

BAB 3

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

3.1.1 Waktu Penelitian

Waktu yang digunakan peneliti untuk penelitian ini dilaksanakan sejak tanggal dikeluarkannya ijin penelitian yang ditentukan kurang lebih 5 (lima) bulan, dari bulan Februari-Juni 2025.

3.1.2 Tempat Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental laboratorium. Pembuatan sediaan *hair tonic* ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averhoa blimbi* L) dan lidah buaya (*Aloe vera* L) dilakukan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi dan Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi S-1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan adalah oven, blender, timbangan digital, *rotary vacuum evaporator*, *climetic chamber*, rak tabung reaksi, *beaker glass*, corong kaca, toples kaca, pipet tetes, tabung reaksi, batang pengaduk, gelas ukur, jangka sorong digital, timbangan digital, saringan, pinset, pisau cukur, mikrometer sekrup, gunting dan *waterbath*.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan adalah daun belimbing wuluh dan lidah buaya yang didapat dari Kecamatan Warureja, Kabupaten Tegal. Etanol 96%, propilen glikol, tween 80, metil paraben, Na₂EDTA, Mentol, sodium

metabisulfit, akuades *destilled*, alumunium foil, kertas saring, kain flanel, plester, kasa steril. Bahan-bahan untuk skrining fitokimia: HCl pekat, Serbuk Mg, stik pH, Ammonia encer, Kloroform, HCl 2N, Pereaksi *Mayer*, Pereaksi *Dragendroft*, HCl 1N, FeCl₃, Asam sulfat pekat (H₂SO₄), dan Asam asetat anhidrat (CH₃COOH).

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah eskperimental laboratorium, yang dilaksanakan di Laboratorium Teknologi Sediaan Farmasi dan Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi S-1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.3.2 Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah konsentrasi bahan aktif kombinasi ekstrak daun belimbing wuluh dan sari lidah buaya dalam formula *hair tonic*.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah laju pertumbuhan rambut kelinci *New Zealand White*.

3. Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah metode ekstraksi, umur kelinci, jenis kelinci, berat badan, suhu dan kondisi lingkungan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Hewan Uji

Hewan uji Kelinci *New Zealand White* (NZW) yang didapat dari peternak kelinci di daerah Kecamatan Pangkah Kabupaten Tegal. Hewan uji yang digunakan adalah kelinci jantan jenis *New Zealand White* (NZW) usia 4-5 bulan dengan berat 1,5-2 kg berjumlah 4 ekor. Sebelum diberi perlakuan kelinci diadaptasikan terlebih dahulu selama satu minggu supaya tidak terjadi stress (Priatna *et al.*, 2022).

3.4.2 Determinasi Tanaman

Determinasi tanaman belimbing wuluh (*Averhoa blimbi* L) dan lidah buaya (*Aloe vera* L) dilakukan untuk memastikan kebenaran identitas dari tanaman yang diteliti dan menghindari kesalahan dalam pengambilan bahan tanaman (Pramiastuti & Agusetianti, 2019). Determinasi tanaman dilakukan di Laboratorium Bahan Alam Universitas Bhamada Slawi.

3.4.3 Pembuatan Sari Lidah Buaya

Tanaman lidah buaya didapat dari Desa Kreman Kecamatan Warureja Kabupaten Tegal. Pembuatan sari lidah buaya dilakukan dengan metode perasan untuk perlakuannya tanaman lidah buaya sebanyak 300 gram dicuci hingga bersih dari kotoran yang menempel, lalu dipotong untuk memisahkan antara pangkal akar dan batang lidah buaya kemudian dikupas diambil gelnya diblender tanpa tambahan aquadest. Selanjutnya untuk memperoleh sari lidah buaya disaring dengan kain flannel (Riskiyana *et al.*, 2020).

3.4.4 Determinasi Hewan Uji

Determinasi hewan pada kelinci *New Zealand White* (*Oryctolagus cuniculus*) dilakukan di Laboratorium Farmakologi Universitas Bhamada Slawi. Identifikasi bertujuan untuk memastikan kebenaran pada kelinci *New Zealand White* (*Oryctolagus cuniculus*) yang akan digunakan dalam penelitian.

