

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 waktu dan Lokasi Penelitian**

Penelitian ini akan dilakukan pada bulan Juli 2024 dan akan dilaksanakan di beberapa lokasi berbeda yaitu:

1. Identifikasi buah Stroberi (*Fragaria* spp.) dilaksanakan di Laboratorium Herbarium Medanense FMIPA Universitas Sumatera Utara. Jl. Bioteknologi No.1, Padang Bulan Kec. Medan Baru, Kota Medan, Sumatera Utara.
2. Pembuatan kombucha sari buah stroberi (*Fragaria* spp.) dan uji aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Streptococcus Mutans* dan *Basillus cereus* dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara. Jl. Lap. Golf No.120, Kp. Tengah, Kec. Pancur Batu, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara 20353.
3. Uji kadar Alkohol Kombucha Sari Buah Stroberi (*Fragaria x anananssa*) dilaksanakan di Balai Standardisasi dan Pelayanan Jasa Industri Medan.
4. Uji Viskositas Kombucha Sari Buah Stroberi (*Fragaria x anananssa*) dilaksanakan di Laboratorium Bioproses Politeknik Kimia Industri Medan. Jl. Medan Tenggara, No VII Medan, Sumatera Utara

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

##### **3.2.1 Alat**

Alat yang di gunakan untuk penelitian ini meliputi :blender,saringan laminar air flow, pH meter, timbangan analitik, autoklaf, jarum ose, mikroskop, *hotplate*, *magneticstirre*, pipettes, *beakerglass*, oven, incubator, penjepit tabung, batang pengaduk, bunsen, jangka sorong, erlenmayer, *cover glass*, gunting, pisau, cawan petri, tabung reaksi, spatula, tabung reaksi dan *object glass*.

##### **3.2.2 Bahan**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi stroberi 3kg,kultur kombucha,gula pasir, alkohol, media NA (*Nutrient Agar*), Media MHA (*Muller HintonAgar*),kapas, iodine, krista vioelet, lugol, safranin, *demetil sulfloksida* (DMSO), dan aqudest.

### **3.3 Pengambilan Sampel**

Sampel penelitian ini diambil di beberapa tempat berbeda meliputi :

1. Buah stroberi diambil di perkebunan dari perkebunan Uci Deleng Singkut Sempajaya, Kec. Berastagi, Kabupaten Karo, Sumatera Utara.
2. Starter kombucha pada penelitian ini diperoleh dari indokombucha medan
3. Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Bacillus cereus* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Sumatera Utara dan Jl. Lap. Golf No.120, Kp. Tengah, Kec. Pancur Batu, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara.

### **3.4 Metode Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental kualitatif dan kuantitatif. Teknik ini digunakan karena pengujian dilaksanakan secara eksperimental berbasis laboratorium. Metode eksperimental ini dilakukan untuk melihat apakah produk yang diberikan peneliti sesuai. Selain itu, data digunakan untuk keterkaitan dengan analisis kualitatif dan kuantitatif.

### **3.5 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan beberapa penambahan sari buah stroberi dengan 4 taraf perlakuan yakni konsentrasi sari buah ( 20%,30%,40% ,dan 50%). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali untuk kontrol positif berupa kloramfenikol 1%, dan kontrol negatif dengan DMSO (*Dimetil Sulfoloksida*)

### **3.6 Prosedur Penelitian**

#### **3.6.1 Identifikasi Tanaman Stroberi**

Menurut Simpson ( 2006) identifikasi tumbuhan bertujuan untuk mengetahui identitas tanaman. Identifikasi tanaman dapat dilakukan dengan beberapa tahapan yakni mendeskripsikan tanaman dengan daftar kemungkinan. Identifikasi tanaman stroberi dilakukan di Laboratorium Herbarium Medanense FMIPA Universitas Sumatera Utara. Jl. Bioteknologi No.1, Padang Bulan Kec. Medan Baru, Kota Medan, Sumatera Utara, bertujuan untuk mengetahui taksonomi dari sampel buah stroberi.

