

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Desain Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental laboratorium (*true experimental*) dengan rancangan *post-test only* menggunakan uji *in vivo* pada kelinci jantan *New Zealand White* (*Oryctolagus cuniculus*). Penelitian dilakukan dengan memberikan perlakuan berupa formulasi sampo yang mengandung ekstrak ampas kopi robusta dan minyak atsiri sereh dalam beberapa konsentrasi, kemudian dievaluasi karakteristik fisik sediaan, uji iritasi, serta efektivitas pertumbuhan rambut. Data hasil penelitian dianalisis secara statistik menggunakan *One-Way ANOVA*.

3.2. Waktu Pelaksanaan

3.2.1. Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Maret hingga Juni 2026

3.2.2. Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Laboratorium Kimia Terpadu dan Farmasetika Sekolah Tinggi Ilmu Kesehatan Malang.

3.3. Identifikasi dan Determinasi Biji Kopi dan Tanaman Sereh

Penelitian ini diawali dengan identifikasi dan determinasi Biji Kopi dan Batang sereh yang dilakukan di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu, Malang, Jawa Timur

3.4. Sampel Penelitian

1. Ekstrak ampas kopi robusta yang diperoleh melalui metode maserasi dengan pelarut etanol 96%
2. Minyak atsiri sereh diperoleh melalui proses ekstraksi distilasi uap dari batang sereh segar yang sudah dibersihkan dan dikeringkan
3. Kelinci jantan *New Zealand White*

3.5. Bahan dan Alat

3.5.1. Bahan

- | | |
|---------------------------|------------------------|
| a. Sodium Lauryl Sulfate | f. Etanol 96% |
| b. Cocamidopropyl Betaine | g. Aquadest |
| c. Carbopol 940 | h. Ekstrak Ampas Kopi |
| d. Triethanolamine (TEA) | i. Minyak Atsiri Sereh |
| e. Phenoxyethanol | |

3.5.2. Alat

- | | |
|------------------------|-----------------------------|
| a. Timbangan Analitik | i. pH universal |
| b. Spatel | j. Termometer |
| c. Tabung reaksi | k. Kertas saring |
| d. Gelas ukur | l. Corong kaca |
| e. <i>Beaker glass</i> | m. <i>Water bath</i> |
| f. Batang Pengaduk | n. <i>Rotary Evaporator</i> |
| g. <i>Hot plate</i> | o. <i>Magnetic stirrer</i> |
| h. Destilasi uap | |

3.6. Formulasi

3.6.1. Formula Acuan (Ameliana *et al.*, 2019)

Tabel 3.1 Formulasi acuan

Materials	Function	Konsentrasi (%)			
		F0	F1	F2	F3
Citronella oil	Active Ingredients	0	4	6	8
Carbopol	Thickening Agent	1	1	1	1
Sodium Lauryl Sulfate	Foaming Agent and Emulgator	3,5	3,5	3,5	3,5
Propylene Glycol	Cosolvenic	10	10	10	10
Nipagin	Preservative	0,02	0,02	0,02	0,02
Nipasol	Preservative	0,01	0,01	0,01	0,01

Triethanolamine (TEA)	Alkalizing Agent	2	2	2	2
Aquadest	Solvent	83,47	79,47	77,47	75
Total		100 g	100 g	100 g	100 g

3.6.2. Formula yang digunakan

Tabel 3.2 Formulasi Sampo

Bahan	Konsentrasi (%b/b)			
	Formula 0	Formula 1	Formula 2	Formula 3
Ekstrak Ampas Kopi	0	5	10	15
Minyak Atsiri Sereh	0	1	2	3
Sodium Lauryl Sulfat	4	4	4	4
Cocamidepropyl Betaine	4	4	4	4
Carbopol	1	1	1	1
Triethanolamine	qs	qs	qs	qs
Phenoxyethanol	1	1	1	1
Asam Sitrat	1	1	1	1
Aquadest ad	50	50	50	50

3.7. Prosedur Kerja

3.7.1. Pembuatan ekstrak ampas kopi (Bouhzam *et al.*, 2023)

1. Biji kopi robusta yang sudah digrinder menjadi bubuk kopi, dimasukkan ke dalam filter porta atau mesin kopi drip.
2. Air panas dituangkan ke bubuk kopi dalam filter drip, kemudian kopi diseduh dan mengalir ke wadah sebagai kopi cair.
3. Setelah proses drip selesai, ampas kopi (bubuk kopi basah tersisa di filter) dikumpulkan sebagai limbah.
4. Ampas kopi tersebut yang kemudian akan digunakan untuk proses ekstraksi, direndam dengan pelarut misalnya etanol 96% untuk mengekstrak zat aktif melalui metode maserasi dengan metode 1:
- 5.