3.4.5 Pembuatan Serbuk Simplisia Daun Belimbing Wuluh

Daun belimbing wuluh yang digunakan pada penelitian ini adalah daun yang masih segar dan fisik daun bagus. Daun belimbing wuluh dicuci menggunakan air yang mengalir kemudian diangin-anginkan. Daun yang sudah dicuci dipisahkan dari benda asing/sortasi basah. Jika permukaan daun sudah sedikit mengering, kemudian lakukan proses pengeringan dalam oven pada suhu 50°C hingga kering.

Proses selanjutnya mengambil daun belimbing wuluh yang sudah kering, lalu timbang untuk mengetahui bobot keringnya. Proses sortasi kering dilakukan dengan cara memisahkan daun belimbing wuluh kering dari benda asing. Hasil pengeringan kemudian dihaluskan menggunakan blender.

Daun belimbing wuluh segar yang digunakan dalam penelitian sebanyak 5000 gram. Setelah daun belimbing wuluh dikeringkan, menghasilkan simplisia sebanyak 750 gram. Hasil pengeringan simplisia dianggap baik jika kadar air di bawah 10%, sehingga mutu simplisia terjamin (Depkes RI, 1986) dalam jurnal (Safitri *et al.*, 2018).

Serbuk daun belimbing wuluh yang digunakan untuk ekstraksi sebanyak 750 gram dilakukan dengan metode maserasi, menggunakan seluruh serbuk daun belimbing wuluh tersebut secara keseluruhan. Serbuk daun belimbing wuluh dimaserasi menggunakan etanol 96% dengan perbandingan (1:5) pada suhu kamar selama 3 hari disertai dengan pengadukan. Disaring kemudian ekstrak cair diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga didapat ekstrak. Ekstrak dihilangkan pelarutnya di atas *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental bebas pelarut. Ekstrak yang diperoleh dihitung rendemennya (Pramiastuti & Agusetianti, 2019).

3.4.6 Pembuatan Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh

Serbuk daun belimbing wuluh yang digunakan untuk ekstraksi sebanyak 750gram dilakukan dengan metode maserasi, menggunakan seluruh serbuk daun belimbing wuluh tersebut secara keseluruhan.

Serbuk daun belimbing wuluh dimaserasi menggunakan etanol 96% dengan perbandingan (1:5) pada suhu kamar selama 3 hari disertai dengan pengadukan. Disaring kemudian ekstrak cair diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga didapat ekstrak. Ekstrak dihilangkan pelarutnya di atas *waterbath* sehingga diperoleh ekstrak kental bebas pelarut (Pramiastuti & Agusetianti, 2019). Ekstrak yang diperoleh kemudian dihitung rendemennya menggunakan rumus berikut:

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

3.4.7 Uji Standardisasi Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L)

1) Penetapan Kadar Susut Pengerinan

Ekstrak daun belimbing wuluh diambil 1 gram dimasukkan dalam botol timbang (sebelumnya dipanaskan pada suhu 105°C selama 30 menit). Ekstrak sebelum ditimbang diratakan dalam botol timbang, dengan lapisan setebal 5 mm hingga 10 mm. Dikeringkan pada suhu 105°C hingga bobot tetap (Hidayati *et al.*, 2018).

$$\% \text{Susut Pengerinan} = \frac{\text{Berat Sampel Sebelum Dipanaskan}}{\text{Berat Sampel Setelah Dipanaskan}} \times 100\%$$

2) Penetapan Kadar Air

Ekstrak daun belimbing wuluh ditimbang 1 gram menggunakan botol timbang tertutup yang sudah diketahui beratnya. Keringkan pada oven dengan suhu 105°C selama 5 jam, kemudian didinginkan menggunakan eksikator. Menimbang kembali hingga diperoleh bobot tetap (Hidayati *et al.*, 2018).

