

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi tanaman yang digunakan pada penelitian ini adalah daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)R.M.Sm) yang diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

Sampel yang digunakan pada penelitian ini merupakan daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)R.M.Sm) yang diambil secara acak dan dipilih daun yang tidak terlalu muda, berwarna hijau, masih segar, bebas hama, tidak busuk, daun diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah pada bulan September.

Hewan uji yang digunakan berjumlah 5 berdasarkan rumus Federer :

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

Keterangan

n : Besar sampel setiap kelompok

t : Jumlah kelompok

15 : Konstanta

Dengan jumlah hewan uji 5 kelompok

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(5-1) \geq 15$$

$$(n-1) \geq 15/4$$

$$n-1 \geq 3,75$$

$$n \geq 4,75$$

Jumlah hewan yang digunakan harus lebih besar atau sama dengan 4,75 ekor hewan uji, sehingga pada penelitian ini menggunakan 5 ekor hewan uji.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)R.M.Sm) yang dibuat sediaan emulgel yang akan di uji aktivitas terhadap pertumbuhan rambut kelinci.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah uji mutu fisik yaitu uji organoleptik, uji pH, uji homogenitas, uji viskositas, uji daya sebar, dan uji daya lekat sediaan emulgel ekstrak daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)R.M.Sm) terhadap pertumbuhan rambut kelinci.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang diidentifikasi terlebih dahulu sehingga dapat diklasifikasikan ke berbagai macam variabel yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi ekstrak daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)R.M.Sm) yang diformulasikan menjadi sediaan emulgel yang di ujikan pada punggung kelinci dengan berbagai konsentrasi.

Variabel tergantung adalah variabel yang dipengaruhi oleh adanya variabel bebas, variabel tergantung dalam penelitian ini yaitu mutu fisik sediaan emulgel (organoleptis, pH, viskositas, homogenitas, daya sebar, dan daya lekat), uji stabilitas, aktivitas sediaan emulgel ekstrak etanol daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)R.M.Sm) terhadap panjang rambut, dan kelebatan rambut kelinci.

Variabel terkendali adalah variabel yang dapat mempengaruhi variabel tergantung, variabel terkendali dalam penelitian ini yaitu kondisi peneliti, kondisi laboratorium yang dipakai termasuk alat-alat, bahan, serta media yang digunakan.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, daun kecombrang adalah bagian dari tanaman kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)R.M.Sm) yang berupa daun segar berwarna hijau muda sampai hijau tua, sehat dan bersih.

Kedua, ekstrak daun kecombrang adalah ekstrak kental yang didapatkan dari proses ekstraksi dengan metode maserasi serbuk daun kecombrang sertamenggunakan pelarut etanol 96%.

Ketiga, konsentrasi ekstrak etanol daun kecombrang adalah ukuran yang menggambarkan jumlah ekstrak yang digunakan kedalam formula emulgel penumbuh rambut yang dibuat dengan konsentrasi 7,5%; 10%; 12,5%.

Keempat, formulasi efektif adalah formulasi yang mempunyai aktivitas yang setara dengan kontrol positif dalam mempercepat pertumbuhan rambut pada kelinci.

Kelima, panjang rambut adalah panjang yang diukur pada rambut kelinci setiap 7 hari sekali setelah diberikan sediaan emulgel ekstrak daun kecombrang.

Keenam, bobot rambut adalah berat keseluruhan rambut yang tumbuh pada kelinci jantan *New Zealand White* setelah diberikan sediaan emulgel ekstrak daun kecombrang selama 21 hari.

Ketuju, uji mutu fisik sediaan emulgel penumbuh rambut adalah pengujian yang dilakukan terhadap sediaan emulgel. Uji organoleptik adalah pemeriksaan yang dilakukan terhadap bentuk, warna, dan bau. Uji pH adalah uji yang digunakan untuk mengetahui tingkat keasaman sediaan agar sesuai dengan pH sediaan topikal. Uji viskositas adalah uji yang dilakukan menggunakan viskometer brookfield. Uji homogenitas adalah uji untuk mengetahui homogenitas bahan aktif dan bahan tambahan lainnya. Uji daya sebar adalah uji yang dilakukan dengan tujuan untuk melihat kemampuan sediaan agar mudah diaplikasikan. Uji daya lekat adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui berapa lama emulgel dapat melekat. Uji tipe emulgel adalah uji yang dilakukan untuk mengetahui emulgel yang telah dibuat termasuk emulgel tipe A/M atau tipe M/A.

