

## **BAB III METODE PENELITIAN**

### **A. Populasi dan Sampel**

Populasi merupakan keseluruhan objek yang memiliki karakteristik tertentu dan menjadi fokus dalam suatu penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah Minyak Bulus (*Amyda Cartilaginea*) yang diperoleh dari Kotagede, Yogyakarta.

Sampel merupakan sebagai bagian kecil dari populasi yang diambil sebagai objek pada penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah Minyak Bulus (*Amyda Cartilaginea*) yang dibuat dengan variasi konsentrasi.

### **B. Variabel Penelitian**

#### **1. Identifikasi variabel utama**

Variabel utama pertama yakni minyak bulus sebagai *anti-aging*. Variabel utama kedua dalam penelitian ini yakni hewan uji kelinci *New Zealand*. Variabel utama ketiga yaitu aktivitas *anti-aging* variasi konsentrasi minyak bulus pada kulit punggung kelinci *New Zealand*.

#### **2. Klasifikasi variabel utama**

Klasifikasi utama mencakup pengelompokan seluruh variabel yang secara langsung diamati dalam penelitian. Variabel-variabel tersebut dapat dibedakan menjadi variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas merupakan variabel yang memberikan pengaruh atau menjadi faktor penyebab timbulnya variabel lainnya. Pada penelitian ini yang merupakan variabel bebas yakni minyak bulus dengan variasi konsentrasi 12,5 % ; 25% ; 50 % ; 100 %.

Variabel tergantung merupakan variabel yang berubah karena variabel bebas. Variabel tergantung di penelitian ini yaitu uji iritasi primer, presentasi elastisitas, presentasi kelembapan, dan presentase kolagen kulit punggung kelinci.

Variabel terkendali merupakan variabel yang dianggap mempengaruhi variabel tergantung selain variabel bebas. Dalam penelitian ini, variabel terkendali meliputi kondisi laboratorium, spesifikasi kelinci *New Zealand*, termasuk berat badan kelinci, galur kelinci, jenis kelamin, umur, pakan, kondisi peneliti, kondisi alat, kesehatan, aktivitas.

### 3. Definisi operasional variabel utama

Pertama, minyak bulus yang dihasilkan adalah melalui proses ekstraksi termal dari lemak hewan bulus yang diperoleh dari toko Lansida Yogyakarta.

Kedua, pengujian keamanan ada dilakukan dengan mengamati kemungkinan timbulnya iritasi primer pada punggung kelinci, yang kemudian dihitung dengan rumus IIPR (Indeks Iritasi Primer).

Ketiga, penelitian ini, Wardah Renew You Intensive serum berperan sebagai kontrol positif karena mengandung bahan aktif *anti-aging* yang sudah terbukti secara ilmiah serta memiliki tekstur topikal yang nyaman.

Kempat, Parameter uji adalah parameter % kolagen, kelembapan, dan elastisitas menggunakan alat skin *analyzer* untuk melihat aktivitas *anti-aging* pada sediaan.

## C. Alat dan Bahan

### 1. Alat

Peralatan yang digunakan penelitian ini seperti alat cukur, timbangan analitik, batang pengaduk, lampu sinar UV-A, botol pipet kaca, pipet ukur, beaker glass, Alat Skin *Analyzer* EH900U, wadah minyak bulus, GCMS-QP2010 SE

### 2. Bahan

**2.1 Bahan Sampel.** Sampel yang digunakan adalah Minyak Bulus sebagai bahan aktif.

**2.2 Bahan Kimia.** Bahan kimia yang digunakan adalah parafin cair

### 3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kelinci jantan ( galur *New Zealand*) berusia 5-8 bulan, berat 2-4 kg, sehat, dan pada kulit punggung kelinci tidak terdapat edema maupun eritema.

