

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi Sampel

1. Populasi

Populasi merupakan semua objek maupun subjek yang terdapat dalam penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian adalah SRFF yang diperoleh dari fermentasi nasi beras putih berjenis IR 64 Setra Ramos yang telah difermentasi selama 72 jam dengan ragi *Saccharomyces cerevisiae*.

2. Sampel

Sampel merupakan sebagian/wakil dari populasi yang nantinya akan diteliti. Sampel dalam penelitian ini yaitu serum dari SRFF (*Saccharomyces rice ferment filtrate*) dengan konsentrasi 10% nasi yang difermentasi selama 3 hari dan variasi basis serum yakni 1%, 2% dan 3%

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama memuat identifikasi dari semua variabel yang diteliti langsung. Variabel utama pada penelitian ini adalah *SRFF* (*Saccharomyces cerevisiae*) yang dibuat menjadi sediaan serum dengan evaluasi mutu yang baik.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Terdapat 3 klasifikasi variabel yang terdapat dalam penelitian ini antara lain variabel bebas, terikat dan variabel tergantung.

2.1 Variabel Bebas. Variabel bebas merupakan variabel yang dapat diubah atau dikendalikan dalam penelitian. Pada penelitian ini variabel bebas yang digunakan adalah variasi konsentrasi basis Na CMC yakni 1%, 2% dan 3%

2.2 Variabel Terikat. Variabel terikat merupakan komponen penelitian yang dipengaruhi oleh variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian meliputi hasil dari pengamatan organoleptis, homogenitas, pengujian pH, viskositas, waktu kering dan aktivitas serum *SRFF* (*Saccharomyces cerevisiae*) konsentrasi 10%

2.3 Variabel Terkendali. Variabel terkendali merupakan variabel yang dapat dimanipulasi oleh peneliti untuk diketahui pengaruhnya terhadap variabel lain. Variabel terkendali dalam penelitian

ini adalah suasana dalam laboratorium, kondisi peneliti dan metode pembuatan serum.

3. Definisi Operasional

Pertama, nasi yang diperoleh merupakan beras dengan jenis IR 64 Setra Ramos yang sudah bersih dan dimasak menjadi nasi, 10 gram nasi yang kemudian difermentasi dengan ragi instan (*saccharomyces cerevisiae*).

Kedua, SRFF yang telah di sonikasi dilakukan pengujian meliputi organoleptis, pH, suhu, dan uji kualitatif fenol.

Ketiga, formulasi serum *anti-aging* dilakukan dengan variasi basis Na CMC yakni dengan konsentrasi 1%, 2% dan 3%.

Keempat, serum SRFF dilakukan identifikasi meliputi uji organoleptis, homogenitas, pengujian pH, viskositas, waktu kering dan uji stabilitas sediaan.

Kelima, pengujian keamanan pada serum dilakukan dengan uji eritema, iritasi dan pengujian okuler yang dilakukan pada hewan uji

Keenam, pengujian *anti-aging* dilakukan dengan alat *skin analyzer* menggunakan parameter kolagen, kelembaban, dan elastisitas yang diamati pada kelinci yang diinduksi oleh sinar UV-A

C. Alat dan Bahan

1. Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah beras putih dengan jenis IR 64 (setra ramos) (*Oryza sativa L.*), ragi instan *fermipan*, Na CMC, *propylene glycol*, metil paraben, *aquadest*, media PDA, glukosa, sukrosa, laktosa, ekstrak daging, pepton, phenol red 1%, pewarna LCB kontrol positif yakni produk I'm from.

2. Alat

Alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah penanak nasi, *beaker glass*, *erlenmayer*, viskometer *brookfield*, *Thermometer digital*, *skin analyzer*, pH meter, gelas objek, gelas ukur, botol serum, pipet, batang pengaduk. Kassa steril, cawan petri, pipet tetes, pH meter, kaca arloji, alat sonikasi dan sentrifugasi, botol kaca, tabung sentrifuse, mortir, stamper, dan *Exoterra® Daylight Basking Spot*.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang akan digunakan dalam penelitian adalah kelinci jantan (galur *New Zealand*) yang berumur 2-3 bulan, dengan berat sekitar

2kg, memiliki kulit yang sehat tidak pernah mengalami iritasi terutama udema pada punggung kulit kelinci

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Tanaman

Metode identifikasi tanaman dilakukan dengan cara pemeriksaan ciri-ciri fisik dari bagian biji beras putih jenis IR 64 (setra ramos) (*Oryza sativa L*).