5. Rendam ampas kopi dalam etanol 96% selama 72 jam pada suhu kamar tanpa pemanasan, aduk sesekali setiap 6 jam untuk mempercepat pelarutan zat aktif.
6. Setelah 72 jam, saring campuran menggunakan saringan kain atau kertas saring untuk memisahkan ampas padat dan cairan ekstrak.
7. Filtrat cair kemudian dikonsentrasikan menggunakan rotary evaporator pada suhu sekitar 45°C hingga menjadi ekstrak kental.
8. Ekstrak kental dikeringkan atau dipertahankan dalam bentuk pekat menggunakan water bath pada 50°C sampai tingkat kekentalan yang diinginkan tercapai.
9. Ekstrak yang telah siap digunakan dalam formulasi sampo, disimpan dalam wadah kedap udara untuk menghindari kontaminasi atau degradasi.

3.7.2. Pembuatan minyak atsiri sereh (Kanza *et al.*, 2025)

1. Siapkan daun sereh segar sebanyak 2 kg, cuci bersih dan tiriskan.
2. Potong sereh menjadi potongan kecil sekitar 1-2 cm untuk memperbesar luas permukaan ekstraksi.
3. Siapkan alat destilasi uap yang terdiri dari bejana destilasi, kondensor uap, dan alat penampung hasil destilat.
4. Masukkan sereh ke dalam bejana destilasi, Tambahkan air secukupnya hingga menutupi sereh 1/3 bagian.
5. Panaskan bejana hingga mendidih, menghasilkan uap air yang mengalir melalui sereh.
6. Uap air membawa minyak atsiri sereh menguap dan dialirkan ke kondensor yang didinginkan.
7. Uap di kondensor mengembun menjadi cairan yang merupakan campuran minyak atsiri dan air.
8. Proses destilasi dilakukan selama 4 – 5 jam dengan suhu mendidih air sekitar 100°C.
9. Kumpulkan distilat di corong pisah atau wadah penampung.

10. Diamkan destilat 1-2 jam di corong pisah pada suhu kamar, buang lapisan air bawah, keringkan minyak atas dengan Na_2SO_4 anhidrat jika keruh.
11. Simpan minyak atsiri sereh dalam botol kedap udara dan gelap agar tetap stabil dan tidak cepat rusak.

3.7.3. Pembuatan Sampo (Pal *et al.*, 2024)

- 1 Timbang 0,5 g Carbopol 940, masukkan ke dalam 25 ml air panas (70°C), diamkan 30 menit hingga mengembang, lalu aduk perlahan sampai membentuk larutan kental homogen.
- 2 Tambahkan Trietanolamin secukupnya ke dalam Carbopol yang telah di aduk secara homogen dan membentuk gel yang kental
- 3 Timbang 2 g Sodium Lauryl Sulfate (SLS), larutkan dalam 20 ml air panas dalam beaker glass sambil diaduk hingga larut sempurna.
- 4 Masukkan larutan SLS ke dalam Carbopol 940 sedikit demi sedikit sambil terus diaduk perlahan hingga homogen.
- 5 Tambahkan 2 ml cocamidopropyl betaine sedikit demi sedikit ke campuran sambil diaduk sampai konsistensi membaik dan larutan homogen.
- 6 Timbang bahan aktif sesuai formula:
 - Formula 1: 2,5 g ekstrak ampas kopi + 0,5 g minyak sereh
 - Formula 2: 5 g ekstrak ampas kopi + 1 g minyak sereh
 - Formula 3: 7,5 g ekstrak ampas kopi + 1,5 g minyak sereh
- 7 Masukkan bahan aktif ke dalam campuran dan aduk sampai homogen.
- 8 Tambahkan aquadest hingga total volume mencapai 50 ml sambil terus diaduk hingga tercampur sempurna.
- 9 Tuangkan sampo ke dalam botol bersih berkapasitas 50 ml, tutup rapat, beri label sesuai formula, nomor batch, dan tanggal pembuatan.