### 3.6.2 Pembuatan Sari Buah Stroberi

Pembuatan sari buah stroberi diperoleh dari metode (Sa'adah 2019) meliputi proses sebagai berikut: disiapkan buah stroberi sebanyak 4kg kemudian dicuci hingga bersih, dipotongan buah menjadi beberapa bagian kecil untuk mempercepat proses penghalusan, proses penghancuran dilakukan menggunakan blender, ditambahkan air dengan perbandingan 4kg stroberi :1liter air. Haluskan buah secara merata kemudian disaring dengan menggunakan kain saring. Hasil saringan (filtrate) didiamkan selama 1 jam, untuk mengendapkan padatan-padatan yang masih ada pada filtrat. Kemudian yang diambil hanya bagian yang jernih. Sari buah yang diperoleh kemudian ditambahkan gula sebanyak 100 gram atau lebih untuk setiap liternya, tergantung dari tingkat kemanisan buah yang digunakan dan tingkat kemanisan minuman sari buah yang dikehendaki. Sari buah selanjutnya dimasak pada suhu 90°C selama 15-20 menit (Sa'adah and Estiasih, 2019).

Adapun ketentuan pembuatan konsentrasi setiap sari buah merujuk pada penelitian yang telah dilakukan (Widhowati,2021), dimana pembuatan larutan dari sari stroberi 20% memiliki komposisi 20ml sari buah stroberi dalam 100ml aquadest steril, larutan stroberi 40% memiliki komposisi 40ml sari buah dalam 100ml aquadest steril. Dipanaskan pada suhu 80°C selama 5 menit hingga mendidih kemudian didinginkan hingga suhu mencapai 28°C dengan waktu kurang lebih 2 jam (Rosita *et al.*, 2021)

### 3.6.3 Sterilisasi Alat

Alat-alat dan media yang akan digunakan terlebih dahulu harus disterilkan untuk menghindari terjadinya pertumbuhan dan pencemaran dari mikroorganisme yang tidak diharapkan. Sterilisasi dapat digunakan dengan tiga cara yaitu sterilisasi udara kering, sterilisasi uap air panas, dan sterilisasi uap air panas bertekanan. Sterilisasi dengan udara kering biasanya menggunakan oven. Alat ini digunakan untuk mensterilkan alat-alat gelas, seperti erlenmeyer, petridish, tabung reaksi, dan alat gelas lainnya. Suhu pada sterilisasi kering umumnya 170- 180°C selama paling sebentar 2 jam. Sterilisasi dengan uap air panas yang bertekanan, alat yang digunakan adalah autoklaf yang dilengkapi dengan katup pengaman.

Alat ini mempunyai tekanan 2 atm dan suhu 121°C selama 15 menit (M. Azizah *et al.*, 2020)

#### **3.6.4 Pembuatan Media MHA (*Muller Hinton Agar*)**

Pembuatan media MHA diawali dengan menimbang MHA sebanyak 38 gram kemudian dilarutkan dalam 1000 ml aquades, dipanaskan hingga mendidih dan homogen. Selanjutnya media MHA disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121°C. Lalu media dituangkan ke dalam 28 tabung reaksi dengan volume 15 ml (Maulana *et al.*, 2021).

#### **3.6.5 Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)**

Pembuatan media *Nutrient Agar* (NA) dimulai dengan menimbang media Nutrient Agar (NA) sebanyak 2 gram, masukkan 100 ml aquadest ke dalam wadah yang sudah berisi Nutrient Agar (NA), panaskan hingga larut, media yang sudah larut kemudian disterilkan di *autoclave* suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit, masukkan media Nutrient Agar (NA) ke dalam cawan petri yang sudah steril (Susanti *et al.*, 2022).

#### **3.6.6 Peremajaan Bakteri *Streptococcus mutans* dan *Bacillus cereus***

Peremajaan bakteri bertujuan agar bakteri memulai metabolisme kembali setelah penyiapan. Peremajaan bakteri dilakukan dengan mengambil satu ose biakan murni bakteri kemudian digores pada media *Nutrient Agar*, kemudian diinkubasi pada suhu 37 derajat celcius selama 24 jam. Biakan bakteri murni diremajakan secara aseptis yaitu dengan mendekatkan mulut tabung reaksi pada nyala api dalam *Laminar Air Flow* (LAF) Setelah itu, media dalam tabung reaksi yang berisi bakteri ditutup rapat dengan menggunakan kapas.