Kedelapan, uji stabilitas adalah uji untuk mengetahui kemampuan emulgel untuk bertahan dalam batas waktu yang telah ditetapkan sepanjang periode tertentudengan metode *cycling test*.

C. Alat Dan Bahan

1. Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian yaitu timbangan Analisa, alat penggiling, ayakan mesh 60, pisau, erlenmeyer, maserator, mikropipet, cawan porselen, gelas ukur, batang pengaduk, tabung reaksi, kertas saring, desikator, *viscometer Brookfield DV2T*, oven, kulkas, *rotary evaporator*, blender, gunting, jangka sorong, pinset, kandang kelinci, *waterbath*, pH meter, obyek glass, serta seperangkat *Notebook* dengan *software* SPSS untuk analisa data.

2. Bahan

2.1 Hewan uji. Penelitian ini menggunakan hewan uji kelinci *NewZealand white* jantan sebanyak 5 ekor.

2.2 Bahan uji. Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu daun kecombrang, etanol 96%, *aquadestilata*, karbomer, TEA, minyak zaitun, tween 60, span 20, propilenglikol, menthol, BHT, *DMDM Hyndatoin*, pereaksi *Dragendorf*, Lieberman-Burchard, pereaksi mayer alkohol, kloroform, HCl 2N, eter, nature[®], NaCl, FeCl₃, serbuk Mg, ammonia, *glycerin*.

D. Jalannya Penelitian

1. Pengumpulan sampel

Daun kecombrang (*Etlingera elatior* (Jack)R.M.Sm) yang diambil yaitu daun yang tidak terlalu muda, berwarna hijau, masih

segar, bebas hama, tidak busuk, daun diperoleh dari daerah Tawangmangu, Kabupaten Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Determinasi tanaman

Determinasi dilakukan untuk mengetahui kebenaran tanaman daun kecombrang yang akan digunakan pada penelitian ini. Determinasi daun kecombrang (*Etingera elatior*(Jack)R.M.Sm) dilakukan di B2P2TOOT Tawangmangu.

3. Pembuatan serbuk

Pembuatan serbuk simplisia daun kecombrang dibuat dari simplisia daun kecombrang utuh atau potongan-potongan halus simplisia yang telah dikeringkan melalui tahapan pembuatan serbuk menggunakan alat tanpa menimbulkan rusak dan hilangnya kandungan kimia yang diperlukan kemudian diayak sampai menjadi serbuk. Serbuk simplisia yang dipakai untuk pembuatan ekstrak yaitu simplisia halus menggunakan ayakan mesh 40 dengan lebar nominal lubang 0,105 mm, garis tengah 0,064 μm , serta ukuranya 250 μm (Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 2008).

4. Penetapan susut pengeringan serbuk daun kecombrang

Penetapan susut pengeringan serbuk dilakukan menggunakan *moisture balance* dengan cara menimbang 2 gram pada lempeng yang sudah ditimbang. Kemudian diratakan dan ditunggu sampai alat berbunyi.

5. Pembuatan ekstrak etanol daun kecombrang

Pembuatan ekstrak daun kecombrang dilakukan menggunakan metode maserasi. Serbuk simplisia sebanyak 1.300 gram direndam dengan pelarut etanol 96% sebanyak 13 L hingga seluruh serbuk terendam selama proses ekstraksi yaitu selama 2 kali 24 jam sambil dilakukan pengadukan sesekali. Selanjutnya ekstrak yang didapat dilakukan pemisahan filtrat dan residu dengan proses penyaringan. Filtrat yang didapatkan kemudian diuapkan menggunakan *rotary evaporator* sehingga diperoleh ekstrak kental daun kecombrang (Kusumawati *et al.*, 2015).

