

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Waktu dan Tempat Penelitian**

Bakteri asam laktat di isolasi pada Laboratorium Mikrobiologi Universitas Sumatera Utara. Sedangkan uji aktivitas antioksidan dilaksanakan di Laboratorium Politeknik Teknologi Kimia Industri (PTKI) yang beralamat di jalan Medan Tenggara No. VII, Kec Medan Denai, Sumatera Utara.

#### **3.2 Alat dan Bahan Penelitian**

##### **3.2.1 Alat Penelitian**

Pisau stainless, toples, sendok, saringan, wadah gelas pyrex, pinset, spatula, neraca analitik, tabung reaksi, Erlenmeyer, vortex, inkubator, autoklaf, oven, LAF, lemari pendingin, hot plate, Bunsen, sentrifus, stopwatch, pipet ukur, pipet tetes, cawan petri, jarum ose, mikroskop, gelas objek, aluminium foil, plastic wrap, kapas, Spektrofotometer, colony counter.

##### **3.2.2 Bahan**

Rebung bambu Betung (*Dendrocalamus asper*), cabai merah, bawang putih, garam 5%, air sebanyak 1000 ml, alkohol 70%, media MRSB (*de Man Rogosa and sharp broth*), MRSA (*de man Rogosa and sharp agar*), media BP (*Bacteriological Pepton*), aseton teknis, aquadest, reagen, PDF steril, CaCO<sub>3</sub>, Media DPPH, Vit C.

#### **3.3 Metode Penelitian**

Metode penelitian ini bersifat eksperimen laboratorium dengan faktor tunggal cara fermentasi rebung dibagi 3 perlakuan yaitu (P1) 100 gram rebung dilakukan fermentasi asinan rebung dengan suhu 15°C, (P2) 100 gram rebung dilakukan fermentasi dengan suhu 37°C, dan (P3) 100 gram rebung dilakukan fermentasi dengan suhu 40°C. Ketiga perlakuan diinkubasi selama 72 jam dengan 4x pengulangan. Pada saat fermentasi rebung ditambahkan garam sebanyak 2,5% pada masing-masing perlakuan, setelah itu rebung diuji aktivitas antioksidan.

### 3.3.1 Pengolahan Asinan Rebung

Buat asinan terlebih dahulu terdiri dari rebung yang telah dibersihkan sebanyak 100g, cabai merah, bawang putih yang dimasukkan ke dalam toples yang telah terisi air yang telah matang lalu diaduk sambil ditaburi garam sebanyak 2,5%, kemudian potong-potong rebungnya dan dimasukkan satu per satu ke dalam toples kemudian ditutup hingga rapat. Proses fermentasi belangasung selama 3 hari pada variasi suhu (15°C, 37°C, 40°C).

### 3.3.2 Isolasi Bakteri

Media isolasi tertentu, yang sering dikenal sebagai media selektif, digunakan dalam isolasi BAL. Karena keunikannya, media selektif ini digunakan untuk menumbuhkan dan mempertahankan mikroorganisme tertentu, khususnya BAL. Hanya bakteri tertentu yang dapat tumbuh subur pada media ini. MRS agar atau *de Man Rogosa Sharpe Agar* ialah media yang digunakan dalam isolasi BAL.

Teknik pengenceran tuang digunakan dengan menggunakan media *de Man Rogosa dan Sharpe* (MRS) untuk mengisolasi Bakteri Asam Laktat (BAL) dari asinan rebung. Diambil asinan rebung menggunakan spatula secara aseptis dibawah LAF, lalu dicampur pada tabung reaksi yang telah berisi 9 mL media MRSB lalu dihomogenkan pada vortex hingga getarannya sampai ke dasar tabung agar inokulum tercampur dengan sempurna, kemudian pada suhu 37°C inokulum diinkubasi 48 jam. Untuk menghasilkan pengenceran  $10^{-1}$ , hasil inkubasi dikumpulkan dengan penambahan 1 mL dan ditambahkan ke dalam tabung yang berisi 9 mL medium PDF steril. Tabung kemudian di vortex selama 30 detik untuk menghomogenkan bahan. Diambil kembali hingga 1 mL dari pengenceran  $10^{-1}$ , ditambahkan ke dalam tabung berikutnya yang berisi 9 mL medium PDF steril, kemudian divortex selama 30 detik untuk membuat pengenceran  $10^{-2}$ . Distilasi dilakukan hingga diperoleh pengenceran  $10^{-6}$ . Pengenceran  $10^{-2}$  sampai  $10^{-6}$  dipipet 1 mL dan dimasukkan masing-masing ke cawan petri steril kemudian dituangkan sebanyak  $\pm 15$  mL media MRSA+CaCO<sub>3</sub> 1%, dihomogenkan dengan menggerakkan membentuk angka diatas meja. Setelah itu dibiarkan hingga padat dan lanjut diinkubasi di suhu 37°C selama 48 jam dan posisinya dibalik. Bakteri asam laktat diasumsikan sebagai isolat yang memiliki zona berbeda di sekitar