3.7.4. Prosedur Uji Organoleptik

Pengujian organoleptic dilakukan dengan mengamati warna, aroma dan bentuk/konsistensi

3.7.5. Prosedur Uji Homogenitas (Aprillia *et al.*, 2021)

1. Kaca preparat dibersihkan sebelum digunakan
2. Tambahkan 1 tetes sampo masing masing sediaan dan diratakan menggunakan cover glass
3. Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 40x
4. Pengamatan dilakukan untuk melihat keseragamandistribusi komponen sediaan, serta melihat ada atau tidaknya pasrtikel kasar, gumpalan atau pemisahan fase

3.7.6. Prosedur Uji pH (Carissa Putri Aurellia Darmawan, 2025; Nurfadilah *et al.*, 2023)

1. Sebanyak 5ml sampo diukur menggunakan gelas ukur, kemudian dituangkan ke dalam beaker glass
2. Sebanyak 50 ml aquadest ditambahkan kedalam beaker glass yang berisi sampo
3. Campuran tersebut diaduk menggunakan batang pengaduk hingga larutan homogen
4. Kertas indikator pH universal dicelupkan ke dalm larutan selama beberapa detik
5. Kertas indikator diangkat, kemudian perubahan warna yang terbentuk dibandingkan dengan skala warna pada kemasan kertas indikator pH universal
6. Nilai pH dicatat sesuai dengan warna yang ditunjukkan oleh indikator

3.7.7. Prosedur Uji Tinggi Busa (Carissa Putri Aurellia Darmawan, 2025)

1. Sebanyak 1 g sampo dimasukkan ke dalam tabung reaksi
2. Ditambahkan 10 mL akuades ke dalam tabung reaksi

3. Tabung ditutup kemudian dikocok secara vertikal sebanyak 10 kali dengan kecepatan yang sama
4. Tinggi busa yang terbentuk segera diukur menggunakan penggaris dan dicatat sebagai tinggi busa awal
5. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pada setiap formula, kemudian dihitung nilai rata-ratanya

3.7.8. Prosedur Uji Stabilitas Busa (Carissa Putri Aurellia Darmawan, 2025)

1. Setelah tinggi busa awal diukur, tabung reaksi didiamkan selama 5 menit pada suhu ruang
2. Tinggi busa yang masih tersisa setelah 5 menit diukur kembali menggunakan penggaris
3. Pengujian dilakukan sebanyak tiga kali pada masing-masing formula, kemudian dihitung nilai rata-ratanya

3.7.9. Prosedur Uji Viskositas (Sulistiyono *et al.*, 2022)

1. Siapkan Brookfield Viscometer dan pasang spindle No. 2.
2. Masukkan sampel shampoo ke dalam gelas beaker hingga spindle terendam sampai batas *immersion mark*.
3. Pasang spindle pada alat, kemudian celupkan secara tegak lurus ke dalam sampel tanpa menyentuh dasar maupun dinding wadah.
4. Atur kecepatan putar alat sesuai karakteristik sampel, yaitu 6 rpm untuk F0, F2, dan F3, serta 0,3 rpm untuk F1, agar nilai torsi berada pada rentang pembacaan yang direkomendasikan.
5. Jalankan alat hingga pembacaan viskositas stabil.
6. Catat hasil viskositas yang ditampilkan dalam satuan mPa·s (cP).
7. Ulangi pengukuran sebanyak tiga kali untuk setiap formula.
8. Hitung nilai rata-rata viskositas dari masing-masing formula.

3.7.10. Prosedur Uji Iritasi (Sugiarti *et al.*, 2025)

1. Kelinci diaklimatisasi terlebih dahulu selama ± 7 hari sebelum penelitian dimulai.

2. Rambut pada bagian punggung kelinci dicukur menggunakan alat pencukur hingga bersih dengan ukuran area sekitar 3×3 cm.
3. Kulit yang telah dicukur dibiarkan selama ± 24 jam sebelum pengujian untuk menghindari iritasi akibat pencukuran.
4. Sampel sampo dioleskan pada area uji sebanyak 0,5 mL secara merata pada kulit kelinci.
5. Area tersebut dibiarkan terbuka tanpa penutup selama periode pengamatan.
6. Setelah aplikasi, kulit kelinci diamati untuk melihat adanya reaksi iritasi berupa:
 - eritema (kemerahan)
 - edema (pembengkakan)
7. Pengamatan dilakukan pada waktu:
 - 24 jam
 - 48 jam
 - 72 jam setelah pengolesan.
8. Reaksi yang muncul kemudian dinilai menggunakan skala skor iritasi kulit.