## D. Jalannya Penelitian

### 1. *Ethical Clearance* (EC)

Sesuai dengan Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor 7 Tahun 2016 tentang Komisi Etik Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Nasional, setiap kegiatan penelitian dan pengembangan kesehatan yang melibatkan subjek manusia maupun hewan percobaan wajib menjunjung tinggi prinsip-prinsip etika. Penelitian ini bertujuan untuk mendukung pelayanan kesehatan dalam rangka meningkatkan kualitas kesehatan masyarakat secara optimal. Proses pengajuan dan

penerbitan persetujuan etik (*ethical clearance*) untuk penelitian ini dilaksanakan di RSUD Dr. Moewardi, Jebres, Kota Surakarta, Jawa Tengah.

## **2. Identifikasi minyak bulus (*Amyda cartilaginea*)**

Tahap identifikasi yaitu menetapkan kebenaran sampel minyak bulus (*Amyda cartilaginea*) yang meliputi organoleptik dan Analisa GC-MS.

### **2.1 Pengamatan Organoleptik.**

Pemeriksaan organoleptik meliputi pemeriksaan warna dan bau dari minyak bulus secara visual.

- a. Pemeriksaan warna, dilakukan melalui melihat langsung minyak bulus secara visual.
- b. Pemeriksaan bau, dilakukan dengan menghirup aroma minyak bulus.

### **2.2 Pengukuran Nilai Bobot Jenis Minyak Bulus**

Berat jenis minyak bulus ditentukan menggunakan alat piknometer berkapasitas, 50 ml. Alat ini terlebih dahulu dibersihkan dan dikeringkan, lalu ditimbang dalam keadaan kosong dan setelah diisi minyak. Selisih antara massa piknometer berisi minyak bulus dan kosong digunakan untuk menghitung berat jenis minyak bulus (Wahyuni, 2017).

**2.3 Analisa GC-MS (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry*).** Analisis komponen kimia dalam minyak bulus dilakukan menggunakan Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) yaitu instrument analitik yang menggabungkan kromatografi gas untuk memisahkan senyawa volatil dan spektrometri massa untuk mengidentifikasi senyawa berdasarkan pola fragmentasi ionnya. Metode ini memungkinkan penentuan karakteristik senyawa seperti massa molekul, rumus kimia, dan klasifikasi senyawa. Pada analisis ini digunakan gas helium sebagai fase gerak, serta kolom kapiler Agilent DB-5MS (panjang 30 meter, diameter dalam 0,25 mm, dan ketebalan film 0,25  $\mu$ m). Fase gerak yang digunakan adalah gas helium dengan tekanan 24,7 kPa. Suhu pemanasan kolom diatur pada suhu 50 °C selama 5 menit, kemudian suhu injeksi dinaikkan hingga 300 °C dan dipertahankan selama 17 menit. Mode injeksi yang digunakan adalah split dengan rasio 129,9. aliran total gas pembawa sebesar 90,6 mL/menit, dengan aliran kolom 0,66 mL/ menit, dan kecepatan linier 29,5 cm/detik (Larsen *et al.*, 2015).

### 3. Rancangan formula dan pembuatan formula minyak bulus

Pembuatan minyak bulus memvariasikan bahan aktif minyak bulus dan parafin cair. Tujuan dari divariasikannya konsentrasi minyak bulus guna melihat pada konsentrasi berapakah minyak bulus (*Amyda cartilaginea*) yang dapat memberikan efek *anti-aging*.

**Tabel 1. Rancangan formulasi minyak bulus**

| Bahan        | F1 % | F2 % | F3% | F4% | F5 % | Kegunaan    |
|--------------|------|------|-----|-----|------|-------------|
| Minyak Bulus | 12,5 | 25   | 50  | 100 | 0    | Bahan aktif |
| Parafin cair | 87,5 | 75   | 50  | 0   | 100  | Pembawa     |

**Keterangan :**

F1 : minyak bulus konsentrasi 12,5%

F2 : minyak bulus konsentrasi 25%

F3 : minyak bulus konsentrasi 50 %

F4 : minyak bulus konsentrasi 100 %

F5 : Parafin cair (kontrol negatif)

### 4. Pembuatan Formula Minyak Bulus

Pembuatan diawali dengan menyiapkan seluruh peralatan dan bahan yang dibutuhkan. Setiap bahan dipipet dengan pipet ukur sesuai dengan komposisi yang telah ditetapkan dalam formula. Masukkan parafin cair kedalam botol pipet kaca tambahkan minyak bulus secara perlahan sambil diaduk hingga homogen.

