

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan pada penelitian ini adalah Nasi beras putih dalam *Saccharomyces rice ferment filtrate* (SRFF). Beras (*Oryza sativa L.*) jenis IR 64 (setra ramos) yang didapatkan dari Pasar Tradisional Gede, Surakarta, Jawa Tengah.

Sampel merupakan sebagian kecil dari populasi pada penelitian ini. Sampel yang akan digunakan pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi nasi adalah 5 %, 10 %, dan 20 % dalam SRFF.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi Variabel Utama

Variabel utama yang pertama pada penelitian ini adalah *Saccharomyces rice ferment filtrate* (SRFF) dengan variasi konsentrasi nasi yaitu 5 %, 10 %, dan 20 %.

Variabel utama kedua pada penelitian ini adalah uji aktivitas *anti-aging Saccharomyces rice ferment filtrate* (SRFF) dari nasi pada kulit punggung kelinci.

Variabel utama ketiga pada penelitian ini adalah uji keamanan *Saccharomyces rice ferment filtrate* (SRFF) dari nasi pada kulit punggung kelinci

2. Klasifikasi Variabel Utama

Dari identifikasi variabel utama tersebut dapat dikelompokkan menjadi tiga variabel, yaitu variabel bebas, variabel tergantung, dan variabel terkendali.

Variabel bebas adalah variabel yang sengaja diubah dan berpengaruh untuk variabel tergantung. Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi nasi dalam *Saccharomyces rice ferment filtrate* (SRFF)

Variabel tergantung pada penelitian ini adalah uji eritema dan udema, uji iritasi, serta persentase kolagen, elastisitas, dan kelembaban pada kulit punggung kelinci.

Variabel terkendali adalah variabel yang berpengaruh terhadap variabel lainnya pada setiap media percobaan. Variabel terkendali pada penelitian ini adalah variasi konsentrasi nasi yang efektif dalam *Saccharomyces rice ferment filtrate* (SRFF), pH, hewan uji kelinci

yang meliputi, galur kelinci, umur, jenis kelamin, genetik, pakan, aktivitas, kesehatan, dan berat badan kelinci.

3. Definisi Operasional Variabel Utama

Pertama, nasi adalah beras yang sudah bersih dan dimasak menjadi nasi kemudian difermentasi dengan penambahan ragi instan (*Saccharomyces cerevisiae*).

Kedua, *Saccharomyces rice ferment filtrate (SRFF)* adalah hasil fermentasi yang menggunakan nasi dengan menambahkan ragi instan dilakukan identifikasi dengan uji organoleptis, uji pH, uji suhu.

Ketiga, filtrat fermentasi nasi adalah produk fermentant yang mengandung nasi dengan ragi (*Saccharomyces cerevisiae*) dengan variasi konsentrasi nasi yang berbeda untuk mendapatkan nilai yang efektif untuk *anti-aging*.

Keempat, pengujian *anti-aging* adalah pengujian *Saccharomyces rice ferment filtrate (SRFF)* dari nasi dengan melihat parameter persentase kolagen, elastisitas, dan kelembaban kulit pada punggung kelinci menggunakan alat *skin analyzer*.

Kelima, pengujian keamanan adalah pengujian eritema dilihat dari warna kemerahan, udema dilihat dari adanya cairan atau air dalam sel yang berlebihan, dan iritasi dengan melihat adanya kemerahan pada kulit. Pengujian okuler dilihat dengan adanya iritasi, konjungtiva, kejernihan, dan kemosis.

C. Alat dan Bahan

1. Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah beras putih jenis IR 64 (setra ramos) (*Oryza sativa L.*) dan ragi instan *fermipan*, media PDA, aquades, glukosa, sukrosa, laktosa, ekstrak daging, pepton, phenol red 1%, SK II *essence* digunakan sebagai kontrol positif.

2. Alat

Alat-alat yang digunakan adalah erlenmeyer, ose, inkubator, cawan petri, kassa steril dan perban, lemari penyimpan, *Exoterra® Daylight Backing Spot*, kandang kelinci, alat cukur, thermometer, pH meter, pipet tetes.

3. Hewan Uji

Hewan uji yang digunakan pada penelitian ini adalah kelinci jantan (galur *New Zealand*) umur 2-3 bulan, berat sekitar 2 kg,

memiliki kulit yang sehat, tidak pernah mengalami iritasi dan udema pada punggung kulit kelinci.