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{Bobot Ekstrak} + \text{Bobot Cawan Konstan}}{\text{Bobot Ekstrak} + \text{Cawan Setelah Pemanasan (konstan)}} \times 100\%$$

3) Penetapan Kadar Abu Total

Ekstrak daun belimbing wuluh ditimbang sebanyak 2 gram dengan menggunakan cawan porselin yang sudah diketahui beratnya. Mengarangkan diatas nyala pembakar, lalu abukan pada tanur listrik pada suhu 550°C sampai pengabuan. Kemudian, didinginkan menggunakan eksikator. Ulang, hingga bobot tetap (Hidayati *et al.*, 2018).

$$\text{Kadar Abu Total} = \frac{W_0 - W_1}{W_2} \times 100\%$$

Keterangan:

W0= Bobot krus kosong + ekstrak yang telah menjadi abu

W1= Bobot krus kosong

W2= Bobot ekstrak

4) Kadar Abu Tidak Larut Asam

Abu yang didapat dilarutkan dengan 25 mL HCl 10%, dididihkan selama 5 menit. Saring larutan dengan kertas saring tak berabu dan cuci dengan air suling sampai bebas klorida. Keringkan kertas saring dalam oven, dinginkan dan timbang sampai bobot tetap (Hidayati *et al.*, 2018).

$$\text{Kadar Abu Tidak Larut Asam} = \frac{W_3 - C - W_0}{W_1} \times 100\%$$

Keterangan:

W0 = Bobot krus kosong (g)

W1 = Bobot ekstrak awal (g)

W3 = Bobot krus + ekstrak setelah diabukan (g)

C = Bobot kertas saring

3.4.8 Skrining Fitokimia

1) Uji Flavonoid

Uji Flavonoid dilakukan dengan menambahkan 2-4 tetes HCl pekat dan ditambah serbuk Mg sebanyak 2-3 keping kecil, lalu larutan dikocok. Perubahan warna menjadi merah, kuning atau jingga menunjukkan adanya senyawa flavonoid (Sulistyarini *et al.*, 2016).

2) Uji Alkaloid

Sampel ditimbang sebanyak 0,5 g dimasukkan kedalam mortar tambahkan ammonia encer dan kloroform, lalu disaring. Filtrat ditambahkan dengan 5 mL HCl 2N. Larutan dibagi ke dalam

tabung reaksi. Tabung pertama sebagai larutan blanko, tabung kedua ditambahkan 3 tetes pereaksi *mayer*, dan tabung ketiga ditambahkan 3 tetes pereaksi *dragendroff*. Hasil positif senyawa alkaloid pada pereaksi *mayer* ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih hingga kekuningan. Pada pereaksi *dragendroff* senyawa alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah bata (Muliani *et al.*, 2022).

3) Uji Saponin

Pengujian saponin dilakukan dengan memasukkan ekstrak dalam tabung reaksi ditambahkan *aquadest* (1:1). Kocok selama 1 menit, bila timbul busa tambahkan HCl 1N, jika ekstrak mengandung senyawa saponin maka akan terbentuk busa yang stabil dalam waktu 10 menit (Putri, 2023).

4) Uji Tanin

Pengujian senyawa tanin dilakukan dengan menambahkan 2 mL pelarut metanol kemudian disaring. Sebagian dari filtrat yang didapatkan dilakukan penambahan 2-3 tetes FeCl₃, jika terjadi warna biru tua atau hitam kehijauan menunjukkan adanya tanin (Pramiastuti & Agusetianti, 2019).

5) Uji Triterpenoid dan Steroid

Sebanyak 3 mL kloroform dimasukkan ke dalam tabung ekstrak, kemudian ditambahkan 2 mL asam sulfat pekat dan 2 mL asam asetat anhidrat. Terbentuk cincin kecoklatan atau violet menunjukkan adanya triterpenoid, sedangkan bila muncul cincin

biru kehijauan menunjukkan adanya steroid (Pramiastuti & Agusetianti, 2019).

3.4.9 Formulasi Sediaan *Hair tonic*

Tabel 3.1. Formulasi Sediaan *Hair tonic*

Bahan	Fungsi	F0 (%)	F1 (%)	F2 (%)	F3 (%)
EEDBW	Zat aktif utama	-	5	10	15
SLB	Zat aktif tambahan, pelembap	-	15	10	5
Etanol 96%	Pelarut, antimikroba	20	20	20	20
Tween 80	Surfaktan	1	1	1	1
Propilen Glikol	Humektan, penstabil	5	5	5	5
Metil Paraben	Pengawet	1	1	1	1
Na ₂ EDTA	Agen pengkelat ion logam	0,05	0,05	0,05	0,05
Mentol	Pendingin, antiseptik	0,1	0,1	0,1	0,1
Sodium Metabisulfit	Antioksidan	0,05	0,05	0,05	0,05
Akuades	Pelarut	ad 100mL	ad 100mL	ad 100mL	ad 100mL

Keterangan Formulasi *Hair tonic* Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh dan Lidah Buaya:

EEDBW : Ekstrak Etanol Daun Belimbing Wuluh (5%,10%,15%).

