

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi merupakan subjek penelitian menyeluruh, pada penelitian ini populasi yang digunakan ialah daun pare (*Momordica Charantia* L.) yang diambil dari Tawangmangu Jawa Tengah.

Sampel merupakan sebagian dari jumlah dan karakteristik dari populasi. Penelitian ini menggunakan sampel daun pare (*Momordica Charantia* L.) yang segar, utuh, bersih, bebas dari penyakit, berwarna hijau muda sampai hijau tua dan dapat diambil dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel

Variabel utama pada penelitian ini ialah sediaan *hair tonic* yang dibuat dari daun pare yang dipercaya memiliki khasiat kemudian akan diuji mutu fisik dan uji aktivitas pertumbuhan rambut pada kelinci. Kelinci yang akan digunakan yaitu kelinci *New Zealand White* berumur lebih dari 1 tahun dan bobot ± 3 kg sebanyak 5 ekor.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang diidentifikasi terlebih dahulu dapat diklasifikasi ke dalam berbagai macam variabel, yaitu variabel bebas, variabel terikat, dan variabel tergantung.

Variabel bebas ialah variabel yang mempengaruhi atau yang menjadi sebab perubahannya atau timbulnya variabel dependen (terikat). Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi pada propilen glikol.

Variabel terikat ialah kepuasan kerja, lingkungan kerja, kompensasi dan stres kerja. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah karakteristik fisik kimia (organoleptis, pH, viskositas, dan bobot jenis), pembuatan sediaan *hair tonic*, alat dan bahan, serta kondisi laboratorium.

Variabel tergantung ialah variabel yang faktornya diamati dan diukur untuk menentukan pengaruh yang disebabkan oleh variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini adalah aktivitas pada sediaan *hair tonic* ekstrak etanol daun pare terhadap pertumbuhan rambut kelinci dan efektifitas konsentrasi propilen glikol dari segi mutu fisik dan stabilitasnya.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, tanaman pare adalah tanaman yang dapat mengurangi kerontokan pada rambut karena tanaman pare mengandung senyawa yang dapat merangsang pertumbuhan rambut, bagian dari tanaman pare (*Momordica charantia* L.) yang digunakan yaitu daun berwarna hijau muda sampai hijau tua diambil dari Tawangmangu.

Kedua, daun pare adalah daun yang berwarna hijau muda sampai hijau tua termasuk daun yang tidak lengkap karena hanya terdiri dari tangkai dan daun saja tanpa ada pelepah.

Ketiga, ekstrak etanol daun pare adalah serbuk yang diekstraksi dengan etanol 96 % menggunakan metode maserasi kemudian hasil ekstraksi diuapkan dengan rotary evaporator sampai didapatkan ekstrak kental.

Keempat, variasi konsentrasi propilen glikol pada sediaan *hair tonic* adalah konsentrasi yang ditambahkan pada sediaan *hair tonic* dibuat dengan konsentrasi yang berbeda-beda yaitu 20%, 25% dan 30%.

Kelima, hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah kelinci *New Zealand White* berumur lebih dari 1 tahun dan bobot ± 3 kg yang diyakini memiliki respon sebagaimana dengan manusia terkait penyakit dan pengobatannya.

Keenam, sediaan *hair tonic* adalah sediaan yang digunakan sebagai perangsang pertumbuhan rambut sehingga pada sediaan dapat diuji mutu fisik dan uji stabilitas adalah pengamatan yang dilakukan terhadap stabilitas sediaan *hair tonic* yang meliputi uji organoleptis, uji pH, uji viskositas, dan bobot jenisnya.

Ketujuh, uji mutu fisik adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui kelayakan suatu sediaan secara fisiknya.

Kedelapan, aktivitas sediaan *hair tonic* adalah kemampuan sediaan ekstrak etanol daun pare menumbuhkan rambut kelinci.

Kesembilan, aktivitas antioksidan adalah kemampuan formula *hair tonic* sebagai daya peredaman terhadap radikal bebas.

Kesepuluh, Konsentrasi efektif adalah konsentrasi paling rendah yang sesuai dengan syarat sediaan yang sudah ditentukan.