6. Penetapan susut pengeringan ekstrak daun kecombrang

Sebanyak 1 sampai 2 g ekstrak ditimbang, masukkan kedalam botol timbang dangkal bertutup yang telah ditimbang sebelumnya dan dipanaskan pada suhu 105°C dalam waktu 30 menit. ekstrak sebelum ditimbang diartakan terlebih dahulu dalam botol timbang dengan digoyang-goyangkan, selanjutnya dilakukan pengeringan dalam oven

pada suhu 105°C dengan dibuka tutupnya hingga didapatkan bobot tetap yaitu selisih berat setelah dikeringkan selama 1 tidak tidak lebih dari 0,0005, kemudian ditimbang. Botol sebelum pengeringan dibiarkan tertutup mendingin hingga suhu kamar dalam desikator (Nurlatifah *et al.*, 2021).

7. Identifikasi kandungan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol daun kecombrang

7.1. Uji Flavonoid. Memasukkan sampel dengan bentuk serbuk atau ekstrak dan air dalam tabung reaksi lalu dididihkan. Menyaring filtrat yang digunakan untuk pengujian. Filtrat yang didapat dibagi menjadi dua bagian. Bagian pertama digunakan untuk blanko dan bagian kedua ditambahkan dengan 0,05 g serbuk Mg dan 1 mL larutan asam klorida serta beberapa tetes larutan amil alkohol, dikocok dengan kuat. Hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna kuning atau jingga yang tertarik oleh amil alkohol (Sulastri *et al.*, 2020).

7.2. Uji Alkaloid. Panaskan sampel sebanyak 10 mg yang sudah ditambahkan asam klorida 2N sebanyak 1 ml dan 9 ml air selama 2 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang dihasilkan dibagi menjadi 3 bagian yang masing-masing bagian 3 tetes. Bagian pertama ditambahkan dengan pereaksi bouchardat sebanyak 2 tetes, jika hasil positif terbentuk endapan coklat sampai kehitaman. Bagian kedua ditambahkan pereaksi mayer sebanyak 2 tetes, jika hasil positif terbentuk endapan putih atau putih kekuningan. Bagian ketiga ditambahkan pereaksi dragendorff sebanyak 2 tetes, jika hasil positif terbentuk endapan merah jingga.

7.3. Uji Saponin. Panaskan sampel dalam bentuk serbuk atau ekstrak dan air dan dinginkan. Kocok ekstrak selama 1 menit. Hasil positif saponin apabila ekstrak membentuk busa sekurang-kurangnya dalam waktu 1 menit kemudian tambahkan asam klorida 1 N, Jika terbentuknya busa tetap dalam kondisi stabil maka positif mengandung saponin (Sulastri *et al.*, 2020).

7.4. Uji Tanin dan Polifenol. Sampel yang telah ditambahkan aquadest panas diaduk lalu didinginkan. NaCl 10% ditambahkan sebanyak 5 tetes kemudian disaring. Filtrat selanjutnya dibagi menjadi 3 bagian yaitu filtrat A, B, dan C. Filtrat A digunakan untuk blanko, Filtrat B ditambahkan pereaksi FeCl₃ 1% sebanyak 3 tetes, dan ditambahkan larutan gelatin 1% kedalam filtrat C dan diamati perubahan yang terjadi. Terbentuknya warna hijau kehitaman pada filtrat B menunjukkan

adanya tanin terhidrolisis, jika pada filtrat B terbentuk warna hijau kecoklatan maka menunjukkan adanya tanin terkondensasi dan terjadinya perubahan warna lain menunjukkan adanya senyawa polifenol (Sulastri *et al.*, 2020).