2. Pengambilan Sampel

Pada penelitian ini, beras yang digunakan berjenis beras putih IR 64 (setra ramos) yang diperoleh dari Pasar Tradisional Gede, Surakarta, Jawa tengah. Setelah itu, beras harus dibersihkan dari kotoran-kotoran.

3. Identifikasi Sampel Ragi

PDA ditimbang sebanyak 3,9g kemudian ditambahkan *aquadest* sebanyak 100ml dan direbus sampai mendidih. Cairan PDA dimasukkan pada tiap tabung reaksi sebanyak 10ml. Media didiamkan sampai padat kemudian di autoklaf selama 24 jam. Tabung reaksi yang berisi media padat dicairkan di atas air mendidih hingga mencair. Tabung dimiringkan sampai memadat. Ditaburkan sampel ragi ke dalam media sebanyak $\pm 0,1$ gram yang dilakukan secara aseptis kemudian diinkubasi pada inkubator sampai jamur tumbuh.

3.1 Pemeriksaan makroskopik. Mencairkan media PDA di atas air mendidih sampai mencair. Media dimasukkan ke dalam cawan petri secara aseptis. Didiamkan media sampai padat. Diambil 1 ose jamur pada media miring kemudian digores pada media cawan petri. Bungkus cawan petri dengan kertas kemudian diinkubasi selama 2-7 hari.

3.2 Pemeriksaan mikroskopik. Jamur yang sudah tumbuh pada media diambil sebanyak 1 ose kemudian mengoleskan pada *obyek glass*. Ditambahkan NaCl 1 tetes pada *obyek glass* kemudian setelah kering ditetesi dengan pewarna LCB sebanyak 3 tetes dan diamkan selama ± 1 menit dialirkan dengan air. Pengamatan pada mikroskop dilakukan dengan perbesaran 100.

3.3 Pemeriksaan biokimia dengan gula-gula. Pada masing-masing bahan ditimbang sebanyak 0,3 g ekstrak daging, 0,5 g pepton, 0,1ml phenol red 1%, 100ml *aquadest*, 0,5 g glukosa, sukrosa dan laktosa. Pada campuran ekstrak daging, pepton dan phenol red masing-masing ditambahkan media gula-gula. Untuk media yang sudah homogen di autoklaf selama 24 jam. Mengambil biakan jamur sebanyak

1 ose dan memasukkan ke dalam masing-masing media gula. Diinkubasi selama 24-48 jam dan diamati perubahan yang terjadi.

4. Pembuatan Nasi

Sebanyak 100 g beras ditambahkan dengan air 100 ml lalu direndam selama 5 menit kemudian ditiriskan. Menambahkan aquadest pada beras sebanyak 100 ml dan dimasak dengan *rice cooker* selama 30 menit (Putra, 2019)

5. Pembuatan Fermentasi Nasi

Sampel yang dibuat merupakan nasi dengan konsentrasi 10% dan fermentasi selama 72 jam . Nasi sebanyak 10 gram kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmayer ditambahkan *aquadeast* ad 100 ml. Suhu sampel diukur menggunakan *thermometer digital*, kemudian menambahkan ragi instan sebanyak 1 g. Campuran tersebut diaduk dengan pengaduk kaca. Kemudian Erlenmeyer ditutup dengan *plastic wrap* dan karet gelang. Sampel disimpan ke dalam lemari penyimpanan dengan suhu 20-30° C.

6. Penetapan Organoleptis Fermentasi Nasi

Penetapan secara organoleptis dilakukan pengamatan pada sampel antara lain bentuk, warna, dan bau

7. Penetapan pH Fermentasi Nasi

Pengukuran pH dilakukan setelah sampel di fermentasi selama 72 jam. Alat yang digunakan merupakan pH meter yang telah di kalibrasi dengan cairan pH 7.0. Sampel dituangkan ke dalam *beaker glass*. Elektroda dicelupkan pada sampel, kemudian ditunggu sampai indikator layar pada pH meter menunjukkan angka pH yang stabil. Elektroda dibersihkan dengan *aquadeast* setelah sampel selesai dilakukan pengukuran.