SLB : Sari Lidah Buaya (15%,10%,5%).

3.4.10 Pembuatan Sediaan *Hair tonic*

Pembuatan sediaan *hair tonic* mengikuti formula dasar Sativa *et al.*, (2022) yang dimodifikasi. Ekstrak daun belimbing wuluh dilarutkan dalam akuades dengan berbagai konsentrasi, konsentrasi dapat dilihat pada tabel 3.1 Formulasi Sediaan *Hair tonic*. Langkahnya yaitu tween 80 dilarutkan

dengan menggunakan etanol kemudian dicampurkan dengan ekstrak daun belimbing wuluh dan sari lidah buaya (larutan 1). Lalu Sodium metabisulfit dan Na₂EDTA dilarutkan ke *aquadest*, setelah itu dicampurkan dengan larutan 1 (larutan 2). Metil paraben dilarutkan dengan etanol, mentol dilarutkan dengan etanol. Kemudian gabungkan keduanya dan tambahkan propilen glikol (larutan 3). Campurkan semua bahan yaitu larutan 2 dan 3 kemudian diaduk hingga tercampur sempurna atau homogen. Tambahkan akuades hingga menjadi 100 mL.

Methyl paraben dan mentol dilarutkan dengan etanol 96% karena keduanya mudah larut dalam etanol 96%. *Methyl paraben* sebagai pengawet sedangkan mentol digunakan untuk memberikan sensasi dingin pada kulit kepala dan memberikan aroma yang segar serta dapat meningkatkan penetrasi ke kulit. Setelah itu masukkan larutan ekstrak daun belimbing wuluh dan sari lidah buaya lalu diaduk hingga homogen. Setelah homogen ditambahkan sisa etanol 96% dan propilenglikol sedikit demi sedikit. Etanol 96% sebagai pelarut ekstrak daun belimbing wuluh, *methyl paraben* dan mentol.

Propilenglikol berfungsi sebagai pelarut lidah buaya dan meningkatkan kelarutan serta dapat mempengaruhi viskositas sediaan. Kemudian ditambahkan *aquadest ad* 100mL aduk lagi hingga homogen (Indriyani & Endrawati, 2021). Konsentrasi etanol yang digunakan adalah 20%, tidak melebihi konsentrasi 50% karena dapat menimbulkan iritasi pada kulit. Propilen glikol digunakan untuk meningkatkan kelarutan dan

viskositas sediaan agar waktu kontak sediaan dengan kulit lebih lama, sehingga peluang ekstrak untuk berpenetrasi ke dalam kulit lebih tinggi.

Sementara itu, metil paraben berfungsi sebagai antimikroba untuk meningkatkan keawetan sediaan. Bahan lainnya, sodium metabisulfit berfungsi sebagai antioksidan yang dapat menetralkan radikal bebas, sedangkan mentol berfungsi untuk memberikan sensasi dingin di kulit dan meningkatkan penetrasi sediaan ke dalam kulit (Rowe, 2006).

3.4.11 Evaluasi Sediaan

Tabel 3.2. Syarat Mutu *Hair tonic* Standar Nasional Indonesia 16-4955-1998

Pengujian	Persyaratan
Organoleptis	Warna dan bau seperti ekstrak dan bentuk yang homogen
pH	3,0 - 7,0
Viskositas	< 5 cP

1) Uji Organoleptis

Uji organoleptis dilakukan dengan cara mengamati sediaan *hair tonic* berupa bentuk, bau dan warna (Indriyani & Endrawati, 2021).

2) Uji pH

Uji pH dilakukan dengan mengoleskan sediaan pada pH *stick*, ditunggu beberapa saat hingga berubah warna lalu dicocokkan dengan indikator, syarat uji pH menurut Standar Nasional Indonesia 16-4955-1998 (3,0-7,0) (Indriyani & Endrawati, 2021).