D. Jalannya Penelitian

1. Identifikasi Tanaman

Metode identifikasi tanaman dilakukan dengan pemeriksaan ciri-ciri fisik dari bagian biji beras putih jenis IR 64 (setra ramos) (*Oryza sativa L.*). Determinasi beras putih jenis IR 64 (setra ramos) (*Oryza sativa L.*) dilakukan di Balai Besar dan Penelitian dan pengembangan Tanaman Obat dan Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

2. Pengambilan Sampel

Beras pada penelitian menggunakan jenis beras putih jenis IR 64 (setra ramos) yang diperoleh dari Pasar Tradisional Gede, Surakarta, Jawa Tengah. Setelah itu, beras dibersihkan dari kotoran-kotoran.

3. Identifikasi Sampel Ragi

Menimbang PDA sebanyak 3,9 g kemudian menambahkan aquades sebanyak 100 ml dan direbus ad mendidih. Memasukkan cairan PDA sebanyak 10 ml pada tiap tabung reaksi. Media didiamkan sampai padat kemudian di autoklaf selama 24 jam. Tabung reaksi yang berisi media padat dicairkan di atas air mendidih sampai mencair. Tabung tersebut dimiringkan sampai padat. Sampel ragi ditaburkan ke dalam media sebanyak $\pm 0,1$ gram dilakukan secara aseptis kemudian diinkubasi pada inkubator sampai jamur tumbuh.

3.1. Pemeriksaan makroskopik. Media PDA dicairkan di atas air mendidih sampai mencair. Media dimasukkan ke dalam cawan petri secara aseptis. Media didiamkan sampai padat. Mengambil 1 ose jamur pada media miring kemudian digores pada media cawan petri. Cawan petri tersebut dibungkus kertas kemudian diinkubasi selama 2-7 hari.

3.2. Pemeriksaan mikroskopik. Jamur yang telah tumbuh pada media diambil sebanyak 1 ose kemudian dioleskan pada *obyek glass*. Menambahkan NaCl sebanyak 1 tetes pada *obyek glass*. Setelah kering jamur pada *obyek glass* ditetesi dengan pewarna LCB sebanyak 3 tetes kemudian didiamkan selama ± 1 menit dan dialirkan dengan air. Pengamatan dilakukan menggunakan mikroskop pada perbesaran 100x.

3.3. Pemeriksaan biokimia dengan gula-gula. Masing-masing bahan ditimbang sebanyak 0,3 g ekstrak daging, 0,5 g pepton, 0,1 ml phenol red 1%, 100 ml aquades, 0,5 g glukosa, sukrosa dan laktosa. Campuran ekstrak daging, pepton, dan phenol red masing-masing

ditambahkan media gula-gula. Media yang sudah homogen di autoklaf selama 24 jam. Pengambilan biakan jamur sebanyak 1 ose dan dimasukkan ke dalam masing-masing media gula. Inkubasi selama 24-48 jam dan diamati perubahan yang terjadi.

4. Pembuatan Nasi

Beras sebanyak 100 g ditambahkan air 100 ml direndam selama 5 menit kemudian ditiriskan. Beras ditambahkan aquades sebanyak 100 ml kemudian dimasak dengan *rice cooker* selama 30 menit (Putra, 2019).

5. Pembuatan Fermentasi Nasi

Sampel dibagi menjadi tiga sesuai dengan konsentrasi nasi 5 %, 10 %, dan 20%. Nasi dimasukkan ke dalam erlenmeyer dengan aquades ad 100 ml. Mengukur suhu sampel menggunakan thermometer digital. Sampel ditambahkan 1 g ragi instan. Campuran tersebut diaduk hingga homogen menggunakan batang pengaduk. Erlenmeyer ditutup dengan kertas dan kapas kemudian diberi penanda sesuai dengan konsentrasi masing-masing. Sampel disimpan dalam lemari penyimpan dengan suhu 20-30° C. Kemudian suhu diukur dan sampel disaring menggunakan kertas saring dalam *beaker glass* (Putra, 2019). Pada sampel kontrol negatif menggunakan nasi yang difermentasi tanpa ragi. Nasi sebanyak 10 g ad 100 ml aquadest kemudian ditutup dan disimpan dalam 24 jam.