8. Penetapan Suhu Fermentasi

Penetapan suhu dilakukan menggunakan *thermometer digital* diukur suhu sebelum dan sesudah nasi difermentasi. *Thermometer* dicelupkan pada cairan sampel, namun tidak sampai menyentuh kaca dan nasi. Lalu diukur suhu sampai angka pada *thermometer* stabil (Putra, 2019)

9. Sonifikasi

Dilakukan sonifikasi dengan peralatan ultrasonik yakni fermentasi di tambahkan ke dalam fermentor, kemudian parameter spesifik antara lain pengadukan, suhu, ventilasi dan diatur ke dalam tangki dan perangkat dimulai oleh panel kontrol (He *et al.*, 2021). Setelah dilakukan

sonikasi, tahap selanjutnya yakni sentrifugasi. Strain dengan perlakuan sonikasi di sentrifugasi dengan suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh supernatan (He *et al.*, 2021).

10. Uji Warna Fenol

Uji senyawa fenol sederhana dengan menggunakan FeCl 1% sebanyak 1 ml yang dicampurkan dengan 5 ml larutan SRFF. Hasil dikatakan positif fenol jika larutan berwarna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat.

11. Rancangan Formulasi Sediaan Serum

Tabel 1. Formulasi serum *Saccharomyces Rice Ferment Filtrat*

Bahan	Fungsi	Konsentrasi (ml)			
		Kontrol (-)	F1	F2	F3
<i>SRFF (Saccharomyces Cerevisiae Rice Ferment Filtrat)</i>	Zat aktif	73	73	73	73
Na-CMC	Gelling agent	-	1	2	3
<i>Propylene glycol</i>	Humektan	-	15	15	15
TEA	Pembasa	-	0,2	0,2	0,2
Metil paraben	Pengawet	-	0,2	0,2	0,2
Oleum rossae	pewangi	-	1	1	1
<i>Aquadest</i>	Pelarut	-	Ad 100	Ad 100	Ad 100

Keterangan :

K- : SRFF 73 ml

F1 : Formula basis Na-CMC 1% + SRFF

F2 : Formula basis Na-CMC 2% + SRFF

F3 : Formula basis Na-CMC 3% + SRFF

Na CMC dengan variasi konsentrasi (1%, 2% dan 3%) di kembangkan dahulu dengan air panas sebanyak hingga menjadi basis gel. Kemudian ditambahkan dengan *propylene glycol* aduk hingga larut dan tambahkan sedikit demi sedikit *aquadest*. Dilarutkan metil paraben dalam 2 ml *aquadest* aduk sampai homogen dan tambahkan pada campuran basis. Ditambahkan SRFF sebanyak 73 ml ke dalam basis yang telah dibentuk. Serum ditambahkan dengan sisa *aquadest* 100 ml, diaduk hingga homogen. Kemudian serum dikemas ke dalam botol serum. Dilakukan evaluasi fisik pada serum meliputi uji : organoleptik, homogenitas, pH, viskositas, daya sebar, dan uji iritasi yang dilakukan pada hewan uji.

11.1 Uji Organoleptik. Uji organoleptik yang dimaksudkan adalah untuk mengamati warna, bau dan konsistensi dari serum.

11.2 Homogenitas. Uji homogenitas, digunakan dua buah *object glass*, lalu sampel diteteskan pada kaca objek secara merata. Umumnya sediaan serum yang baik tidak menunjukkan zat yang menggumpal dan tercampur rata.

11.3 Uji pH. Uji derajat keasaman, diukur dengan pH meter pengukuran diawali dengan kalibrasi pada alat pH menggunakan dapor pH 4 dan 7. Kemudian alat dicelupkan pada sampel, tunggu hingga indikator nilai pH stabil. Sensor alat dibersihkan setelah selesai diukur. Syarat pH kulit yakni 4,5-6,5 (Khaira *et al.*, 2022).

