

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian pembuatan nata dari umbi ubi jalar ungu oleh bakteri *Acetobacter xylinum* ini merupakan penelitian eksperimental yang menggunakan rancangan acak kelompok (RAK) secara faktorial dengan 12 perlakuan dan 3 kali ulangan.

➤ Faktor I : Pengaturan pH

Terdiri dari 3 level : 3 (P1)

4 (P2)

5 (P3)

➤ Faktor II : Konsentrasi gula

Terdiri dari 5 level : 0 % (G1)

5 % (G2)

10 % (G3)

15 % (G4)

Dari kedua faktor tersebut diperoleh 12 kombinasi perlakuan dan tiap-tiap perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, maka didapatkan 36 satuan percobaan. Desain perlakuan pada penelitian ini disajikan pada Table 3.1

Tabel 3.1 Rancangan Percobaan Penelitian Nata *de Ipomoea skin*

pH substrat Konsentrasi gula	P ₁	P ₂	P ₃
G ₀	P ₁ G ₀	P ₂ G ₀	P ₃ G ₀
G ₁	P ₁ G ₁	P ₂ G ₁	P ₃ G ₁
G ₂	P ₁ G ₂	P ₂ G ₂	P ₃ G ₂
G ₃	P ₁ G ₃	P ₂ G ₃	P ₃ G ₃

Keterangan:

P1G1 : pH 3 dengan konsentrasi gula 0%

P2G1 : pH 4 dengan konsentrasi gula 0%

P3G1 : pH 5 dengan konsentrasi gula 0%

P1G2 : pH 3 dengan konsentrasi gula 5%

P2G2 : pH 4 dengan konsentrasi gula 5%

P3G2 : pH 5 dengan konsentrasi gula 5%

P1G3 : pH 3 dengan konsentrasi gula 10%

P2G3 : pH 4 dengan konsentrasi gula 10%

P3G3 : pH 5 dengan konsentrasi gula 10%

P1G4 : pH 3 dengan konsentrasi gula 15%

P2G4 : pH 4 dengan konsentrasi gula 15%

P3G4 : pH 5 dengan konsentrasi gula 15%

3.2 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium kimia jurusan kimia Universitas Muhammadiyah Malang dan laboratorium Biokimia Jurusan Biologi

Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri (UIN) Maulana Malik Ibrahim Malang, pada bulan Mei- September 2014.

3.3 Alat dan Bahan

3.3.1 Alat-alat

Alat-alat yang digunakan penelitian, yaitu: spektrofotometer, kuvet, vortex, tabung reaksi, mikropipet, tube putih, sentrifugasi, refluk, pendingin balik, Erlenmeyer, cawan crucible, desikator, oven, baskom, beaker glass 500 mL, gelas ukur 25 ml, plastik, karet, kertas label, neraca analitik, baskom sedang, kain saring, kompor, penggaris, pisau, blender, panci, Koran/kertas penutup, kertas saring, Bunsen, LAF.

3.3.2 Bahan-bahan

Bahan-bahan yang digunakan penelitian ,yaitu: Kulit ketela ungu atau ubi jalar ungu, Larutan alkohol 70% dan alkohol 96%, H_2SO_4 1,25%, NaOH 1,25%, K_2SO_4 10%, Gula pasir (sukrosa), Bakteri *Acetobacter xylinum*, Aquades, Pupuk ZA, cuka dapur merk “sari”, asam sitrat teknis, larutan etanol 96%.

3.4 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 3 variabel yang meliputi : 1) variabel bebas, 2) variabel terikat dan 3) variabel terkendali.

1. Variable bebas yaitu faktor yang sengaja diubah atau dimanipulasi oleh peneliti dengan maksud untuk mengetahui perubahan yang terjadi Variabel bebas yang

digunakan adalah jumlah pemberian gula pasir 0%(tanpa gula), 5%, 10%, 15% dan medium fermentasi nata kulit ubi jalar ungu (*Ipomoea batatas*)).

2. Variabel terkontrol yaitu faktor yang sengaja dikendalikan supaya tidak mempengaruhi variabel bebas maupun variabel terikat. Variabel kendali dalam penelitian ini adalah *Acetobacter xylinum*.
3. Variabel terikat yaitu faktor yang diukur atau diamati sebagai akibat dari manipulasi variabel bebas. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar antosianin, serat dan ketebalan nata.

3.5 Kegiatan Penelitian

1. Tahap peremajaan starter bakteri *Acetobacter xylinum*
2. Tahap pembuatan nata dari bahan dasar kulit ubi jalar ungu
3. Tahap pengukuran ketebalan nata
4. Tahap pengujian kadar antosianin dari hasil nata kulit ubi jalar ungu
5. Tahap penentuan serat kasar

3.5.1 Peremajaan Starter Bakteri *Acetobacter xylinum* dengan Bibit Jadi (Karlina dan Sri, 2012)

Air kelapa disaring menggunakan penyaring. Kemudian, direbus air kelapa diatas api sampai mendidih sambil terus diaduk. Kemudian, ditambahkan Za 0,6%, gula pasir 10 % dan cuka 50 ml/L. Larutan yang sudah siap dituang kedalam botol yang sudah disterilkan, ditutup dengan kertas/Koran bersih dan ditali dengan karet. Dibiarkan pada suhu ruang sampai suhu media sama dengan suhu ruang, setelah

mencapai suhu ruang ($\pm 30^{\circ}\text{C}$) dituang starter sebanyak 10 % (v/v) menggunakan beaker glas 500 ml dan gelas ukur 25 ml di dalam LAF. Disimpan selama empat hari. Setelah empat hari starter siap digunakan.