6. Penetapan Organoleptis Fermentasi Nasi

Penetapan organoleptis fermentasi dilakukan dengan mengamati bentuk, warna, dan bau dari filtrat fermentasi nasi.

7. Penetapan pH Fermentasi Nasi

Menggunakan alat pH meter yang sudah dikalibrasi. Setiap masing-masing sampel diambil dan dituangkan ke dalam *beaker glass*. Elektroda dicelupkan pada masing-masing sampel. Setiap pergantian pengukuran, elektroda dicuci dengan air dan dibersihkan dengan tisu. Kemudian, ditunggu sampai pH meter menunjukkan angka pH stabil (Ameliana *et al.*, 2022).

8. Penetapan Suhu Fermentasi

Pengukuran suhu pada fermentasi menggunakan thermometer dilakukan sebelum beras ditutup dalam erlenmeyer dan sesudah difermentasi. Termometer dicelupkan pada cairan, tetapi tidak menyentuh pada kaca dan nasi. Mengukur suhu sampai angka thermometer stabil (Putra, 2019).

9. Rancangan Variasi Fermentasi

Tabel 1. Rancangan variasi konsentrasi SRFF dari nasi

Variasi filtrat fermentasi	Formula (%)		
Nasi	5	10	20
Ragi	1 g	1 g	1g
Suhu	30°C	30°C	30°C
Waktu	24 jam	24 jam	24 jam

10. Uji Keamanan

Sebanyak 3 ekor kelinci pada punggung dioleskan *ferment filtrate* 0,5 ml, sebelum dioleskan pada punggung terlebih dahulu dioleskan ke kain kasa kemudian pada kulit SRFF dipaparkan pada kulit seluas ± 6 (2×3) cm² kemudian ditutup dengan kasa dan plester yang bersifat non-iritan. Setelah pemaparan sediaan dilakukan pengamatan uji eritema dan udema pada jam 1, 24, 48, dan 72. Setelah itu, dilanjutkan sampai hari ke 14 untuk dilihat reversibilitas (BPOM, 2014).

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

Pengamatan uji okuler dilakukan dengan bagian bawah mata kanan dioleskan SRFF sebanyak 0,1 ml sedangkan pada mata kiri tidak diberi SRFF sebagai kontrol. Pengamatan uji okuler meliputi skor kornea, iris, konjungtiva, dan kemosis dilakukan selama 24, 48, dan 72 jam (BPOM, 2022; Hayes, 2001).

Tabel 4 Skor iritasi okuler

Kornea	Skor
Jernih	0
Redup dan iris terlihat jelas	1
Bagian jernih mudah dibedakan dan bagian iris sedikit tidak jelas/kabur	2
Bagian <i>nacrous</i> , iris tidak terlihat, dan ukuran pupil tidak dapat dibedakan	3
Kornea gelap dan iris yang tidak terlihat	4

Konjungtiva	Skor
Normal (tidak ada kemerahan)	0
Pembesaran pembuluh darah	1
Pembuluh darah berwarna merah tua dan tunggal sulit dibedakan	2
Warna merah darah menyebar dan merata	3

Iritasi	Skor
Normal	0
Iris melipat jelas dan dalam, penyumbatan, pembengkakan, reaksi lambat dan buram terhadap cahaya	1
Tidak ada reaksi pada cahaya, perdarahan, kerusakan salah satu atau kombinasi dari semua tanda tersebut	2

Kemosis/udem	Skor
Tidak terdapat pembengkakan	0
Sedikit pembengkakan termasuk membran niktitan	1
Pembengkakan jelas, sebagian terdapat di bagian dalam kelopak	2
Setengah kelopak mata tertutup dengan peembengkakan	3
Lebih dari setengah kelopak mata tertutup dengan pembengkakan	4

11. Pengujian Aktivitas *Anti-Aging* Pada Hewan Uji

11.1. Penyiapan Hewan Uji. Kelinci sebelum dilakukan pengujian, diaklimatisasi terlebih dahulu selama 5 hari dalam kandang individual yaitu 1 kandang untuk 1 ekor di ruang laboratorium Universitas Setia Budi. Sebelum pengujian, kurang dari 24 jam bulu kelinci harus dicukur pada daerah punggung seluas $\pm 10 \times 15$ cm. Bulu kelinci dicukur mulai dari tulang belikat (bahu) sampai tulang pangkal paha (tulang pinggang) dan setengah ke bawah badan tiap sisi (BPOM, 2014).

