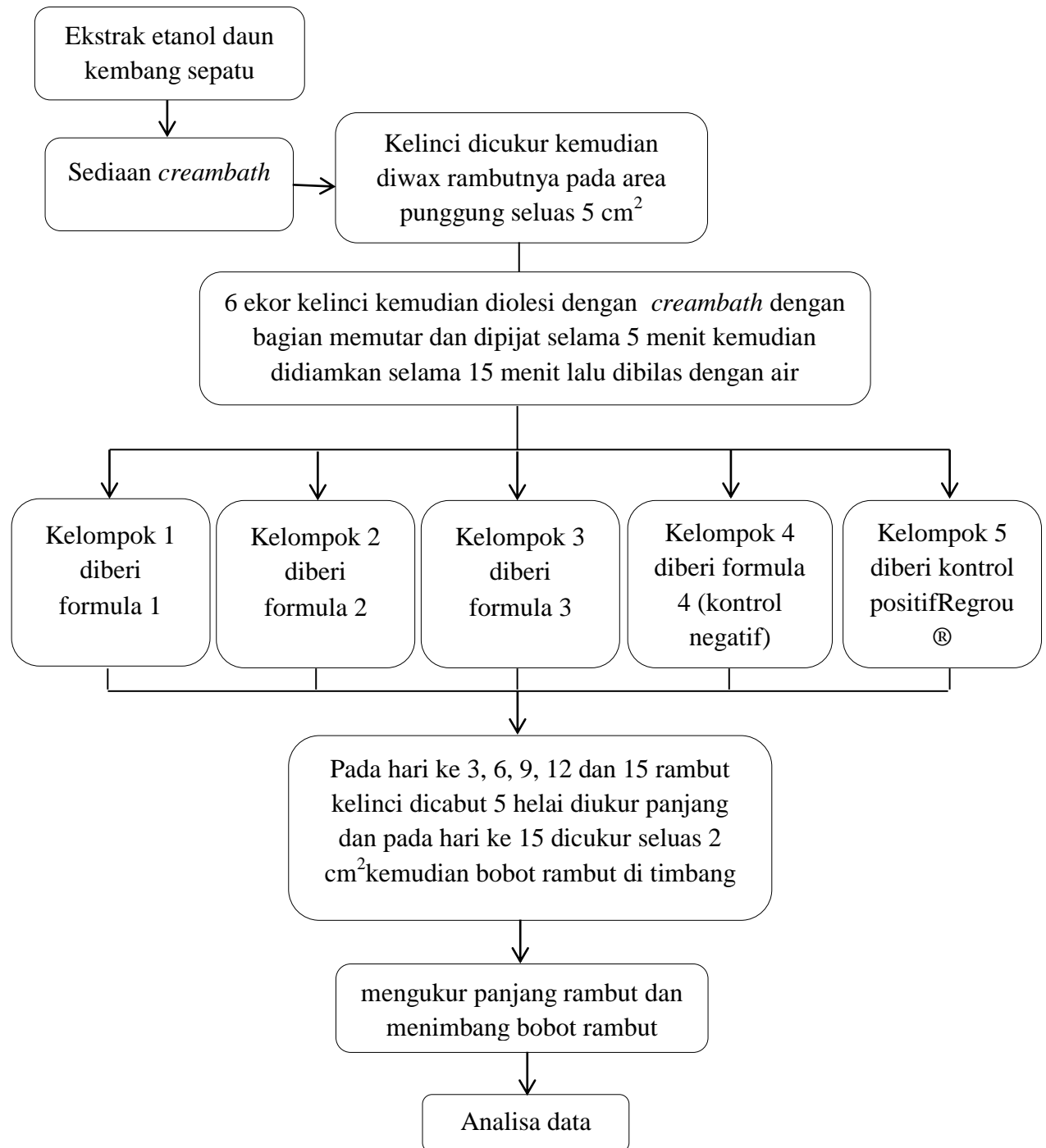
Cycling test dilakukan dengan cara sediaan *creambath* disimpan pada suhu 4°C selama 24 jam, lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu 40°C selama 24 jam. Waktu penyimpanan 2 suhu tersebut dianggap 1 siklus. Percobaan ini dilakukan sebanyak 6 siklus dan dievaluasi sediaan pada awal dan akhir tes siklus.



