

BAB III METODE PENELITIAN

A. Populasi Sampel

1. Populasi

Populasi sampel yang digunakan dalam penelitian ini merupakan *Saccharomyces Rice Ferment Filtrate (SRFF)* dari beras jenis IR 64 (setra ramos).

2. Sampel

Sampel termasuk dalam sebagian kecil dari populasi pada penelitian ini. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil filtrat dari fermentasi nasi dengan konsentrasi yaitu 5% dengan masa inkubasi 1 hari dan 10% dengan masa inkubasi 3 hari.

B. Variabel Penelitian

1. Identifikasi variabel utama

Variabel utama yang pertama dalam penelitian ini yaitu sediaan *essence* dengan konsentrasi 5% dengan masa inkubasi 1 hari dan 10% dengan masa inkubasi 3 hari.

Variabel utama yang kedua dalam penelitian ini yaitu uji aktivitas *anti-aging* sediaan *essence* pada punggung kelinci.

Variabel utama yang ketiga dalam penelitian ini yaitu uji keamanan sediaan *essence* pada punggung kelinci dengan parameter iritasi kulit dan iritasi okuler.

2. Klasifikasi Variabel Utama

Variabel bebas merupakan variabel yang dapat diubah dan memengaruhi variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sediaan *essence* dengan konsentrasi 5% dengan masa inkubasi 1 hari dan 10% dengan masa inkubasi 3 hari.

Variabel terikat merupakan variabel yang bergantung pada variabel yang lain atau terikat dengan variabel yang mempengaruhinya. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji aktivitas *anti-aging* dengan menentukan % kolagen, % kelembapan, dan % elastisitas pada punggung kelinci.

Variabel terkontrol merupakan variabel yang berpengaruh pada variabel yang lain. Variabel terkontrol dalam penelitian ini adalah hewan uji kelinci yang meliputi, galur kelinci, umur, jenis kelamin, berat badan kelinci, genetik, suhu ruangan, pakan, aktivitas, dan kesehatan.

3. Definisi operasional variabel utama

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

Kedua, *Saccharomyces Rice Ferment Filtrate (SRFF)* merupakan hasil fermentasi nasi dengan penambahan ragi instan dan dilakukan identifikasi dengan pengujian organoleptis, pH, suhu.

Ketiga, pembuatan sediaan *essence anti-aging* dari *Saccharomyces Rice Ferment Filtrate (SRFF)* dengan konsentrasi 5% masa inkubasi 1 hari dan konsentrasi 10% masa inkubasi 3 hari dengan formula pada tabel 3.

Keempat, sediaan *essence anti-aging* dari *Saccharomyces Rice Ferment Filtrate (SRFF)* dengan konsentrasi 5% dan 10% dilakukan pengujian mutu fisik sediaan dengan pengujian organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, dan stabilitas.

Kelima, pengujian aktivitas *anti-aging* merupakan pengujian sediaan *essence* dari *Saccharomyces Rice Ferment Filtrate (SRFF)* dengan parameter persentase kolagen, persentase kelembapan, dan persentase elastisitas pada punggung kelinci menggunakan alat *skin analyzer*.

Keenam, pengujian keamanan merupakan pengujian eritema yang dilihat dari warna kemerahan, edema dilihat dari adanya cairan atau air dalam sel yang berlebihan, dan iritasi dilihat dari adanya kemerahan pada kulit. Pengujian okuler yang dilihat dari adanya iritasi konjungtiva, kejernihan, dan kemosis.

C. Alat dan Bahan

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, *Beaker glass*, *Erlenmeyer*, batang pengaduk, pipet tetes, botol sediaan *essence*, *obyek glass*, pH meter, viskometer *brookfield*, *skin analyzer*, *thermometer*, jarum ose, cawan petri, tabung reaksi, rak tabung reaksi, inkubator, kendang kelinci, alat cukur, *thermometer*, *Exoterra Daylight Backing Spot*, kassa steril, dan perban.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beras putih jenis IR 64 (setra ramos), ragi instan *fermipan*, glukosa, sukrosa, laktosa, ekstrak daging, pepton, phenol red 1%, media PDA, metoo *essence*

(digunakan sebagai kontrol positif), *Saccharomyces Rice Ferment Filtrate* (SRFF), PEG-40, propilen glikol, gliserin, xanta gum, phenoxyetanol, oleum rosae, dan aquadest.

