

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **A. Populasi dan sampel**

Populasi mencakup semua objek yang menjadi subjek penelitian. Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah beras putih jenis IR 64 Setra Ramos yang didapatkan dari pasar tradisional gede, Surakarta, Jawa Tengah.

Sampel adalah sebagian kecil dari populasi yang digunakan untuk melakukan penelitian. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil filtrat etanol dari nasi beras putih yang difermentasi dengan ragi instan yang mengandung *saccharomyces cerevisiae* dengan variasi waktu konsentrasi adalah 24 jam, 48 jam, 72 jam.

#### **B. Variabel Penelitian**

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

Variabel utama pertama dalam penelitian ini adalah fermentasi nasi beras putih terhadap kelinci *New Zealand*.

Variabel utama kedua dalam penelitian ini adalah pengujian stabilitas hasil fermentasi ragi *saccharomyces cerevisiae* dengan nasi beras putih.

Variabel utama ketiga dalam penelitian ini adalah efektivitas anti aging fermentasi ragi *saccharomyces cerevisiae* dengan nasi beras putih yang dipapar sinar UV-A pada kulit kelinci *New Zealand* dilihat dari persentase kolagen, elastisitas, kelembaban, dan iritasi pada kulit kelinci.

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

Variabel utama yang terlebih dahulu telah diidentifikasi, selanjutnya dapat diklasifikasikan ke dalam berbagai macam variabel yakni variabel bebas, variabel terkontrol, dan variabel terikat.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variabel utama yang sengaja diubah-ubah untuk diteliti pengaruhnya terhadap variabel terikat dengan perubahan yang dilakukan. Variabel yang dimaksud adalah variasi waktu lamanya proses fermentasi.

Variabel terkontrol adalah variabel yang mempengaruhi variabel terikat sehingga perlu ditetapkan kualifikasinya agar hasil yang diperoleh tidak tersebar dan dapat diulang oleh peneliti lain secara cepat. Variabel terkontrol yang dimaksud adalah uji stabilitas hasil

fermentasi terhadap pH hasil fermentasi dan suhu untuk penyimpanan hasil fermentasi, jumlah air dan berat nasi yang digunakan untuk membuat fermentasi serta hewan uji yaitu kelinci *New Zealand* dengan kondisi fisik hewan uji yang meliputi : berat badan, usia, jenis kelamin, tempat pemaparan, temperatur, makan dan minum, penelitian dan laboratorium.

Variabel tergantung adalah titik pusat permasalahan yang merupakan pilihan dalam penelitian. Variabel tergantung yang dimaksud yakni adanya efektivitas *anti-aging* pada kulit kelinci *New Zealand* yang dilihat dari persentase kolagen, elastisitas, kelembaban, dan iritasi pada kulit kelinci.

### **3. Definisi operasional variabel utama**

Pertama, beras putih IR 64 Setra Ramos adalah bagian tanaman padi yang diperoleh dari pasar tradisional gede, Surakarta, Jawa Tengah dengan kondisi beras yang sudah dikemas.

Kedua, nasi beras putih adalah hasil beras yang dimasak dengan *rice cooker* selama kurang lebih 30 menit.

Ketiga, etanol adalah hasil filtrat fermentasi dari nasi beras putih yang difermentasi dengan ragi instan yang dibiarkan selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam sampai terbentuknya busa kemudian disaring.

Keempat, pengujian stabilitas adalah pengujian hasil filtrat fermentasi nasi beras putih yang akan diuji meliputi uji pH dan suhu.

Kelima, pengujian efektivitas *anti-aging* dan uji iritasi hasil filtrat fermentasi nasi beras putih terhadap kelinci *New Zealand*.

## **C. Alat dan Bahan**

### **1. Alat**

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah penanak nasi (*rice cooker*), timbangan analitik, cawan petri, erlenmeyer, beaker glass, gelas ukur, corong, pengaduk kaca, wadah sediaan, kapas, kassa steril dan perban, alat cukur, penggaris, pH meter, termometer digital, *Exoterra Daylight Backing Spot* dan alat *skin analyzer*.

### **2. Bahan**

**2.1 Bahan sampel.** Bahan sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah beras putih jenis IR 64 Setra Ramos, produk SK-II sebagai kontrol positif.

