

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah semua obyek yang menjadi sasaran penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) yang ditanam di Bibis Luhur, Banjarsari, Surakarta.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan dalam melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun waru diambil secara acak dan dipilih daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, agar kandungan senyawa didalamnya stabil, hijau dan segar, bebas penyakit, serta bersih.

B. Variasi Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama dalam penelitian ini adalah pertama, variasi konsentrasi ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.).

Kedua, uji mutu fisik *creambath* ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) yang dihasilkan.

Ketiga, aktivitas pemicu pertumbuhan rambut ekstrak daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.).

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 waru yang diujikan pada punggung kelinci dalam berbagai konsentrasi.

Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara tepat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah metode pembuatan *creambath*, suhu pembuatan, hewan uji kelinci *New Zealand White*, sediaan *creambath* yang dilakukan uji mutu fisik dan uji stabilitas, kondisi peneliti, kondisi laboratorium yang digunakan termasuk alat dan bahan.

Variabel terikat adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian ini. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah mutu fisik sediaan *creambath* (organoleptis, pH, homogenitas, daya sebar, daya lekat, viskositas, proteksi, stabilitas, iritasi kulit, iritasi mata) dan aktivitas sediaan *creambath* ekstrak etanol daun kembang sepatu terhadap panjang rambut dan bobot rambut.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun waru adalah bagian dari tanaman waru (*Hibiscus tiliaceus* L.) yang berupa daun yang tidak terlalu muda dan tidak terlalu tua, berwarna hijau yang segar, bersih, sehat, dan diambil dari Bibis Luhur, Banjarsari, Surakarta.

Kedua, serbuk daun waru adalah serbuk yang diperoleh dari daun waru yang ditimbang lalu dicuci dengan air mengalir yang bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel setelah itu dikeringkan dengan menggunakan alat pengering (*oven*) pada suhu 40°-50°C, kemudian disortir dan ditimbang. Lalu diblender dan diayak dengan pengayak no. 60.

Ketiga, ekstrak daun waru adalah ekstrak kental yang diperoleh dari proses maserasi dan remaserasi serbuk daun waru selama 5 hari dan 2 hari menggunakan cairan penyari etanol 96%.

Keempat, proses pembuatan *creambath* adalah dengan cara mencampurkan fase minyak dengan fase air hingga terbentuk sediaan cream.

Kelima, variasi konsentrasi ekstrak etanol daun waru dalam formula *creambath* adalah konsentrasi ekstrak etanol daun waru yang ditambahkan ke dalam formula *creambath* dan diasumsikan dengan konsentrasi 12,5%; 25%; 37,5%.

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* yang meliputi, uji organoleptis, uji pH, uji homogenitas, uji viskositas, uji daya lekat, uji daya sebar, uji proteksi, *cycling test*, uji iritasi kulit dan uji iritasi mata.

Kedelapan, aktivitas *creambath* adalah kemampuan ekstrak etanol daun waru atau sediaan *creambath* ekstrak etanol daun waru untuk menumbuhkan rambut pada punggung kelinci yang hasilnya akan lebih cepat dibandingkan kontrol negatifnya.

Eritema adalah inflamasi akut yang terjadi pada kulit dan membran mukosa (jaringan tipis, berair yang terletak pada rongga tubuh) yang sering diiringi dengan penyakit umum. Iritasi mata adalah suatu keadaan dimana mata terjadi gatal, rasa panas, kemerahan, nyeri, bengkak, robek, sakit, seolah-olah ada sesuatu didalam matanya.

Kesembilan, Konsentrasi efektif adalah konsentrasi yang hasil aktivitas pertumbuhan rambutnya menyamai kontrol positif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat penyari terdiri atas blender, mesh no 60, timbangan, timbangan analitik, 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

2.1 Bahan sampel. Bahan sampel yang digunakan meliputi serbuk daun waru, reagent yaitu es batu, air suling, etanol 96%, kertas saring, kelinci yang sudah diadaptasi di Universitas Setia Budi.

2.2 Bahan kimia. Bahan kimia yang digunakan setil alkohol, steareth-20, isopropil miristat, setrimonium klorida, natrium metabisulfit, metil paraben, propil paraben dan parfum.

