

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 RANCANGAN PENELITIAN

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok yang melibatkan 2 faktor perlakuan dengan 3 ulangan dengan jumlah keseluruhan adalah 27 unit. Data dianalisis dengan menggunakan SPSS (*Analysis of Variance* atau ANOVA) dilanjutkan dengan uji lanjut BNT dengan selang kepercayaan 5%.

3.2 VARIABEL PENELITIAN

Variabel utama yang didefinisikan menurut fungsinya dapat dibedakan menjadi:

1. Variabel Bebas/ Independent

Variabel Bebas dalam penelitian adalah konsentrasi sari kurma (*Phoenix dactylifera* L.) (5%, 10%, 15%) dan lama fermentasi (5 hari, 10 hari, 14 hari).

2. Variabel Terikat/ Dependent

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah aktivitas antimikroba

3. Variabel Kendali

Variabel kendali dalam penelitian ini antara lain kombucha sari bunga bakung paskah (*Lilium longiflorum* Thunb.)

3.3 TEMPAT DAN WAKTU

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Biokimia Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Pengambilan data dilakukan selama ± 1 bulan, pada bulan Mei - Juni 2015.

3.4 ALAT DAN BAHAN

3.3.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah: panci, kompor, hotplate, pengaduk, toples kaca, botol steril, erlenmeyer, kertas saring, mikropipet 1 ml, timbangan analitik, gelas ukur, beaker glass, freezer, almari es, tabung reaksi, rak tabung reaksi, petridish steril, dan pinset steril.

3.3.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: *baby kombucha*, starter kombucha, starter yoghurt, ekstrak bunga bakung (*Lilium longiflorum* Thunb), ekstrak kurma (*Phoenix dactilyfera* L.), biakan *Eschericia coli*, biakan *Salmonella typhi*, biakan *Bacillus cereus*, aquades, susu skim, natrium agar, dan paper disk.

3.5 PARAMETER PENELITIAN

Pada penelitian ini yang diamati adalah daya hambat yang dihasilkan oleh aktivitas antimikroba kombucha sari bunga bakung paskah (*Lilium longiflorum* Thumb.) dengan penambahan sari buah kurma (*Phoenix dactilyfera* L.).

3.6 DESAIN PENELITIAN

Penelitian ini merupakan eksperimen murni yang menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 3 kali ulangan.

Lama fermentasi Konsentrasi kurma	5 hari	10 hari	14 hari
5%	√	√	√
10%	√	√	√
15%	√	√	√

3.7 PROSEDUR PENELITIAN

3.4.1 Ekstraksi Sari Bunga Bakung Paskah (*Lilium longiflorum* Thunb.)

Bahan bunga bakung paskah yang akan digunakan sebagai substrat pertumbuhan scoby kombucha dibersihkan dari kotoran serta obat-obatan yang melekat pada mahkota bunga, kemudian ditimbang 50g mahkota bunga lalu dimasukkan ke dalam 1 liter aquades dan diblender. Setelah halus kemudian direbus pada suhu 80°C hingga mendidih kemudian disaring.