3. Hewan uji

Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah kelinci jantan galur *New Zealand* yang memiliki umur berkisar 2-3 bulan, berat badan berkisar 2kg, dan memiliki kulit yang sehat, seperti yang tidak pernah mengalami iritasi terutama udema pada kulit kelinci.

D. Jalanya Penelitian

1. Pengambilan sampel

Pengambilan sampel dari penelitian ini merupakan *Saccharomyces Rice Ferment Filtrate* (SRFF) dari beras jenis IR 64 (setra ramos) dari konsentrasi yaitu 5% dengan masa inkubasi 1 hari dan 10% dengan masa inkubasi 3 hari.

2. Identifikasi sampel ragi

Pengambilan sampel dari penelitian ini adalah menimbang PDA (*Potato Dextrose Agar*) sebanyak 3,9 gram, menambahkan aquadest sebanyak 100ml dan di rebus sampai mendidih. Memasukkan PDA sebanyak 10 ml pada tiap tabung reaksi. Media didiamkan sampai padat dan kemudian di autoklaf selama 24 jam. Tabung reaksi yang sudah berisi media padat dicairkan di atas air mendidih sampai mencair. Tabung reaksi tersebut di miringkan sampai menjadi padat. Sampel ragi di taburkan ke dalam media kurang lebih sebanyak 0,1 gram dengan dilakukan secara aseptis kemudian diinkubasi pada inkubator sampai jamur tumbuh.

2.1 Pemeriksaan ragi secara makroskopik. Mencairkan media PDA di atas air mendidih sampai mencair. Memasukkan media ke dalam cawan petri secara aseptis. Media didiamkan sampai menjadi padat. Mengambil jamur pada media miring sebanyak 1 ose, kemudian digores pada media cawan petri. Membungkus cawan petri tersebut menggunakan kertas dan diinkubasi selama 2-7 hari.

2.2 Pemeriksaan ragi secara mikroskopik. Mengambil jamur yang telah tumbuh pada media sebanyak 1 kemudian mengoleskan pada *obyek glass*. Menambahkan larutan NaCl sebanyak 1 tetes pada *obyek glass*. Setelah kering, meneteskan pewarna LCB sebanyak 3 tetes pada *obyek glass*, kemudian didiamkan selama kurang lebih 1 menit dan

dialirkan dengan air. Melakukan pengamatan menggunakan mikroskop pada perbesaran 100x.

2.3 Pemeriksaan biokimia dengan gula-gula. Menimbang ekstrak daging sebanyak 0,3 gram, pepton 0,5 gram, phenol red 1% sebanyak 0,1 ml, aquadest sebanyak 100 ml, glukosa, laktosa, dan fructose sebanyak 0,5 gram. Mencampurkan ekstrak daging, pepton, dan phenol red dengan masing-masing ditambahkan media gula-gula. Media yang sudah homogen di autoklaf selama 24 jam. Kemudian mengambil biakan jamur sebanyak 1 ose dan memasukkan masing-masing ke media gula. Media di inkubasi selama 24-48 jam dan amati perubahan yang terjadi.

3. Pembuatan nasi

Menyiapkan beras sebanyak 100 gram dengan menambahkan air sebanyak 100 ml, direndam selama 5 menit kemudian ditiriskan. Menambahkan sebanyak 100ml aquadest pada beras dan dimasak dengan *rice cooker* selama 30 menit (Putra, 2019).

4. Pembuatan fermentasi nasi

Sampel pertama yang dibuat adalah nasi dengan konsentrasi 5%, memasukkan sampel nasi sebanyak 5 gram ke *Erlemeyer* dengan ditambahkan aquadest sampai 100ml. Mengukur suhu sampel menggunakan thermometer digital, kemudian menambahkan ragi instan sebanyak 1 gram. Campuran tersebut di aduk menggunakan batang pengaduk sampai homogen. *Erlemeyer* di tutup menggunakan kapas dan kertas dan masing-masing diberi penanda sesuai konsentrasinya. Sampel di simpan dengan suhu 20-30°C di dalam lemari penyimpanan selama 1 hari. Terakhir, mengukur suhu dan menyaring sampel dengan kertas saring dalam *Beaker glass*.