Kesebelas, formula terbaik adalah formula yang memiliki efek sebanding dengan kontrol positif dan berbeda makna dengan kontrol negatif.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi timbangan analitik, serangkaian alat maserasi, pinset, ayakan no 60 mesh, alat penghalus, corong kaca, spektrofotometer UV-Vis, tabung reaksi, rak tabung reaksi, alat penyaring vakum, batang pengaduk, *rotary evaporator*, toples kaca, botol bening 100 mL, vial 10 mL, botol kaca 100 mL kertas saring, pipet tetes, kain hitam, pipet ukur, viskometer, pH meter, piknometer, alat alat gelas, jangka sorong, alat cukur dan kandang kelinci gunting, selotip bening dan *moisture balance*.

2. Bahan

Bahan yang dibutuhkan untuk penelitian ini yaitu daun pare, pereaksi bouchardat mayer, dragendorf, serbuk magnesium, HCl pekat, asam klorida 2N, larutan DPPH, besi (III) klorida, etanol 96%, propilenglikol, metil paraben, tween 80, metanol pro analisis natrium metabisulfit, menthol, parfum, aquadest, *minoxidil* dan vitamin C.

D. Jalannya Penelitian

1. Determinasi Sampel Daun Pare

Tahap pertama penelitian adalah menegaskan kebenaran sampel daun pare terhadap karakteristik morfologi daun pare dibuktikan dengan dilakukannya determinasi daun pare di B2P2TOOT Tawangmangu, Jawa Tengah.

2. Pengumpulan Bahan

Sampel daun pare yang akan digunakan diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun pare yang dipilih adalah daun yang segar, utuh, bersih, bebas dari penyakit, berwarna hijau muda sampai hijau tua.

3. Pembuatan Serbuk Daun Pare

Daun pare segar dibuat simplisia dengan cara dibersihkan terlebih dahulu dari kotoran dengan pencucian lalu dirajang kecil-kecil dan dikeringkan menggunakan bantuan sinar matahari langsung dengan ditutup kain hitam. Setelah kering, simplisia diserbuk dan diayak dengan ayakan untuk mengetahui tingkat kehalusan serbuk simplisia. Pembuatan ekstrak digunakan pengayak dengan nomor mesh 60.

4. Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Pare

Ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi. Dalam Formularium Herbal Indonesia perbandingan serbuk daun pare dengan etanol 96% sebesar (1:10). Serbuk daun pare sebanyak 500 gram dimasukkan kedalam 5000 mL etanol 96% diaduk sesekali selama 6 jam pertama, lalu didiamkan selama 24 jam kemudian di remaserasi dengan etanol 96% sebanyak 2500 mL. Maserat disaring dengan menggunakan penyaring vakum hingga terpisah dengan ampasnya. Hasil saringan diuapkan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 120 rpm hingga diperoleh ekstrak kental.

Setelah didapatkan ekstrak kental dihitung persentase rendemen dengan rumus :

$$\% \text{Rendemen} = \frac{\text{bobot ekstrak}}{\text{bobot simplisia}} \times 100\%$$

5. Susut Pengeringan Serbuk Daun Pare

Serbuk daun pare diuji susut pengeringan menggunakan alat *moisture balance* dengan cara ditimbang 2 gram serbuk kemudian diratakan diatas piringan logam lalu dimasukkan kedalam *moisture balance*. Alat diatur pada suhu 105°C selama 30 menit. Pengujian diulangi sebanyak 3 kali. Angka yang muncul dalam satuan persen pada alat *moisture balance* dicatat sebagai kadar susut pengeringan serbuk daun pare.

6. Skrining Fitokimia Serbuk dan Ekstrak Etanol Daun Pare

6.1. Preparasi larutan uji. Larutan uji dibuat dengan perbandingan ekstrak dan etanol sebesar 1:10. Larutan uji yang akan digunakan untuk skrining fitokimia serbuk daun pare maupun ekstrak etanol daun pare dibuat dengan cara 500 mg ekstrak etanol daun pare dilarutkan kedalam 5 mL etanol kemudian diaduk sampai homogen. Pada serbuk simplisia campuran disaring terlebih dahulu sebelum digunakan untuk pengujian skrining fitokimia (Fithriani dkk., 2015).

6.2. Flavonoid. 0,5 mL larutan masing masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 5 mL etanol, dipanaskan selama 5 menit lalu larutan ekstrak dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain. Beberapa tetes HCl pekat , amil alkohol dan 0,2gram Mg bubuk ditambahkan kedalam tabung reaksi. Flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna merah-coklat (Depkes RI, 1995).