11.4 Uji Viskositas. Pengujian viskositas pada serum wajah mengacu pada penelitian (Irawati 2018), sebelum dilakukannya uji viskositas maka harus mencari terlebih dahulu densitasnya untuk menghitung koefisien viskositas. Analisa densitas digunakan alat piknometer dengan prinsip penentuan massa jenis pada piknometer. Piknometer kosong ditimbang lalu dicatat kemudian piknometer yang sudah diisi sampel ditimbang kembali dan setelah penimbangan dilakukan perhitungan dari selisih penimbangan piknometer yang sudah diisi dan piknometer kosong. Selanjutnya, dilakukan pengujian viskositas dengan memasukkan sampel ke dalam viskometer otswald melalui tabung A hingga gelembung pada tabung A penuh, cairan sampel dihisap dengan *bulb* ke tabung b hingga permukaan cairan melewati batas atas cairan sampel dibiarkan mengalir melalui batas, kemudian dihitung waktu yang dibutuhkan untuk cairan sampel mengalir mulai dari batas atas hingga melewati batas bawah menggunakan *stopwatch*.

Viskositas :

$$n = n_0 \frac{t \times p}{t_0 \times p_0}$$

Keterangan :

n = koefisien viskositas cairan sampel

n_0 = koefisien viskositas *aquadest*

p = Massa jenis cairan sampel (g/ml)

p_0 = Massa jenis *aquadest* (g/ml)

t = waktu alir cairan uji cairan sampel

t_0 = waktu alir *aquadest*

11.5 Uji Stabilitas. Pengujian dilakukan dengan metode *Freeze Thaw Cycling* dengan cara penyimpanan sediaan pada suhu rendah 4⁰ C selama 24 jam yang kemudian sediaan langsung dipindah pada suhu 40⁰ C dan juga didiamkan selama 24 jam yang dianggap sebagai 1 siklus (Hadi *et al.*, 2023). Metode *Freeze Thaw Cycling* ini dilakukan sebanyak 6 siklus.

12. Pengujian Aktivitas Serum *Anti-Aging* Pada Hewan Uji

12.1 Penyiapan Hewan Uji. Pengujian dilakukan pada kelinci yang telah diaklimatisasi lebih dulu selama 5 hari dalam kandang individual. Sebelum dilakukan pengujian kurang dari 24 jam, punggung kelinci di cukur pada daerah punggung dengan luas $\pm 10 \times 15$ cm atau <10% dari permukaan tubuh untuk tempat terpaparnya sediaan uji, pada bulu kelinci dicukur mulai dari area tulang belikat (bahu) hingga tulang paha bawah (tulang pinggang) dan setengah ke bawah badan untuk tiap sisi (Purwanti *et al.*, 2022)

12.2 Pembagian Kelompok Hewan Uji. Hewan yang digunakan dalam penelitian ini adalah hewan dengan kondisi kulit yang sehat. Sebanyak 5 ekor hewan uji yang telah di adaptasi dilakukan pembagian sebanyak 5 perlakuan untuk 1 kelinci. Setiap kelompok kelinci akan dipaparkan sinar UV-A.

Kelompok I : Dioleskan sampel *Saccharomyces Cerevisiae Rice Ferment Filtrat* sebagai kontrol negatif

Kelompok II : Sebagai kontrol positif (dioleskan I'm from serum)

Kelompok III : Dioleskan serum dengan konsentrasi Na CMC 1%

Kelompok IV : Dioleskan serum dengan konsentrasi Na CMC 2%

Kelompok V : Dioleskan serum dengan konsentrasi Na CMC 3%

12.3 Induksi dengan sinar UV-A. Hewan uji ditempatkan dalam kandang dengan ukuran yang cukup agar hewan uji yang dipakai tidak bergerak saat diinduksi sinar UV. Dilakukan pengukuran persen kolagen, kelembaban, dan elastisitas menggunakan *skin analyzer* pada hewan uji setelah pencukuran pada punggung. Kulit punggung kelinci diinduksi sinar UV-A dengan *Exoterra® Daylight Basking Spot* pada jarak 30 cm dengan dosis 63,69 J.cm⁻²/jam selama 6 jam (Putri *et al.*, 2023)

12.4 Pemberian Sampel Serum. Setelah hewan uji diinduksi sinar UV-A, mulai dilakukan pengolesan sampel serum pada punggung kelinci sesuai dengan perlakuan untuk tiap kelompok uji yakni sebanyak 1 kali sehari dalam waktu 30 hari dengan volume 0,5ml. Standar *anti-aging* yang diamati meliputi besar persen kolagen, kelembapan, dan juga elastisitas pada saat sebelum diinduksi sinar UV-A pada hari ke 0 (sebelum pemberian serum) dan pada minggu ke- 4 (setelah serum dioleskan) menggunakan alat *skin analyzer* (Putri *et al.*, 2023). Untuk cara penggunaan alat *skin analyzer*, perangkat lebih dulu dihubungkan pada komputer, pasang CD *driver skin analyzer*. Dilakukan analisis pada

kulit dan difoto, data dimasukkan ke dalam komputer yang nantinya akan dianalisis mikroskop elektronik. Kemudian penampakan kulit hewan uji dan hasil analisis akan ditampilkan pada layar monitor.