**2.2 Bahan kimia.** Bahan kimia yang digunakan dalam penelitian ini yaitu ragi instan komersial merk fermipan yang

mengandung *saccharomyces cerevisiae*, ekstrak daging, pepton, phenol red, glukosa, maltose, pati, aqua destilata.

### **3. Hewan uji**

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini yaitu kelinci jantan (galur *New Zealand*) berusia 5-8 bulan, berat 2-4 kg, dengan kondisi sehat.

## **D. Jalannya Penelitian**

### **1. Determinasi tanaman**

Determinasi tanaman merupakan merupakan metode identifikasi tanaman dengan melakukan pemeriksaan ciri-ciri mikroskopis maupun makroskopis dari beras putih jenis IR 64 Setra Ramos. Identifikasi beras putih jenis IR 64 Setra Ramos dilakukan di Balai Besar dan Penelitian dan Pengembangan Tanaman Obat dan Tradisional (B2P2TOOT) Tawangmangu, Karanganyar, Jawa Tengah.

### **2. Pengumpulan bahan**

Beras putih jenis IR 64 Setra Ramos dan ragi instan merk fermipan pada penelitian ini diperoleh dari pasar tradisional gede, Surakarta, Jawa Tengah. Beras putih yang digunakan dalam kondisi baik. Setelah itu beras dicuci untuk menghilangkan kotoran.

### **3. Pembuatan suspensi mikroorganisme**

Suspensi mikroorganisme disiapkan dengan menginokulasi 0,1 gram ragi instan merk fermipan ke kaldu *Potatos Dextrose Agar* (PDA) secara aseptik. Pembuatan media suspensi dapat dilakukan dengan menimbang PDA sebanyak 3,9 gram kemudian ditambahkan aquadest dan direbus sampai mendidih. Masukkan media pada 10 tabung reaksi sebanyak 10 mL pada masing-masing tabung reaksi. Diamkan sampai sedikit memadat kemudian autoklaf selama 24 jam, setelah di autoklaf ambil 2 tabung reaksi untuk dipanaskan di atas panci sampai mencair, miringkan tabung reaksi sampai sedikit memadat masukkan 0,1 gram fermipan kedalam media secara aseptis. Media diinkubasi selama 24 - 48 jam sampai jamur tumbuh yang ditandai dengan terbentuknya warna putih seperti sariawan.

### **4. Identifikasi *saccharomyces cerevisiae* dalam ragi instan fermipan**

#### **4.1. Identifikasi makroskopis dilakukan dengan PDA.**

Media PDA yang sudah dibuat diencerkan kemudian dituangkan ke cawan petri secara aseptis. PDA dalam tabung lain yang sudah ditumbuhi jamur digoreskan pada cawan petri sebanyak 1 ose

(dilakukan secara aseptis), lalu diinkubasi pada suhu 35°C di inkubator selama 48-72 jam. Setelah itu akan terlihat koloni secara terpisah. Koloni-koloni yeast ditandai dengan warna putih.

#### **4.2. Identifikasi mikroskopis dilakukan dengan LPCB.**

Dilakukan sterilisasi jarum ose dengan pemijaran api, kemudian secara aseptis diambil cairan fermentasi 1 ose, ditempatkan pada objek glass setelah itu diberikan 1 tetes NaCl. Selanjutnya dilakukan fiksasi diatas api bunsen sampai mengering, setelah kering ditetesi larutan LPCB 1 tetes, kemudian objek glass dicuci dengan air mengalir lalu dikering anginkan dengan udara. Setelah kering kemudian ditutup dengan deck glass lalu diamati dibawah mikroskop. Khamir *saccharomyces cerevisiae* akan terlihat bersel tunggal berbentuk telur/oval.

#### **4.3. Identifikasi biokimia dilakukan dengan gula-gula.**

Dilakukan uji menggunakan gula-gula seperti glukosa, laktosa, dan sukrosa. Prosedur pengerjaannya adalah menimbang media gula-gula yaitu ekstrak daging 0,3 g, pepton 0,5 g, phenol red 1% 2 gtt, aquadest 100 mL, dan Kh (gula) yaitu glukosa 0,5 g, laktosa 0,5 g, sukrosa 0,5 g. Dalam beaker glass media dibuat dan ditambahkan masing-masing Kh gula. Selanjutnya media dimasukkan dalam tabung reaksi ditambahkan 1 ose biakan jamur, inkubasi sampai terjadi perubahan warna. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna menjadi kuning karena bersifat asam, dan hasil negatif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna menjadi kemerahan karena bersifat basa.

