BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan selama 4 bulan yaitu bulan Januari–April 2025 dan melakukan determinasi tumbuhan. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi di Fakultas Ilmu Kesehatan Program Studi Farmasi Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Rotary evaporator* (biobase), Timbangan analitik, (Ohaus), Oven (Getra), *Waterbath* (biobase), Disintegratorr (biobase), Viskometer *Brookfield* (NDJ-8S), *Moisture Balance* (DSH-50-1), *Climatic Chamber*, *Magnetic strirrer* (IKA C-MAG HS 4), *Particle Size Analyzer* (PSA) (Horiba Sz-100), Cawan poselen (pyrex), Tabung reaksi (pyrex), *Beaker glass* (pyrex), Gelas ukur (pyrex), Erlenmeyer (pyrex), Mortir, Stamper, Pipet tetes, Batang pengaduk, Pisau cukur dan Jangka Sorong.

3.2.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak daun pare, minyak kemiri, tween 80, etanol 96%, gliserin, methyl pareben, propyl pareben (CV Nurul Jaya Medical Sains), *tutty frutty essens* dan aquadest (PT Brataco), larutan HCl pekat, serbuk Mg, larutan $FeCl_3$, aquadest hangat, kertas saring stik pH. (D_R G_{RAY}).

3.2.3 Hewan Percobaan

Pada penelitian ini digunakan hewan coba berupa Kelinci Albino Jantan berumur kurang lebih 5 bulan dengan bobot 2.000 - 2.500g

3.3 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian ini digunakan adalah ekperimental, untuk mengetahui kombinasi ekstrak daun pare (Mom*ordica charantia L.*) dan minyak kemiri (*Aleurites moluccana*) pada *hair tonic* sebagai penumbuh rambut.

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas merupakan variabel yang secara disengaja diubah untuk mempelajari pengaruh terhadap variabel yang terikat, variabel bebas yang digunakan pada penelitian adalah konsentrasi kombinasi ekstrak daun pare dan minyak kemiri.

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat merupakan variabel dapat menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu hasil fisik sediaan *hair tonic* dan aktivitas pertumbuhan rambut pada kelinci jantan dengan menggunakan ekstrak daun pare (Mom*ordica charantia L.*) dan minyak kemiri (*Aleurites moluccana*) dengan variasi konsentrasi formulasi.

3.3.3 Variabel Terkendali

Variabel terkendali adalah variabel yang dikendalikan, sehingga tidak akan memengaruhi varibel yang akan diteliti. Pada penelitian ini, variabel yang digunakan adalah pembuatan ekstrak daun pare (*Momordica charantia L.*) dengan metode maserasi.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pengumpulan Sampel

Proses pengumpulan sampel penelitian ini meliputi daun pare yang diperoleh dari Desa Prupuk, Kecamatan Margasari, Kabupaten Tegal dan minyak kemiri diperoleh melalui pembelian secara *online* (shopee) di toko minyak kemiri distributor yang berada di Kota Tanggerang Selatan.

3.4.2 Determinasi Tanaman

Proses determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam di Fakultas Ilmu Kesehatan Program Studi Farmasi Universitas Bhamada Slawi. Determinasi dilakukan agar memastikan kebenaran dalam tanaman yang digunakan dalam penelitian.

3.4.3 Pembuatan Serbuk Simplisia

Daun pare segar diperoleh dari Desa Jejeg sebanyak 4 kg kemudian dilakukan pencucian pada daun pare dengan menggunakan air mengalir agar kotoran yang terdapat pada daun pare hilang. Setelah daun pare dicuci dengan bersih dilakukan perajangan lalu dikeringkan. Pada proses pengeringan daun pare yang sudah dirajang dikeringkan dengan cara diangin-anginkan atau dapat dijemur dibawah sinar matahari tidak secara langsung dan dapat juga dikeringkan dengan menggunakan oven dengan suhu 60^{o}C. Simplisia kering daun pare dihaluskan dengan menggunakan blender sehingga didapatkan serbuk simplisia daun pare.

$$\%\ \text{Rendemen Simplisia} = \frac{\text{Berat Simplisia Kering (g)}}{\text{Berat Awal}} \times 100\%$$