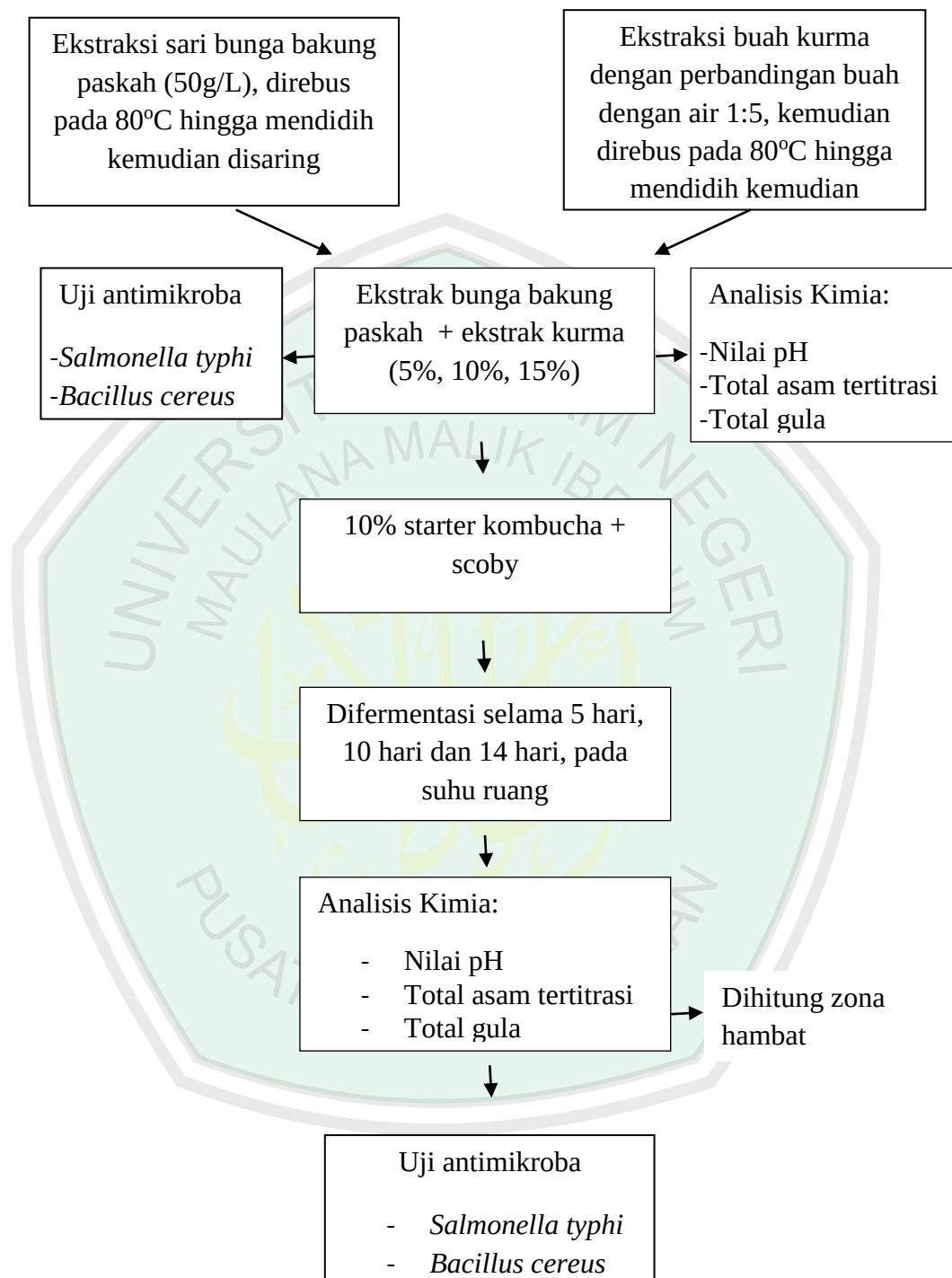
3.4.2 Pembuatan Ekstrak Kurma (*Phoenix dactilyfera* L.)

Buah kurma yang telah dibersihkan dari bijinya kemudian ditimbang 10g buah kurma, lalu diblender dengan perbandingan buah dan air 1: 5, sehingga didapatkan 50ml aquades untuk 10g buah kurma. Setelah itu, ekstrak direbus pada suhu 80°C hingga mendidih kemudian disaring (Khotimah *et al.*, 2014).

3.4.3 Pembuatan Kombucha

Pembuatan kombucha diawali dengan menambahkan ekstrak kurma sesuai dengan konsentrasi yang digunakan yaitu 5% (0,5ml), 10% (5ml) dan 15% (7,5ml). Kemudian ditambahkan ekstrak bunga bakung paskah hingga mencapai batas 50ml, setelah tercampur rata ditambahkan starter kombucha sebanyak 10% (Ngan *et al*, 2014), sehingga dalam penelitian ini dimasukkan 5ml starter dan scoby kombucha ke dalam wadah kaca yang telah berisi campuran ekstrak bunga bakung paskah dan ekstrak kurma.

Ditutup toples kaca dengan menggunakan serbet atau sapu tangan bersih, hal ini bertujuan agar debu atau lalat buah tidak masuk ke dalam kombucha, namun di dalam toples kaca masih terdapat udara. Diikat sapu tangan dengan tali atau karet agar tidak mudah terbuka. Toples kaca kemudian diletakkan di tempat yang tidak langsung terkena cahaya matahari langsung, karena sinar ultraviolet dapat membunuh bakteri yang terkandung di dalam kombucha (Indo Kombucha, 2009). Didiamkan selama 5, 10 dan 14 hari kemudian dipanen, dengan memisahkan bagian *Baby Kombucha* dengan cairan kombucha. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 3 kali ulangan.



Gambar 3.
Skema Prosedur Penelitian

3.8 METODE ANALISIS

3.5.1 Analisis Total Asam Titrasi

a. Standarisasi NaOH

Sebanyak 0.1 g asam oksalat ((COOH)₂.2H₂O) (BM=126) ditimbang lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian dilarutkan dengan 25 ml akuades dan ditetaskan dengan 2-3 tetes indikator fenolftalein lalu dititrasi dengan larutan NaOH hingga terbentuk warna merah muda yang bertahan selama 15 detik.