8. Rancangan formula emulgel ekstrak daun kecombrang

Tabel 1. Formula emulgel ekstrak daun kecombrang

Bahan	Konsentrasi (%)			
	F0 (%)	Formula 1 (%)	Formula 2 (%)	Formula 3 (%)
Ekstrak etanol daun kecombrang	-	7,5%	10%	12,5%
Karbomer	1	1	1	1
TEA	0,5	0,5	0,5	0,5
Minyak Zaitun	5	5	5	5
Tween 60	3,6	3,6	3,6	3,6
Span 20	1,4	1,4	1,4	1,4
Propilen glikol	10	10	10	10
Gliserin	10	10	10	10
Etanol 96%	3	3	3	3
Menthol	1	1	1	1
BHT	0,03	0,03	0,03	0,03
<i>DMDM Hydantoin</i>	0,6	0,6	0,6	0,6
<i>Aquadestilata</i>	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100
Jumlah	100	100	100	100

Keterangan :

F0 = Basis emulgel

F2 = Emulgel dengan konsentrasi ekstrak daun kecombrang 7,5%

F3 = Emulgel dengan konsentrasi ekstrak daun kecombrang 10%

F4 = Emulgel dengan konsentrasi ekstrak daun kecombrang 12,5%

9. Cara pembuatan emulgel

Pembuatan emulgel dapat dilakukan dengan :

9.1. Pembuatan basis emulsi. a.) Membuat fase minyak emulsi dengan cara melarutkan terlebih dahulu span 20, dan butil hidroksi toluena dalam minyak zaitun. b.) Kemudian fase air dibuat dengan cara melarutkan tween 60 dalam *aquadestilata* dan ditambahkan propilen glikol. Kedua fase dipanaskan pada suhu 40°C kemudian fase minyak dan fase air dicampur, lalu campuran kedua fase tersebut diaduk sampai homogen dan hingga suhunya turun mencapai suhu ruang (20-25°C) dan terbentuk emulsi.

9.2. Pembuatan basis gel. Basis gel dibuat dengan menaburkan karbomer diatas *aquadestilata* panas diaduk hingga terdispersi sempurna atau tidak ada butiran yang menggumpal. TEA dilarutkan dalam *aquadestilata* dan dicampur kedalam basis gel karbomer hingga diperoleh basis gel yang kental. Menthol dilarutkan dalam etanol kemudian diambahkan dalam basis gel.

9.3. Pembuatan emulgel. Sediaan emulgel dibuat dengan cara mencampurkan sedikit demi sedikit emulsi kedalam basis gel dan diaduk hingga membentuk massa gel yang homogen. Ekstrak yang telah dilarutkan dengan gliserin ditambahkan ke dalam basis emulgel kemudian ditambahkan *DMDM Hydantoin*. Pembuatan sediaan emulgel ekstrak daun kecombrang dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

10. Pengujian mutu fisik emulgel ekstrak daun kecombrang

10.1 Uji Organoleptik. Uji ini disebut juga uji indra merupakan uji yang dilakukan secara visual serta dilihat secara langsung pada warna, bentuk, dan bau dari sediaan emulgel yang telah dibuat (Astuti *et al.*, 2017). Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

10.2 Uji Homogenitas. Menimbang 0,1 gram sediaan emulgel kemudian di oleskan pada *object glass* dan di amati susunan partikelnya (Wibowo *et al.*, 2021). Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

10.3 Uji pH. Kalibrasi elektroda pH terlebih dahulu dengan larutan dapar pH 7 kemudian elektroda dicuci dengan air suling dan dikeringkan. Menyiapkan sediaan emulgel sebanyak 1 gram. Masukkan elektroda yang telah dikalibrasi kedalam sediaan dan diamkan sampai layer pH meter sudah menunjukkan angka yang stabil. Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

10.4 Uji Viskositas. Sediaan dimasukkan *beaker glass* 100 ml kemudian alat *viscometer Brookfield DV2T* dinyalakan dengan menekan tombol ON dibelakang alat hingga auto zero. Menggunakan spindel yang sesuai dan alat disetting sampai spindel terendam dalam sediaan. Setting nomer spindel, kecepatan putaran, waktu pengujian, dan memastikan persen *torque* antara 10-90%. Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

10.5 Uji Daya Sebar. Menimbang gel sebanyak 0,5 g letakkan ditengah *object glass* dan tutup dengan *object glass* lain serta pemberat di atasnya (50, 100, 150, dan 200,gram). Diamkan selama 1 menit kemudian amati dan catat diameter penyebarannya (Supriadi dan Yusuf, 2020). Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