2.3 Hewan uji. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci yang diperoleh dari Laboratorium Farmakologi Fakultas Farmasi Universitas Setia Budi.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi sampel daun waru

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

2. Pengumpulan bahan

Daun waru yang digunakan diperoleh dari Bibis Luhur, Banjarsari, Surakarta, Jawa Tengah. Daun waru yang diambil adalah daun yang hijau, bersih, segar dan bebas dari penyakit.

3. Pembuatan serbuk daun waru

Daun waru yang telah diambil dari pohonnya dicuci dengan air mengalir bertujuan untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel, setelah itu dipotong-potong menjadi bagian lebih kecil, lalu dikeringkan dengan alat pengering (*oven*) pada suhu 40°-50°C selama beberapa hari hingga kering, setelah kering dibuat serbuk dan diayak dengan ayakan no. 60.



Gambar 3. Pembuatan serbuk daun waru

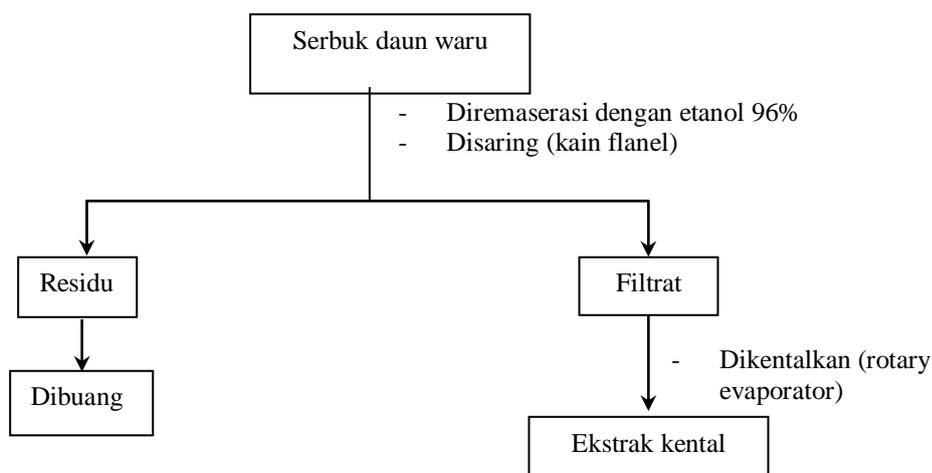
4. Penetapan kadar kelembaban serbuk daun waru

Penetapan kadar kelembaban dapat dilakukan dengan berbagai cara. Penetapan kadar air *Hibiscus tiliaceus* 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 etanol 96% daun waru

Pembuatan ekstrak etanol daun waru dibuat dengan menggunakan metode remaserasi. Dengan menimbang 500 gram serbuk daun waru, kemudian dimasukkan ke dalam botol coklat yang terhindar dari cahaya, lalu ditambah dengan etanol 96% dengan perbandingan 1:10, kemudian tutup. Direndam selama 6 jam pertama sampai sekali-kali dikocok atau diaduk, kemudian didiamkan selama 18 jam. Proses penyarian diulangi sekurang-kurangnya dua kali dengan jenis dan jumlah pelarut yang sama. Maserat yang didapat dipekatkan dengan *rotary evaporator* (suhu tetap dijaga pada 40°C-50°C) sampai diperoleh ekstrak kental (Depkes 2008). Hasil inilah yang selanjutnya disebut sebagai ekstrak etanol daun waru (*Hibiscus tiliaceus* L.).



Gambar 4. Pembuatan ekstrak daun waru

6. Identifikasi golongan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol daun waru 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. Adapun tujuan pendekatan fitokimia

adalah untuk mensurvei tumbuhan mendapatkan kandungan yang berguna untuk pengobatan (Farnsworth 1996).

Golongan senyawa yang terkandung di dalam ekstrak daun waru 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.

6.1 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).

6.2 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).

6.3 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.* 2013).

