

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi adalah keseluruhan subjek penelitian populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun mangkokan (*Nothopanax scutellarium* L.) yang diambil dari Tawangmangu, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian dari jumlah dan karakteristik yang dimiliki oleh populasi. Sampel yang digunakan dalam penelitian adalah daun mangkokan. Daun yang dipilih yaitu daun berwarna hijau muda sampai hijau tua, utuh, bebas penyakit serta bersih dan daun dapat diambil didaerah Tawangmangu, Jawa Tengah.

B. Variabel penelitian

1. Identifikasi variabel

Variabel utama dalam penelitian ini adalah sediaan *hair tonic* dari tanaman mangkokan yang sudah lama dikenal kemampuan ekstraknya yang akan di uji aktivitas dan uji mutu sediaan *hair tonic* ekstrak etanol daun mangkokan terhadap pertumbuhan rambut kelinci. Kelinci yang digunakan yaitu kelinci new zealand sebanyak 4 ekor.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah stabilitas dan mutu fisik dari sediaan *hair tonic*.

2. Klasifikasi variabel utama

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

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

Variabel tergantung adalah variabel yang faktor-faktornya diamati dan diukur untuk mengetahui pengaruh yang ditimbulkan oleh variabel bebas. Variabel tergantung pada penelitian ini merupakan

aktivitas sediaan *hair tonic* ekstrak daun mangkokan terhadap pertumbuhan rambut kelinci.

3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, daun mangkokan adalah tanaman herbal yang mampu mengatasi rambut rontok karena mengandung senyawa yang berpotensi suntuk mempercepat pertumbuhan rambut, bagian dari tanaman mangkokan (*Nothopanax scutellarium* L.) yang berupa daun berwarna hijau tua diambil dari Tawangmangu.

Kedua, daun mangkokan yang masih segar di sortasi basah, dicuci, dan ditiriskan kemudian dikeringkan dengan meletakkan ditempat terbuka lalu ditutup dengan kain hitam supaya tidak terkena matahari langsung, kemudian daun disortasi kering dan dihaluskan menggunakan menggunakan blender setelah itu diayak menggunakan ayakan nomer 60.

Ketiga, ekstrak daun mangkokan adalah serbuk daun mangkokan yang diekstraksi dengan menggunakan metode maserasi hingga didapat filtrate yang diuapkang dengan menggunakan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

Keempat, variasi konsentrasi pada propilen glikol dalam formula sediaan *hair tonic* adalah konsentrasi propilen glikol yang ditambahkan kedalam formula sediaan *hair tonic* dan dibuat dengan konsentrasi yang berbeda.

Kelima, konsentrasi yang efektif adalah konsentrasi yang memiliki efek mempercepat pertumbuhan rambut dengan konsentrasi terkecil dari lainnya.

Keenam, hewan uji yang digunakan adalah *New Zeland White* dimana memiliki respon yang sama sebagaimana manusia pada penyakit dan pengobatannya.

Ketujuh, sediaan *hair tonic* adalah sediaan yang digunakan untuk merangsang pertumbuhan rambut pada kebotakan atau kerontokan sehingga pada sediaan dapat diuji mutu fisik dan uji stabilitas adalah pengamatan yang dilakukan terhadap stabilitas sediaan *hair tonic* yang meliputi uji organoleptis, uji viskositas, uji pH, dan bobot jenis.

Kedelapan, aktivitas sediaan hair tonic adalah kemampuan sediaan ekstraketanol daun mangkokan untuk pertumbuhan rambut kelinci

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang akan digunakan penelitian ini adalah timbangan analitik, lemari pendingin (LG), oven, pH meter, evaporator, viskometer ostwald, pinset, jangka sorong, kain flannel, batang pengaduk, piknometer, alat cukur, alat-alat gelas, plat tetes untung skrining fitokimia dan kendang kelinci.

2. Bahan

Bahan yang dipakai saat penelitian yaitu kelinci new zealand white, daun mangkokan, etanol 96%, propilen glikol, metil paraben, menthol, natrium metabisulfit, natur, aquadest, Liberman-Burchard, dan Mollisch, serbuk magnesium, ammonia encer, klotroform, , pereaksi Bouchardat, Mayer, Dragendorf, HCl 2N, amil alkohol, gelatin 10%, eter, anisaldehid-asam sulfat, dan NaOH, krim pencukur, parfum jasmine.