3.4.4 Pembutan Ekstrak

Pembuatan ekstrak daun pare pada penelitian ini diperoleh dengan menggunakan metode maserasi, sampel daun pare yang sudah dihaluskan dan diayak ditimbang sebanyak 500 gram direndam dalam wadah kaca dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan (1:10). Serbuk dimaserasi selama 3 hari sambil sesekali di aduk. Kemudian setelah 3 hari hasil maserasi disaring dengan kertas saring dan ambil filtratnya. Maserat yang sudah didapatkan lalu dipanaskan diatas *waterbath* sampai diperoleh ekstrak kental kemudian disimpan dalam wadah yang tertutup rapat. Ekstrak kental yang didapat dihitung rendemennya, menggunakan rumus rendemen ekstrak :

$$\%\ \text{Rendemen Ekstrak} = \frac{\text{Berat Ekstrak yang didapat (g)}}{\text{Berat Serbuk Simplisia (g)}} \times 100\%$$

3.4.5 Uji Parameter Ekstrak

a. Penetapan Kadar Susut Pengeringan

Sebanyak 1 g ekstrak ditimbang dalam cawan yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 105^{o}C selama 30 menit dan ditimbang. Ratakan dengan menggoyangkan hingga merupakan lapisan setebal (5-10 mm). Lalu dikeringkan pada suhu penetapan hingga bobot tetap. Buka tutupnya, biarkan cawan dalam desikator hingga suhu kamar. Kemudian dicatat bobot tetap yang diperoleh (Marpaung & Septiyani 2020). Persentase susut pengeringan dihitung dengan rumus:

$$\text{Susut pengeringan} = \frac{\text{Bobot Ekstrak Kering (g)}}{\text{Bobot Ekstrak Basah (g)}} \times 100\%$$

b. Penetapan Kadar Air

Sebanyak 1 g ekstrak ditimbang dalam cawan yang telah ditara. Lalu dikeringkan pada suhu 105ºC selama ± 3 jam di dalam oven. Kemudian dimasukkan cawan dalam desikator hingga suhu kamar dan dicatat bobot tetap yang diperoleh (Marpaung & Septiyani 2020). Rumus dalam menentukan kadar air yaitu:

$$\text{Kadar air} = \frac{\text{A - B}}{\text{A}} \times 100\%$$

keterangan :

A : bobot sampel sebelum dipanaskan

B : bobot sampel setelah dipanaskan

c. Penetapan Kadar Abu Total

Sebanyak 1 g ekstrak ditimbang dan dimasukkan dalam krus silikat yang sebelumnya telah dipijarkan dan ditimbang. Kemudian ekstrak dipijar dengan menggunakan tanur secara perlahan-lahan hingga arang habis.

Kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang hingga bobot tetap (Marpaung & Septiyani 2020). Lalu dihitung kadar abu total yang dinyatakan dalam % (b/b) dengan rumus:

$$\text{Kadar abu total} = \frac{\text{Bobot Abu (g)}}{\text{Bobot Ekstrak (g)}} \times 100\%$$

3.4.6 Skirining Fitokimia

a. Uji Alkaloid

Sebanyak 0,5 g ekstrak daun pare (Mom*ordica charantia* L.) ditambahakan reagen Mayer sebanyak 4-5 tetes. Apabila terbentuk

endapan berwarna putih menunjukkan bahwa ekstrak daun pare tersebut mengandung alkaloid (Surya, Kamal, & Eka Putri 2022).

b. Uji Flavonoid

Sebanyak 0,5 g ekstrak daun pare (Mom*ordica charantia* L.) ditambahkan dengan air panas, didihkan selama 5 menit, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan 0,05g serbuk Mg dan 1 ml HCl pekat, kemudian digojog dengan kuat. Jika larutan berubah warna menjadi kuning, merah dan jingga maka positif mengandung flavonoid (Surya, Kamal, & Eka Putri 2022).

c. Uji Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak daun pare (Mom*ordica charantia* L.) ditambahkan 10 ml air panas, kemudian gojog larutan selama 1 menit. Jika terbentuk busa yang stabil kurang lebih 7 menit maka menunjukkan ekstrak daun pare mengandung saponin (Surya, Kamal, & Eka Putri 2022).

d. Uji Tanin

Sebanyak 0,5 g ekstrak daun pare (Mom*ordica charantia* L.) diencerkan dengan air dan panaskan *waterbath* kemudian ditambahkan dengan pereaksi $FeCl_3$. Jika larutan terbentuk warna hijau maka ekstrak daun pare mengandung tanin (Surya, Kamal, & Eka Putri 2022).