7. Formulasi *creambath* ekstrak etanol daun waru

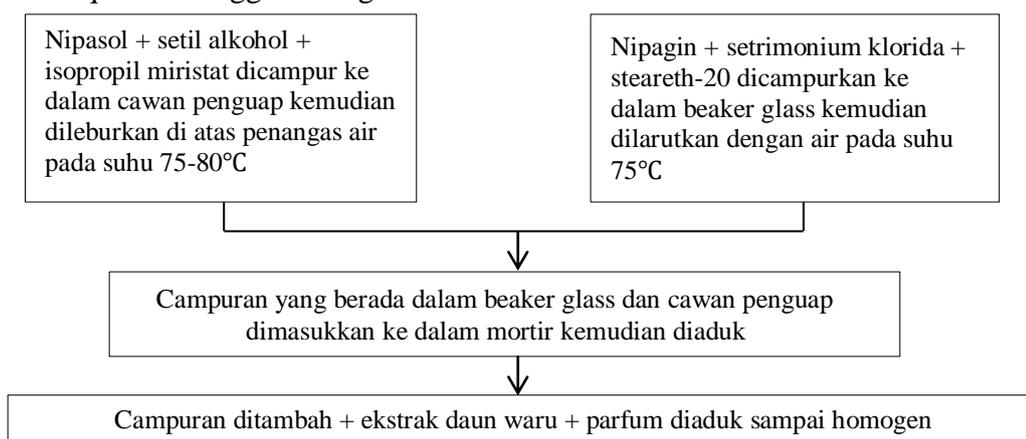
Formula *creambath* ekstrak etanol daun waru dapat dilihat pada:

Tabel 1. Formula *creambath* ekstrak etanol daun waru dengan berbagai konsentrasi ekstrak kental (Sofia & Indrawati 2018).

Bahan	Konsentrasi bahan (%)			
	F1	F2	F3	F4 (kontrol -)
Ekstrak daun waru	12,5	25	37,5	-
Setil alkohol	5	5	5	5
Steareth-20	2	2	2	2
Isopropil miristat	5	5	5	5
Setrimonium klorida	4	4	4	4
Metil paraben	0,15	0,15	0,15	0,15
Propil paraben	0,05	0,05	0,05	0,05
Natrium metabisulfit	0,10	0,10	0,10	0,10
Parfum	Qs	Qs	Qs	Qs
Air suling	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml	ad 100 ml

8. Pembuatan sediaan *creambath* ekstrak etanol daun waru

Pembuatan *creambath* ekstrak daun waru dimulai dari semua komponen minyak (propil paraben, setil alkohol, isopropil miristat) dicampur ke dalam cawan penguap kemudian dileburkan di atas penangas air pada suhu 75-80°C (fase minyak). Kemudian semua komponen air (metil paraben, natrium metabisulfit, setrimonium klorida dan steareth-20) dimasukkan ke dalam beaker glass kemudian dilarutkan 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 waru aduk hingga homogen. Setelah itu tambahkan parfum qs aduk hingga homogen.



Gambar 5. Pembuatan sediaan *creambath* ekstrak etanol daun waru

9. Pengujian sifat fisik *creambath* ekstrak etanol daun waru

9.1 Uji organoleptis. Uji organoleptis dilakukan dengan cara pemeriksaan konsisten, bau dan warna selama penyimpanan untuk mengetahui kondisi fisik dari *creambath* (Amelia *et al.* 2016).

9.2 Uji pH. Pengukuran pH dilakukan dengan cara mencampurkan sediaan dengan aquadest dengan perbandingan 1:9, lalu celupkan pH meter ke dalam sediaan *creambath* dari ekstrak etanol daun waru (Amelia *et al.* 2016).

9.3 Uji homogenitas. Sediaan *creambath* diamati apakah terdispersi secara merata atau dengan cara mengocok sediaan.

9.4 Uji viskositas. Pasanglah viskotester pada klemnya dengan arah vertikal/tegak lurus dengan arah klem. Rotor kemudian dipasang pada viskotester dengan menguncinya berlawanan arah jarum jam. Masukkan sampel ke dalam mangkuk, kemudian alat dihidupkan. Catat berapa kekentalan sampel setelah jarum pada viskotester stabil.

9.5 Uji daya lekat. Letakkan sediaan (secukupnya) di atas objek glass yang telah ditentukan luasnya. Letakkan objek glass yang lain diatas sediaan tersebut. Tekan dengan beban sebesar 1 kg selama 5 menit. Pasang objek glass pada alat uji. Lepaskan beban seberat 80 gram dan catat waktunya hingga kedua obyek glass tersebut terlepas. Ulangi sebanyak 3 kali. Lakukan tes untuk formula sediaan yang lain dengan masing-masing 3 kali percobaan.