D. Jalanya Penelitian

1. Determinasi sampel daun mangkokan

Tahap pertama dalam dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui keaslian sampel daun mangkokan berdasarkan ciri morfologi daun mangkokan terhadap keputusan dan dibuktikan dengan dilakukan determinasi di B2P2TOOT Tawangmangu.

2. Pengumpulan bahan

Daun mangkokan yang akan digunakan diperoleh dari Tawangmangu, Jawa Tengah. Daun mangkokan yang diambil adalah daun yang hijau muda sampai hijau tua, bersih, segar, dan bebas dari penyakit.

3. Pembuatan serbuk daun mangkokan

Daun mangkokan yang digunakan yaitu daun segar yang akan dibuat simplisia dengan cara dicuci bersih bertujuan untuk menghindari kotoran pada daun, kemudian daun mangkokan dikeringkan di bawah sinar matahari secara tidak langsung (ditutup dengan kain hitam) lalu dirajang kasar. Serbuk diayak menggunakan kehalusan serbuk simplisia untuk menghasilkan ekstrak saringan No.60 (Depkes RI, 2008).

4. Uji kelarutan serbuk daun mangkokan

4.1 Uji kadar sari larut air. Tujuan penentuan ekstrak yang larut dalam air. Penetapan kadar sari larut air ditentukan dengan

menimbang sekitar 5 gram bubuk kering, kemudian dimasukkan ke dalam botol tertutup, tambahkan 100 mL air jenuh, kloroform, kocok beberapa kali selama 6 jam pertama, biarkan selama 18 jam. Saring 20 mL filtrat dan evaporasi hingga kering dalam cawan yang dipanaskan hingga 105 °C hingga beratnya tetap, kemudian hitung konsentrasi kadar dalam persen (Kemenkes RI, 2017).

4.2 Uji kadar sari larut etanol. Penetapan kadar sari larut etanol, ditentukan dengan menimbang sekitar 5 g serbuk kering kemudian dimasukkan ke dalam botol bersumbat, ditambahkan 100 ml etanol P dan dikocok beberapa kali selama 18 jam pada 6 jam pertama. Kemudian saring dengan cepat, hindari penguapan etanol, evaporasi 20,0 mL filtrat hingga kering di dalam cawan yang dipanaskan hingga 105 °C, lalu panaskan filtrat yang tersisa hingga 105 °C hingga berat konstan, hitung kadar dalam % sari larut etanol (Kemenkes RI, 2017)

5. Susut pengeringan serbuk daun mangkokan

Menurut Hanani a *et al* (2016) susut pengeringan dilakukan dengan cara ditimbang 2 gram simplisia menggunakan moisture balance diatur dengan suhu 105 °C. Kemudian penutup pada moisture balance ditutup dan ditunggu selama beberapa menit dan sampai bunyi alarm menyala. Setelah nilai susut muncul dalam bentuk persen maka hasil yang diperoleh dicatat.Pembuatan ekstrak daun mangkokan

6. Pembuatan ekstrak daun mangkokan

Sebanyak 1000 gram daun mangkokan ditimbang kemudian dimaserasi dengan 10 L etanol 70% . Masukkan serbuk simplisia kering ke dalam maserator, tambahkan pelarut. Kemudian simplisia direndam selama 6 jam pertama dengan gerakan dan dibiarkan selama 18 jam. Maserasi dipisahkan dengan penyaringan. Proses ekstraksi diulang minimal satu kali dengan 5L etanol 70% pada suhu kamar selama 1 hari, kemudian disaring dengan kain flanel dan diambil filtratnya. Filtrat dipekatkan pada *rotary evaporator* sampai diperoleh ekstrak kental (Aini Q, 2017).