### 5. Pengujian aktivitas anti aging minyak bulus

**5.1 Penyiapan hewan uji.** Sebanyak 5 ekor kelinci digunakan dalam penelitian ini dan diadaptasi terlebih dahulu selama satu minggu di dalam kandang. Pembagian sebanyak 6 perlakuan untuk 1 kelinci. Setiap kelompok kelinci akan dipaparkan sinar UV-A.

I : kontrol negatif (parafin cair )

II : kontrol positif (Wardah renew you)

III : dioleskan minyak bulus konsentrasi 12,5 %

IV : dioleskan minyak bulus konsentrasi 25 %

V : dioleskan minyak bulus konsentrasi 50 %

VI : dioleskan minyak bulus konsentrasi 100%

**5.2 Induksi kerutan dengan penyinaran sinar UV-A.** Seluruh kelinci yang digunakan dalam penelitian ini dicukur bulunya pada area punggung. Area punggung kemudian dibagi menjadi 6 bagian dengan masing-masing area berbentuk lingkaran berdiameter 2 cm. Setelah pencukuran, dilakukan pengukuran parameter kulit meliputi persentase kolagen, kelembapan, dan elastisitas menggunakan alat *skin analyzer*. Perlakuan UV-A dilakukan menggunakan lampu *Exoterra Daylight Basking Spot* pada jarak 30 cm dengan dosis  $63,69 \text{ J.cm}^{-2}/\text{jam}$  selama 6 jam selama 1 minggu (Safitri *et al.*, 2014).

**5.3 Pengaplikasian minyak bulus.** Kelinci yang telah mengalami induksi kerutan melalui paparan sinar UV-A diamati parameter kulitnya, yaitu % kolagen, kelembapan, dan elastisitas, menggunakan alat *skin analyzer* pada hari ke-0, sebelum dilakukan aplikasi minyak bulus. Selanjutnya, minyak bulus dioleskan sebanyak 1 tetes pada masing-masing kelompok perlakuan satu kali sehari (Sholaekah *et al.*, 2025).

**5.4 Pengamatan aktivitas anti-aging.** Parameter kerutan diamati pada tiga titik waktu, yaitu sebelum induksi sinar UV, pada hari ke-0 (setelah induksi dan sebelum pengaplikasian minyak bulus), hari ke 30 setelah pengaplikasian minyak bulus. Parameter yang dievaluasi meliputi % kolagen, kelembapan, dan elastisitas kulit, dengan menggunakan alat *skin analyzer*.

**Tabel 2. Parameter hasil pengukuran dengan Skin Analyzer**

| Pengukuran               |              | Parameter |          |          |
|--------------------------|--------------|-----------|----------|----------|
| Kadar kolagen            | Serious lack | Reduce    | Normal   |          |
|                          | (25-50%)     | (50-65%)  | (65-80%) |          |
| Elastisitas              | Loose skin   | Weak      | Normal   | Better   |
|                          | (15-35%)     | (35-50%)  | (50-65%) | (67-70%) |
| Moisture<br>(kelembaban) | Dry          | Ageing    | Normal   | Higher   |
|                          | (3-4%)       | (4-10%)   | (10-15%) | (15-30%) |

(Yupitawati, 2017)

**5.5 Uji keamanan.** Pengujian keamanan dilakukan guna mengantisipasi kemungkinan efek samping pada kulit dibutuhkan sebanyak 3 ekor kelinci. Observasi dilakukan pada 24,48, dan 72 jam setelah aplikasi minyak bulus. Dua parameter yang diamati meliputi tingkat eritema (kemerahan) dan tingkat edema (pembengkakan), dengan penilaian berdasarkan sistem skoring yang dikembangkan.