6.3. Alkaloid. 0,5 mL larutan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing masing ditambahkan 1 mL asam klorida 2N dan 9 mL air suling lalu dipanaskan selama 2 menit diatas penangas air, setelah itu didinginkan lalu saring. Filtrat yang diperoleh dibagi menjadi 3 dalam tabung reaksi yang berbeda. Tabung reaksi pertama ditambahkan 3 tetes reagen bouchardat, tabung kedua ditambahkan 3 tetes reagen dragendroff, dan 3 tetes reagen mayer pada tabung ketiga. Jika terbentuk endapan coklat pada tabung pertama, endapan jingga pada tabung kedua dan endapan putih sampai kekuningan pada tabung ketiga maka ekstrak mengandung alkaloid (Depkes RI, 1995).

6.4. Saponin. 0,5 mL ekstrak masing masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditambahkan air suling panas kemudian didinginkan dan dikocok kuat-kuat selama 10 detik, reaksi positif jika terbentuk busa selama 10 menit, tinggi 1 cm sampai 10 cm, dan pada saat ditambahkan 1 tetes asam klorida 2N busa tidak menghilang (Depkes RI, 1995).

6.5. Tanin. 0,5 mL larutan uji dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing masing disari dengan 10 ml air suling, lalu disaring dandi encerkan filtratnya dengan menggunakan air suling sampai tidak berwarna. Diambil 2 ml larutan lalu

ditambahkan 1 sampai 2 tetes reagen besi (III) klorida. Jika terbentuk warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tannin (Depkes RI, 1995).

7. Formulasi Sediaan *Hair Tonic* Ekstrak Etanol Daun Pare

Formula *hair tonic* ekstrak etanol daun pare dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Formula sediaan *hair tonic*

Bahan	Kontrol (-) (%)	Komposisi Formula (%)			Fungsi
		A	B	C	
Ekstrak etanol daun pare	-	8	8	8	Zat aktif
Etanol 96 %	40	40	40	40	Solven
Propilen Glikol	40	40	50	60	Kosolven
Metil Paraben	0,2	0,2	0,2	0,2	Pengawet
Natrium Metabisulfit	0,02	0,02	0,02	0,02	Antioksidan
Tween 80	4	4	4	4	Dispersing agent
Menthol	0,2	0,2	0,2	0,2	Peningkat penetrasi
Parfum	5 tetes	5 tetes	5 tetes	5 tetes	Pewangi
Aquadest	Ad 200	Ad 200	Ad 200	Ad 200	Basis

Keterangan :

- Formula A : mengandung ekstrak etanol daun pare 4% dan propilen glikol sebanyak 20 %
- Formula B : mengandung ekstrak etanol daun pare 4% dan propilen glikol sebanyak 25 %
- Formula C : mengandung ekstrak etanol daun pare 4% dan propilen glikol sebanyak 30 %
- Kontrol (-) : tidak mengandung ekstrak etanol daun pare dan propilen glikol sebanyak 20 %
- Kontrol (+) : menggunakan produk *minoxidil*

8. Pembuatan Sediaan *Hair Tonic* Ekstrak Etanol Daun Pare

Ekstrak etanol daun pare dilarutkan dengan etanol didalam *beaker glass* (campuran 1). Tween 80 dilarutkan di dalam air hingga homogen masukkan campuran 1 (campuran 2). Metil paraben dan menthol dilarutkan dengan etanol didalam *beaker glass* yang lain, setelah homogen propilen glikol ditambahkan sedikit demi sedikit (campuran 3). Natrium metabisulfit dilarutkan dengan sedikit aquadest didalam *beaker glass*, setelah larut dimasukkan kedalam campuran 2 Campuran 2 dan campuran 3 disatukan dalam wadah dan diaduk kemudian ditambahkan parfum lalu diaduk kembali serta ditambahkan aquadest sampai volume yang ditentukan.

9. Pengujian Mutu Fisik *Hair Tonic* Ekstrak Etanol Daun Pare

9.1. Organoleptis. Pengujian organoleptis dilakukan dengan cara diamati warna dan bau sediaan *hair tonic* ekstrak etanol daun.

9.2. pH. Pengujian pH dilakukan dengan cara nilai pH menggunakan alat yang disebut pH meter. Elektroda terlebih dahulu dikalibrasi dengan larutan kalibrator pH 4 dan 7, lalu elektroda dibilas dengan aquadest kemudian dikeringkan

dengan tisu yang lembut. Sampel disiapkan lalu elektroda dicelupkan kedalamnya ditunggu hingga alat dapat membaca pH secara stabil. Hasil pembacaan pH dan suhu yang tertera pada monitor pH meter dicatat. Elektroda dibilas dengan aquadest dan dikeringkan.