7. Uji kelarutan ekstrak daun mangkokan

7.1 Uji kadar sari larut air. Sebanyak 0,5 gram ekstrak dimaserasi selama 24 jam dengan 100 mL larutan pereaksi air-kloroform (LP) menggunakan botol bersumbat, dikocok beberapa kali selama 6 jam pertama, kemudian didiamkan selama 18 jam dan disaring. Filtrat dituang ke dalam cawan penguap sebanyak 20 mL dan kemudian diuapkan hingga kering. Residu dipanaskan pada suhu 105

°C hingga berat konstan. Kemudian dihitung persentase senyawa terlarut dalam air dari ekstrak pekat (Depkes, 2000).

7.2 Uji kadar sari larut etanol. Sebanyak 0,5 gram ekstrak, dimerasi dengan etanol P menggunakan labu tersumbat sambil kocok selama 6 jam pertama dan biarkan selama 18 jam kemudian saring. 20ml filtrate dituang ke cawan yang sudah ditara dan uapkan hingga kering pada temperatur 105°C hingga botol tetap (Depkes, 2000).

8. Susut pengeringan ekstrak daun mangkokan

Menurut Hanani *et al* (2017) susut pengeringan dilakukan dengan cara ditimbang 2 gram ekstrak menggunakan moisture balance diatur dengan suhu 105 °C. Kemudian penutup pada moisture balance ditutup dan ditunggu selama beberapa menit dan sampai bunyi alarm menyala. Setelah nilai susut muncul dalam bentuk persen maka hasil yang diperoleh dicatat. Identifikasi golongan senyawa kimia serbuk dan ekstrak etanol daun mangkokan

8.1 Saponin. Serbuk dan ekstrak simplisia dimasukkan dalam tabung reaksi sebanyak 0,5 gram dan ditambah air suling panas, kemudian didinginkan dan kocok kuat-kuat selama 10 detik, reaksi dinyatakan positif jika terbentuk buih yang mantap selama 10 menit, setinggi 1 cm sampai 10 cm, dan pada saat penambahan 1 tetes asam klorida 2N buih tidak hilang (Depkes, 1995).

8.2 Flavonoid. Sebanyak 200 mg sampel dimasukkan dalam tabung reaksi, kemudian tambahkan 5ml etanol dan dipanaskan selama 5 menit dalam tabung reaksi. Larutan ekstrak kemudian dipipet dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang lain. Kemudian tambahkan beberapa HCl pekat dan ditambahkan 0,2 gram serbuk Mg. Amati adanya flavonoid membentuk warna merah coklat (DepkesRI, 1995) .

8.3 Tanin. Sebanyak 0,5 gram sampel diekstraksi dengan 10 ml akuades, disaring kemudian filtratnya diencerkan dengan akuades hingga tidak berwarna. Ambil 2 ml larutan lalu tambahkan 1-2 tetes reagen besi (III) klorida. Munculnya warna biru atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin sampel disari dengan 10 ml air suling, disaring kemudian filtratnya diencerkan dengan menggunakan air suling sampai tidak berwarna.

8.4 Alkaloid. Sebanyak 0,5 gram Serbuk Simplisia ditimbang sebanyak 0,5 gram, kemudian ditambahkan 1 ml asam klorida 2N dan 9 ml akuades, dipanaskan dalam penangas air selama 2 menit, didinginkan dan disaring. Filtrat digunakan untuk

mendeteksi alkaloid sebagai berikut: 3 tetes filtrat yang telah ditambahkan 2 tetes larutan pereaksi Meyer membentuk endapan putih atau kuning. 3 tetes filtrat dan 2 tetes larutan pereaksi Bouchardat akan membentuk endapan berwarna coklat sampai hidup. 3 tetes filtrat dan 2 tetes larutan pereaksi Dragendorff membentuk endapan merah atau jingga. Alkaloid positif ketika sedimen atau kekeruhan hadir setidaknya dalam dua dari tiga percobaan (Dirjen POM., 1995).

9. Formulasi sediaan hair tonic ekstrak daun mangkokan

Formula sediaan ekstrak etanol daun mangkokan dapat dilihat pada tabel 1.