3) Uji Viskositas

Uji viskositas bertujuan untuk mengetahui kekentalan suatu zat yang akan berpengaruh terhadap kemampuan tuang dari sediaan

hair tonic tersebut. Semakin tinggi nilai viskositas maka semakin tinggi nilai kekentalan zat tersebut. Pengukuran viskositas dilakukan dengan menggunakan *Viskometer Brookfield* dengan cara menuangkan sampel kedalam gelas ukur 50 mL yang telah disediakan, kemudian pasangkan *spindle* yang sesuai dengan sediaan tersebut lalu diputar sampai *spindle* tersebut terendam kedalam sampel yang ada didalam gelas ukur. Kemudian atur kecepatannya yaitu 50 rpm dan tekan tombol ON. Catat nilai yang sering muncul pada layar setelah didapat tekan tombol OFF. Syarat mutu pengujian viskositas terhadap sediaan *hair tonic* ada pada peraturan Standar Nasional Indonesia (SNI) 16-4955-1998 yaitu $<5\text{cP}$ (Anwar, 2022).

4) Uji Stabilitas

Uji stabilitas *hair tonic* ekstrak daun belimbing wuluh dan sari lidah buaya yang dilakukan meliputi *cycling test* pada alat *climatic chamber*. Setiap uji dilakukan evaluasi fisik meliputi uji organoleptis, uji pH, dan uji viskositas.

Sediaan *hair tonic* awal yang telah dibuat dilakukan evaluasi terlebih dahulu. Kemudian disimpan pada suhu $4\pm 2^{\circ}\text{C}$, selama 24 jam, lalu dikeluarkan dan ditempatkan pada suhu $40\pm 2^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam, waktu selama penyimpanan dua suhu tersebut dianggap satu siklus. Percobaan ini diulang sebanyak 3 siklus dan dievaluasi organoleptis sediaan pada awal dan akhir tes siklus (Pramiastuti & Agusetianti, 2019).

5) Uji Iritasi

Pengujian iritasi pada sediaan *hair tonic* dilakukan menggunakan metode *patch test* dengan empat ekor kelinci yang telah dicukur bulunya dan diberi tanda. Sediaan diaplikasikan pada punggung kelinci di area yang telah ditandai sebelumnya, lalu ditutup dengan kasa dan diplester menggunakan plester non iritan. Berikut adalah prosedur pengolesan sediaan *hair tonic* dalam uji iritasi:

a. Kelinci 1

Sisi kiri atas diberikan aquadest sebagai blanko (B), sisi kanan atas diolesi *hair tonic* formulasi 0 (F0), sisi kiri bawah diberikan *hair tonic* formulasi 1 (F1), sisi kanan bawah diberikan *hair tonic* formulasi 2 (F2), serta sisi tengah bawah diolesi *hair tonic* formulasi 3 (F3) (BPOM, 2022).