#### **3.6.7 Pewarnaan Gram**

Pewarnaan Gram dilakukan untuk mengetahui morfologi bakteri dan sifat gramnya. Pewarnaan Gram menggunakan empat macam cat yakni Gram A (Kristal violet), Gram B (Lugol), Gram C (alkohol 95%) dan Gram D (Safranin). Bakteri yang mempunyai sifat Gram positif akan berwarna biru keunguan sedangkan bakteri yang mempunyai sifat Gram negatif berwarna merah. Prosedur pewarnaan gram melibatkan serangkaian langkah, dimulai dengan langkah awal membersihkan kaca benda dengan menggunakan alkohol 70%. Selanjutnya, kaca

benda ditempelkan pada pembakar bunsen dan dibiarkan mengering. Satu kultur murni secara aseptik diperoleh dan setelah itu diletakkan di atas kaca objek, yang kemudian ditempelkan dengan aman ke pembakar bunsen.

Selanjutnya kaca objek diberi pewarna kristal violet, untuk memastikan bahwa semua area kultur tertutupi dengan baik. Kemudian didiamkan pada suhu kamar selama 1 menit, diikuti dengan pencucian lembut dengan air suling selama 5 detik, artefak kaca yang menunjukkan rona biru menjadi sasaran aplikasi lugol, diikuti dengan periode inkubasi yang ditentukan selama 1-2 menit pada kondisi sekitar. Selanjutnya, prosedur pembilasan singkat dengan air suling dilakukan selama 5 detik. Selanjutnya, proses dekolorisasi dilakukan dengan menggunakan larutan alkohol 95%, diikuti dengan pembilasan berikutnya dengan air suling selama 5 detik, sehingga menghentikan proses dekolorisasi

Selanjutnya, objek kaca diperlakukan secara lembut dengan larutan safranin, diikuti dengan periode istirahat selama satu menit. Kemudian dibilas secara menyeluruh dengan air suling selama lima detik dan selanjutnya dikeringkan melalui paparan udara. Selanjutnya, bakteri tersebut menjalani pemeriksaan mikroskopis untuk memastikan karakteristik morfologi mereka dalam kaitannya dengan pewarna (Dani *et al.*, 2020).

### **3.7 Pembuatan Kombucha Sari Buah Stroberi**

Pembuatan kombucha sari buah stroberi meliputi proses sebagai berikut: 500ml hasil filtrat sari buah stroberi ditambahkan dengan 50 gram gula, kemudian dituang sebanyak 20 ml starter cair kombucha beserta SCOBY pada setiap konsentrasi, lalu tutup hingga rapat. kombucha siap difermentasi selama 7 hari pada suhu ruang (37°C) dan disimpan pada tempat yang steril dan tidak terpapar cahaya matahari langsung (Fajriyah *et al.*, 2017).

### **3.8 Pembuatan Suspensi Bakteri uji**

Diambil 3 ose biakan murni bakteri streptococcus mutans dan bacillus cereus di masukan ke dalam tabung reaksi yang sebelumnya sudah diisi dengan NaCl 0,9%. Kemudian dihomogenkan dengan cara dikocok selama kurang lebih 10 detik, lalu dilakukan penghomogenan Kembali menggunakan vortex hingga warna berubah menjadi keruh. Setelah divorteks suspense bakteri uji siap digores pada media MHA.

### 3.8.1 Pembuatan Antibiotik

Antibiotik yang digunakan pada penelitian ini berupa klorafenikol kapsul. 1 kapsul klorafenikol dilarutkan kedalam 5 ml aqudest steril.

### 3.8 .2 Uji Antibakteri Menggunakan Metode Difusi Cakram

Tahapan uji antibakteri dilakukan pada hari ke 7 dengan metode difusi cakram meliputi proses sebagai berikut: disiapkan cawan petri sebanyak 28 buah, dituangkan media MHA (*Muller Hinton Agar*) pada masing-masing cawan sebanyak 15 ml, ditunggu media sampai kondisi padat, dimasukkan lidi kapas steril pada bagian dalam suspense bakteri uji yaitu *Streptococcus mutans*, dan *Bacillus* Kemudian suspense bakteri uji di gores pada permukaan media MHA ditempel disk yang sudah direndam pada sediaan larutan fermentasi kombucha sari buah stroberi dengan konsentrasi sari buah 20%, 30%, 40%, dan 50%. diinkubasi selama 24 jam, dilakukan pengukuran diameter zona hambat pada masing-masing konsentrasi dari fermentasi kombucha sari buah stroberi beserta kontrol positif dan negatif (Abdilah *et al.*, 2022).