Tabel 1. Formula sediaan hair tonic

Bahan	Kontrol negatif (%)	Komposisi (%)		
		Formula A	Formula B	Formula C
Ekstrak daun mangkok	-	25	25	25
Etanol 96%	20	20	20	20
Propilen Glikol	20	10	15	20
Metil Paraben	0,1	0,1	0,1	0,1
Menthol	0,1	0,1	0,1	0,1
Natrium metabisulfit	0,075	0,075	0,075	0,075
Aquadest	Ad 100	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Keterangan :

- Formula A : menggunakan konsentrasi ekstrak daun mangkokan 25% dan konsentrasi propilen glikol 10%
- Formula B : menggunakan konsentrasi 25 % dan konsentrasi propilen glikol 15%
- Formula C : menggunakan konsentrasi ekstrak daun mangkokan 25% dan konsentrasi propilen glikol 20%
- Kontrol negatif : menggunakan konsentrasi propilen glikol 20%
- Kontrol positif : menggunakan sediaan natur sebanyak 2%

10. Pembuatan sediaan hair tonic ekstrak daun mangkokan

Ekstrak daun mangkokan 25 gram dilarutkan dalam etanol 96%, kemudian metil paraben dan mentol dilarutkan dalam etanol secukupnya, ditambahkan propilen glikol secara bertahap, dan ditambahkan natrium metabisulfit, dicampur hingga homogen. Larutan ekstrak daun mangkokan dicampur dengan larutan metilparaben dan mentol, kemudian dikocok hingga homogen dan ditambahkan aquades sebanyak 100 mL.

11. Pengujian mutu fisik hair tonic eksrak etanol daun mangkokan

11.1 Pengujian Organoleptis. Pengamatan uji organoleptis dilakukan dengan mengamati warna dan bau.

11.2 Pengujian pH. Nilai pH diukur menggunakan alat yaitu pH meter, pH meter yang digunakan sudah dikalibrasi dengan larutan kalibrator pH 4 dan 7, kemudian elektroda dicuci keringkan dengan air

demineralisasi dan kemudian dengan kertas tisu. Celupkan elektroda ke dalam sampel sampai pH meter menunjukkan pembacaan yang stabil. Perhatikan pembacaan skala atau angka pada tampilan pH meter. Catat suhu pada saat pengukuran pH dan cuci kembali elektroda dengan air demineralisasi setelah pengukuran (Menurut Depkes RI, 1993).

11.3 Penentuan Viskositas. Uji viskositas dilakukan untuk mengetahui tingkat kekentalan sediaan. Viskositas diukur dengan menggunakan *BrookField* dalam pengujian *hair tonic* ditempatkan dalam beaker glass kemudian jarum spindel dipasang , putar revolver untuk menurunkan spindel sampai terendam dalam sediaan *hair tonic* dan putar dengan kecepatan RPM, amati skala yang terlihat. Bila kecepatan <10 maka naikan RPM, namun jika kecepatan lebih dari maka nomor spindel diganti dengan nomor yang lebih besar dari yang sebelumnya digunakan (Bunga, 2022).

11.4 Pengukuran Bobot Jenis Sediaan. Uji bobot jenis menurut Dalimarta (2015) dengan menggunakan piknometer yang sudah bersih dan dikeringkan. Ditimbang piknometer kosong (A) pada suhu ruang. Timbang piknometer berisi air suling (B), kemudian piknometer yang berisi sediaan ditimbang (C) dan dicari berat jenisnya dengan rumus berikut :

$$\rho = \frac{C-A}{B-A} \times \rho_{\text{air}}$$

Keterangan:

- ρ : Berat jenis sediaan (gram/ml)
- ρ_{air} : Berat jenis air (1 gram/ml)
- A : Berat piknometer kosong (g)
- B : Berat piknometer + air suling (g)
- C : Berat piknometer + sediaan (g)