koloni. Dengan menggunakan Quebec Colony Counter, koloni yang tumbuh di atas cawan petri dihitung sebagai total bakteri asam laktat per gram asinan rebung dengan cara mengalikan jumlah koloni per cawan dengan nilai pengenceran. (Ernawati, 2012).

### 3.3.3 Uji Antioksidan

Dengan menggunakan teknik DPPH (2,2-Difenil-1-Pikrilhidrazil), bahan kimia antioksidan yang ada dalam sampel dan pembanding vitamin C direaksikan untuk menentukan aktivitas antioksidan. Nilai IC50 dan % Penghambatan digunakan untuk menghitung aktivitas antioksidan.

Sebanyak 0,2 ml dari setiap sampel larutan uji (sampel uji ekstrak kental, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dengan konsentrasi yang berbeda dan larutan pembanding dengan konsentrasi yang berbeda dipipet ke dalam botol untuk uji antioksidan. Labu ukur 250 ml yang berisi 5 mg DPPH diisi dengan metanol hingga batas yang ditunjukkan, dan campuran tersebut diaduk dengan baik untuk menghasilkan konsentrasi larutan DPPH 0,05 mM. 0,2 ml metanol ditambahkan ke dalam 3,8 ml larutan DPPH 0,05 mM. Setelah disimpan dalam keadaan gelap dan jauh dari cahaya selama tiga puluh menit, absorbansi diukur dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang antara 515 dan 520 nm sampai panjang gelombang maksimum tercapai.

Sebelum reaksi, absorbansi DPPH diukur sebagai kontrol dengan memipet 0,2 ml metanol dan menambahkan 0,05 mM DPPH dalam volume 3,8 ml. Absorbansi kemudian diukur setelah 30 menit, untuk setiap sampel uji dan pembanding. Absorbansi DPPH yang direaksikan dengan sampel dan larutan uji pembanding diukur dengan memipet 0,2 ml larutan uji (ekstrak kental, fraksi n-heksana, fraksi etil asetat, dan fraksi air) dan larutan pembanding yang telah disiapkan, diikuti dengan penambahan 3,8 ml larutan DPPH 0,05 mM. Sampel kemudian dibiarkan selama 30 menit di tempat yang gelap dan terlindung dari cahaya.

Dengan menghitung persentase penghambatan serapan DPPH menggunakan rumus ini, jumlah penghambatan serapan radikal DPPH digunakan untuk memperkirakan aktivitas antioksidan sampel:

$$\% \text{ Inhibisi} = \frac{\text{Awal} - \text{Asetelah reaksi}}{\text{Asetelah reaksi}} \times 100\%$$

Keterangan:

Awal = Absorbansi DPPH kontrol pada  $\lambda$  maksimum sebelum direaksikan dengan larutan uji.

Setelah reaksi = Absorbansi DPPH pada  $\lambda$  maksimum setelah direaksikan dengan larutan sampel uji dan pembanding.

Pertama, persamaan garis yang menghubungkan persentase penghambatan dengan konsentrasi larutan uji masing-masing sampel (100 ppm, 80 ppm, 60 ppm, 40 ppm, dan 20 ppm) dan vitamin C pembanding (25 ppm, 20 ppm, 15 ppm, 10 ppm, dan 5 ppm) dibuat untuk mendapatkan nilai IC<sub>50</sub>. Persamaan garis regresi linier korelasi I dengan K digunakan untuk menentukan konsentrasi larutan uji yang dapat menghasilkan penghambatan radikal bebas (%inhibisi) senilai 50, yang dikenal sebagai IC<sub>50</sub>. Rumus untuk perhitungan ini adalah:

$$y = ax + b$$

Keterangan:  $y = 50$

$x =$  Konsentrasi larutan uji (K).

### 3.3.4 Analisis Data

Data yang terkumpul dianalisis secara statistik menggunakan uji analisis varians satu arah (ANOVA satu arah); jika uji tersebut memberikan hasil yang signifikan, uji *Duncan* digunakan untuk menentukan hasilnya.

SUMATERA UTARA MEDAN