9.3. Viskositas. Pengujian viskositas bertujuan untuk mengetahui tingkat kekentalan sediaan. Viskositas diukur menggunakan *BrookField* pengujian dimulai dengan sampel dimasukkan ke dalam *beaker glass* kemudian jarum *spindle* dipasang dan diturunkan hingga *spindle* terendam sampel dengan cara baut pada penyangga dikendorkan, visko meter dinyalakan dengan kecepatan *rpm* tertentu. Nilai yang muncul pada monitor alat dicatat sebagai nilai viskositanya. Skala diperhatikan jika kecepatan <10 maka *rpm* ditingkatkan tetapi jika kecepatan di >100, maka jarum *spindle* diganti dengan nomor yang lebih besar dari jarum *spindle* sebelumnya (Bunga, 2022).

9.4. Bobot Jenis. Pengukuran bobot jenis dilakukan dengan cara piknometer kosong yang bersih dan kering ditimbang dan dicatat bobotnya. Piknometer kosong diisi dengan aquadest kemudian ditimbang dan dicatat kembali bobotnya dan aquadest didalamnya dibuang. Piknometer yang sama dalam kondisi kosong dan kering diisi dengan sampel lalu ditimbang dan dicatat bobotnya.

Bobot jenis dapat dihitung dengan rumus berikut :

$$B_j = \frac{\text{Berat piknometer (A)} - \text{Berat piknometer (c)}}{\text{Berat piknometer (B)} - \text{Berat piknometer (C)}}$$

Keterangan :

- A : Berat piknometer + sampel
- B : Berat piknometer + aquadest
- C : Berat piknometer kosong

10. Uji Antioksidan Metode DPPH

10.1. Pembuatan Larutan DPPH 0,4 mM. Pembuatan larutan DPPH 0,4 mM dilakukan dengan mencampurkan 7,88 mg serbuk DPPH ke dalam 50 mL methanol Pro Analisis (PA) kemudian campuran diinkubasi dalam ruangan yang gelap selama kurang lebih 30 menit (Najihudin dkk., 2017).

10.2. Penentuan Panjang gelombang Maksimum. Panjang gelombang maksimum ditentukan dengan larutan DPPH 1 mL diencerkan dengan etanol sampai dengan 5 mL kemudian disimpan selama 30 menit, untuk mendapatkan

nilai absorbansi dilakukan pengukuran panjang gelombang pada 500-600 nm (Najihudin dkk., 2017).

10.3. Penentuan *Operating Time* (OT). *Operating Time* (OT) ditentukan dengan cara 50 µg/mL larutan pembanding vitamin C direaksikan dengan 4 mL larutan DPPH kemudian dicampur dengan *stirer* selama kurang lebih 1 menit lalu absorbansi diukur pada menit ke 5, 10, 15, 20, 25, dan 30 pada panjang gelombang maksimum yang sudah ditentukan (Salampe dkk., 2019).

10.4. Pembuatan Larutan Standar Vitamin C Metode DPPH. Dibuat larutan stok 1000 ppm dengan cara 50 mg vitamin C dilarutkan dengan 50 mL metanol pa hingga larut sempurna kemudian dipipet masing-masing sebanyak 100, 200, 300, 400, dan 500 µL kemudian dicukupkan volumenya hingga 5 mL sehingga didapatkan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 ppm (Salampe dkk., 2019).

10.5. Pengujian Aktivitas Antioksidan Vitamin C dengan DPPH. Pengujian dilakukan dengan memipet 4 mL dari berbagai konsentrasi larutan vitamin C (2,4, 6, 8, dan 10 ppm) lalu ditambah dengan 1 mL larutan DPPH hingga tercampur sempurna kemudian campuran disimpan selama 30 menit di ruangan gelap. Langkah berikutnya yaitu absorbansi diukur menggunakan spektrofotometer UV-Vis dengan panjang gelombang maksimum (Salampe dkk., 2019).

10.6. Pembuatan Larutan Stok Ekstrak Etanol Daun Pare Metode DPPH. Pembuatan larutan stok 1000 ppm dengan cara melarutkan 50 mg ekstrak etanol daun pare dengan metanol pro analisis hingga 50 mL dalam labu erlenmeyer hingga larut kemudian masing-masing dipipet sebanyak 100, 200, 300, 400, dan 500 µL sehingga didapatkan konsentrasi 20, 40, 60, 80, dan 100 ppm (Salampe dkk., 2019).