12. Uji aktivitas pertumbuhan rambut

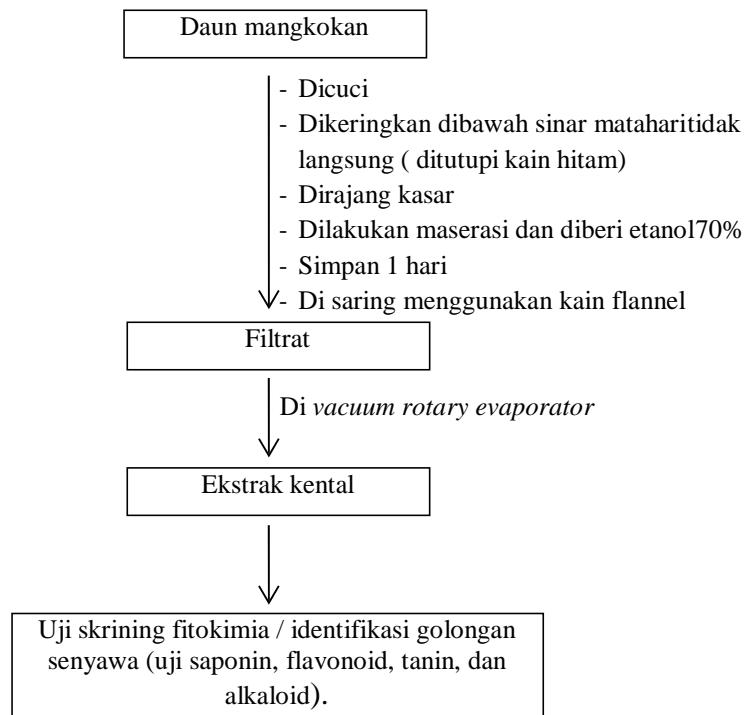
Hewan uji yang digunakan yaitu kelinci *New Zealand White* sebanyak 5 empat ekor . Kelinci yang akan digunakan untuk pengujian aktivitas sediaan *hair tonic* terhadap pertumbuhan rambut sebelumnya diberi makan dengan makanan yang bernutrisi dengan jumlah yang sama. Kemudian untuk pengujian aktivitas tumbuhnya bulu punggung kelinci dibersihkan dari bulu dengan cara mencukur bulu-bulu halus yang masih ada pada punggung kelinci dengan krim pencukur. Kemudian dipotong menjadi 5 bagian yang masing-masing berbentuk persegi panjang berukuran 2x2 cm dengan jarak antar muka 1 cm. Diteteskan sediaan *hair tonic* sebanyak 1 mL kemudian di oles

menggunakan handcon dan dilakukan satu kali sehari pada masing-masing kelompok. Hari pertama penetesan dianggap hari ke satu. Setiap bagian diberi perlakuan sebagai berikut:

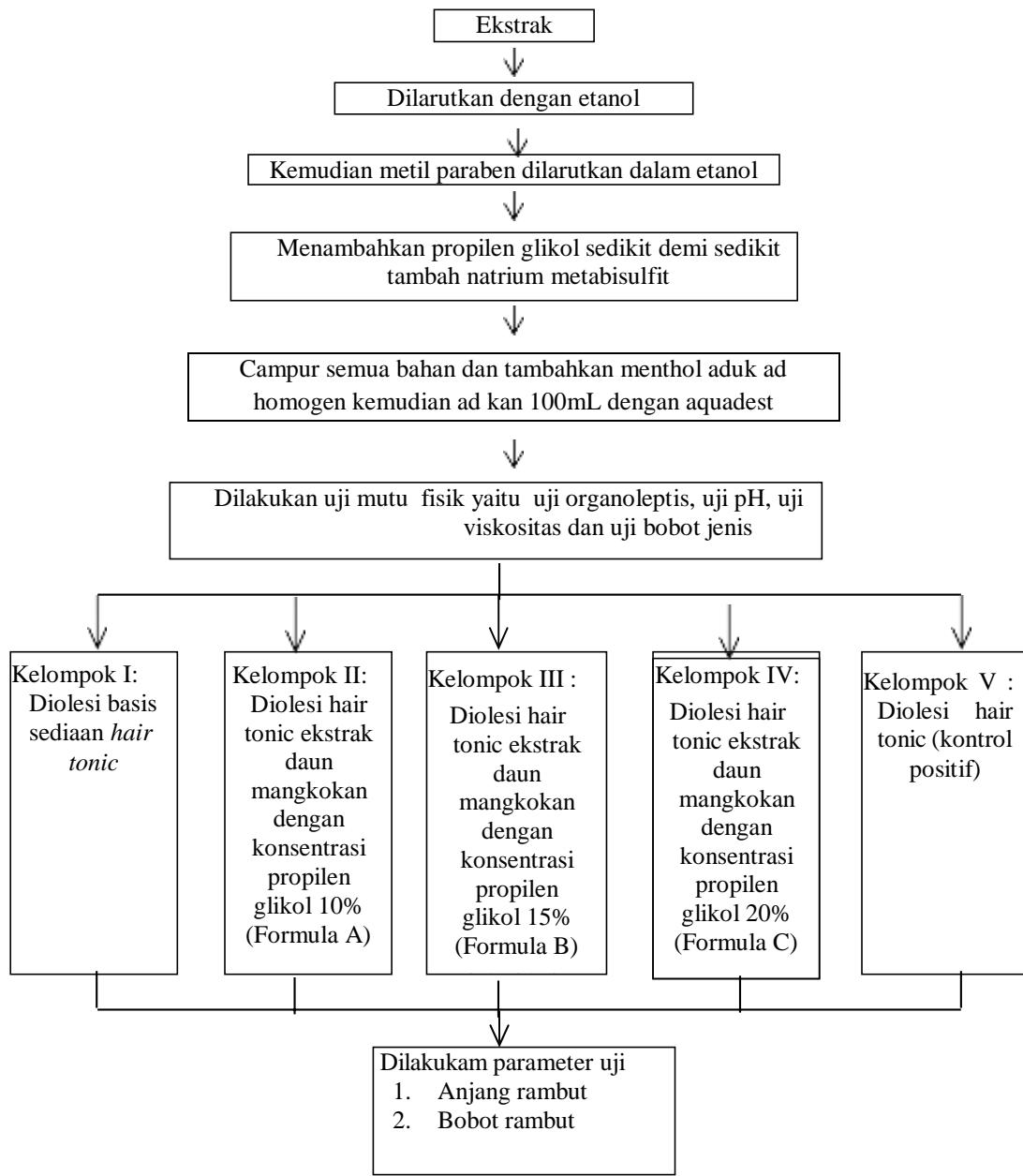
- Daerah I diolesi sediaan basis *hair tonic* sebagai kontrol negatif
Daerah II diolesi sediaan *hair tonic* ekstrak daun mangkokan dan konsentrasi propilen glikol 10% (Formula A)
Daerah III diolesi sediaan *hair tonic* ekstrak daun mangkokan dan konsentrasi propilen glikol 15% (Formula B)
Daerah IV diolesi sediaan *hair tonic* ekstrak daun mangkokan dan konsentrasi propilen glikol 20% (Formula C)
Daerah V diolesi sediaan *hair tonic* Natur (kontrol positif).

Setiap kotak kelinci diberi kelpompok perlakuan berbeda-beda yang bertujuan untuk meminimalisir variabel terkendali. Pemberian *hair tonic* dilakukan selama 21 hari. Pengukuran panjang rambut untuk masing-masing perlakuan kelompok yang dilakukan pada hari 11 dan hari ke-21. Sebanyak 10 helai rambut dicabut masing-masing kelompok perlakuan, ditempelkan pada selotip bening dan diukur panjangnya dengan jangka sorong. Pengukuran berat rambut dilakukan pada hari ke-21 dengan mencukur bulu yang tumbuh pada masing-masing kelompok perlakuan, setelah itu rambut pada masing-masing kelompok perlakuan ditimbang. Parameter evaluasi rambut meliputi panjang dan bobot rambut. Menurut Khesia (2012) penelitian aktivitas pertumbuhan rambut dilakukan selama 21 hari agar hasil yang dihasilkan maksimal