Gambar 2. Skema pembuatan creambath daun kembang sepatu dan pengujian sifat fisik

11. Uji aktivitas pertumbuhan rambut

Creambath ekstrak etanol daun kembang sepatu diuji aktivitas pertumbuhan rambut menggunakan 6 kelinci jantan putih galur *New Zealand White* yang berumur 4-5 bulan dengan bobot 1,5-2 kg kelinci diadaptasi selama 1 minggu. Bulu pada bagian punggung kelinci di bagi menjadi 2 bagian kanan dan kiri, dicukur dan di wax membentuk persegi dengan ukuran 5x5 cm. Sebelum dioleskan dengan *creambath* ekstrak etanol daun kembang sepatu kulit punggung kelinci dibersihkan dengan kapas yang dibasahi air. Pengolesan dilakukan 2 kali sehari pada waktu pagi dan sore selama 15 hari. Dan dilakukan pemijatan selama 5 menit, didiamkan selama 15 menit kemudian dibilas dengan air. Pengamatan pertumbuhan rambut kelinci dilakukan pada hari ke 3, 6, 9, 12 dan 15 dengan cara mencabut 5 helai rambut kelinci secara acak kemudian diukur menggunakan jangka sorong. Pada hari ke 15 rambut kelinci seluas 2 cm² dicukur dan timbang bobot rambut kelinci dengan timbangan analitik (Sona 2018).



Gambar 3. Skema pengujian aktivitas pertumbuhan rambut *creambath* ekstrak daun kembang sepatu

12. Uji iritasi kulit

Dilakukan dengan pengamatan pada punggung kelinci yang sudah dikerok kemudian diolesi dengan *creambath* diamati timbul kemerahan tidak pada kulit punggung kelinci. Selanjutnya untuk setiap keadaan kulit diberi nilai sebagai berikut (Draize 1959) :

Jenis eritema	Nilai	Ciri-ciri
Tidak ada eritema	0	Tidak ada reaksi
Eritema sangat ringan	1	Warna kulit agak merah keputihan
Eritema ringan	2	Warna kulit agak merah
Eritema sedang	3	Warna kulit merah dan timbul bintik-bintik merah
Eritema berat	4	Warna kulit sangat merah dan bintik merah lebih banyak jumlahnya

Indeks iritasi dihitung dengan cara menjumlahkan nilai dari setiap kelinci percobaan setelah 24 jam dan 72 jam pemberian sampel iritan, kemudian dibagi

4. Penilaian iritasinya sebagai berikut :

0,00	Tidak mengiritasi
0,04 – 0,99	Sedikit mengiritasi
1,00 – 2,99	Iritasi ringan
3,00 – 5,99	Iritasi sedang
6,00 – 8,00	Iritasi berat

13. Uji iritasi mata

Sediaan uji dalam dosis tunggal dipaparkan kedalam salah satu mata pada beberapa hewan uji dan mata yang tidak diberi perlakuan digunakan sebagai kontrol. Derajat iritasi/korosi dievaluasi terhadap cedera pada konjungtiva, kornea, dan iris pada interval waktu tertentu. Waktu pemantauan setelah 24 jam, 48 jam, dan 96 jam. Hasil dinilai dari gejala yang timbul pada mata yaitu edema, kekeruhan pada kornea, reaksi terhadap cahaya, pelebaran vaskuler, dan kemerahan.

0	Normal
1	Terdapat inflamasi
2	Inflamasi tampak jelas, dengan eversi parsial dari kelopak mata
3	Inflamasi, dengan setengah kelopak mata tertutup
4	Inflamasi, lebih dari setengah kelopak mata tertutup

E. Analisa Data

Analisa data dalam penelitian ini menggunakan program SPSS. Data uji aktivitas pertumbuhan rambut yang diperoleh dianalisis menggunakan *Saphiro-Wilk*. Hasil yang diperoleh, jika terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan analisa ANAVA satu arah kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test* dengan taraf kepercayaan 95%.