3.7.11. Prosedur Pengaplikasian Sampo (Lestari *et al.*, 2024)

1. Kelinci diaklimatisasi terlebih dahulu selama ± 7 hari sebelum perlakuan.
2. Rambut pada bagian punggung kelinci dicukur hingga bersih menggunakan alat pencukur, kemudian dibuat area uji berukuran 3×3 cm.
3. Area tersebut dibersihkan terlebih dahulu dan dibiarkan selama ± 24 jam sebelum perlakuan dimulai agar kulit tidak mengalami iritasi akibat pencukuran.
4. Sampel sampo dioleskan pada area uji sebanyak 0,5 mL secara merata menggunakan pipet atau spatula.

5. Sampo yang telah dioleskan didiamkan selama $\pm 3-5$ menit agar bahan aktif dapat kontak dengan kulit. (Dalam banyak uji topikal kosmetik hewan, waktu kontak beberapa menit digunakan untuk simulasi penggunaan sampo).
6. Setelah itu, area tersebut dibilas menggunakan air bersih atau aquadest secukupnya hingga tidak ada sisa sampo yang tertinggal.
7. Area kulit kemudian dikeringkan dengan tisu atau kain bersih secara perlahan.
8. Perlakuan dilakukan 1 kali sehari selama 28 hari pada area yang sama.

3.7.12. Prosedur Pengukuran Panjang Rambut Kelinci (Budi, 2022)

1. Rambut pada area uji dicukur terlebih dahulu pada hari ke-0 sebelum perlakuan dimulai.
2. Sampel diaplikasikan setiap hari pada area uji selama masa penelitian.
3. Pengukuran panjang rambut dilakukan pada hari ke-7, 14, dan 21.
4. Pada setiap waktu pengamatan, sekitar 5 helai rambut diambil dari area uji menggunakan pinset.
5. Rambut yang telah diambil kemudian diluruskan dan ditempel pada permukaan datar menggunakan selotip agar tidak melengkung.
6. Panjang rambut diukur menggunakan jangka sorong (vernier caliper) dengan ketelitian 0,05 mm.
7. Nilai panjang rambut yang diperoleh dihitung rata-rata dari beberapa helai rambut untuk setiap area perlakuan.
8. Data pertumbuhan rambut kemudian dianalisis secara statistik.

3.8. Identifikasi Variabel

3.8.1. Variabel Bebas

Penambahan ekstrak ampas kopi robusta dan minyak atsiri sereh dalam formulasi sampo.

3.8.2. Variabel Terikat

Pertumbuhan rambut pada kelinci jantan

3.8.3. Variabel Terkontrol

Jenis kelinci, kondisi lingkungan, pemberian pakan, area aplikasi sampo dan dosis sampo yang digunakan.

3.9. Definisi Operasional

Tabel 3.3: Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
1	Biji Kopi Robusta	Biji kopi robusta Dampit berbentuk oval kecil, ukuran 10–15 mm, berwarna coklat muda, tanpa lapisan minyak pada permukaan, tingkat roasting rendah	Pengamatan visual, jangka sorong/penggaris	- Oval kecil (10–15 mm) - Coklat muda - Tanpa minyak permukaan	Ordinal
2	Daun Sereh	Bagian yang digunakan adalah daun sereh yang diambil dari pangkal batang hingga ujung daun dengan panjang $\pm$ 50–100 cm (sesuai karakteristik)	Penggaris, pisau potong	Panjang daun sereh (cm)	Rasio

		morfologi tanaman dan penelitian terdahulu), karena daun merupakan bagian tanaman sereh dengan kandungan minyak atsiri tertinggi			
3	Ekstraksi Minyak Sereh	Proses pengambilan minyak atsiri dari batang dan daun sereh menggunakan metode destilasi uap.	Alat ekstraksi (destilasi uap, corong pisah)	Volume minyak atsiri (ml)	Rasio
4	Ekstraksi Ampas Kopi	Proses perendaman ampas kopi robusta dengan pelarut tertentu menggunakan metode maserasi hingga diperoleh ekstrak cair.	Wadah maserasi, pelarut, corong pisah, <i>rotary evaporator</i>	Volume ekstrak (ml) atau berat ekstrak kental (g)	Rasio
5	Hewan Uji (Kelinci New Zealand)	Hewan uji berupa kelinci jantan <i>New Zealan White</i> yang sehat, berumur 4 bulan, dengan berat badan 2 - 3 kg sesuai kriteria inklusi penelitian.	Data identifikasi hewan, timbangan, observasi klinis	- Jantan - Usia (4 bulan) - Berat (2 - 3 kg) - Sehat	Nominal & Rasio
6	Panjang Rambut Kelinci	Ukuran panjang rambut kelinci yang diukur dari pangkal	Jangka sorong	Panjang rambut (mm)	Rasio