3.5.2 Pembuatan Nata

1. Dipilih kulit ubi ungu dan dicuci dengan air mengalir
2. Diblancing kulit ubi ungu suhu 65°C selama 15 menit
3. Ditimbang kulit ubi ungu sebanyak 100 g
4. Dipotong kecil-kecil, kemudian ditambahkan air dengan perbandingan kulit ubi ungu : air sebanyak 1 : 8 (b/v), di blender sampai halus
5. Disaring dengan kain penyaring sedikit demi sedikit sambil sekali-kali diperas ampasnya agar seluruh filtrat dapat diambil
6. Diambil 1000 mL filtrat ke dalam panci
7. Diukur pH awal kemudian ditambahkan asam sitrat teknis sampai mencapai pH yang diinginkan (pH 3, 4, 5) lalu dididihkan diatas kompor
8. Ketika mendidih ditambahkan gula pasir, ZA 0,6%, sambil diaduk agar larut dengan sempurna
9. Diangkat, didinginkan, dituang ke dalam baskom yang sudah disterilisasi (dituangi air mendidih/disemprot alkohol sebelum digunakan) dan ditutup dengan koran/kertas penutup selama pendinginan
10. Setelah dingin, ditambahkan starter *Acetobacter xylinum* sebanyak 10%
11. Dilakukan fermentasi selama 14 hari

12. Dilakukan cara yang sama (1-8), tetapi dengan variasi konsentrasi gula pasir yang berbeda, yaitu 0%,5%,10%,15%.

3.5.3 Analisa Ketebalan

1. Ditiriskan nata selama 5 menit.
2. Diukur ketebalan nata pada berbagai sisi menggunakan penggaris.
3. Dihitung rata-rata hasil pengukuran.

3.5.4 Pengukuran Kadar Antosianin Nata dengan Menggunakan Metode *pH differential Spektrofotometri* (Giusti dan Worlstad, 2001)

1. Ditimbang sample sebanyak 5 g.
2. Diblender sampel selama 5 menit.
3. Dimaserasi dalam beaker glass 500 ml dengan pelarut asam sitrat 0,75%, etanol 95% dan aquades.
4. Dihomogenkan dengan rotary shaker pada kecepatan 200 rpm dan dibiarkan selama 10 jam pada suhu ruangan memucat dan ruang gelap.
5. Disaring sampel dengan corong Bunchner, diperoleh ekstrak yang kemudian disentrifuge dengan kecepatan 2000 rpm selama 10 menit. Diperoleh sampel antosianin.
6. Ekstrak nata dilarutkan dengan larutan etanol 96%.
7. Dihomogenkan dengan vortex selama 1 menit dan dibagi menjadi dua bagian
8. Digunakan masing-masing ekstrak pada larutan pH 1 dan pH 4,5
9. Dimasukkan dalam kuvet filtrat nata yang sudah homogen.

10. Diletakkan kuvet kedalam spektrofotometer dan dilakukan absorbansi pada panjang gelombang 510 nm dan panjang gelombang 700 nm pada masing-masing larutan.
11. Dimasukkan nilai absorbansi kedalam rumus persentase kadar antosianin.

Untuk menentukan nilai absorbansi menggunakan persamaan berikut:

$$A = \frac{A((A_{vis-max} - A_{700})_{pH 1,0} - (A_{vis-max} - A_{700})_{pH 4,5}) \times MW \times DF \times 1000}{\epsilon \times l}$$

Keterangan:

A : Absorbansi

ϵ : absorptivitas molar Sanidin-3-glukosida = 26900 L1 (mol.cm)

l : Tebal kuvet: l cm

MW : Massa relative molekul (449,2 g/mol)

DF : faktor pengenceran

Selanjutnya untuk menentukan total antosianin menggunakan persamaan:

$$\text{Total Antosianin (mg/L)} = \text{Absorbansi} \times \text{DF} \times 1000 / 55,9 \times 1$$

3.6.5 Analisis Serat Kasar dengan Menggunakan Metode Gravimetri (AOAC dalam Sudarmadji, *et.al*, 1989)

1. Ditimbang 2 gram sampel, dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 200 ml larutan H₂SO₄ (0,255 N) mendidih, ditutup dengan pendingin balik kemudian dididihkan selama 30 menit

2. Disaring suspensi dengan kertas saring, residu yang tertinggal dalam erlenmeyer dicuci dengan aquades mendidih, residu pada kertas saring dicuci sampai tidak bersifat asam lagi
3. Residu dalam kertas saring dimasukkan lagi ke dalam erlenmeyer dengan spatula, dicuci dengan 200 ml NaOH (0,313 N) kemudian dididihkan selama 30 menit
4. Disaring dengan kertas saring yang telah diketahui berat konstan sambil dicuci dengan K₂SO₄ 10%, residu dicuci dengan aquades mendidih dan 15 ml alkohol 95 %
5. Dikeringkan kertas saring di oven pada suhu 110°C.
6. Diabukan dalam tanur pada suhu 500 °C
7. Didinginkan dalam desikator
8. Ditimbang dan diulang sampai tiga kali sampai berat sama
9. Dihitung kadar serat dalam rumus yaitu % kadar serat = Berat serat/Berat sampel X 100%.

3.5.5 Analisis Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah uji statistik *Two way*. Anova digunakan untuk membuktikan hipotesa yaitu mengetahui pengaruh penambahan gula dan pH substrat terhadap ketebalan, serat dan kadar antosianin nata. Apabila hasil analisa menunjukkan ada pengaruh antar perlakuan ($F_{hitung} > F_{tabel}$), maka dilanjutkan dengan uji lanjut Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan tingkat signifikansi 5%.