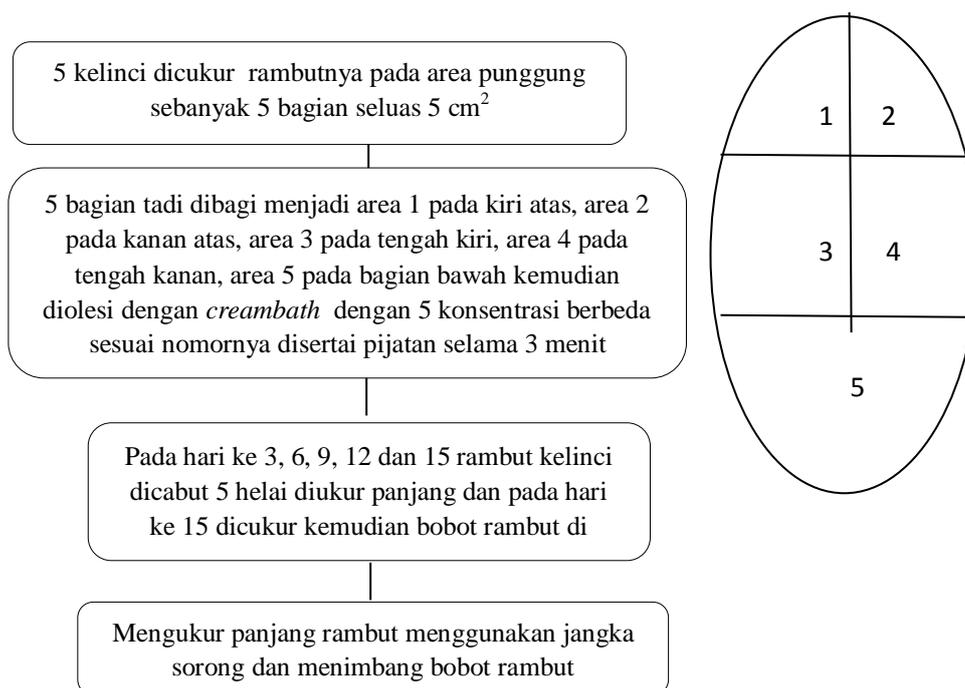
9.6 Uji daya sebar. Letakkan sejumlah 0,5 gram *creambath* di atas kaca yang berskala. Kemudian bagian atasnya di beri kaca yang sama, dan di tingkatkan bebannya dan di beri rentang waktu 1–2 menit. Kemudian diameter penyebaran diukur pada setiap penambahan beban, saat sediaan berhenti menyebar (dengan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

9.7 Uji proteksi. Ambillah sepotong kertas saring (10x10 cm). Basahilah dengan larutan fenolftalein untuk indikator. Setelah itu kertas saring dikeringkan. Olesilah kertas tersebut pada no. 1 dengan sediaan yang akan dicoba (1 lapis) seperti lazimnya orang mempergunakan sediaan. Sementara itu pada kertas saring yang lain, buatlah suatu area (2,5x2,5 cm) dengan parafin padat yang telah dilelehkan. Setelah kering/dingin akan didapat areal yang dibatasi dengan parafin padat. Tempelkan kertas no. 3 diatas kertas sebelumnya (kertas no. 2). Tetesi area ini dengan sedikit larutan KOH 0,1 N. Lihatlah sebalik kertas yang dibasahi dengan larutan fenolftalein pada waktu 15:30:45:60 detik, 3 dan 5 menit. Apakah ada noda berwarna merah/kemerahan pada kertas tersebut. Jika tidak ada noda berarti sediaan dapat memberikan proteksi terhadap cairan larutan KOH). Lakukan percobaan untuk sediaan yang lain.

9.8 Cycling test. Letakkan sediaan pada suhu 4°C selama 24 jam lalu dipindahkan ke oven bersuhu 40±2°C selama 24 jam hingga 6 siklus. Selanjutnya dilakukan pemeriksaan meliputi stabilitas pemisahan fasenya.

10. Uji aktivitas pertumbuhan rambut

Creambath ekstrak etanol daun waru diuji aktivitas pertumbuhan rambut menggunakan 5 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 5 bagian yang akan diolesi 5 konsentrasi berbeda, dicukur membentuk persegi dengan ukuran 5x5 cm. Sebelum dioleskan dengan *creambath* ekstrak etanol daun waru kulit punggung kelinci dibersihkan dengan kapas yang dibasahi air. Pengolesan disertai pemijatan selama 3 menit, lalu dibilas dilakukan 2 kali sehari pada waktu pagi dan sore selama 15 hari. 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.