### **5. Fermentasi nasi dengan ragi instan fermipan**

**Tabel 1. Formulasi fermentasi**

<b>Sampel</b>	<b>FI</b>	<b>FII</b>	<b>FIII</b>
Lama fermentasi (jam)	24	48	72
Nasi beras putih (g)	10	10	10
Ragi instan (g)	1	1	1
Aquades (mL)	100	100	100

(I kadek, 2019)

### **6. Persiapan nasi beras putih**

Beras putih jenis IR 64 Setra Ramos diperoleh dari pasar tradisional gede, Surakarta, Jawa Tengah. Beras sebanyak 100 gram direndam dalam 100 mL air selama 5 menit kemudian ditiriskan. Beras dimasukkan ke dalam *rice cooker* dan dimasak selama kurang lebih 30 menit (I Kadek, 2019).

### **7. Fermentasi nasi beras putih**

Nasi dengan bobot 10 gram ditambahkan ke dalam erlenmeyer yang telah diisi 100 mL aquades. Kemudian ditambahkan dengan 1

gram ragi instan merk fermipan. Campuran kemudian diaduk dengan pengaduk kaca. Sampel diukur suhunya dengan termometer. Pengukuran pH dan suhu dilakukan sebelum dan sesudah difermentasi dengan tujuan untuk mengetahui apakah fermentasi berjalan dengan baik sesuai dengan pH dan suhu yang telah dipersyaratkan dalam pertumbuhan ragi. Termometer dicelupkan pada cairan, tetapi tidak disentuh pada kaca dan nasi. Nilai suhu ditunggu sampai angka pada termometer stabil. Selanjutnya pengukuran pH dilakukan sebelum dan setelah sampel difermentasi menurut waktunya masing-masing. Pengujian pH dilakukan dengan cara alat pengukuran pH digital dikalibrasi dengan cairan pH 7.0 sampai stabil. Kemudian alat dicelupkan pada fermentasi nasi beras putih, kemudian dilihat perubahan skala yang tertera pada pH meter. Erlenmeyer kemudian ditutup dengan kapas dan kertas. Lalu sampel diberi penanda berupa label sesuai dengan waktu penyimpanan. Sampel kemudian disaring dan disimpan dalam lemari penyimpanan (I Kadek, 2019).

## **8. Uji kualitatif senyawa fenol dan etanol pada cairan hasil fermentasi**

**8.1. Uji kualitatif fenol dengan  $\text{FeCl}_3$ .** Cara mendeteksi adanya senyawa fenol secara sederhana dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  (Besi(III)klorida yang ditambahkan dalam air atau etanol dengan 5 mL larutan yang akan diuji. Hasil akan menimbulkan warna hijau, merah, ungu atau hijau kehitaman, dan biru kehitaman (Andayani, Djekti, dan Hakim, 2009).

## **9. Pembuatan kontrol uji aktivitas**

**9.1. Kontrol positif.** Kontrol positif yang digunakan dalam penelitian ini adalah produk kosmetik *essence* dari SK-II yang berkhasiat sebagai *anti-aging*.

**9.2. Kontrol negatif.** Kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah rendaman nasi dengan aquades. Nasi sebanyak 10 gram direndam dengan aquades 100 mL tanpa penambahan ragi instan fermipan dengan lama waktu fermentasi 24 jam. Selanjutnya hasil rendaman berupa cairan disaring untuk kemudian dioleskan pada kulit punggung kelinci.

## **10. Pengujian aktivitas *anti-aging* fermentasi ragi *saccharomyces cerevisiae* dengan nasi beras putih**

**10.1. Penyiapan hewan uji.** Sebanyak 6 ekor kelinci diadaptasi selama satu minggu dalam kandang. Satu kelinci diberikan satu kelompok perlakuan.