11.2. Pembagian Kelompok Hewan Uji. Sebanyak 5 ekor kelinci yang sudah diadaptasi selama 5 hari diberikan pembagian 5 perlakuan untuk 1 kelinci. Setiap kelompok kelinci dipaparkan sinar UV-A.

Kelompok I : dioleskan fermentant nasi tanpa ragi (kontrol negatif)

Kelompok II : dioleskan SK II *Facial Treatment Essence* (kontrol positif)

Kelompok III : dioleskan SRFF dari nasi 5%

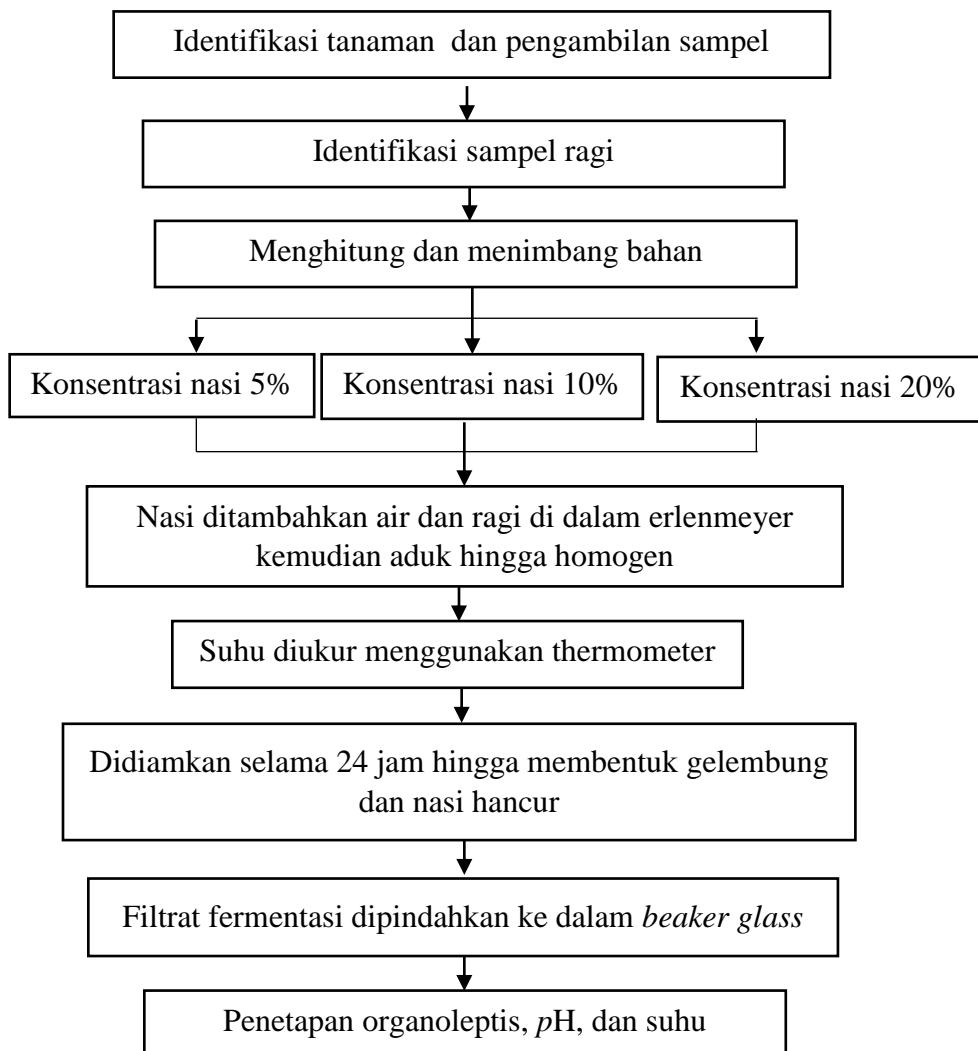
Kelompok IV : dioleskan SRFF dari nasi 10%