Normalitas NaOH dihitung dengan rumus:

$$\text{Normalitas NaOH} = \frac{\text{Gram asam oksalat} \times 2}{0.126 \times \text{ml NaOH}}$$

b. Persiapan Sampel

Sampel kombucha sebanyak 10 ml dilarutkan menjadi 250 ml dalam labu takar kemudian diambil 50 ml lalu ditambah 2-3 tetes indikator fenolftalein. Selanjutnya dititrasi dengan larutan NaOH 0.1 M sampai terjadi perubahan warna menjadi merah muda. Total asam titrasi (TAT) dinyatakan dalam persen asam asetat. Total asam titrasi dihitung dengan rumus:

$$\text{TAT (\% asam laktat)} = \frac{V \times M \times P \times \text{BM} \times 100\%}{B}$$

Dimana TAT : Total Asam Titrasi (% asam laktat)
 V : Jumlah larutan NaOH untuk titrasi (ml)
 M : Molaritas NaOH
 P : Jumlah pengenceran

BM : Berat molekul asam asetat (60,05 g/mol)

B : Berat contoh (mg)

3.5.2 Analisis Total Gula

Uji total gula dilakukan menggunakan metode *Anthrone*. Pembuatan kurva standar gula total dilakukan dengan cara melarutkan 0,2 g glukosa standar dalam 100 mL aquades sehingga diperoleh konsentrasi 2000 ppm. Larutan kemudian diencerkan dengan aquades sehingga diperoleh konsentrasi 0 (kontrol); 100; 200; 300; 400; 500 ppm. Masing-masing larutan tersebut kemudian ditambah dengan 5 mL pereaksi *anthrone*, kemudian ditutup dan dicampur secara merata. Setelah ditempatkan dalam penangas air (*water bath*) 100°C selama 12 menit, dan didinginkan dengan air mengalir, kemudian dilakukan pembacaan absorbansinya pada panjang gelombang maksimum dan dibuat hubungan antara absorbansi dengan g glukosa (Apriyantono *et al.*, 1989).

Sampel sebanyak 5g dimasukkan dalam labu ukur 100 ml kemudian ditambahkan aquades sampai tanda batas. Dituang kedalam erlenmeyer 250 ml dan ditambahkan 1 g CaCO_3 , diaduk dan ditutup plastik. Dipanaskan pada suhu 100°C selama 30 menit dan didinginkan. Disaring dengan kertas saring. Jika masih terdapat endapan, maka sampel perlu disaring kembali dengan menambahkan Pb-asetat sebanyak 2 ml kemudian ditambahkan 1g Na-oksalat untuk mengendapkan Pb-asetat. Diambil 1ml filtrat dalam labu ukur (pengenceran sesuai pembacaan). Diambil tiap 1 ml larutan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 5 ml *Anthrone* (0,05g dalam 50 ml H_2SO_4

pekat). Dipanaskan pada suhu 100°C selama 12 menit. Baca pada panjang gelombang (λ) 630nm dan catat hasil pembacaan (Retnowati dan Kusnadi, 2014). Total gula diperoleh dari persamaan $y = ax + b$, kemudian dimasukkan dalam rumus (Khotimah *et al.*, 2014):

$$\text{Total Gula (\%)} = \frac{X \times \text{pengenceran}}{\text{berat sampel (mg)}} \times 100\%.$$

Dimana, X = Nilai Total Gula

3.5.3 Analisis Nilai pH

Contoh sebanyak 50 ml, kemudian dihomogenkan, dibiarkan sekitar 15 menit baru diukur pHnya dengan pHmeter yang telah dikalibrasi dengan *buffer* pH 4.0 dan pH 7.0. Tahap-tahap penetapan pH secara umum adalah (1) suhu sampel diukur, pengatur suhu pH sampel pada suhu terukur diset, (2) kemudian pH meter dinyalakan sampai stabil, (3) probe elektrode dibilas dengan akuades dan dikeringkan dengan kertas tisu, (4) elektrode dicelupkan pada larutan sampel, diset pengukuran pH dan (5) elektrode dicelupkan beberapa saat sampai diperoleh pembacaan yang stabil. Nilai pH diukur sebanyak 3 kali ulangan.

3.5.4 Uji Antimikroba

Uji antimikroba dilakukan menurut Subandi (2010) yaitu dengan merendam paper disk ke dalam kombucha dan sari bunga bakung (kontrol) masing-masing 3 ulangan sehingga didapatkan 81 paper disk, selama 5 menit. Sambil menunggu paper disk menyerap bahan antimikroba, dimasukkan 1 ml biakan murni *Salmonella typhi* dan *Bacillus cereus* ke

dalam petridish yang berbeda, dilakukan sebanyak 3 kali. Lalu ditambahkan media tumbuh Nutrient Agar (NA) 50°C hingga rata menutup dasar petridish, didiamkan hingga membeku. Dimasukkan paper disk yang telah direndam ke permukaan NA yang telah membeku, diinkubasi selama 48 jam pada temperatur 37°C kemudian diamati dan dihitung zona hambatnya (zona bening antara paper disk dengan bakteri).

3.5.5 Analisis Statistik

Data berupa luas zona bening yang menunjukkan daya hambat bakteri dianalisis secara deskriptif kualitatif. Analisis deskriptif dilakukan dengan membandingkan luas zona bening antar kombucha sari bunga bakung dengan konsentrasi buah kurma dan lama fermentasi.