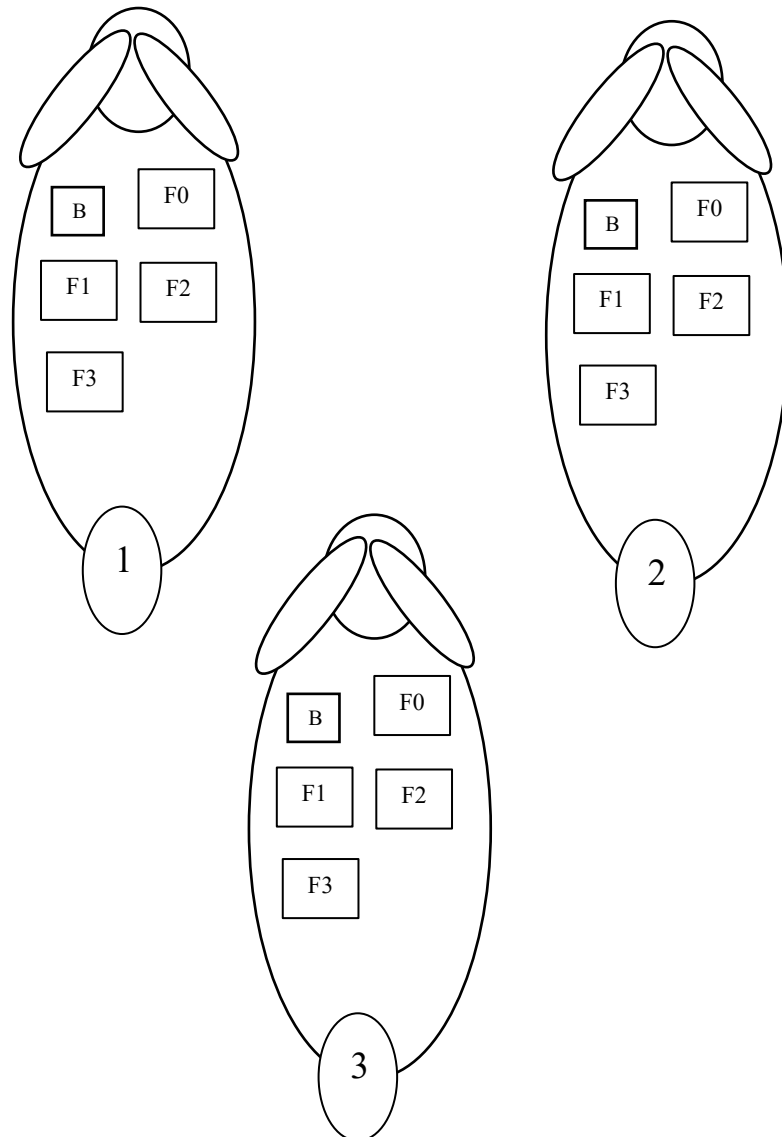
b. Kelinci 2

Sisi atas diberikan aquadest sebagai blanko (B), sisi kanan atas diolesi *hair tonic* formulasi 0 (F0), sisi kiri bawah diberikan *hair tonic* formulasi 1 (F1), sisi kanan bawah diberikan *hair tonic* formulasi 2 (F2), serta sisi tengah bawah diolesi *hair tonic* formulasi 3 (F3) (BPOM, 2022).

c. Kelinci 3

Sisi kiri atas diberikan aquadest sebagai blanko (B), sisi kanan atas diolesi *hair tonic* formulasi 0 (F0), sisi kiri bawah diberikan *hair tonic* formulasi 1 (F1), sisi kanan bawah

diberikan *hair tonic* formulasi 2 (F2), serta sisi tengah bawah diolesi *hair tonic* formulasi 3 (F3) (BPOM, 2022).



Gambar 3.6 Lokasi Paparan Uji Iritasi

Keterangan:

- B : Blanko (Aquadest).
- F0 : Formulasi 0 (*Hair tonic* tanpa ekstrak).
- F1 : Formulasi 1 (*Hair tonic* dengan kombinasi ekstrak daun belimbing wuluh dan sari lidah buaya 5:15%).
- F2 : Formulasi 2 (*Hair tonic* dengan kombinasi ekstrak daun belimbing wuluh dan sari lidah buaya 10:10%).
- F3 : Formulasi 3 (*Hair tonic* dengan kombinasi ekstrak daun belimbing wuluh dan sari lidah buaya 15:5%).

Evaluasi reaksi kulit dilakukan pada jam ke-1, 24, 48, dan 72 setelah plester dilepas. Jika pada jam ke-72 kerusakan kulit tidak dapat dikategorikan sebagai iritasi atau korosi, maka pengamatan dilanjutkan hingga hari ke-14 untuk menentukan apakah reaksi tersebut bersifat reversibel. Data yang diperoleh kemudian dikategorikan berdasarkan tingkat reaksi kulit (BPOM, 2022). Tingkat iritasi yang timbul ditunjukkan sebagai indeks iritasi dan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut (Arifin *et al.*, 2023) :

$$PPI = \frac{\text{Jumlah keseluruhan eritema dan edema}}{\text{jumlah kelompok} \times \text{jumlah pengamatan}}$$

Tabel 3.3. Skor Iritasi Pada Eritema dan Edema

Reaksi	Skor
Eritema	
1. Tidak ada eritema	0
2. Eritema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	1
3. Eritema berbatas jelas	2
4. Eritema moderat sampai berat	3
5. Eritema berat (merah daging) terdapat kerak (luka dalam)	4
Total skor eritema yang mungkin	4
Edema	
1. Tidak ada edema	1
2. Edema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	
3. Edema berbatas jelas	2
4. Edema moderat sampai berat	3
5. Edema berat (merah daging) terdapat kerak (luka dalam)	4
Total skor edema yang mungkin	4

6) Uji Kesukaan (Hedonik)

Uji hedonik dilakukan terhadap 20 orang panelis dengan mengisi pertanyaan terhadap *hair tonic* ekstrak daun belimbing wuluh dan lidah buaya. Setiap panelis akan diberikan kuisioner atau

pertanyaan yang sama meliputi aroma, warna, tekstur. Dengan penilaian suka atau tidak suka, kesukaan ini disebut skala hedonik, sangat tidak suka (skor 1), tidak suka (skor 2), netral (skor 3), suka (skor 4), sangat suka (skor 5) (Putri & Mardesci, 2018).