Sampel kedua yang dibuat adalah nasi dengan konsentrasi 10%, memasukkan sampel nasi sebanyak 10 gram ke *Erlemeyer* dengan ditambahkan aquadest sampai 100ml. Mengukur suhu sampel menggunakan thermometer digital, kemudian menambahkan ragi instan sebanyak 1 gram. Campuran tersebut di aduk menggunakan batang pengaduk sampai homogen. *Erlemeyer* di tutup menggunakan kapas dan kertas dan masing-masing diberi penanda sesuai konsentrasinya. Sampel di simpan dengan suhu 20-30°C di dalam lemari penyimpanan selama 3 hari. Terakhir, mengukur suhu dan menyaring sampel dengan kertas saring dalam *Beaker glass* (Putra, 2019).

4.1 Penetapan organoleptis fermentasi nasi. Penetapan organoleptis dalam penelitian ini dilakukan dengan pengamatan pada sampel antara lain, warna, bau, bentuk.

4.2 Penentuan pH fermentasi nasi. Menyiapkan alat pH meter yang sudah dikalibrasi. Mengambil masing-masing sampel dimasukkan ke dalam *Beaker glass*. Mencelupkan elektroda ke dalam masing-masing sampel dengan setiap pergantian pengukuran, elektroda dibilas dengan aquadest atau air dan di bersihkan dengan tisu. Menunggu sampai alat pH meter menunjukkan angka pH yang stabil. Menurut penelitian (Nuralifah *et al.*, 2019) persyaratan pH pada kulit wajah yang baik berkisar 4,5-6,5. Tujuan dari pengujian pH adalah untuk memastikan bahwa sediaan aman digunakan dan tidak menyebabkan iritasi pada kulit (Ain Thomas *et al.*, 2022).

4.3 Penetapan suhu fermentasi. Pada fermentasi pengukuran suhu menggunakan alat thermometer dilakukan pada beras sebelum ditutup dalam erlemeyer dan sesudah difermentasi. Mencelupkan thermometer pada cairan, akan tetapi tidak sampai menyentuh pada nasi dan kaca. Mengukur suhu angka thermometer sampai stabil (Putra, 2019). Menurut penelitian (Anita *et al.*, 2015) pada *Saccharomyces cerevisiae* suhu optimumnya adalah 30-35°C dan pada suhu 40°C tidak aktif dengan pH 4,0-4,5. Tujuan dari pengujian suhu untuk mengetahui mikroba masih hidup dapat digunakan atau sudah mati.

5. Sonikasi

Dilakukan sonikasi 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). Pada proses sonikasi pada suhu 30°C selama 15 menit, kemudian tahap selanjutnya yakni sentrifugasi. Strain dengan perlakuan sonikasi di sentrifugasi dengan suhu 4°C dengan kecepatan 10.000 rpm selama 10 menit sehingga diperoleh supernatant (He *et al.*, 2021).

6. Uji kualitatif senyawa fenolik dan alkaloid

Cara mendeteksi adanya senyawa fenol secara sederhana atau secara kualitatif dengan larutan FeCl_3 (Besi III klorida) yang ditambahkan ke dalam air dengan 5 ml larutan yang akan di uji. Hasil positif terdapat adanya fenol akan menimbulkan warna hijau, merah, ungu, atau hijau kehitaman, dan biru kehitaman (Andayani *et al.*, 2009). Pengujian alkaloid dengan pereaksi Mayer, larutan filtrat sebanyak 5 ml

ditambahkan pereaksi Mayer akan mendapatkan hasil positif jika terdapat endapan berwarna putih. Pengujian alkaloid dengan pereaksi Dragendroff, larutan filtrat sebanyak 5ml ditambahkan pereaksi Dragendroff akan mendapatkan hasil positif jika terdapat endapan coklat dan terbentuk endapan jingga. Pengujian alkaloid dengan pereaksi Bouchardat, larutan filtrat sebanyak 5 ml ditambahkan pereaksi Bouchardat akan mendapatkan hasil positif jika terdapat perubahan warna menjadi coklat (Raharjo *et al.*, 2023).