**Tabel 3. Skor derajat edema**

| Reaksi kulit                                                     | Score |
|------------------------------------------------------------------|-------|
| Tanpa edema                                                      | 0     |
| Sangat sedikit edema (hampir tidak terlihat)                     | 1     |
| Edema tapi terbatas jelas                                        | 2     |
| Edema sedang (tepi naik 1 mm)                                    | 3     |
| Edema berat (tepi naik >1 mm dan meletus keluar daerah penjanan) | 4     |

**Tabel 4. Skor derajat eritema**

| Reaksi kulit                                                       | Score |
|--------------------------------------------------------------------|-------|
| Tanpa eritema                                                      | 0     |
| Sangat sedikit eritema(hampir tidak terlihat)                      | 1     |
| Eritema tapi terbatas jelas                                        | 2     |
| Eritema sedang (tepi naik 1 mm)                                    | 3     |
| Eritema berat (tepi naik >1 mm dan meletus keluar daerah penjanan) | 4     |

Masing-masing sediaan uji dihitung jumlah dari indeks eritema dan indeks edema kemudian dihitung indeks iritasi dengan cara berikut.

$$\text{Indeks iritasi primer} = \frac{\text{Jumlah eritema 24/28/72 jam} + \text{Jumlah edema 24/48/72 jam}}{\text{Jumlah kelinci}}$$

**Tabel 5. Skor derajat iritasi**

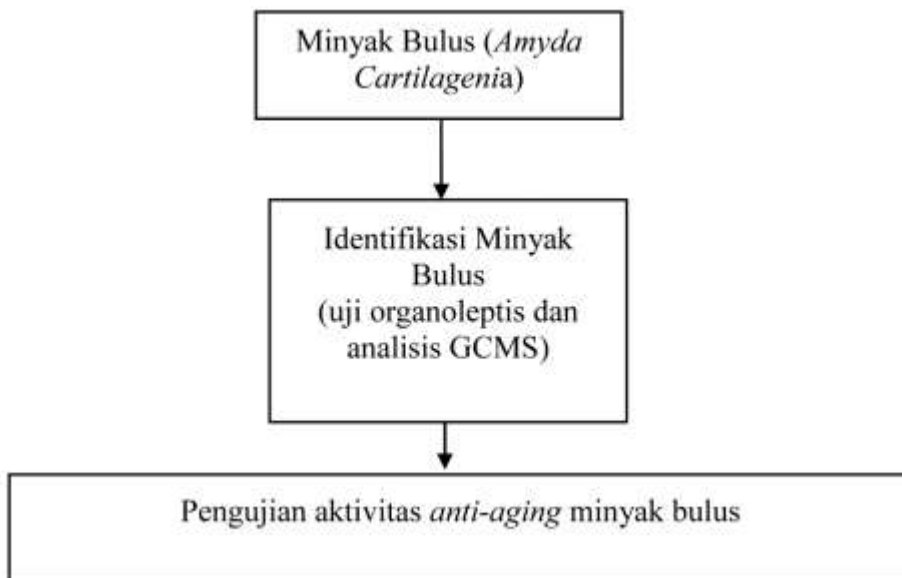
| Reaksi kulit               | Score   |
|----------------------------|---------|
| Tidak mengiritasi          | 0,0     |
| Sangat sedikit mengiritasi | 0,0-0,5 |
| Sedikit iritasi            | 0,5-1,9 |
| Iritasi sedang             | 2,0-4,9 |
| Iritasi parah              | 5,0-8,0 |

(Sani dan Lukmayani, 2010)