Gambar 6. Uji aktivitas pertumbuhan rambut

11. 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).

Eritema	
Tidak ada eritema	: 0
Eritema sangat ringan	: 1
Eritema ringan	: 2
Eritema sedang	: 3
Eritema berat	: 4

12. Uji Iritasi Mata

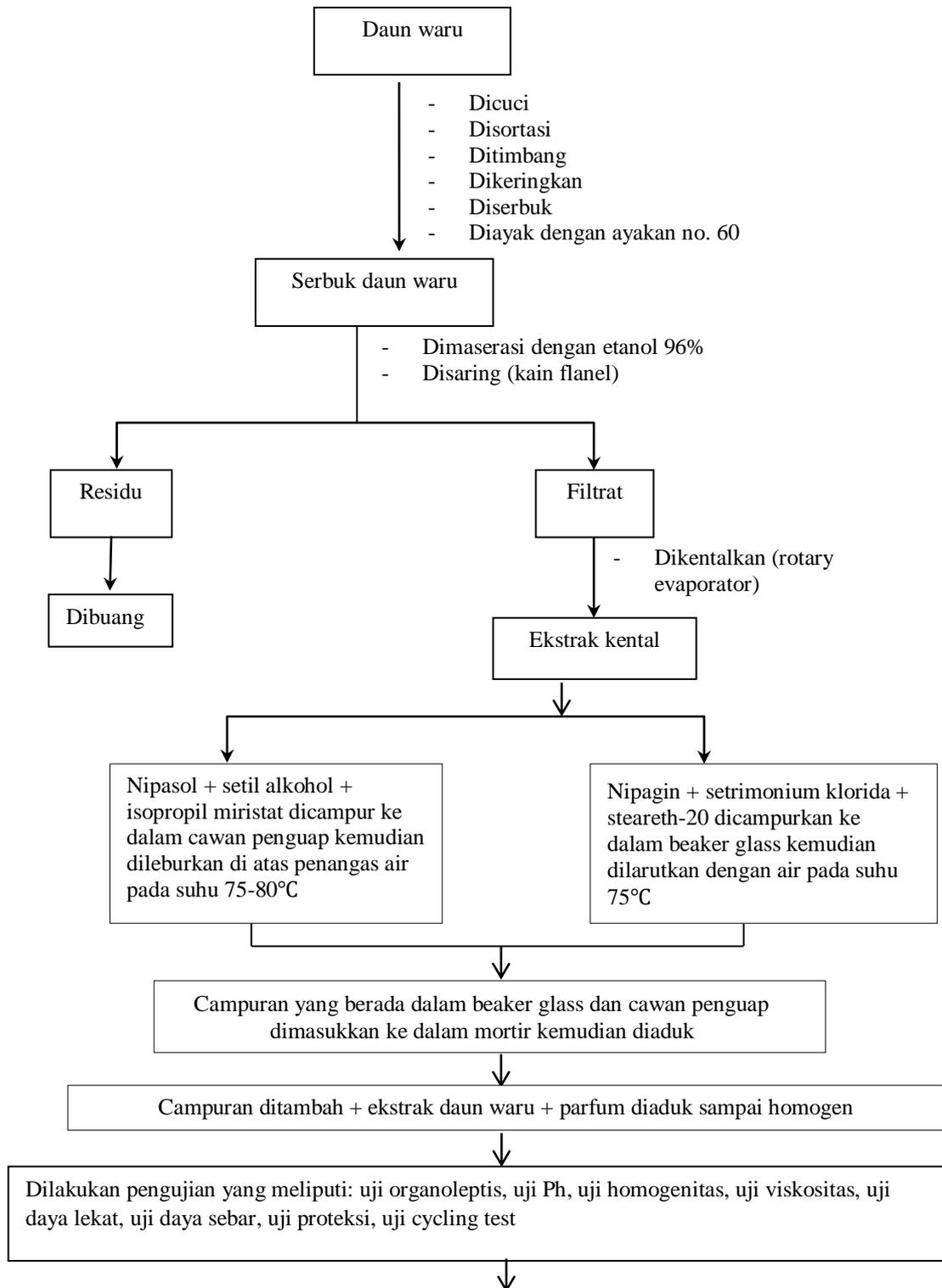
Prinsip uji iritasi mata adalah sediaan uji dalam dosis tunggal dipaparkan kedalam salah satu mata pada beberapa hewan uji dan mata yang tidak diberi perlakuan digunakan sebagai kontrol negatif. Derajat iritasi/korosi dievaluasi dengan pemberian skor terhadap cedera pada konjungtiva, kornea dan iris pada interval waktu tertentu. Selanjutnya untuk setiap keadan mata diberi nilai sebagai berikut (Badan Pengawasan Obat dan Makanan Republik Indonesia 2014).