10.7. Pengukuran Aktivitas Antioksidan Ekstrak Etanol Daun Pare dengan DPPH. Pengukuran aktivitas antioksidan pada daun pare dilakukan dengan sebanyak 4 mL ekstrak etanol daun pare (20, 40, 60, 80, dan 100 ppm) ditambah dengan 1 mL larutan DPPH dicampur hingga larut lalu disimpan selama 30 menit. Pengukuran serapan dilakukan menggunakan spektrifotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimum (Salampe dkk., 2019).

10.8. Penentuan Persen Inhibisi dan Nilai IC₅₀. Aktivitas antioksidan dinyatakan dalam nilai presentase inhibisi yang dihitung dengan rumus (Hasanah, 2017).

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{A_{\text{blanko}} - A_{\text{ekstrak}}}{A_{\text{blanko}}} \times 100\%$$

Keterangan :

A blanko ekstrak : absorbansi tidak mengandung sample

A ekstrak : absorbansi ekstrak

Nilai IC₅₀ didapat dengan cara menghitung konsentrasi yang diperlukan untuk menghambat radikal bebas sebesar 50% berdasarkan persamaan garis regresi linier menggunakan rumus:

$$y = ax + b$$

Keterangan:

y = 50

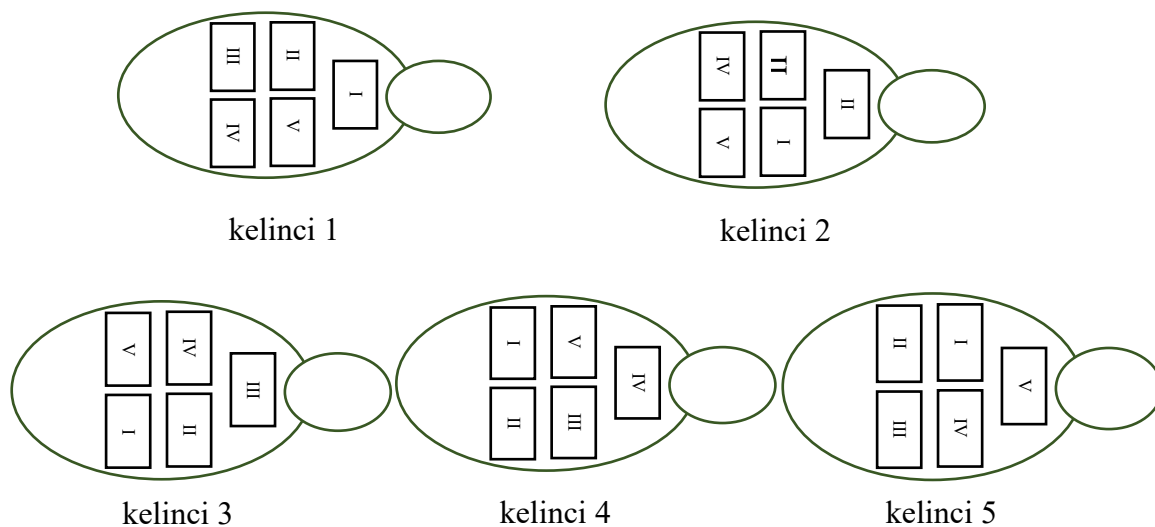
x = Konsentrasi larutan uji

Pengujian antioksidan menggunakan parameter IC₅₀ sebagai konsentrasi sampel yang dibutuhkan untuk menangkap radikal DPPH sebanyak 50% yang artinya semakin kecil nilai IC₅₀ maka aktivitas antioksidan semakin kuat (Setiawan & Yunita, 2018).

11. Perlakuan Hewan Uji

11.1. Penyiapan Hewan Uji. Hewan uji yang digunakan dalam pengujian ini adalah kelinci *New Zealand White* dengan usia >1 tahun dengan bobot ± 3kg. Sebelum dilakukan pengujian kelinci diaklimatisasikan selama 1 minggu kemudian diamati kondisi umumnya.

11.2. Perlakuan Hewan Uji. Kelinci *New Zealand White* yang digunakan untuk pengujian aktivitas pertumbuhan rambut sebanyak 5 ekor. Sebelum diberikan perlakuan kelinci diberi makanan yang bernutrisi dengan jumlah yang sama. Punggung kelinci dibersihkan dari rambut dengan cara dicukur dibuat menjadi 5 bagian yang masing-masing berbentuk persegi dengan ukuran 2x2 cm diberi jarak antar daerah sekitar 1 cm. Dilakukan penetesan sampel dan diratakan dengan volume sediaan sebanyak 1 mL pada masing masing kelompok sekali dalam sehari. Penetesan hari pertama dianggap hari ke satu.