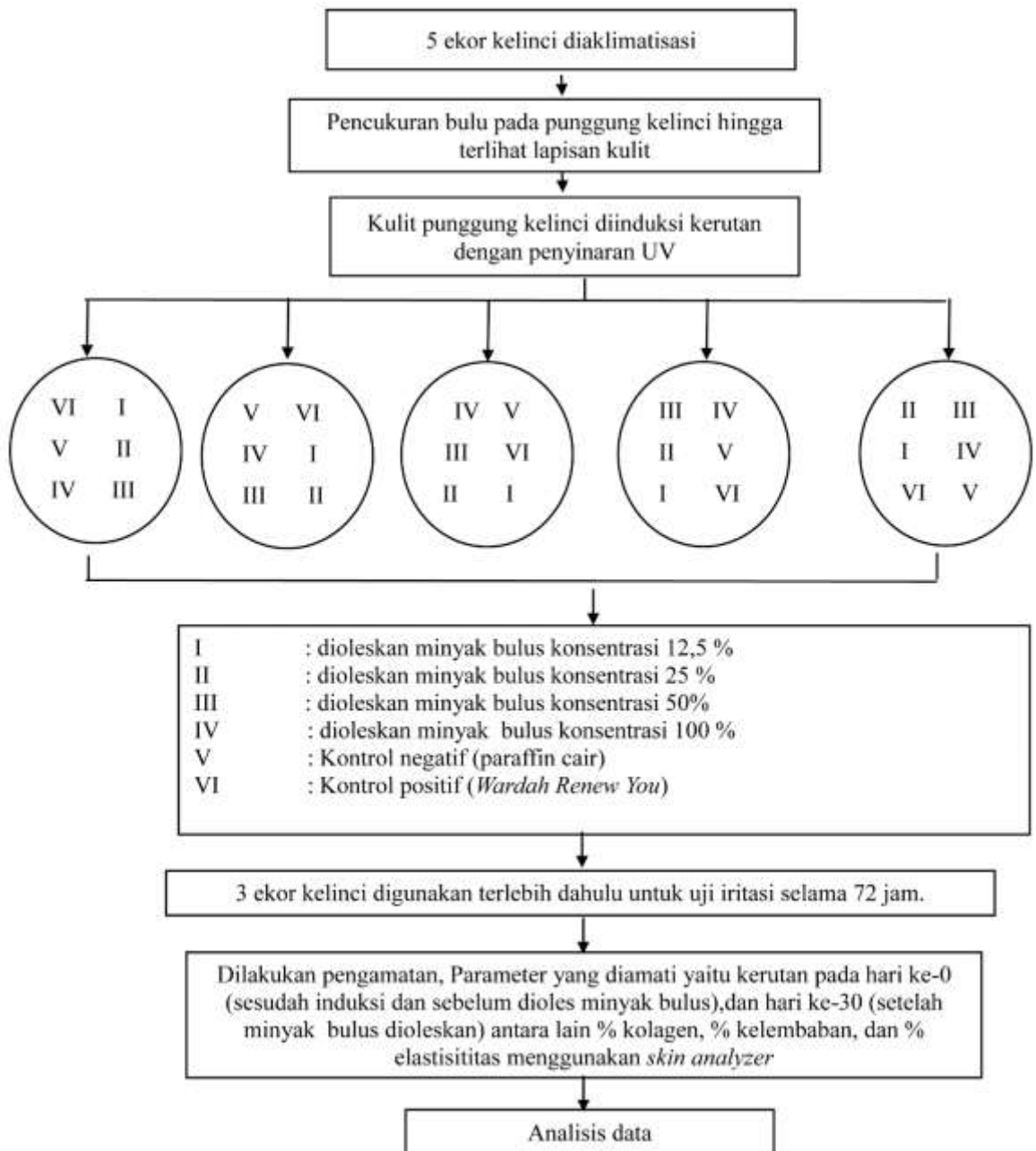
### E. Analisis Data

Data hasil uji mutu fisik sediaan yang telah dikumpulkan dianalisis secara statistik menggunakan software SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*). Sebelum dilakukan analisis lebih lanjut, uji normalitas terlebih dahulu dilakukan dengan metode *Shapiro-Wilk* ( $p > 0,05$ ). Jika data terdistribusi normal, maka dilanjutkan dengan analisis *One Way ANOVA* yang diikuti oleh *post hoc Tukey*. Pengujian aktivitas *anti-aging* pada hewan uji dilakukan dengan menggunakan alat *Skin Analyzer* untuk mengukur parameter persentase elastisitas, kelembapan, dan kolagen kulit.

### F. Skema Penelitian



**Gambar 5. Skema Penelitian**



Gambar 6. Skema pengujian aktivitas *anti aging* minyak bulus