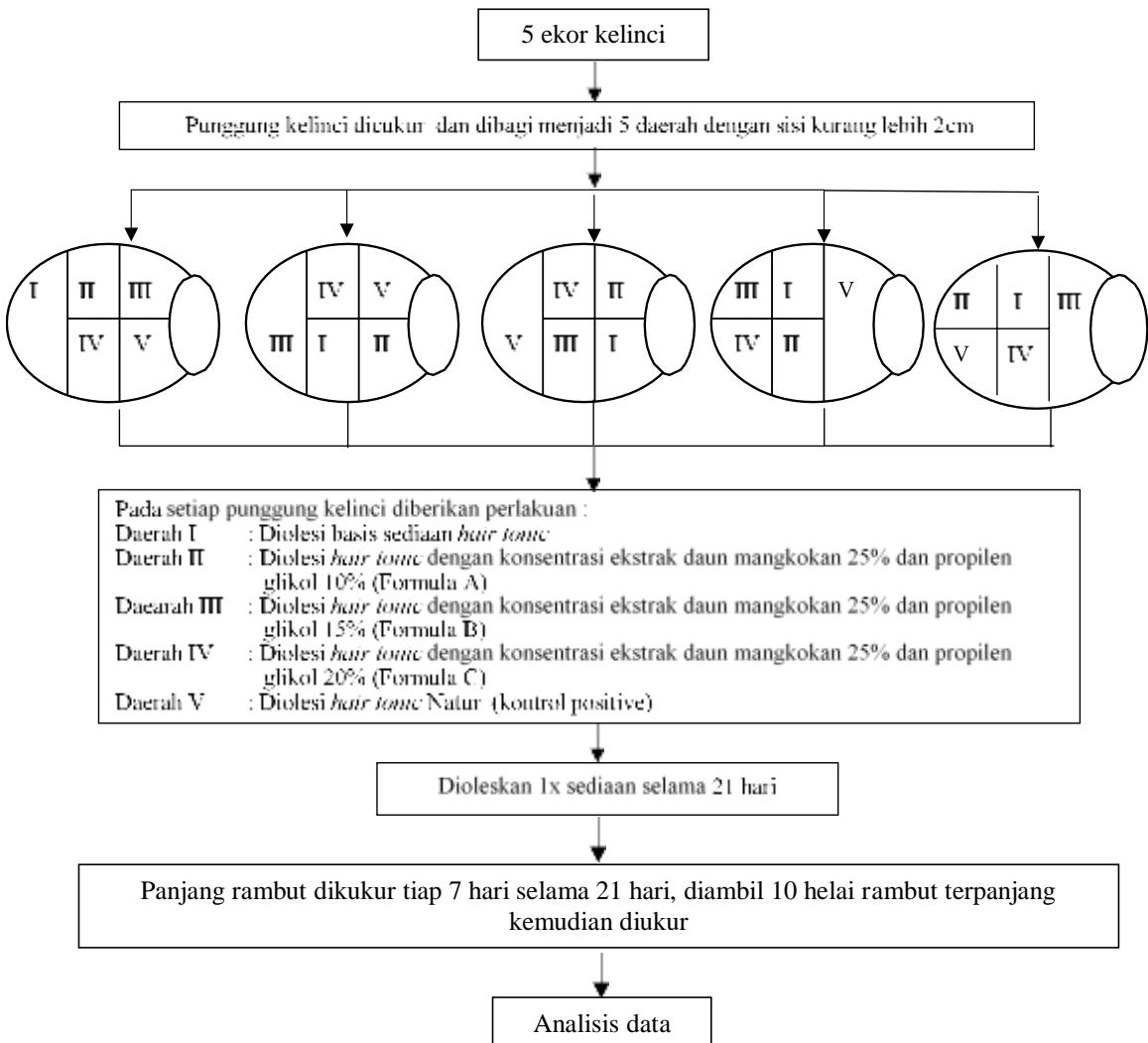
E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 9. Skema pembuatan ekstrak



Gambar 10. Skema jalannya penelitian



Gambar 11. Uji aktivitas hair tonik

F. Analisis Data

Analisa dalam penelitian ini menggunakan SPSS (*Statistical Product and Service Solution*). Data uji aktivitas pertumbuhan rambut yang diperoleh dianalisis menggunakan *Sapiro Walk*. Hasil yang diperoleh jika nilai signifikansi $<0,05$ maka diuji dengan *Kruskal walls* untuk mengetahui kebermaknaan lebih dari dua kelompok. Apabila nilai signifikansi $>0,05$ maka dilakukan uji ANOVA satu arah setelah itu dilanjutkan dengan uji *Post Hoc* untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan pada masing-masing perlakuan kemudian dilanjutkan dengan uji *Tukey*.