Gambar 13. Perlakuan hewan uji

Keterangan :

- a. Area I : kontrol positif (dioleskan *minoxidil*)
- b. Area II : kontrol negatif (dioleskan formula tanpa ekstrak)
- c. Area III : dioleskan formula 1
- d. Area IV : dioleskan formula 2
- e. Area V : dioleskan formula 3

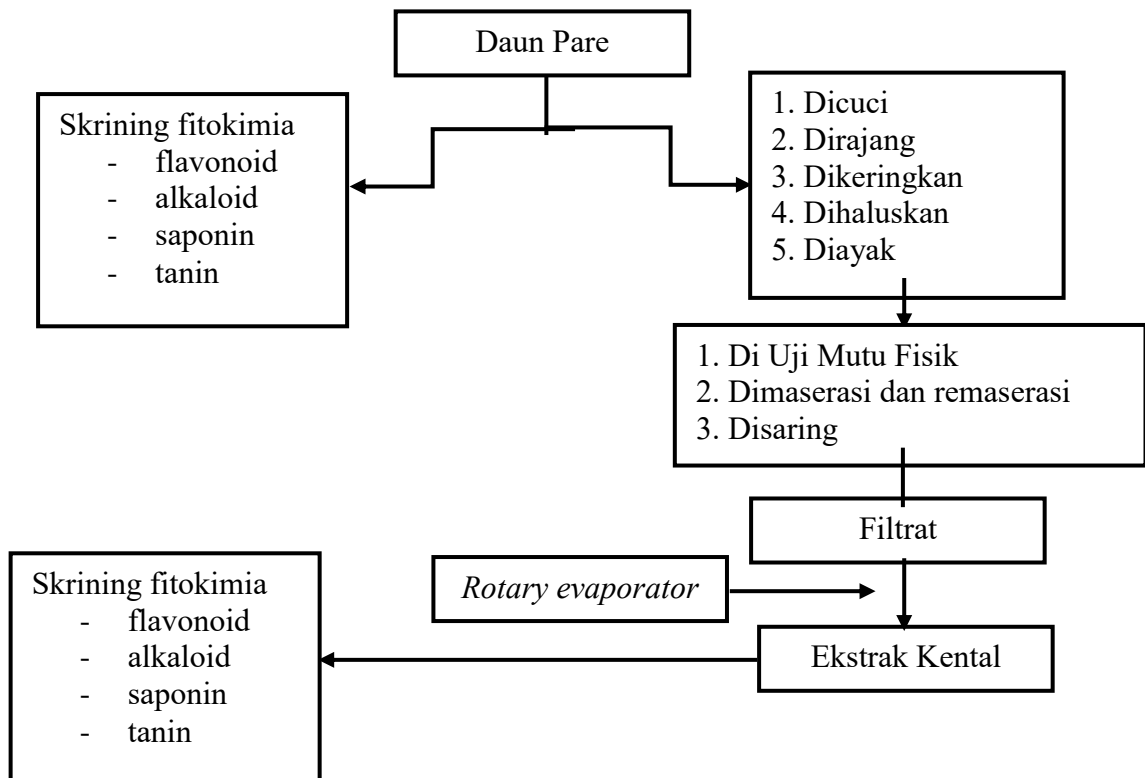
11.3. Pengamatan Pertumbuhan Rambut. Parameter aktivitas pertumbuhan rambut yaitu panjang pertumbuhan dan bobot rambut. Pengukuran Panjang rambut dilakukan dengan cara dicabut 10 helai rambut ditempelkan pada selotip bening diukur dengan jangka sorong. Dilakukan pengukuran selama 21 hari dengan pengamatan pada hari ke-7, hari ke-14 dan hari ke-21. Pengukuran bobot rambut dengan cara dicukur rambut yang tumbuh pada hari ke-21 oleh masing masing kelompok kemudian ditimbang.

