

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini termasuk dalam penelitian eksperimental yang ditekankan pada stabilitas sensoris, pH, dan mikrobiologi kombucha daun tin (*Ficus carica*) pada penyimpanan suhu rendah dalam *refrigerator* selama 6 minggu. Dari hasil yang diperoleh akan dilakukan pengujian terhadap stabilitas sensoris, pH, dan mikrobiologi kombucha daun tin pada penyimpanan suhu rendah dengan 2 perlakuan dan 3 kali replikasi sehingga diperoleh 6 satuan percobaan. Tujuan penelitian ini untuk mengetahui stabilitas sensoris, pH, dan mikrobiologi kombucha daun tin (*Ficus carica*) pada penyimpanan suhu rendah selama 6 minggu. Penelitian ini meliputi persiapan sampel, persiapan alat dan bahan, kemudian melakukan pembuatan seduhan daun tin dan fermentasi dengan menggunakan kultur kombucha selama 12 hari lalu diakhiri dengan dilakukan pengujian stabilitas sensoris menggunakan metode uji hedonik dengan memberikan lembar penilaian kepada 25 orang panelis tidak terlatih pada semua perlakuan; stabilitas pH dari produk kombucha daun tin dengan 3 kali replikasi; dan mikrobiologi kombucha daun tin dengan 3 kali replikasi yaitu melakukan perhitungan total mikroba menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*) dan media PCA (*Plate Count Agar*). Data yang didapatkan akan di analisa dan membuat kesimpulan.

3.2 Populasi Dan Sampel Penelitian

3.2.1 Populasi Penelitian

Populasi dari penelitian ini adalah kombucha daun tin.

3.2.2 Sampel Penelitian

Sampel dari penelitian ini adalah kombucha daun tin sebanyak 3850 mL untuk setiap perlakuan yang meliputi pengujian sensoris kurang lebih sebanyak 3750 mL, pengujian pH sebanyak 90 mL, dan perhitungan total mikroba sebanyak 3 mL yang diambil terlebih dahulu sebelum pengujian pH.

3.3 Lokasi Dan Waktu Penelitian

3.3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang.

3.3.2 Waktu Penelitian

Waktu penelitian dimulai dari proses penyusunan proposal bulan November 2018 sampai dengan Juli 2019.

3.4 Definisi Operasioanal Variabel

Definisi operasional variabel dalam penelitian adalah sebagai berikut :

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Sub Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukuran	Skala Ukur
Stabilitas sensoris kombucha daun tin	-	Karakteristik dari produk kombucha daun tin melalui panca indera pada penyimpanan suhu rendah	Panca indera	Warna, rasa, dan aroma	Nominal
Stabilitas pH kombucha daun tin	-	Derajat keasaman dari kombucha daun tin pada penyimpanan suhu rendah	pH meter	Tingkat keasaman 3 – 5 (Naland, 2008) dalam (Umami, 2018)	Ordinal
Stabilitas mikrobiologi kombucha daun tin	Total Mikroba	Jumlah total mikroba yang terdapat dalam kombucha daun tin pada penyimpanan suhu rendah	TPC (<i>Total Plate Count</i>)	Jumlah total mikroba dalam satuan cfu/mL.	Nominal

3.5 Alat dan Bahan

Adapun alat dan bahan yang digunakan untuk penelitian ini sebagai berikut:

1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah autoklaf, oven, inkubator, *vortex homogenizer*, LAF (*Laminar Air Flow*), timbangan analitik, bunsen, botol semprot alkohol, toples kaca, glassware, pipet mikro dan blue tip, termometer, pH meter, wadah cup kombucha daun tin.

2. Bahan

Bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah simplisia daun tin, kultur kombucha, gula pasir, alkohol 70%, NaCl 0,9%, media PCA (*Plate Count Agar*), aquadest.

3.6 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian yang dilakukan dalam pengumpulan data meliputi pembelian bahan baku, pembuatan simplisia daun tin, sterilisasi alat, pembuatan seduhan daun tin dan fermentasi menggunakan kultur kombucha, pengujian stabilitas sensoris, pH, dan mikrobiologi kombucha dimulai dari pengujian sensoris dengan metode uji hedonik menggunakan lembar penilaian (warna, rasa, dan aroma), pengujian pH, dan perhitungan total mikroba dengan metode TPC (*Total Plate Count*) dan media PCA (*Plate Count Agar*).