3.4.12 Uji Pertumbuhan Rambut

Sebelum dilakukan pengujian, kelinci terlebih dahulu menjalani masa adaptasi terhadap lingkungan, kandang, dan pakan selama dua minggu. Jika selama masa adaptasi terjadi penurunan berat badan hingga 10%, maka kelinci tersebut dianggap tidak layak untuk digunakan dalam penelitian. Setelah tahap adaptasi, rambut pada punggung kelinci dicukur hingga benar-benar bersih menggunakan gunting dan alat pencukur khusus.

Proses pencukuran dilakukan pada 6 (enam) bagian punggung kelinci, yang terdiri dari tiga bagian di sisi kiri dan tiga bagian di sisi kanan, dengan masing-masing area berbentuk segi empat berukuran 2×2 cm dan jarak antar bagian sebesar 1 cm. Setelah dibagi, seluruh area tersebut terlebih dahulu diolesi dengan etanol 70%, baik sebelum maupun sesudah aplikasi ekstrak *hair tonic* (Yasir, 2019). Setiap bagian yang telah ditentukan diberikan perlakuan sebagai berikut:

- a. Kelinci 1
Bagian kiri atas tidak diberikan perlakuan sebagai kontrol negatif (KN). Bagian kanan atas diberikan *minoxidil* sebagai kontrol positif (KP). Bagian tengah sisi kiri diberikan *hair tonic* formulasi 0 (F0). Bagian tengah sisi kanan diberikan *hair tonic* formulasi 1

(F1). Bagian bawah sisi kiri diberikan *hair tonic* formulasi 2 (F2).
 Bagian bawah sisi kanan diberikan *hair tonic* formulasi 3 (F3)
 (Yasir, 2019).