12.5 Pengamatan Aktivitas *anti-aging*. Parameter pengujian *anti-aging* antara lain besar persentase dari kolagen, kelembapan, dan juga elastisitas dengan menggunakan alat *skin analyzer*. Pengamatan dilakukan pada hari ke 0 dan pada minggu ke empat.

13. Uji Keamanan

Hewan uji yang dibutuhkan sebanyak 3 ekor, ditimbang sampel serum sebanyak 0,5 g kemudian sampel dioleskan dahulu pada kasa dan tempelkan pada kulit punggung. Menurut (Purwanti *et al.*, 2022) sampel serum dipaparkan pada kulit seluas ± 6 (2×3) cm² kemudian daerah pemaparan tersebut ditutup dengan kain kasa dan plester yang bersifat non-iritan dengan periode pemaparan pada jam ke 4, penilaian respons dilakukan pada jam ke-1, 24, 48 dan 72 pasca pembukaan tempelan. Jika kerusakan kulit tidak terjadi pada jam ke 72, dilanjutkan pengamatan selama 14 hari untuk menentukan reversibilitas.

Tabel 2. Skor iritasi kulit

Pembentukan eritema	Skor
Tidak terdapat eritema	0
Eritema kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	1
Eritema sangat jelas	2
Eritema sedang sampai parah	3
Eritema parah (darah daging) sampai pembentukan sechar yang menghambat penilaian eritema	4

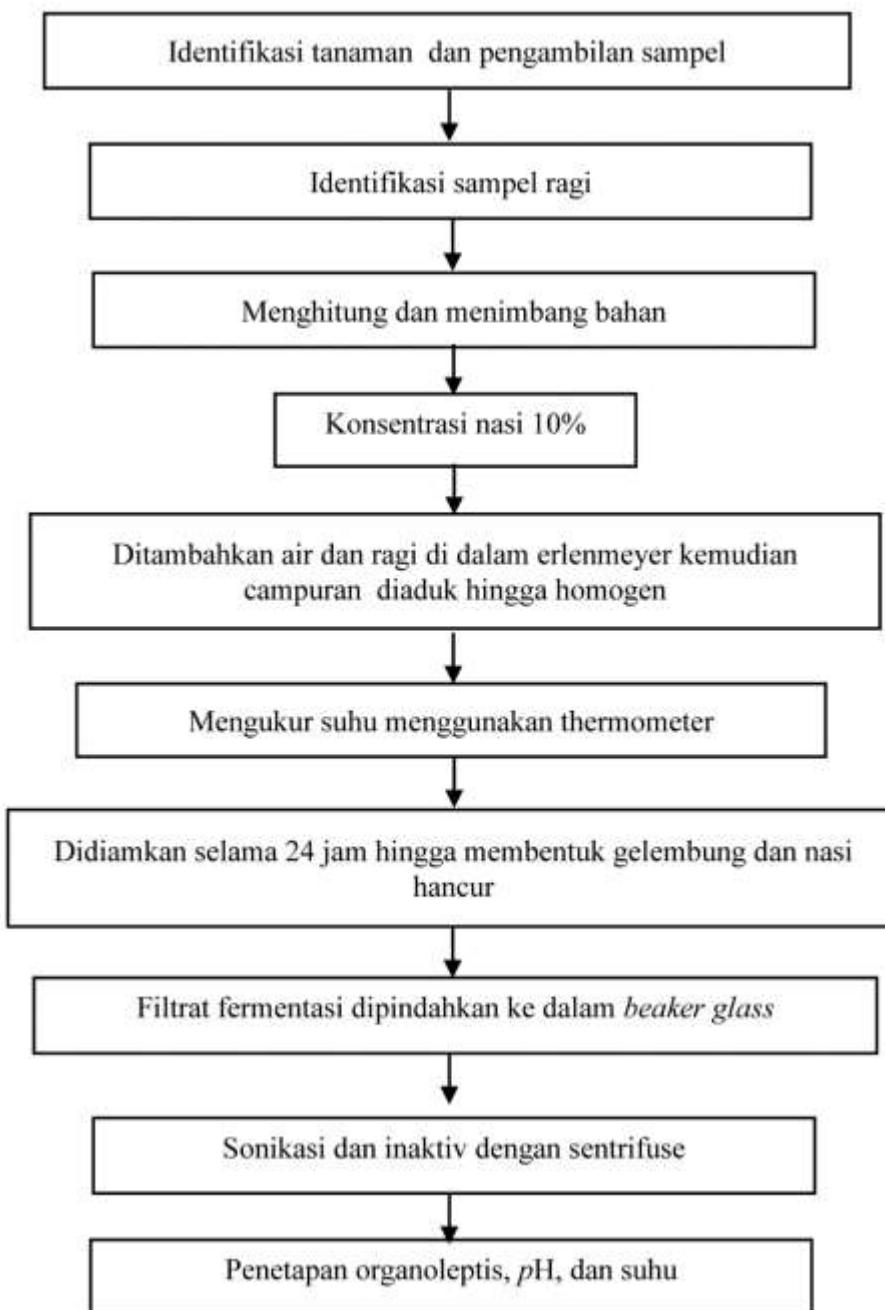
Pembentukan udema	Skor
Tidak terdapat udema	0
Udema sangat kecil (hampir tidak dapat dibedakan)	1
Udema kecil (batas area terlihat jelas)	2
Udema sedang (luasnya bertambah sekitar 1 mm)	3
Udema parah (luas bertambah lebih 1 mm dan melebar melebihi area pemaparan oleh sediaan uji)	4