		hingga ujung rambut menggunakan penggaris.			
--	--	--	--	--	--

3.10. Desain Uji *In Vivo*

Uji *in vivo* dilakukan untuk mengetahui efek formula sampo ekstrak ampas kopi robusta (*Coffea canephora*) dan minyak atsiri sereh (*Cymbopogon citratus*) terhadap pertumbuhan rambut kelinci jantan *New Zealand White*.

1. Etika Penelitian:

- Peneliti telah mendapatkan persetujuan tertulis dari Komite Etik Penelitian Hewan yang berwenang
- Peneliti menjamin bahwa prosedur perlakuan hewan mengikuti standar kesejahteraan hewan (*animal welfare*), termasuk pengurangan rasa sakit dan stres.
- Peneliti mengikuti prinsip 3R (*Replacement, Reduction, Refinement*) dan prosedur yang etis.

2. Hewan Uji

- Kelinci jantan *New Zealand White* sehat, berumur 4 – 5 bulan, berat 1,5 – 2,5 kg.
- Jumlah hewan uji disesuaikan dengan kebutuhan penelitian

3. Persiapan Hewan Uji

- Kelinci diadaptasikan selama 7 hari di laboratorium
- Area punggung kelinci dicukur bersih pada luas $\pm 3 \times 3$ cm untuk area aplikasi sampo.

4. Pembagian Kelompok Perlakuan

- Kontrol negatif (F0): diberi basis sampo tanpa bahan aktif.
- F1: sampo ekstrak ampas kopi dan minyak sereh (5:1)
- F2: sampo kombinasi ekstrak kopi dan minyak sereh (10:2)
- F3: sampo kombinasi ekstrak kopi dan minyak sereh (15:3)

- Kontrol pembanding tambahan berupa sampo komersial dengan klaim penumbuh rambut juga disertakan untuk memberikan perbandingan klinis yang lebih kuat dan valid
- Blanko: tidak diberi perlakuan apapun

5. Pemberian Perlakuan

- Formula diaplikasikan pada area punggung kelinci yang telah dicukur 1 hari sebelumnya
- Durasi perlakuan: 21 hari.

6. Parameter Pengamatan

- Panjang rambut: diukur setiap 7 hari menggunakan penggaris/mistar dari pangkal hingga ujung rambut.

3.11. Pengumpulan Data

1.1 Data Panjang Rambut

- Rambut pada area punggung kelinci yang telah dicukur diukur pertumbuhannya setiap 7 hari (hari ke-7, 14, dan 21).
- Pengukuran dilakukan menggunakan penggaris/mistar dari pangkal hingga ujung rambut pada tiga titik area yang sama, kemudian dihitung rata-ratanya.

2.1 Data Penunjang Hewan Uji

- Identitas hewan (jenis, umur, berat badan, kondisi kesehatan) dicatat sebelum perlakuan
- Berat badan kelinci ditimbang pada awal dan akhir penelitian untuk memastikan kondisi hewan tetap sehat