Kelompok V : dioleskan SRFF dari nasi 20%

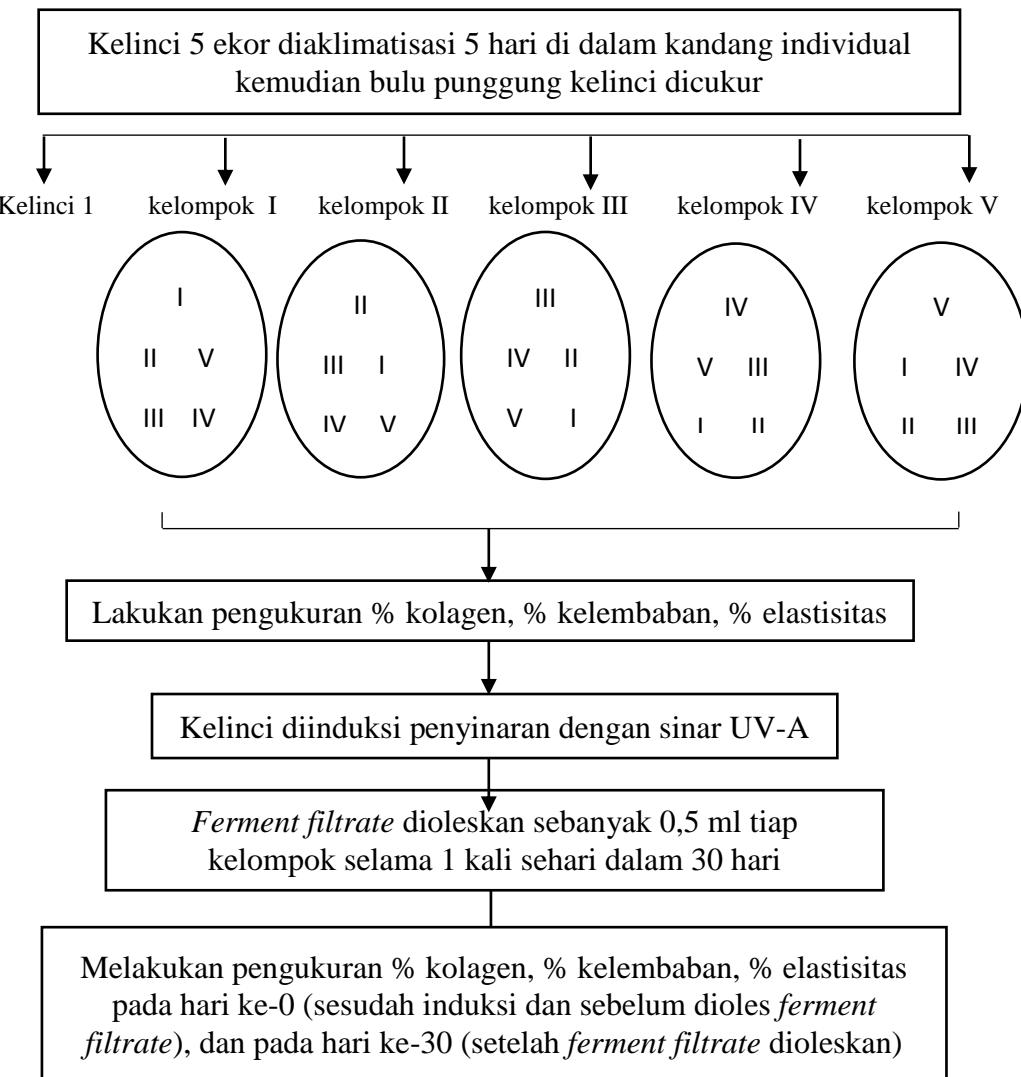
11.3. Induksi Kerutan Dengan Sinar UV-A. Kelinci ditempatkan di dalam kandang yang cukup agar tidak bergerak saat diinduksi sinar UV. Bulu punggung kelinci dicukur, kemudian melakukan pengukuran persen kolagen, kelembaban, dan elastisitas menggunakan alat *skin analyzer*. Induksi sinar UV-A pada punggung kelinci menggunakan *Exoterra® Daylight Basking Spot* pada jarak 30 cm dengan dosis $63,69 \text{ J.cm}^{-2}$ /jam selama 6 jam (Putri *et al.*, 2023).