- Kelompok I : dioleskan hasil cairan fermentasi 24 jam (FI)
- Kelompok II : dioleskan hasil cairan fermentasi 48 jam (FII)
- Kelompok III : dioleskan hasil cairan fermentasi 76 jam (FIII)
- Kelompok IV : dioleskan essence pitera SK-II (kontrol positif)
- Kelompok V : dioleskan fermentasi nasi dan aquades (kontrol negatif)

**10.2. Induksi kerutan dengan penyinaran sinar UV-A.** Semua kelinci yang digunakan dalam penelitian dicukur bulunya menggunakan pencukur bulu secara berhati-hati pada bagian punggung. Punggung kelinci dibagi menjadi 6 bagian, masing-masing bagian berbentuk lingkaran dengan diameter 2 cm. Setelah itu diamati dengan parameter pengamatan persentase kolagen, kelembaban, dan elastisitas menggunakan alat *skin analyzer*. Kelinci I, II, III, IV, dan V diberi perlakuan yang sama dengan penyinaran UV-A (Budiawan, 2018). Kulit kelinci diinduksi dengan sinar UV-A menggunakan *Exoterra Daylight Basking Spot* pada jarak 30 cm dengan waktu 6 jam perhari selama 1 minggu sampai kulit punggung kelinci terlihat kering, kendur, dan kemerahan (Putri *et al.*, 2023).

**10.3. Perlakuan cairan hasil fermentasi nasi beras putih terhadap hewan uji.** Cairan hasil fermentasi dioleskan sebanyak 0,5 ml pada setiap perlakuan. Kelinci yang sebelumnya diinduksi kerutan diperiksa parameter kerutan menggunakan *skin analyzer* pada hari ke 0 sebelum pemberian nasi beras putih fermentasi. Dari hari ke-0 hingga minggu ke-3, kulit punggung kelinci diolesi cairan hasil fermentasi nasi beras putih 1 kali sehari (Duraivel *et al.*, 2014).

**10.4. Pengamatan aktivitas *anti-aging*.** Pengamatan dilakukan sebelum pemberian hasil fermentasi dan setelah pemberian hasil fermentasi pada minggu ketiga. Parameter yang diamati antara lain persentase kolagen, kelembaban, dan elastisitas kulit dengan menggunakan *skin analyzer*. Adapun cara penggunaan alat ini pada uji kelembaban adalah dibuka tutup pada alat dan akan terlihat probe logam. Tombol start ditekan, tempatkan probe pada kulit kelinci dan ditekan dengan lembut untuk memastikan alat bersentuhan dengan kulit

dengan baik. Setelah beberapa detik akan terdengar bunyi “bip” yang menunjukkan pengujian telah selesai dan skor kelembaban kulit dapat dibaca (Manggau, M. A., Damayanty, R., & Muslimin, L., 2017).

**Tabel 2. Parameter hasil pengukuran *anti-aging* menggunakan *Skin Analyzer***

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

(yupitawati, 2017)

**10.5. Pengujian keamanan pada kulit punggung kelinci.** Uji iritasi dilakukan secara *in vivo* pada 3 kelinci dengan metode *Draize test*. Kelinci yang digunakan adalah kelinci albino *New Zealand* berkelamin jantan dan sehat. Tiga ekor kelinci disiapkan dan pencukuran dilakukan sebelum 24 jam diberi perlakuan. Sediaan sebanyak 0,5 mL dioleskan pada punggung kelinci yang telah dicukur bulunya, tutup area uji dengan kasa steril atau perban, kemudian dibiarkan selama 24 jam. Setelah 24 jam, plester dan perban dibuka dan dibersihkan menggunakan air untuk menghilangkan sisa perlakuan, lalu amati. Pengamatan dilakukan kembali setelah 24 jam, 48 jam, dan 72 jam. Untuk setiap keadaan kulit diberi nilai sesuai dengan metode skroning dari *Draize* dengan memberi skor 0 sampai 4 sebagai berikut :

**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 seperti 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)

**10.6. Pengujian Keamanan Okuler.** Uji iritasi okuler, bahan uji dioleskan pada bagian bawah kelopak mata kanan kelinci sedangkan mata kiri kelinci tidak diberi sediaan sebagai kontrol. Pengamatan dilakukan pada waktu 24 jam, 48 jam, dan 72 jam setelah perlakuan. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap respon yang terjadi yaitu dengan menghitung skor kornea, iris dan konjungtiva (Hayes 2001).