10.6 Uji Daya Lekat. Sediaan uji dioleskan pada *object glass* dan tutup dengan *object glass* lainnya di atasnya kemudian diberikan tekanan dengan beban 1 kg dalam waktu 5 menit. Selanjutnya *object glass* diletakkan di alat daya lekat lalu diberikan beban dengan berat 80 g dan

lepaskan . Kemudian catat waktu ketika *object glass* lepas (Saraung *et al.*, 2018). Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

10.7 Uji Tipe Emulsi. Pengujian tipe emulgel dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu dengan metode pengenceran, metode dispersi larutan zat warna, dan daya hantar listrik. Metode pengenceran Metode pengenceran dilakukan dengan memasukkan sediaan emulgel kedalam tabung reaksi lalu di encerkan dengan air. Jika sediaan dapat diencerkan dalam air maka tipe emulsinya minyak dalam air (M/A) dan sebaliknya jika sediaan tidak dapat dapat diencerkan dalam air maka tipe emulsinya air dalam minyak (A/M). Metode dispersi larutan zat warna dilakukan dengan menambahkan *metylen blue* dan sudan III pada sediaan jika terbentuk warna biru yang dominan maka tipe emulsinya minyak dalam air (M/A), jika terbentuk warna merah yang dominan maka tipe emulsinya air dalam minyak (A/M). Metode pengukuran daya hantar listrik dilakukan dengan alat voltmeter yang dicelupkan dalam sediaan dan di amati pergerakan jarum voltmeter, jika terjadi pergerakan maka tipe emulsinya minyak dalam air (M/A) dan sebaliknya jika tidak terjadi pergerakan maka tipe emulsinya air dalam minyak (A/M). Pengujian ini dilakukan replikasi sebanyak 3 kali.

11. Uji Stabilitas

Uji stabilitas dilakukan menggunakan metode *cycling test* yaitu dengan cara menyimpan sediaan pada suhu $\pm 4^{\circ}\text{C}$ dalam waktu 24 jam kemudian dipindahkan pada suhu $\pm 40^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam dan proses tersebut dianggap sebagai satu siklus. Uji stabilitas metode ini dilakukan sejumlah 6 siklus. Selanjutnya dapat dilihat perbandingan fisik antara sediaan yang telah diuji dengan sediaan sebelum di uji.

12. Uji aktivitas pertumbuhan rambut kelinci

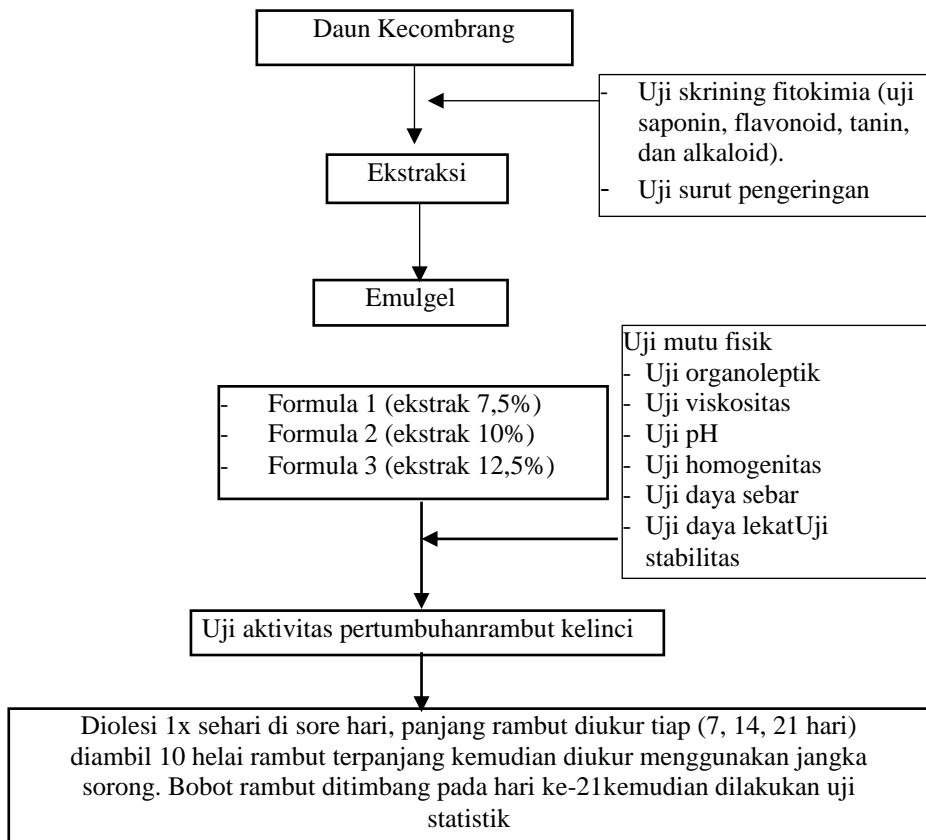
Pengujian aktivitas sediaan emulgel ekstrak daun kecombrang pada pertumbuhan rambut kelinci jantan dilakukan dengan metode Tanaka *et al* (1980). Kelinci diaklimatisasi dalam waktu 1 minggu sebelum dilakukan pengujian, selanjutnya dibersihkan dengan mencukur rambut dipunggungnya sampai bersih dan dilakukan pembagian daerah pengolesan menjadi 5 bagian dengan bentuk segi empat (luas area 2×2 cm) serta jarak 1 cm setiap daerah. Dilakukan pengolesan etanol 96% pada punggung kelinci yang berfungsi sebagai antiseptik sebelum dilakukan pengolesan sediaan uji.