Tabel 3. Indeks iritasi

Indeks iritasi	Kriteria iritasi
0	Tidak mengiritasi
< 2	Kurang merangsang
2-5	Iritasi moderat
> 5	Iritasi berat

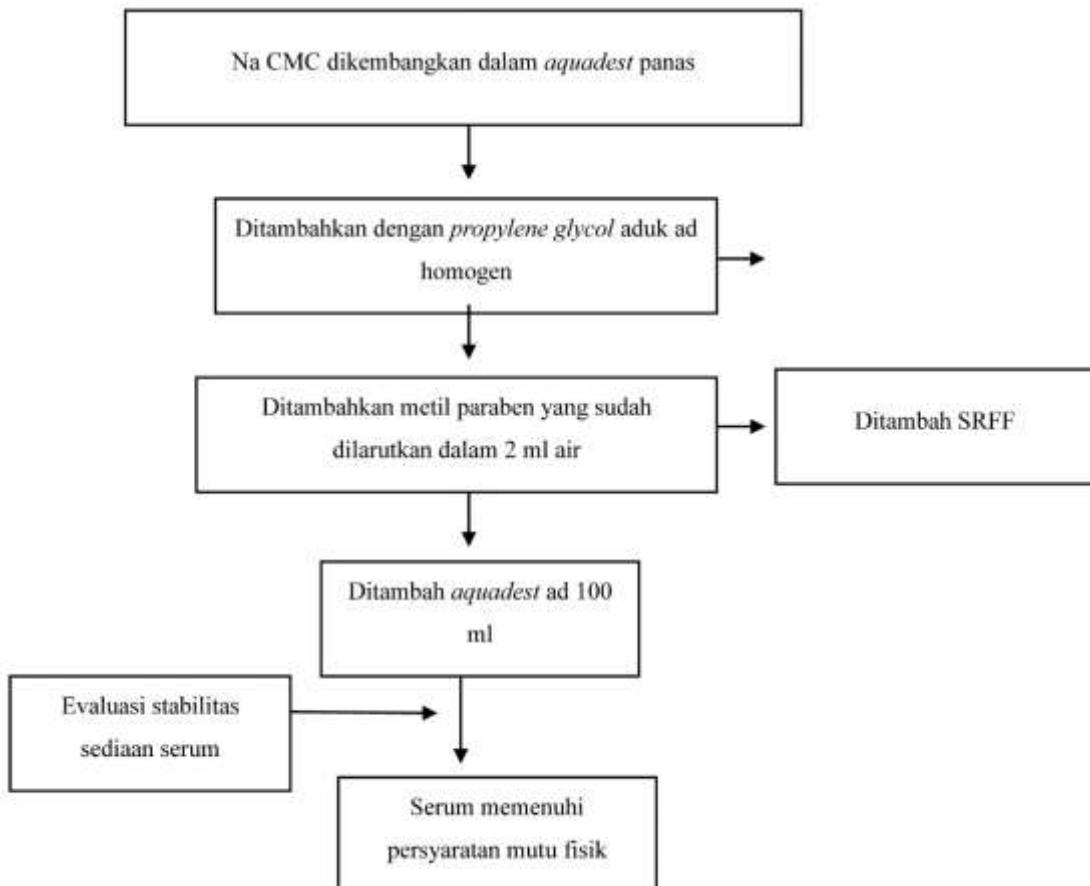
E. Skema Penelitian

1. Skema Jalannya Penelitian

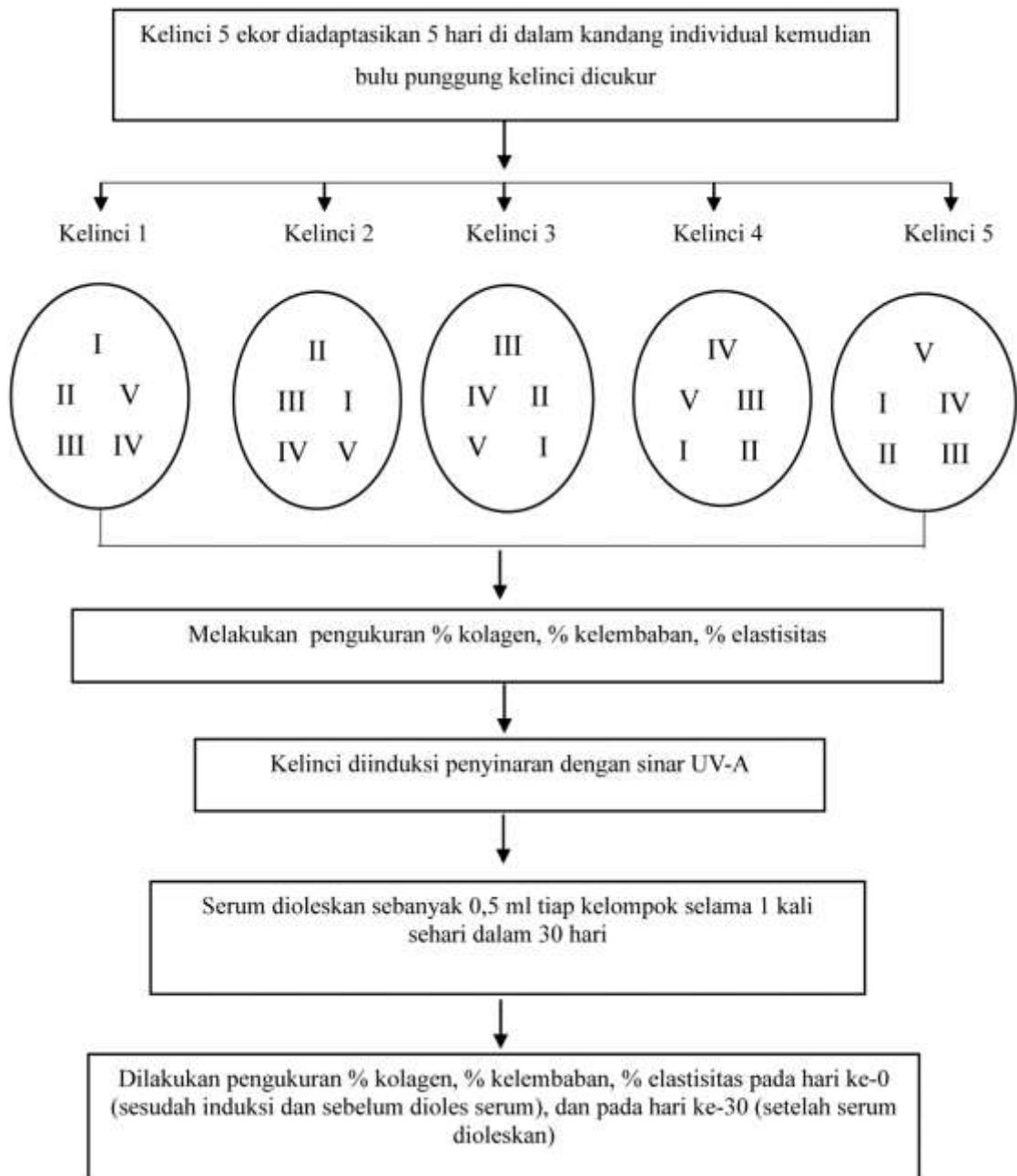


Gambar 5. Skema pembuatan SRRF dari nasi

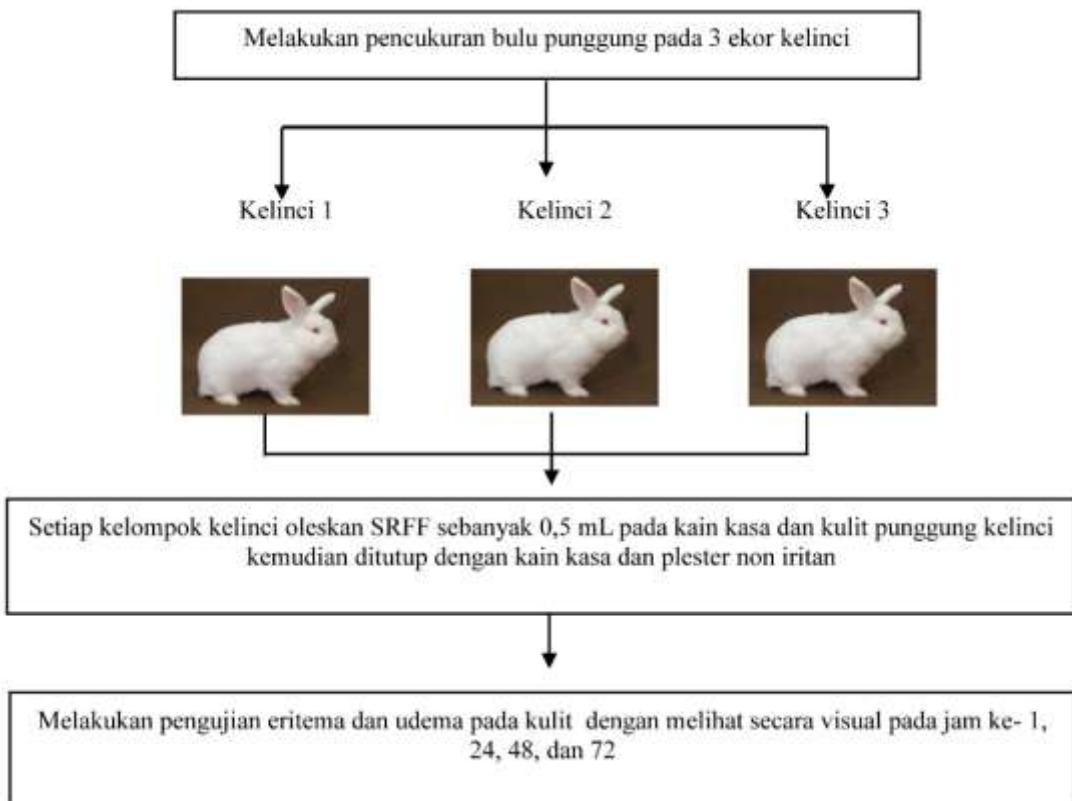
2. Skema Pembuatan Serum



Gambar 6. Skema Pembuatan Serum



Gambar 7. Skema pengujian SRFF



Gambar 8. Skema pengujian keamanan serum

F. Analisis Data

Berdasarkan data yang dihasilkan, langkah selanjutnya adalah melakukan analisis data dengan SPSS. Data hasil dari pengujian mutu fisik sediaan serum dengan tujuan memastikan sediaan memenuhi standar mutu fisik yang baik yakni dengan parameter organoleptis, homogenitas, pengujian pH, viskositas dan uji stabilitas sediaan. Analisis data dari serum dengan hasil uji aktivitas serum *anti-aging* pada hewan uji dengan menggunakan alat *Skin Analyzer* dari sebelum hingga setelah dioleskan sediaan serum *anti-aging* SRFF menggunakan parameter persen kolagen, kelembapan, dan elastisitas yang di analisa menggunakan *paired T-test* bertujuan untuk menganalisis sampel berpasangan dengan perlakuan berbeda, dan ANOVA kemudian dilanjutkan uji *tukkey* dengan tujuan untuk melihat perbedaan yang signifikan.