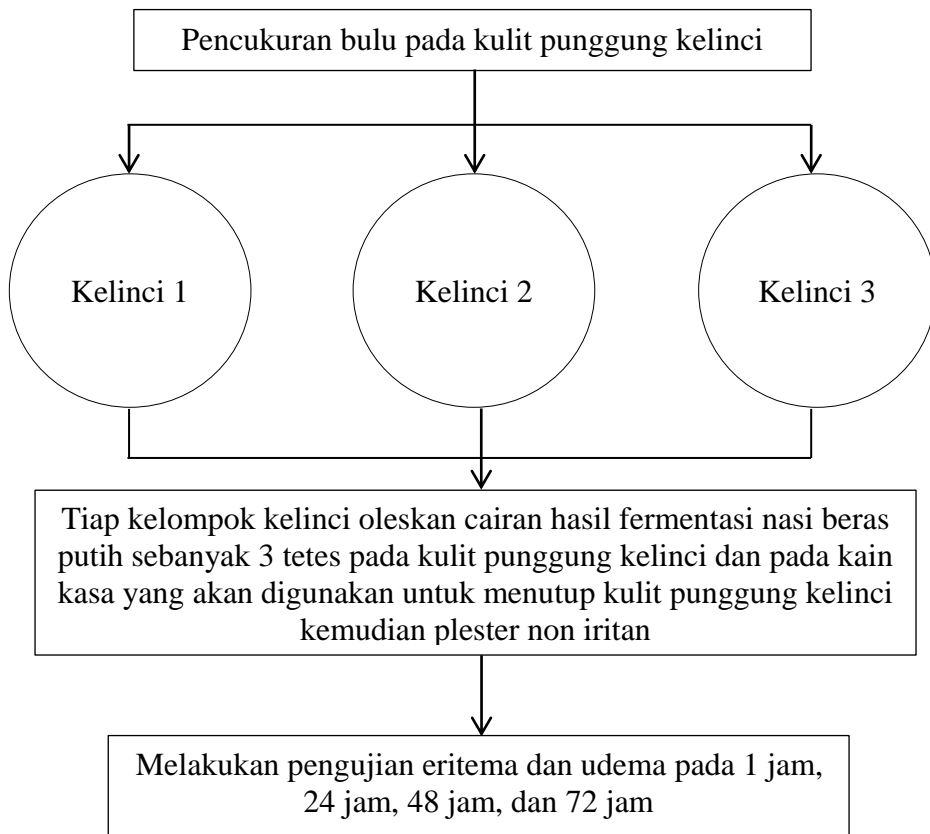
**Tabel 6. Penilaian luka ocular pada mata**

Obyek pengamatan	Skor
<b>Kornea</b> : Derajat Opasitas/kejernihan	
Jernih.....	0
Sedikit redup dibanding normal; bagian iris jelas terlihat.....	1
Bagian yang jernih dapat dibedakan dengan mudah; bagian iris sedikit tidak jelas/kabur.....	2
Bagian <i>nacreous</i> ; bagian iris tidak terlihat; ukuran pupil hampir tidak dapat dibedakan.....	3
Kornea gelap; iris tidak kelihatan.....	4
<b>Iris</b>	
Normal.....	0
Rugae terlihat jelas dan dalam, penyumbatan, pembengkakan circumcorneal hyperaemia, adanya tanda-tanda tersebut baik salah satu ataupun kombinasi; iris masih bereaksi terhadap cahaya (reaksi lambat dan buram).....	1
Tidak bereaksi terhadap cahaya, perdarahan, kerusakan yang nyata (salah satu atau kombinasi dari semua tanda tersebut).....	2
<b>Konjungtiva</b>	
Pembuluh darah normal (tidak ada kemerahan).....	0
Pembuluh darah mengalami pembesaran.....	1
Pembuluh darah merah tua, pembuluh darah tunggal sulit dibedakan.....	2
Warna merah darah tersebar merata.....	3
<b>Khemosis/Udem</b> (pada kelopak mata atau membrane nikitan)	
Tidak ada pembengkakan / normal.....	0
Sedikit pembengkakan diatas normal, termasuk membrane niktitan.....	1
Pembengkakan terlihat jelas, sebagian pembengkakan terdapat di bagian dalam kelopak.....	2
Pembengkakan dengan setengah kelopak tertutup.....	3
Pembengkakan dengan lebih dari setengah kelopak tertutup.....	4

(OECD, 2002)