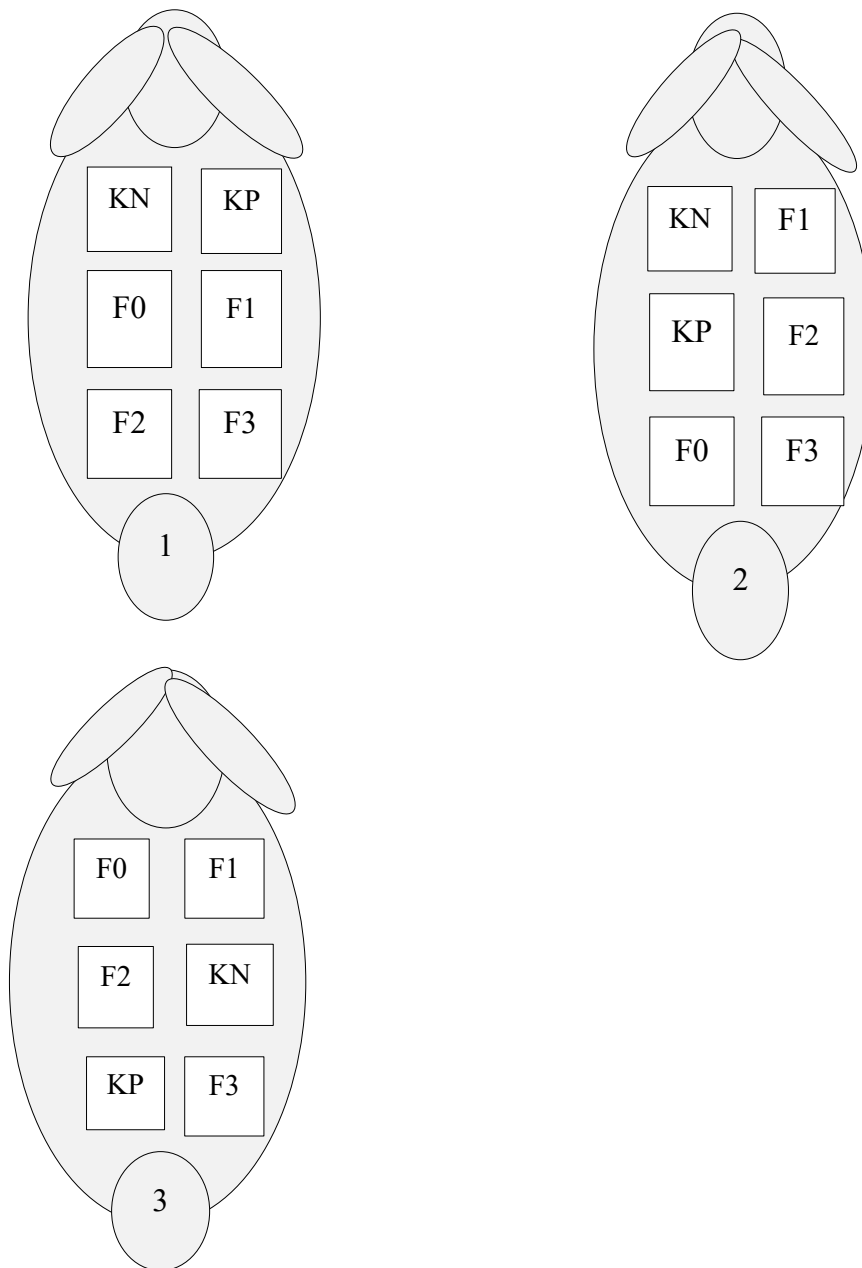
b. Kelinci 2

Bagian kiri atas tidak diberikan perlakuan sebagai kontrol negatif (KN). Bagian kanan atas diberikan *hair tonic* formulasi 1 (F1).
 Bagian tengah sisi kiri diberikan *minoxidil* sebagai kontrol positif (KP). Bagian tengah sisi kanan diberikan *hair tonic* formulasi 2 (F2). Bagian bawah sisi kiri diberikan *hair tonic* formulasi 0 (F0).
 Bagian bawah sisi kanan diberikan *hair tonic* formulasi 3 (F3)
 (Yasir, 2019).

c. Kelinci 3

Bagian kiri atas diberikan *hair tonic* formulasi 0 (F0). Bagian kanan atas diberikan *hair tonic* formulasi 1 (F1). Bagian tengah sisi kiri diberikan *hair tonic* formulasi 2 (F2). Bagian tengah sisi kanan tidak diberikan perlakuan sebagai kontrol negatif (KN).
 Bagian bawah sisi kiri diberikan *minoxidil* sebagai kontrol positif (KP). Bagian bawah sisi kanan diberikan *hair tonic* formulasi 3 (F3) (Yasir, 2019).

Sebelum perlakuan dimulai, kelinci menjalani proses adaptasi selama satu minggu untuk menghindari stres. Aplikasi *hair tonic* dilakukan sekali sehari dengan dosis 1 mL pada setiap area yang telah ditentukan. Hari pertama pengolesan dianggap sebagai hari ke-1, dan perlakuan dilakukan selama 12 hari berturut-turut (Yasir, 2019).



Gambar 3.7. Skema Pembagian Area Punggung Pengaplikasian Sediaan Pada Punggung Kelinci

Keterangan:

1. KP = *Minoxidil*
2. KN = Kontrol Negatif
3. F0 = *Hair tonic* 0%
4. F1 = *Hair tonic* EEDBW (5%); SLB (15%)
5. F2 = *Hair tonic* EEDBW (10%); SLB (10%)
6. F3 = *Hair tonic* EEDBW (15%); SLB (5%)

3.5 Analisis Data

Data diuji statistik menggunakan metode uji ANOVA, dan dilanjutkan dengan LSD (*Least Significant Difference*). Sedangkan bila distribusi data tidak normal, digunakan *kruskal wallis*, yang dilanjutkan uji *man-whitney* dengan tingkat kepercayaan 95%. Data dibandingkan dengan $p < 0,05$ dinyatakan berbeda secara signifikan, dan $p > 0,05$ dinyatakan tidak berbeda secara signifikan. Uji statistik menggunakan program SPSS versi 25.