Pengujian aktivitas pertumbuhan rambut dilaksanakan terhadap 5 kelompok perlakuan. Yaitu emulgel dengan konsentrasi ekstrak daun

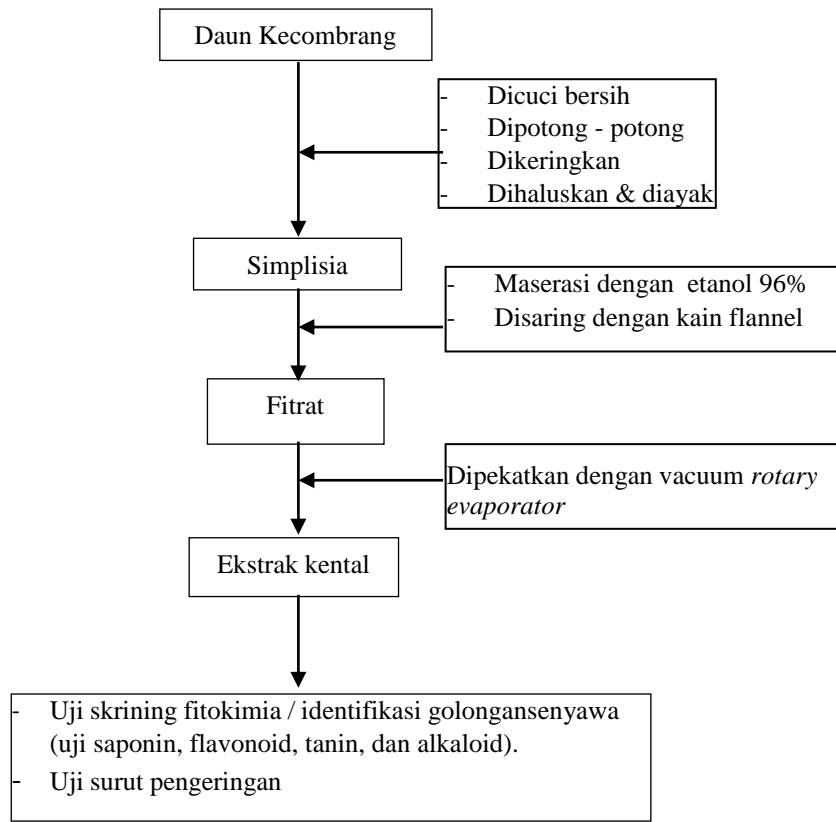
kecombrang 7,5%; 10%; dan 12,5%, kontrol negatif, serta kontrol positif. Pengolesan kontrol negatif dan positif sebanyak 0,5 g. Kontrol negatif hanya diolesi basis emulgel, sedangkan kontrol positif diberikan nature[®] yang merupakan sediaan penumbuh rambut dipasaran. Kelompok konsentrasi 1 dilakukan pengolesan emulgel ekstrak etanol daun kecombrang sebanyak 7,5%, konsentrasi 2 sebanyak 10%, dan konsentrasi 3 sebanyak 12,5%. Pengolesan sediaan uji pada punggung kelinci tersebut dioleskan dua kali sehari sebanyak 0,5 g sediaan selama 21 hari.