3.1 Pencatatan Data

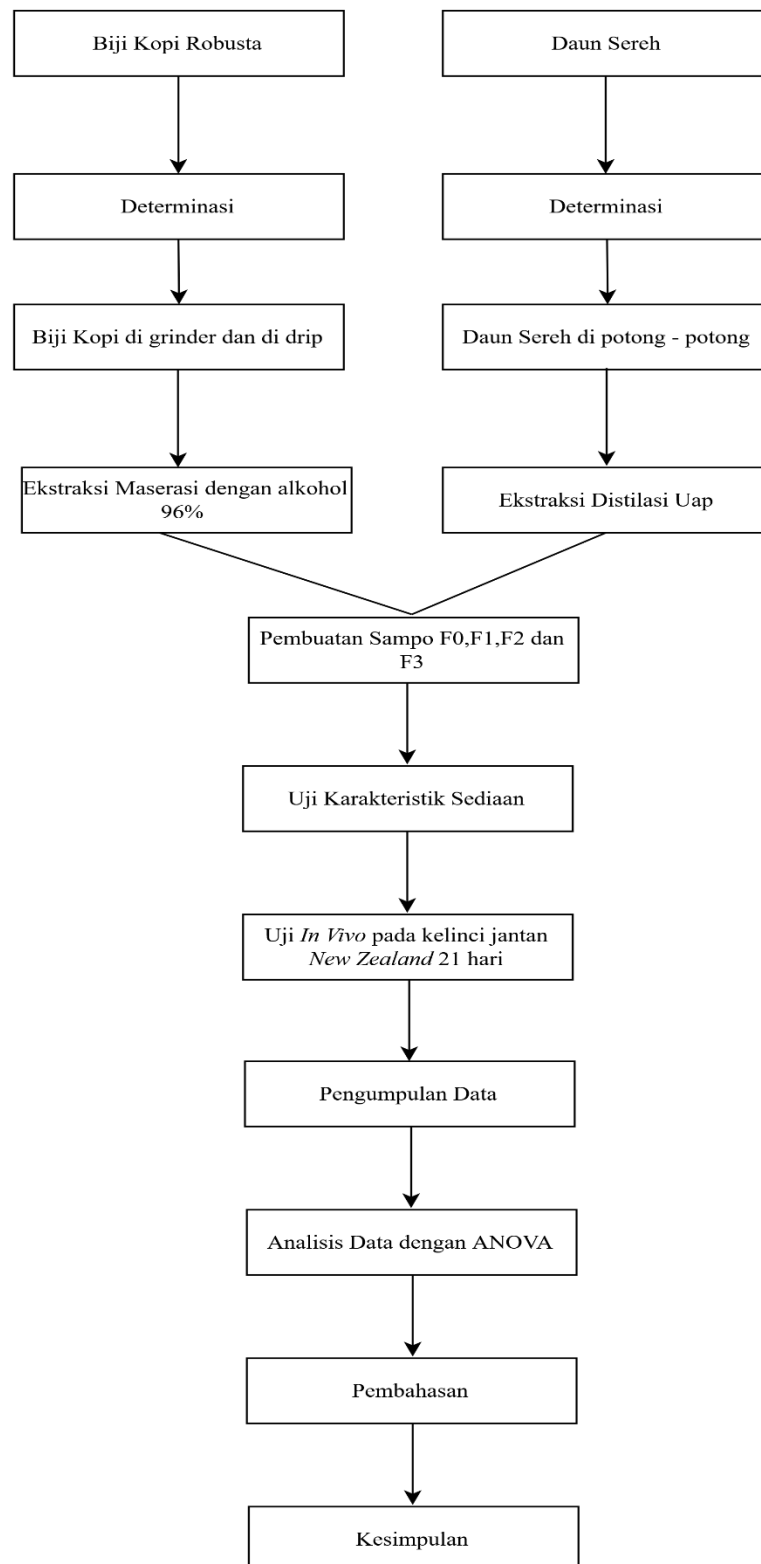
- Semua data dimasukkan ke dalam tabel pengamatan harian/mingguan.
- Data kemudian direkapitulasi untuk analisis statistik

3.12. Analisis Data

Analisis data panjang rambut dilakukan dengan menggunakan uji ANOVA satu arah (*One-Way ANOVA*) menggunakan perangkat lunak SPSS

versi 26 untuk menguji perbedaan secara statistik antara rata-rata panjang rambut pada masing-masing kelompok perlakuan. Sebelum melakukan uji ANOVA, terlebih dahulu dilakukan uji normalitas menggunakan metode Shapiro-Wilk dan uji homogenitas varians dengan *Levene's Test* untuk memastikan data memenuhi asumsi analisis statistik, karena data panjang rambut diambil secara berulang setiap 7 hari selama 21 hari, maka analisis juga akan menggunakan ANOVA *Repeated Measures* guna mengakomodasi korelasi data berulang pada subjek yang sama. Jika hasil ANOVA menunjukkan perbedaan signifikan antar kelompok, uji *post hoc* seperti Tukey atau LSD akan digunakan untuk mengetahui kelompok mana yang berbeda secara signifikan. Langkah-langkah ini dilakukan agar analisis data valid, hasilnya dapat dipercaya, dan interpretasi pola pertumbuhan rambut pada kelinci dapat dilakukan secara tepat.

3.14. Kerangka Operasional



Gambar 3.1: Kerangka Operasional