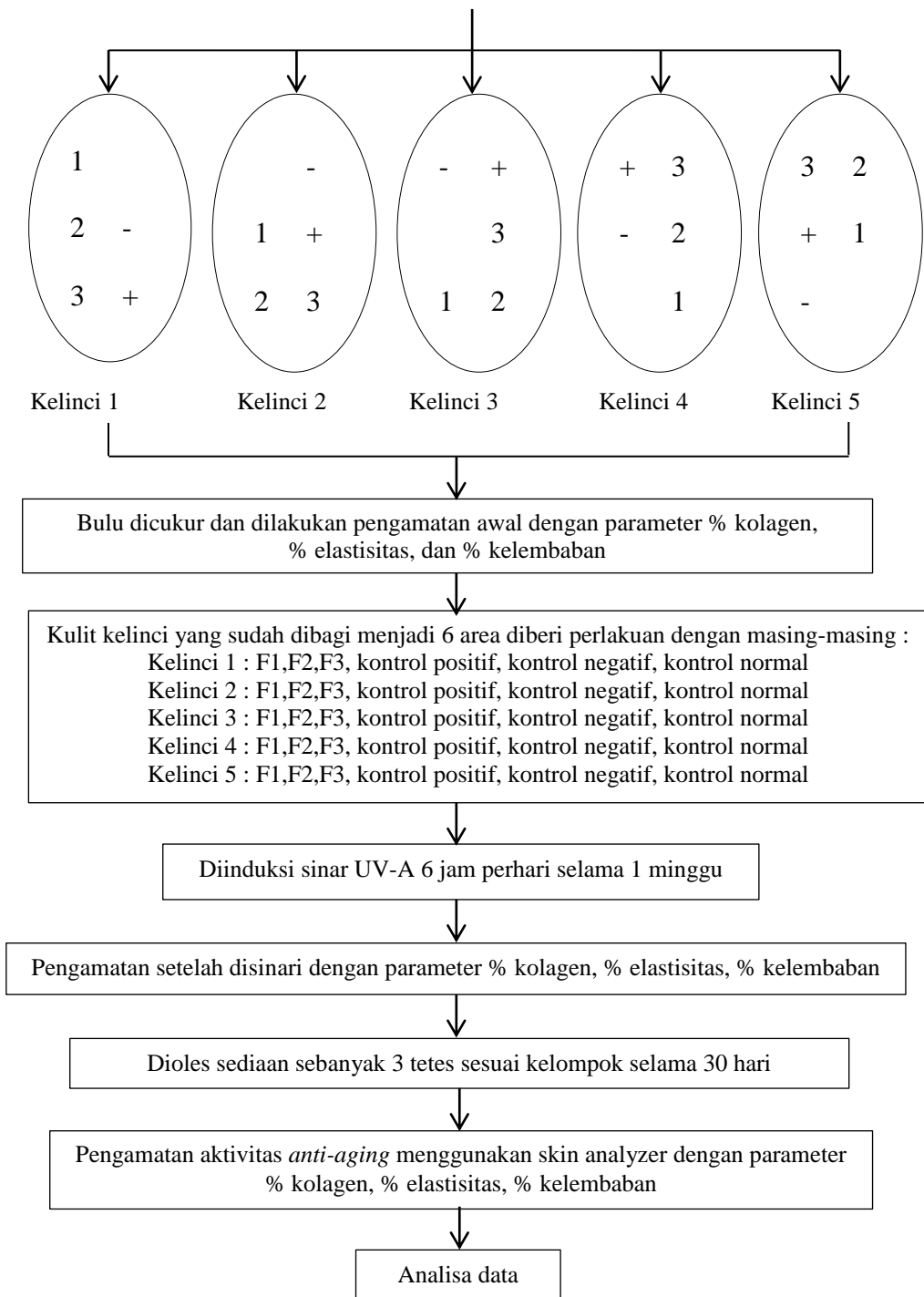


### Skema Uji Keamanan



**Gambar 5. Skema uji keamanan pada kulit punggung kelinci**

**Skema pengujian aktivitas *anti-aging* cairan hasil fermentasi nasi beras put**



**Gambar 6. Skema pengujian aktivitas *anti-aging* cairan hasil fermentasi**

### **E. Analisa data**

Data yang telah terkumpul selanjutnya diproses dengan menggunakan IBM *Statistical and Product Service Solution* (SPSS) versi 26 dengan parameter % kolagen, % elastisitas, dan % kelembaban kemudian dianalisis menggunakan *paired T-test* dengan tujuan untuk menganalisis sampel berpasangan yang mengalami perbedaan perlakuan dan uji ANOVA dilanjutkan uji *Tukey* untuk melihat data yang signifikan.