7. Rancangan formulasi sediaan *essence*

Tabel 1. Formulasi sediaan *essence*

Bahan	Konsentrasi			Fungsi
	F1	F2	F3	
SRFF (5%)	0	90	0	Zat aktif
SRFF (10%)	0	0	90	Zat aktif
PEG-40	0,3	0,3	0,3	Co-solvent
Propilen glikol	4	4	4	Humektan
Gliserin	4	4	4	Humektan
Xanthan gum	0,3	0,3	0,3	Peningkat viskositas
Phenoxyetanol	0,2	0,2	0,2	Pengawet
Oleum Rosae	1	1	1	Pewangi
TEA	0,2	0,2	0,2	Pembasa
Aquadest	90	0	0	Pelarut

Keterangan :

F1 : formula tanpa SRFF (kontrol negatif)

F2 : formula SRFF 5%

F3 : formula SRFF 10%

8. Prosedur pembuatan sediaan *essence*

Membuat formulasi sediaan *essence* dengan mencampurkan bahan-bahan yang terdapat dalam tabel. Menaburkan xanthan gum kedalam mortir yang berisi 20 ml SRFF dan gliserin didiamkan $\pm$ 10 menit, aduk perlahan sampai terbentuk basa *essence* (campuran 1). Memasukkan phenoxyetanol, propilen glikol, TEA, PEG-40, dan ol.rosae ke dalam mortir aduk sampai homogen (campuran 2). Campuran 2 ditambahkan pada campuran 1 sedikit demi sedikit diaduk sampai homogen. Menambahkan sisa filtrat SRFF dimasukkan ke dalam mortir diaduk sampai homogen. Memasukkan ke dalam wadah sediaan *essence*.

8.1 Uji organoleptis. Pengujian organoleptis sediaan *essence* dilakukan dengan mengamati warna, bau, dan tekstur.

8.2 Uji homogenitas. Pengujian homogenitas menggunakan dua obyek glass, kemudian sediaan *essence* ditetaskan menggunakan pipet tetes pada obyek glass dan diratakan menggunakan obyek glass yang lain. Sediaan yang homogen menunjukkan tidak adanya butiran kasar

pada sediaan *essence*. Uji homogenitas bertujuan untuk mengetahui bahan yang digunakan dalam pembuatan *essence* tercampur secara merata dan tidak terdapat partikel kasar yang mengganggu kualitas sediaan.

8.3 Uji pH. Pengujian pH *essence* menggunakan alat pH meter. Mengkalibrasi menggunakan larutan dapar pH netral, basa, dan asam sampai alat pH meter menunjukkan nilai pH tersebut. Mencuci elektrodida dengan aquadest pada setiap pergantian pengukuran dan dikeringkan menggunakan tisu. Sampel dimasukkan ke dalam wadah kemudian mencelupkan elektrodida ke dalam *essence* tersebut. Menunggu dan mengamati pH meter menunjukkan nilai pH konstan. Angka yang ditunjukkan pada pH meter merupakan pH dari sediaan (Ameliana *et al.*, 2022). Uji pH dilakukan untuk mengetahui nilai keasaman pH pada sediaan *essence*. Persyaratan pH *essence* yang baik sesuai dengan pH pada kulit wajah yaitu berkisar 4,5-6,5 (Asanah *et al.*, 2023).

8.4 Uji viskositas. Pengujian viskositas *essence* menggunakan alat viskotester Ostwald dengan mengukur waktu alir. Sediaan *essence* dimasukkan ke dalam viscometer Ostwald dengan mencatat waktu yang diperlukan sampel uji untuk melewati batas garis atas hingga bawah (satuan waktu alir dalam detik). Perhitungan nilai viskositasnya dengan cara mengalikan waktu alir dan kerapatan yang telah didapat sebelumnya (Amira, 2021). Uji viskositas dilakukan untuk mengetahui seberapa besar konsistensi sediaan dan dapat mengetahui kekentalan sediaan *essence*. Menurut penelitian (Ambarwati *et al.*, 2022) syarat standar uji viskositas sediaan *essence* yaitu 230-1150 cPs (1150 m.P.a S).

8.5 Uji stabilitas. Pengujian stabilitas *essence* menggunakan metode *cycling test*. Sediaan *essence* diletakkan selama 24 jam pada temperatur suhu 4°-8°C kemudian dipindahkan ke dalam oven selama 24 jam pada temperature suhu 40°C dan proses tersebut terhitung 1 siklus pengujian. Pengujian stabilitas ini dilakukan selama 6 siklus yaitu dalam 12 hari, sehingga akan menunjukkan perubahan sediaan yang bervariasi. Uji kondisi fisik masing-masing sediaan diamati mulai awal sampai akhir pengujian yang meliputi uji organoleptis, homogenitas, pH, dan viskositas. Uji stabilitas dilakukan untuk mengetahui kemampuan suatu sediaan untuk mempertahankan kualitasnya dalam jangka waktu tertentu dan dalam kondisi penyimpanan tertentu. sediaan *essence* dengan metode *cycling test* dapat di katan memenuhi syarat jika menunjukkan

hasil yang stabil dengan tidak adanya perubahan warna, bau, dan bentuk pada sediaan (Asanah *et al.*, 2023).