11.4. Aplikasi Anti-Aging Filtrat Fermentasi. Setelah diinduksi *photoaging* kemudian mengoleskan *SRFF* sesuai perlakuan pada tiap kelompok sebanyak 1 kali sehari dalam 30 hari. *SRFF* dioleskan sebanyak 0,5 ml pada setiap perlakuan. Parameter *anti-aging* diamati yang meliputi persen kolagen, kelembaban, dan elastisitas pada saat sebelum diinduksi sinar UV A, pada hari ke-0 (sesudah induksi dan sebelum dioles *SRFF*), dan pada hari ke-30 (setelah *SRFF* dioleskan) menggunakan alat *skin analyzer* (Putri *et al.*, 2023). Penggunaan alat *skin analyzer* dilakukan dengan cara perangkat dihubungkan pada komputer, dimana CD *driver skin analyzer* yang sudah dipasang. Kulit dianalisis dan difoto menggunakan *handset* kamera, setelah itu foto dan data dimasukkan ke dalam komputer untuk dianalisis mikroskop elektronik. Penampakan kulit dan analisis hasil ditampilkan di monitor (Nurfitriyawatie *et al.*, 2023).

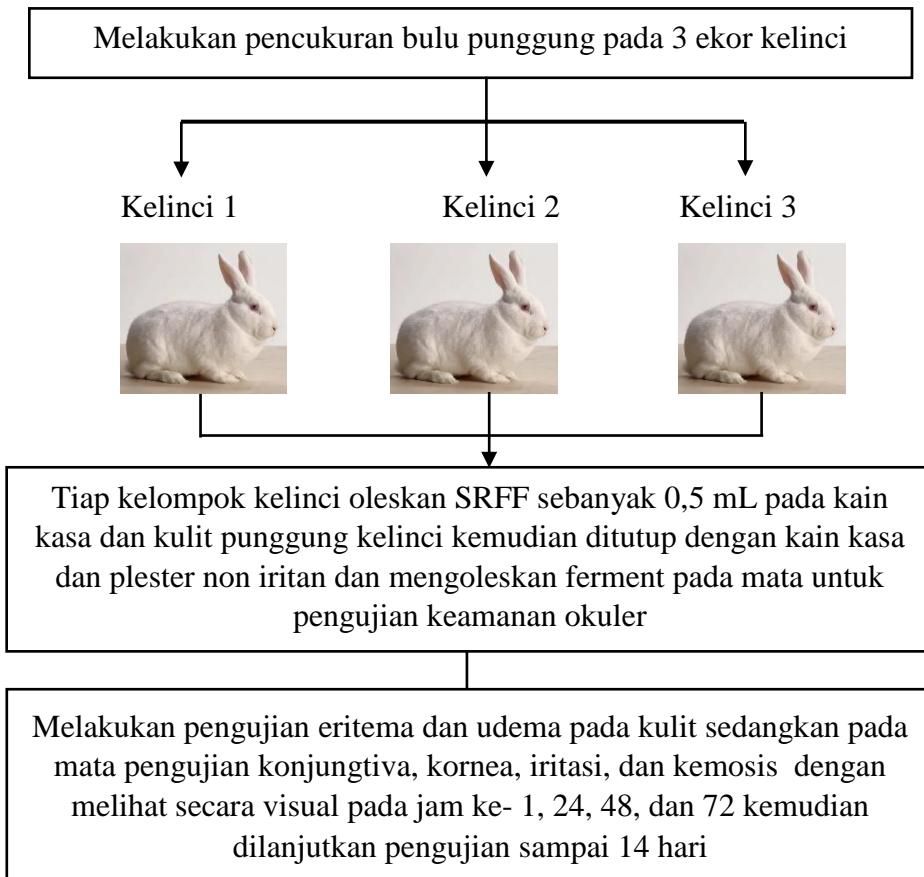
E. Skema Jalannya Penelitian



Gambar 5 Skema pembuatan SRFF dari nasi



Gambar 6 Skema pengujian SRFF



Gambar 7 Skema pengujian keamanan SRFF

F. Analisis Hasil

Berdasarkan data yang telah terkumpul, maka dilakukan analisis data dengan hasil uji aktivitas *ant- aging* pada hewan uji menggunakan alat *Skin Analyzer* sebelum dan sesudah dioleskan *SRFF* dengan parameter persen kolagen, persen kelembaban, dan persen elastisitas dianalisa menggunakan *paired T-test* dengan tujuan untuk menganalisis sampel berpasangan yang mengalami perlakuan berbeda dan ANOVA kemudian dilanjutkan uji *tukey* untuk melihat perbedaan signifikan.