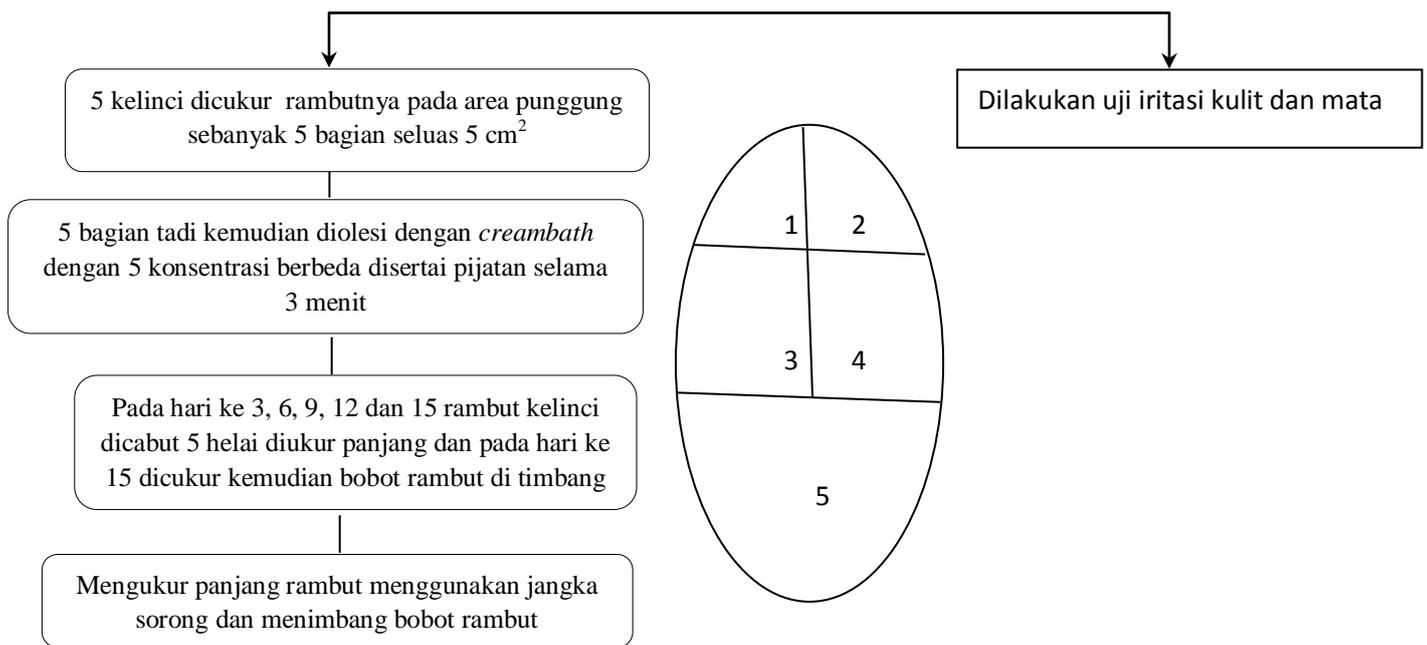
Iritasi	
Tidak ada iritasi	: 0
Iritasi sangat ringan	: 1
Iritasi ringan	: 2
Iritasi sedang	: 3
Iritasi berat	: 4

E. Analisa Data

Analisa data dalam penelitian ini menggunakan program SPSS. Data uji aktivitas pertumbuhan rambut yang diperoleh dianalisis menggunakan *Kolmogorov-Smirnov*. Hasil yang diperoleh, jika $>0,05$ terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan analisa ANOVA satu arah kemudian dilanjutkan dengan uji *Post Hoc Test* dengan taraf kepercayaan 95%, jika $<0,05$ tidak terdistribusi normal maka dilanjutkan dengan uji menggunakan *Dunnet t3* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan setiap formula.

F. Alur Penelitian





Gambar 7. Alur penelitian