Perhitungan diameter zona hambat bertujuan untuk mengetahui adanya daya hambat yang terbentuk pada suatu agen antibakteri. Perhitungan daya hambat dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam, kemudian dilakukan pengukuran diameter zona hambat di sekitar cakram kertas pada masing masing kelompok penelitian dengan menggunakan rasio perbandingan antara besar diameter terluar zona hambat dengan diameter kertas cakram menggunakan jangka sorong. Pengukuran dilakukan dengan menghitung diameter rata-rata zona hambat dengan rumus hasil pengurangan diameter vertikal (a) dan diameter kertas saring (c) dijumlahkan dengan hasil pengurangan diameter horizontal (b) dan diameter kertas saring (c) lalu dibagi 2. (Tjiptoningsih, 2021). Menurut Nur et al, (2018) hasil pada zona bening dapat dikategorikan kedalam beberapa kategori, yaitu lemah ( $\leq 5$  mm), sedang (6-10 mm), kuat (11– 20 mm) dan sangat kuat ( $>20$  mm) (Rahmi Fadhilah et al., 2023).

### **3.9 Pengujian pH Kombucha Sari Buah Stroberi**

Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH meter, dimana sebelum digunakan, terlebih dahulu dilakukan kalibrasi menggunakan buffer Ph 6 dan 9, lalu di keringkan pH meter yang sudah di kalibrasi, Nilai pH diperoleh setelah mencelupkan 25ml larutan kombucha. Pengujian pH dilakukan pada hari ke 7 (Lestari & Sa'diyah, 2020)

### **3.10 Pengujian Organoleptik**

Analisis organoleptis pada penelitian ini dilakukan pada hari ke- 7 pengujian ini bertujuan untuk mengamati perubahan warna rasa dan aroma.15 orang panelis, merupakan mahasiswa Universitas Islam Negeri Sumatera Utara baik laki laki maupun Perempuan. Pengujian diawali dengan memberikan 10 ml kombucha sari stroberi, setelah itu para panelis akan di arahkan untuk menuliskan skala penilaian.

### **3.11 Uji Viskositas**

Nilai viskositas ditentukan dengan cara memasukkan sampel kombucha pada pipa ostwald kemudian kombucha diisap hingga mencapai bagian atas tanda tera setelah itu, lubang pipa ostwald dibuka secara bersamaan dan mengaktifkan pewaktu untuk menghitung lama waktu yang dibutuhkan kombucha untuk turun mencapai tanda tera bawah. Satuan viskositas dinyatakan dalam bentuk cP.

### **3.12 Uji Skrining Fitokimia Kombucha Sari**

#### **1. Uji Flavonoid**

Identifikasi senyawa flavonoid dilakukan dengan menggunakan pereaksi serbuk magnesium (Mg) dan asam klorida pekat (HCl). Penambahan serbuk Mg bertujuan agar membentuk ikatan dengan gugus karbonil pada senyawa flavonoid. Penambahan HCl bertujuan untuk membentuk garam flavilium yang ditandai dengan perubahan warna menjadi merah jingga.

#### **2. Uji Tanin**

Uji tanin dilakukan dengan menambahkan larutan  $FeCl_3$  5 % terhadap 5ml sampel. Sampel yang mengandung polifenol akan membentuk senyawa kompleks  $Fe^3$  dengan ikatan koordinasi dengan terjadinya perubahan warna menjadi biru kehitaman atau hijau kecoklatan. Hal ini terjadi karena atom O pada tanin dapat

mendonorkan pasangan elektron bebasnya ke  $\text{Fe}^{3+}$  yang memiliki orbital d kosong membnetuk ikatan kovalen koordinat untuk menjadi suatu senyawa kompleks

### 3. Uji saponin

Uji saponin dilakukan dengan melarutkan 5ml sampel dalam akuades kemudian dipanaskan selama 15 menit lalu dikocok selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang stabil selama kurang lebih 10 menit dan ditambahkan beberapa tetes asam klorida 2 N, maka sampel positif mengandung saponin.

### 3.13 Uji Alkohol

Metode dalam pengujian alkohol merujuka pada metode satria dan wildan (2023) dimana menggunakan alkoholmeter, dimasukkan sampel kedalam gelas ukuran berukuran 100 ml . Lalu alkoholmeter dimasukkan kedalam gelas yang sudah berisi sampel dan dilakukan pencatatan nilai yang terbaca



UNIVERSITAS ISLAM NEGERI  
SUMATERA UTARA MEDAN