9. Pengujian aktivitas *essence anti-aging* pada hewan uji

9.1 Penyiapan hewan uji. Menurut penelitian (Purwanti *et al.*, 2022) pengujian hewan uji dilakukan pada kelinci yang selesai diaklimatisasi terlebih dahulu selama 5 hari dalam kandang secara individual. Mencukur bulu punggung kelinci sebelum dilakukan pengujian kurang dari 24 jam. Pencukuran dengan luas kurang lebih 10 x 15 cm atau < 10% dari permukaan tubuh untuk tempat pengolesan sediaan uji, mencukur bulu kelinci mulai dari area tulang belikat (bahu) sampai tulang paha bawah (tulang pinggang) dan setengan ke bawah badan untuk setiap sisi.

9.2 Pembagian kelompok hewan uji. Hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini merupakan hewan uji yang memiliki kondisi kulit yang sehat. Menyiapkan sebanyak 5 ekor hewan uji yang telah diadaptasi melakukan pembagian sebanyak 5 perlakuan untuk 1 kelinci. Pada setiap kelompok kelinci akan dipaparkan sinar UV-A.

Kelompok I : Mengoleskan sediaan *essence* dengan konsentrasi *SRFF* 5%

Kelompok II : Mengoleskan sediaan *essence* dengan konsentrasi *SRFF* 10%

Kelompok III : Mengoleskan *SRFF* 5%

Kelompok IV : Mengoleskan *SRFF* 10%

Kelompok V : Mengoleskan SK II *essence* (kontrol positif)

Kelompok VI : Mengoleskan sediaan *essence* tanpa *SRFF* (kontrol negatif)

9.3 Induksi dengan sinar UV-A. Penetapan kelinci di tempatkan dalam kandang yang cukup agar tidak bias bergerak pada saat diinduksi sinar UV-A. Mencukur bulu punggung kelinci dengan mengukur persen kolage, persen kelembapan, dan persen 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 J.cm⁻²/jam selama 6 jam (Rezky Putri *et al.*, 2023).

9.4 Aktivitas pengujian sampel *essence*. Pemberian sampel *essence* dilakukan dengan mengoleskan sampel *essence* pada punggung kelinci sebanyak 0,5 ml, sesuai dengan perlakuan untuk setiap kelompok hewan uji yaitu dengan perlakuan 1 kali sehari dalam waktu 30 hari. Standart anti penuaan yang dilakukan meliputi persen kolagen, persen

kelembapan, dan persen elastisitas pada saat sebelum diinduksi sinar UV-A pada hari ke 0 (sebelum pemberian sampel *essence*) dan pada minggu ke-4 (setelah pengolesan sampel *essence*) menggunakan alat *skin analyzer* (Rezky *et al.*, 2023).

10. Uji keamanan sediaan *essence* pada hewan uji

Menyiapkan 3 ekor kelinci, kemudian mengoleskan sediaan *essence* sebanyak 0,5 ml pada punggung kelinci. Cara pengolesan dengan dioleskan ke kain kasa terlebih dahulu, kemudian dipaparkan pada kulit seluas ± 6 (2 x 3) cm² kemudian ditutup dengan kasa dan plester yang bersifat non-iritan. Setelah pemaparan dilakukan pengamatan uji eritema dan edema pada jam 1, 24, 48, dan 72. Pengamatan dilanjutkan sampai hari ke 14 untuk dilihat reversibilitas (BPOM, 2014).