E. Analisis Data

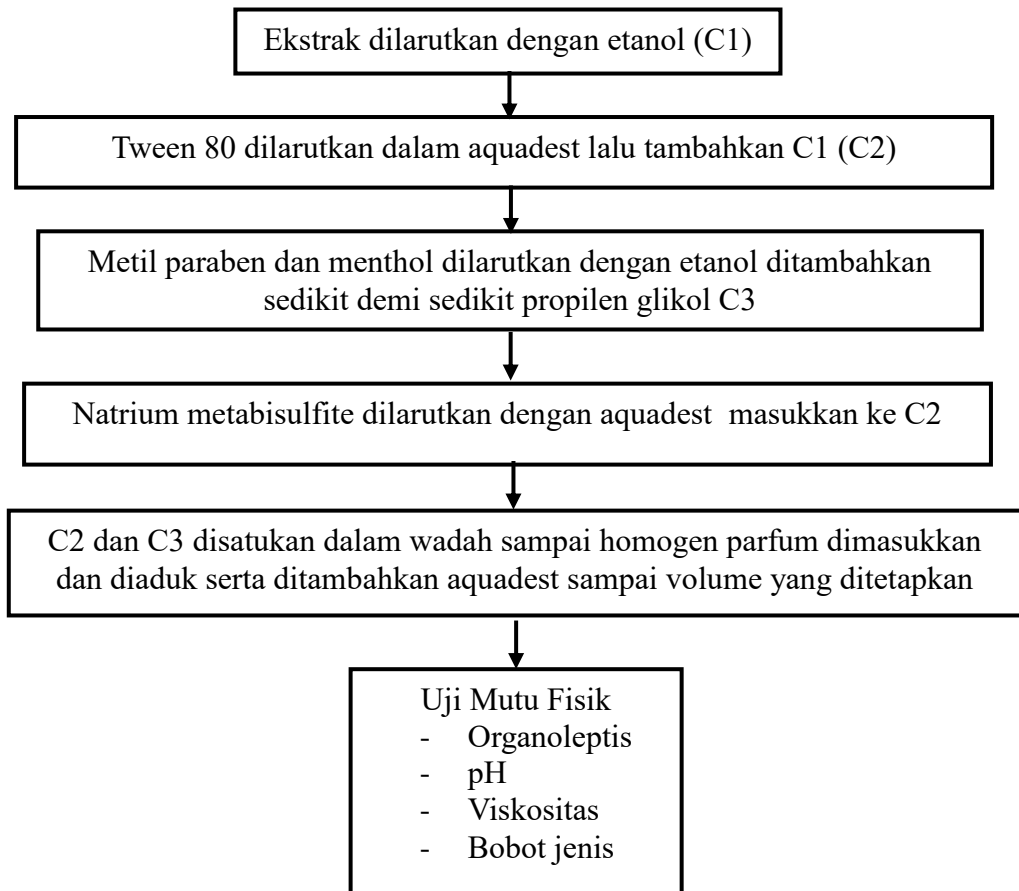
Analisa data yang digunakan pada penelitian ini adalah SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Data uji aktivitas pertumbuhan rambut yang didapatkan di analisa menggunakan *Saphiro walk*. Berdasarkan hasil yang diperoleh jika nilai normal, homogen atau $> 0,05$ dilanjutkan dengan uji parametrik metode *ANOVA* kemudian dilakukan uji *Post Hoc Turkey* Namun apabila signifikasi nilai yang didapatkan tidak normal, tidak homogen atau $< 0,05$ dilanjutkan dengan uji non parametrik metode *Kruskal walis*. Apabila signifikasi $< 0,05$ dilanjutkan

dengan uji non parametrik parametrik dengan uji *Mann Withney* dengan tujuan mengetahui apakah terdapat perbedaan pada masing masing perlakuan.