3.4.7 Fomulasi Sediaan *Hair tonic*

Sediaan *hair tonic* nanoemulsi dibuat dalam tiga formula yang dibedakan pada konsentrasi ekstrak daun pare dan minyak kemiri. Masing-

masing *hair tonic* nanoemulsi mengandung ekstrak daun pare dan minyak kemiri sebesar 0%:0%, 1%:4%, 2,5%:2,5%, 4%:1%. Formula sediaan *hair tonic* nanoemulsi dapat dilihat pada tabel 3.1 (Collins et al., 2023).

Tabel 3.1 Formulasi Sediaan *Hair tonic* Nanoemulsi Ekstrak Daun Pare Dengan Kombinasi Minyak Kemiri

Bahan	Formulasi (%)				Fungsi
	F0	F1	F2	F3	
Ekstrak Daun Pare	0	1	2,5	4	Zat Aktif
Minyak Kemiri	0	4	2,5	1	Zat Aktif
Tween 80	35	35	35	35	Surfaktan
Gliserin	25	25	25	25	Kosurfaktan
Methyl paraben	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengawet
Propyl pareben	0,1	0,1	0,1	0,1	Pengawet
Tutty frutty essens	10tts	10tts	10tts	10tts	Pewangi
Aquadest	Ad	Ad	Ad	Ad	Pelarut
	100	100	100	100	

Keterangan :
F0: Ekstrak Daun Pare 0% dan Minyak Kemiri 0%
F1: Ekstrak Daun Pare 1% dan Minyak Kemiri 4%
F2: Ekstrak Daun Pare 2,5% dan Minyak Kemiri 2,5%
F3: Ekstrak Daun Pare 4% dan Minyak Kemiri 1%

3.4.8 Pembuatan Sediaan *Hair tonic*

Panaskan aquadest dan tween 80 secara terpisah sampai suhunya sekitar 50℃, lalu tween 80 dilarutkan kedalam aquadest sambil diaduk dengan konstan menggunakan *magnetic stirrer* pada suhu 50℃. Selanjutnya minyak kemiri dan ekstrak pare ditambahkan sedikit demi sedikit, sambil terus diaduk dengan *magnetic stirrer* lalu dihomogenkan. Terakhir ditambahkan gliserin, pengawet dan *tutty frutyy essens* sambil diaduk dengan magnetic strirrer 1500 rpm kurang lebih selama 15 menit sampai terbentuk larutan nanoemulsi yang homogen, jernih dan transparan. Setiap formula dibuat 3x replikasi.

3.4.9 Uji Sifat Fisik Sediaan *Hair tonic*

a. Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan melalui pengamatan panca indera untuk mengamati perubahan-perubahan warna, bau, bentuk dan tekstur sediaan (Puspitasari & Sulistyawati 2024).

b. Uji pH

Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH universal yang dimasukkan ke dalam sampel, serta dilihat perubahan warnanya pH universal. Menurut SNI 16-4955 1998 dalam (Puspitasari & Sulistyawati 2024) pH sediaan *hair tonic* berada diantara nilai 3,0 - 7,0.

c. Uji Viskositas

Uji ini dilakukan menggunakan viskometer *Brookfield* dengan spindle ukuran 1 dan rpm 60 dengan cara menempatkan sediaan *hair tonic* ke dalam beker glass, kemudian diletakkan dibawah alat viskometer *brookfield* dengan tongkat pemutar (spindel). Spindel dimasukkan ke dalam sediaan sampai terendam, kemudian alat dinyalakan menurut SNI 16-4955-1998 dalam (Puspitasari and Sulistyawati 2024) nilai syarat viskositas nanoemulsi yaitu 10-2000cPa.s.

d. Uji Stabilitas

Uji stabilitas dilakukan dengan metode *cycling test*. Satu siklus meliputi penyimpanan pada suhu 40℃ selama 24 jam dilanjutkan suhu 4℃ selama 24 jam, percobaan ini dilakukan sebanyak enam siklus (Puspitasari & Sulistyawati 2024).

e. Uji Homogenitas

Uji homogenitas dilakukan dengan cara dua keping kaca diolesi atau disemprotkan *hair tonic*, kemudian diratakan dan diamati apakah terdapat partikel yang tidak merata (Puspitasari & Sulistyawati, 2024).