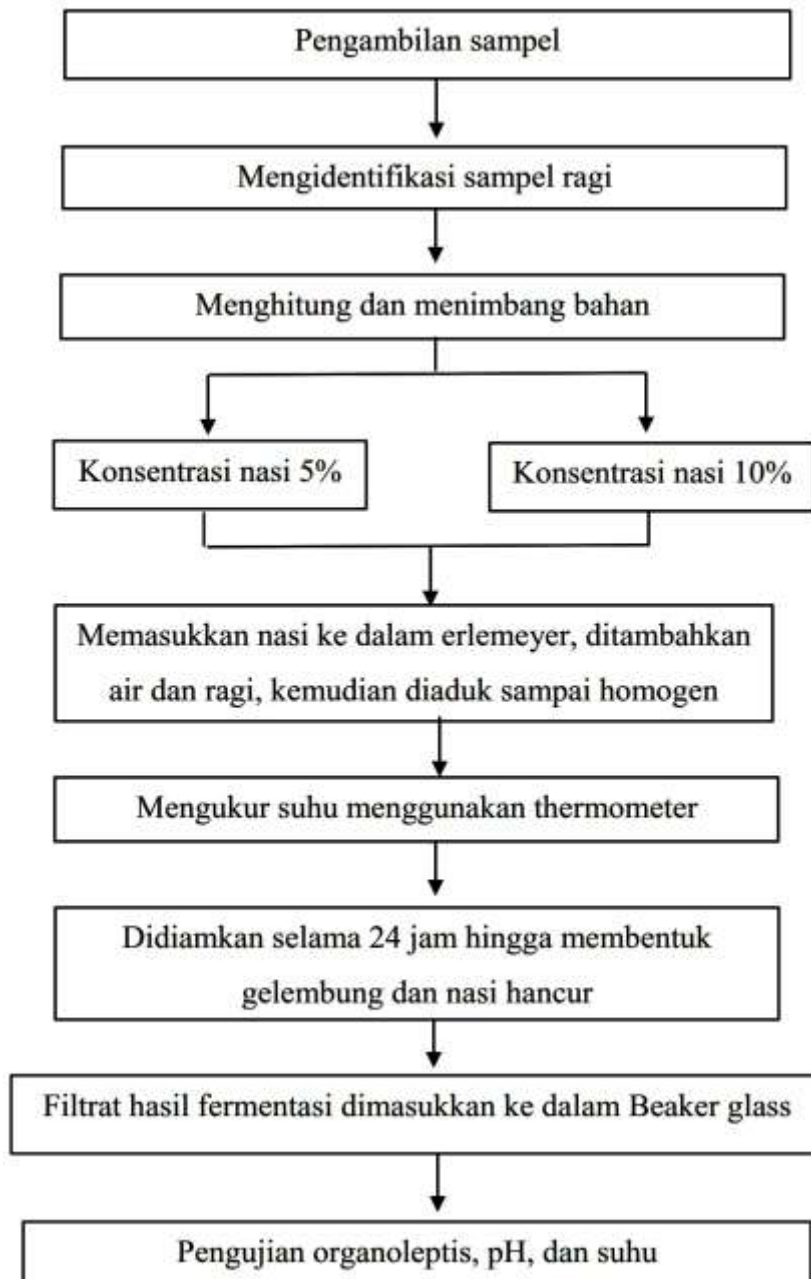
Tabel 2. Skor iritasi kulit

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

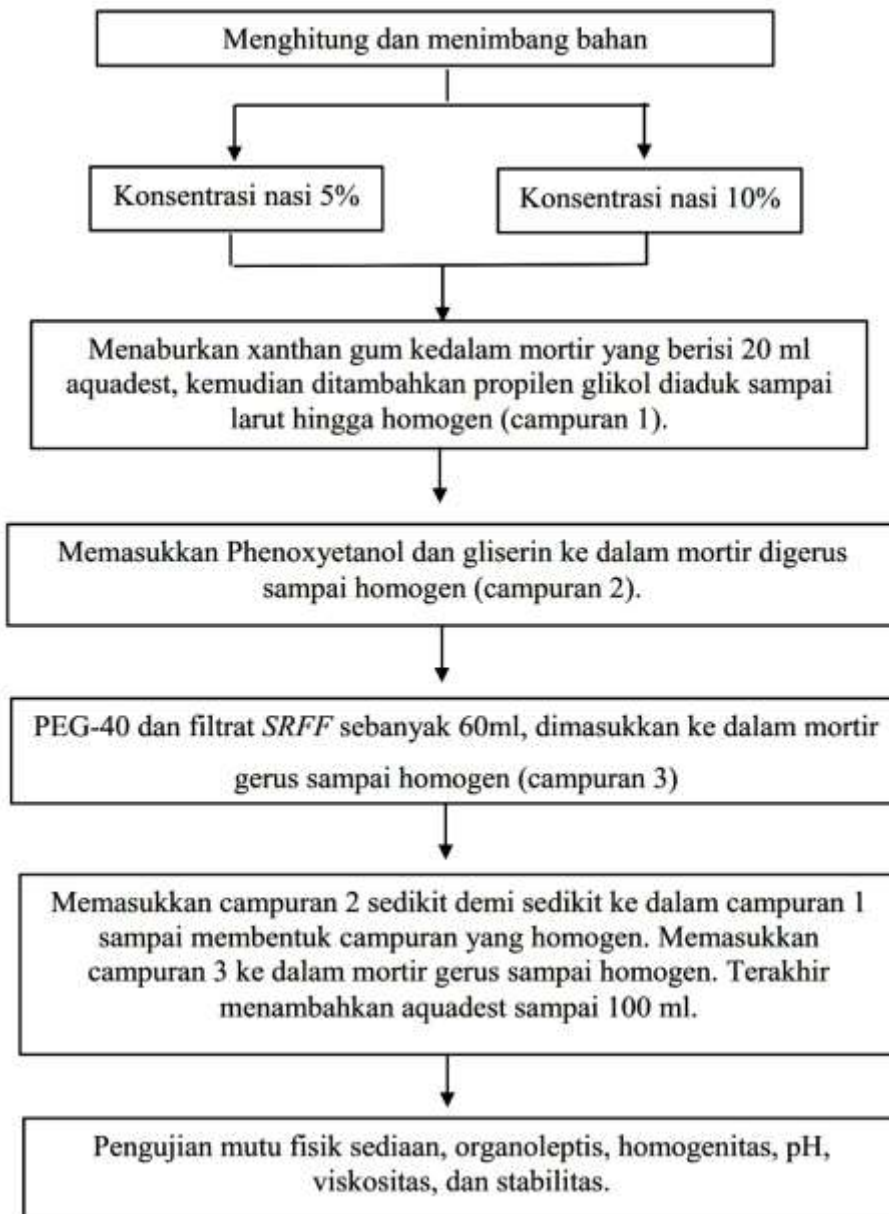
Tabel 3. Indeks iritasi

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

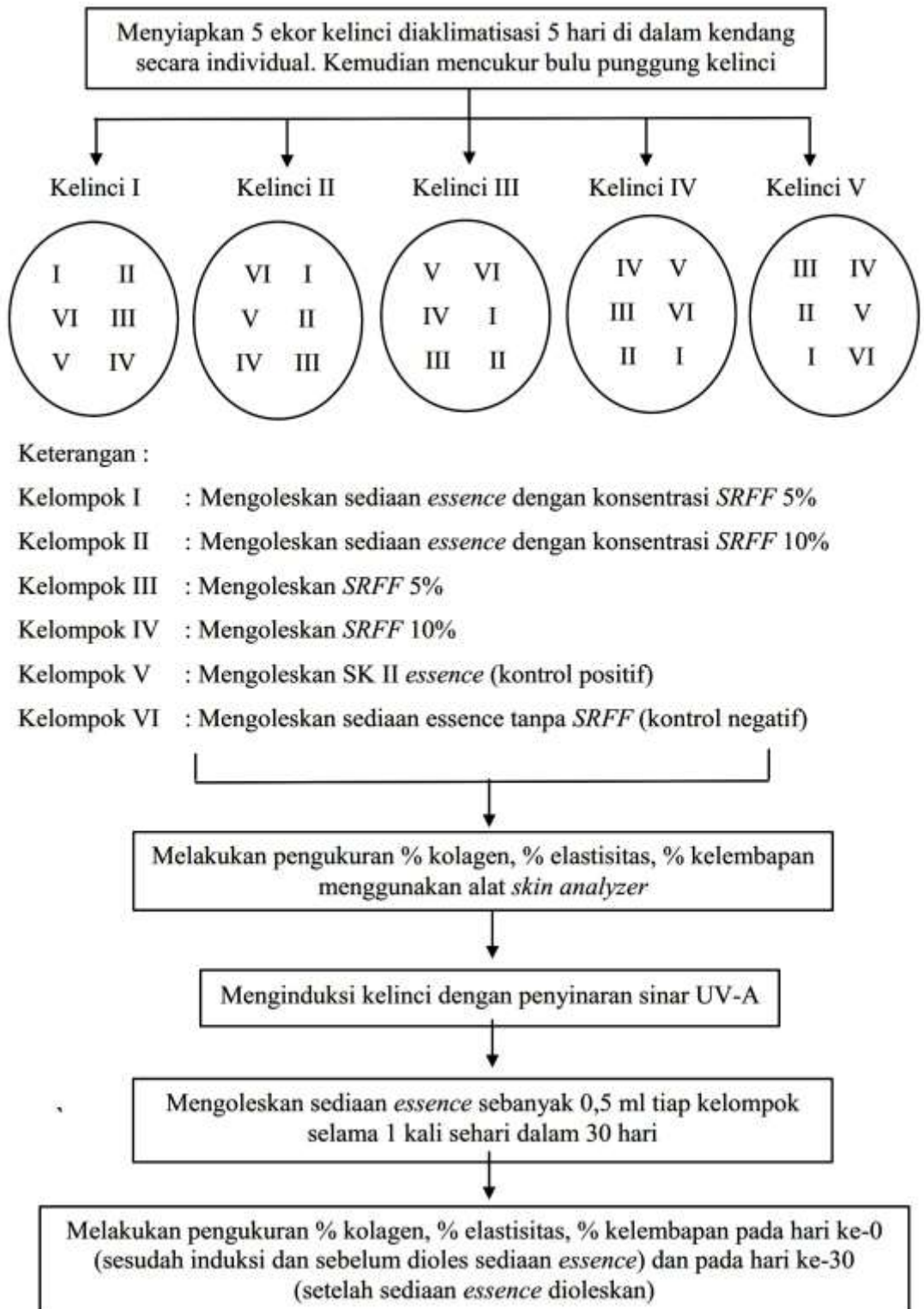
E. Skema Penelitian



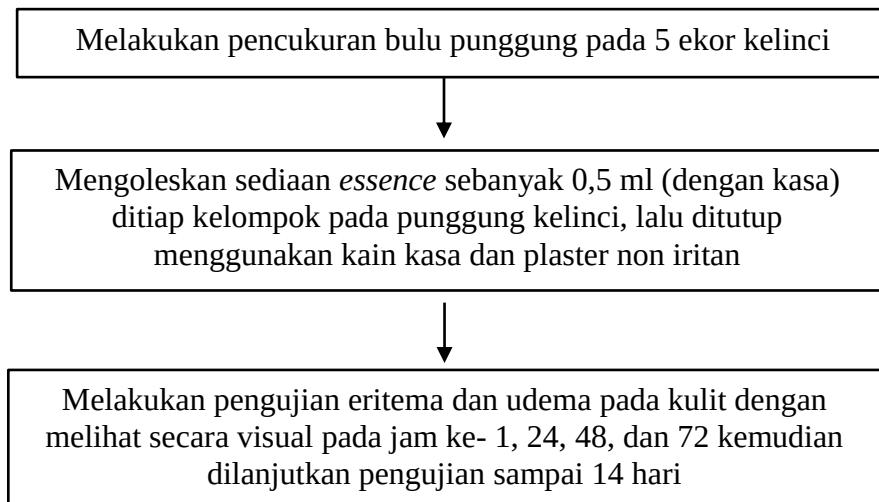
Gambar 5. Skema pembuatan SREF dari nasi



Gambar 6. Skema pembuatan sediaan *essence*.



Gambar 7. Skema Pengujian aktivitas *anti-aging*



Gambar 8. Skema pengujian keamanan sediaan *essence*.

F. Analisis Hasil

Analisis hasil dalam penelitian ini berdasarkan data yang telah terkumpul, data data dengan hasil uji mutu fisik sediaan *essence* dengan parameter organoleptis, homogenitas, pH, viskositas, dan stabilitas dengan tujuan untuk memastikan sediaan *essence* memenuhi standart kualitas yang telah ditetapkan. Data dengan hasil uji aktivitas *anti-aging* pada hewan uji, selanjutnya dilakukan pengujian menggunakan alat *skin analyzer* dengan parameter % kolagen, % kelembapan, dan % elastisitas sebelum dan sesudah dioleskan sediaan *essence* dan dilakukan analisis menggunakan *T-test* dengan tujuan untuk menganalisis sampel berpasangan yang mengalami perlakuan berbeda dan ANOVA.