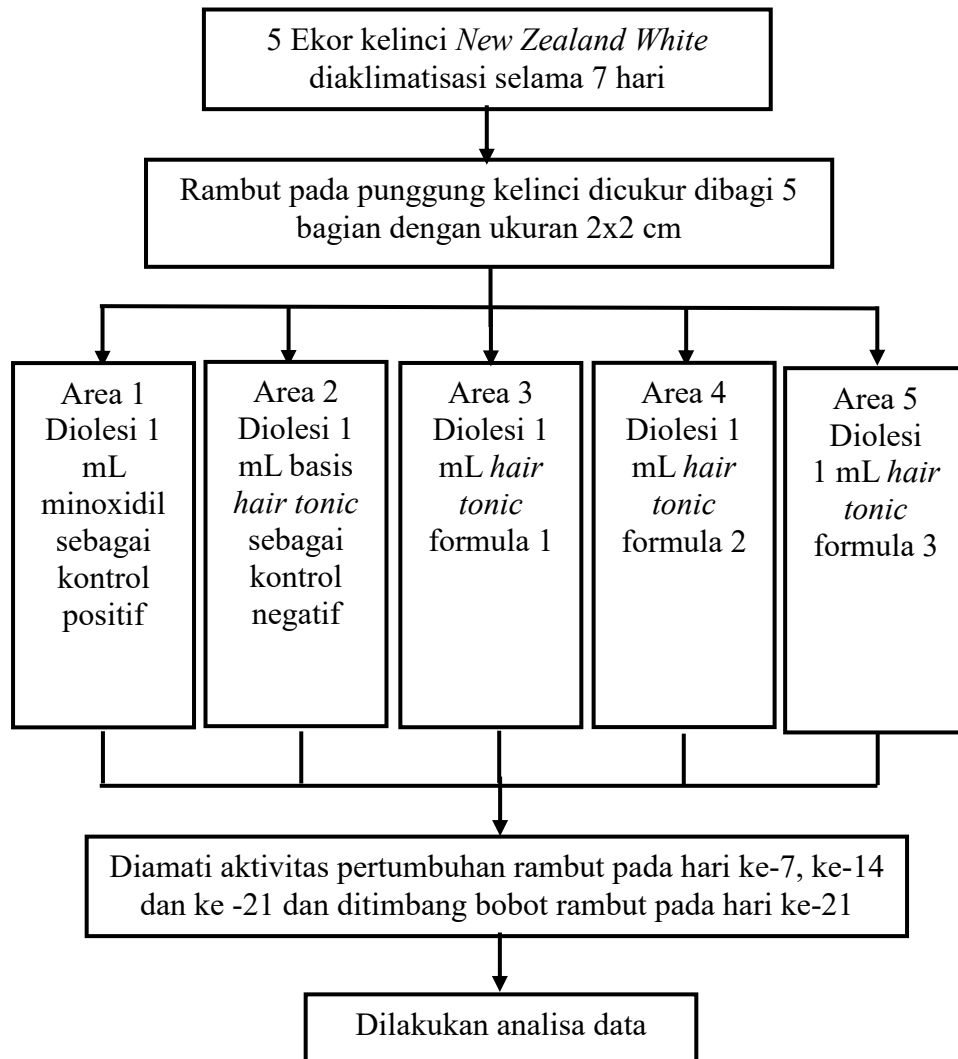
F. Skema Jalannya Penelitian



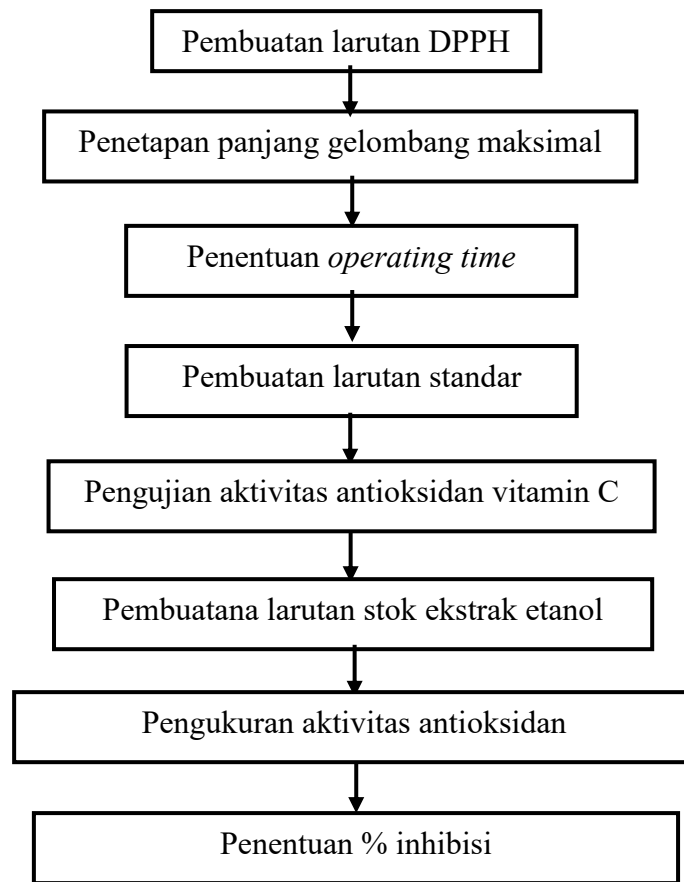
Gambar 14. Pembuatan ekstrak etanol daun pare (*Momordica Charantia L.*)



Gambar 15. Pembuatan Formula hair tonic



Gambar 16. Perlakuan dan pengamatan hewan uji



Gambar 17. Uji antioksidan metode DPPH