Pengolesan pada punggung kelinci dilakukan didaerah yang acak, karena diperkirakan pertumbuhan rambut terjadi secara berbeda disetiap daerah. Tujuan pengacakan tersebut harapannya dapat memiliki aktivitas pertumbuhan rambut pada semua daerah dengan perlakuan yang berbeda dapat terwakilkan. Kemudian dilakukan pengujian yaitu setiap 7 hari sekali pada masing-masing daerah pengolesan diambil 10 helai rambut kelinci, dan pada hari ke-7, ke-14, dan ke-21 dilakukan pengukuran panjang rambut kelinci dengan jangka sorong. Hari terakhir yaitu hari ke-21 rambut kelinci dicukur dan ditimbang. Kemudian dianalisa secara statistik menggunakan software SPSS 23 `pada laju pertumbuhan rambut serta bobot rambut kelinci (Nurlatifah *et al.*, 2021).

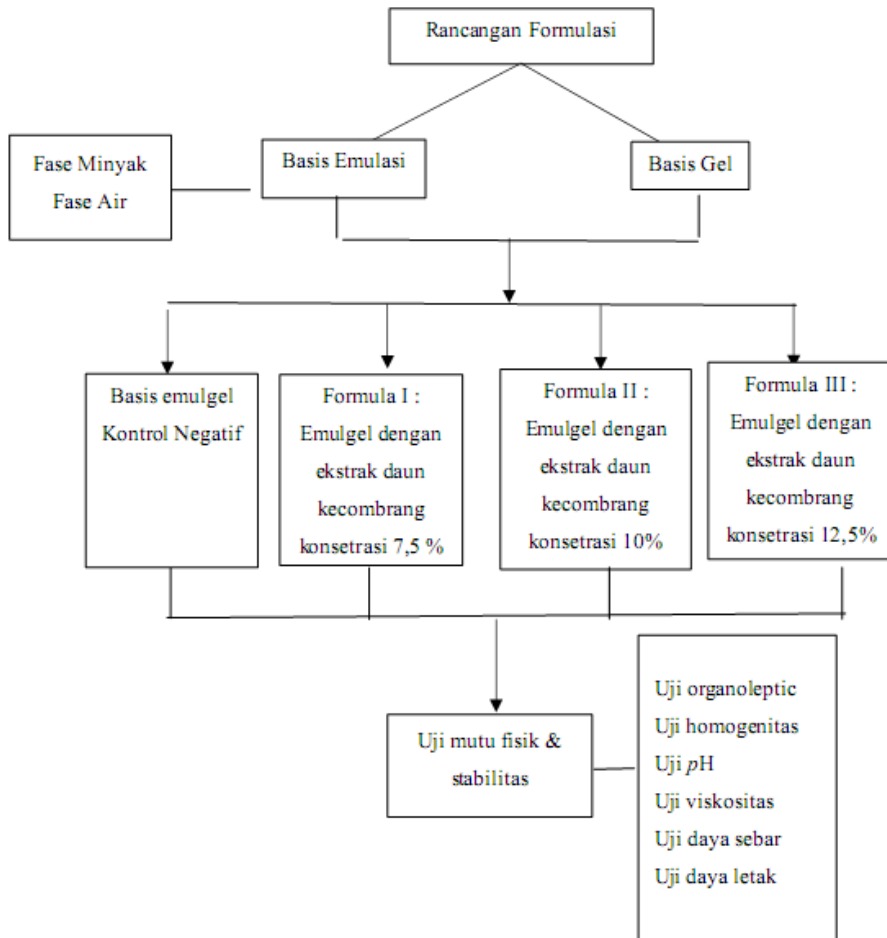
E. Skema Jalannya Penelitian



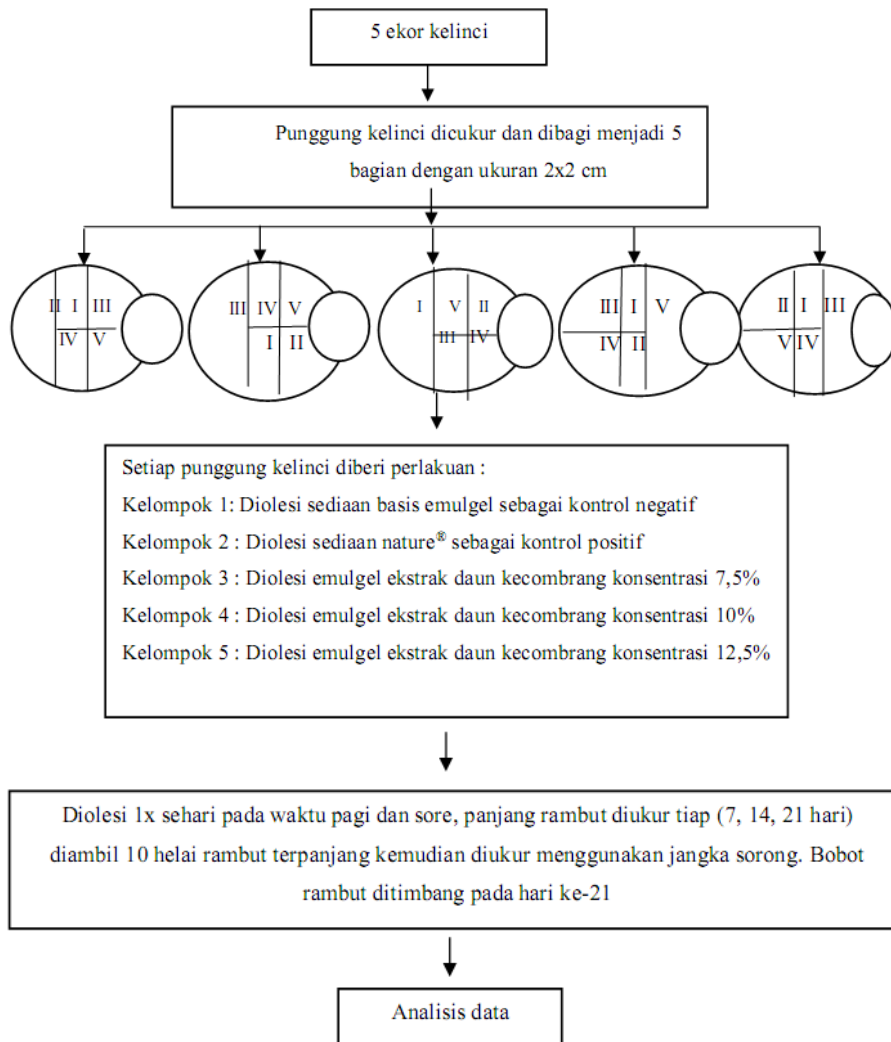
Gambar 16. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 17. Skema pembuatan ekstrak



Gambar 18. Skema pembuatan emulgel



Gambar 19. Skema Pengujian aktivitas pertumbuhan rambut emulgel ekstrak daun kecombrang.

F. Analisis Hasil

Analisis data yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan program SPSS. Data yang dianalisis yaitu data hasil uji mutu fisik sediaan emulgel, stabilitas dan data hasil uji aktivitas pertumbuhan rambut. Hasil mutu fisik, stabilitas, dan aktivitas pertumbuhan rambut dilakukan uji normalitas (*Saphiro-Wilk*). Jika diketahui data yang dihasilkan terdistribusi normal ($>0,05$) dilanjutkan dengan uji homogenitas (*Levene statistic*) dan jika data yang dihasilkan homogen ($>0,05$) dilanjutkan dengan uji ANOVA dua arah, kemudian dilakukan uji *Tukey* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang

bermakna dari masing-masing kelompok. Untuk data uji stabilitas setelah dilakukan uji *Tukey* dilakukan uji *T-test* untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan yang signifikan pada uji mutu fisik sediaan emulgel antara sebelum dan sesudah dilakukan stabilitas.