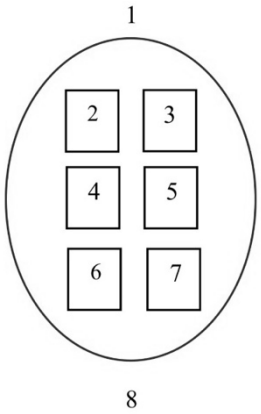
3.4.10 Uji Aktivitas Pertumbuhan Rambut

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini yaitu kelinci albino jantan sebanyak 4 ekor, sebelum penelitian dilakukan kelinci harus beradaptasi dan menyesuaikan diri dengan lingkungan selama 1-2 minggu. Selanjutnya pada punggung kelinci diberi tanda menggunakan spidol. Perlakuan selanjutnya kelinci dicukur menggunakan gunting atau pisau cukur, kemudian dibagi menjadi 6 daerah dengan masing-masing sisi yang kurang lebih $9cm^2$ (3cm x 3cm) dan antar kotak diberi jarak 1 cm. Lalu setiap kotak diberikan nomor 1 sampai 6 kemudian hewan uji didiamkan selama 24 jam (Koralina dkk., 2023).

Sebelum *hair tonic* digunakan pada hewan uji, dilakukan pembersihan terlebih dahulu pada punggung kelinci menggunakan alkohol sebagai antiseptik. Pengamatan aktivitas pertumbuhan rambut dilakukan selama 3 minggu dan setiap 1 minggu sekali dilakukan pemeriksaan uji efektivitas. Kelompok 1 tidak ditetesi sediaan sebagai kontrol normal (blanko), kelompok 2 ditetesi *hair tonic* yang tidak mengandung khasiat sebagai kontrol negatif, kelompok 3 ditetesi formula I dengan perbandingan ekstrak daun pare dan minyak kemiri 1%:4% kelompok 4 ditetesi formula II yaitu dengan perbandingan

ekstrak daun pare dan minyak kemiri 2,5%:2,5% kelompok 5 ditetesi formula III yaitu perbandingan ekstrak daun pare dan minyak kemiri 4%:1% kelompok 6 ditetesi dengan *hair tonic* yang ada di pasaran yaitu minoxidil sebagai kontrol positif. Pemberian *hair tonic* dilakukan 1 kali sehari dengan volume 1 mL pada masing-masing bagian, hari pertama penetesan dianggap hari ke satu (Koralina dkk., 2023).

Aktivitas dari sediaan *hair tonic* dilihat melalui panjang dan bobot rambut hewan coba. Pengamatan panjang rambut pada tiap daerah dilakukan pada hari ke-7, 14 dan 21 dengan cara mengambil 6 helai rambut terpanjang. Masing-masing helaian rambut diluruskan, ditempelkan pada selotip dengan alas gelap dan diukur menggunakan jangka sorong. Pengamatan bobot rambut dilakukan pada hari ke-21 dengan cara mencukur semua rambut kelinci pada daerah uji. Rambut kelinci ditimbang menggunakan timbangan analitik. Hasil yang diperoleh dihitung secara statistik (Koralina dkk., 2023).



Keterangan:
1. Kepala kelinci
2. Daerah pemaparan kontrol negatif
3. Daerah pemaparan F0
4. Daerah pemaparan F1
5. Daerah pemaparan F2
6. Daerah pemaparan F3
7. Daerah pemaparan kontrol positif (Minoxidil 2%)
8. Ekor kelinci

3.4.11 Uji Ukuran Partikel

Pada analisis ukuran partikel dari sediaan nanoemulsi esktrak daun pare dengan kombinasi minyak kemiri diukur dengan *Particle Size Analyzer* (PSA) yang meliputi ukuran partikel dan indeks polidispersitas. Uji partikel dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui ukuran partikel zat dari suatu sediaan. Pengujian pada awal pengamatan setelah sediaan dibuat dengan cara 100 µL sampel nanoemulsi dilarutkan dalam 50 mL aquadest. Ukuran partikel nanoemulsi berkisar antara 10-200 nm. Nilai indeks polidispersitas <0,5 termasuk kedalam monodisperse menunjukkan ukuran droplet yang seragam (Redhita et al., 2022). Sampel yang akan diujikan yaitu sampel yang memiliki aktivitas pertumbuhan rambut terbaik.

3.5 Analisis Data

Data stabilitas dianalisis menggunakan uji Wilxocon dan pada data sediaan *hair tonic* kombinasi ekstrak daun pare dan minyak kemiri terhadap pertumbuhan rambut kelinci dianalisis menggunakan metode ANOVA *One Way* yang bertujuan untuk mengetahui apakah terdapat perbedaan bermakna atau tidak terhadap pertumbuhan rambut, pada taraf nyata 5% (Carrolina dkk., 2021).