3.6.1 Pembuatan Simplisia Daun Tin

Pembuatan simplisia daun tin dapat dilakukan dengan mengacu pada penelitian sebelumnya (Umami, 2018), dilakukan modifikasi yaitu sebagai berikut:

1. Dilakukan pengumpulan bahan baku yaitu daun tin varietas *green yordania* dengan memilih daun yang masih muda hampir ke tua dan berwarna hijau segar.
2. Disortasi basah, setelah pemanenan daun di sortasi yaitu dengan cara membersihkan kotoran yang masih menempel pada daun serta pemilihan daun yang sehat.
3. Dicuci bersih daun dengan di alirkan air bersih dan perendaman, daun diposisikan dalam keadaan berdiri selama 1 x 24 jam untuk menghilangkan getah dari daun tin.

4. Dilakukan perajangan daun tin dan pengeringan, dengan cara menghamparkan daun tin diatas paranet dan dipanaskan dengan sinar matahari langsung.
5. Disortasi kering, dipilih daun yang sudah kering dan daun yang masih basah serta memisahkan daun dari kotoran yang masih menempel.

3.6.2 Pembuatan Seduhan Daun Tin

Pembuatan teh asam daun tin mengacu pada penelitian sebelumnya (Umami, 2018), yaitu sebagai berikut :

1. Diambil simplisia sebanyak 7 g.
2. Diseduh dengan air hangat (suhu 60-80°C) sebanyak 1000 mL.
3. Disaring hasil seduhan setelah \pm 10 menit dan ditambahkan gula pasir 100 g.
4. Ditunggu hingga suhu hasil seduhan sesuai dengan suhu kamar yaitu suhu 25-27°C.

3.6.3 Fermentasi Kombucha Daun Tin

Fermentasi kombucha daun tin dilakukan dengan mengacu pada penelitian sebelumnya (Umami, 2018), yaitu sebagai berikut :

1. Ditambahkan 1 lembar starter kombucha pada seduhan daun tin.
2. Dipindahkan ke stoples kaca.
3. Difermentasi selama 12 hari.

3.6.4 Pengujian Stabilitas Sensoris, pH dan Mikrobiologi kombucha Daun Tin

3.6.4.1 Pengujian Sensoris

Prosedur pengujian organoleptis menurut (Umami, 2018), dilakukan modifikasi yaitu sebagai berikut :

1. Digunakan lembar penilaian yang diberikan pada 25 orang panelis tidak terlatih pada setiap perlakuan (lihat Lampiran 1).
2. Diberikan 3 sampel produk kombucha daun tin masing – masing sebanyak 50 mL kepada panelis.
3. Diberikan daftar presensi panelis untuk mengisi data nama dan tanda tangan.
4. Pengujian menggunakan indera manusia sebagai alat utama untuk mengetahui karakteristik terhadap suatu produk yang ditentukan dengan skala nominal 1 sampai 4 dengan keterangan (1: Sangat Tidak Suka), (2: Cukup Suka), (3: Suka), dan (4: Sangat Suka) meliputi rasa, bau, dan aroma dari kombucha daun

tin sehingga diperoleh data dan dapat dihitung menggunakan rumus uji hedonik.

3.6.4.2 Pengujian pH

Prosedur pengujian pH menurut (Umami, 2018), yaitu sebagai berikut :

1. Diambil 30 mL sampel yang telah dihomogenkan dan tempatkan pada beaker glass ukuran 50 mL.
2. pH meter dikalibrasi dengan larutan buffer pH 7 dan pH 4 lalu dibersihkan dengan aquadest.
3. Elektroda gelas pada alat pH meter dicelupkan ke dalam sampel dan dibaca angka yang tertera.
4. Setiap selesai pengukuran pH maka elektroda gelas pada alat pH meter harus dibersihkan dengan aquadest.

3.6.4.3 Perhitungan Total Mikroba

Prosedur pengenceran bertingkat atau berseri sampel menurut (Hakim, 2016) yang dimodifikasi yaitu sebagai berikut :

1. Dimasukkan sampel kombucha daun tin sebanyak 1 mL ke dalam tabung pengenceran pertama ($1/10$ atau 10^{-1}) secara aseptis yang sudah terdapat 9 mL larutan NaCl 0,9%.
2. Dilarutkan dengan mengocoknya sampai homogen atau menggunakan *vortex homogenizer*.
3. Diambil 1 mL dari tabung 10^{-1} dengan pipet ukur, pindahkan ke tabung 10^{-2} secara aseptis kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex homogenizer*.
4. Pemindehan dilanjutkan hingga tabung pengenceran terakhir yaitu 10^{-5} dengan cara yang sama.
5. Hal yang perlu diingat bahwa *blue tip* yang digunakan harus selalu diganti, artinya setiap tingkat pengenceran digunakan *blue tip* steril yang berbeda atau baru. Prinsipnya bahwa *blue tip* tidak perlu diganti jika memindahkan cairan dari sumber yang sama.

Prosedur penanaman mikroba pada media menggunakan metode tuang (*pour plate*) menurut (Rofi'i, 2009) yang dimodifikasi yaitu sebagai berikut :

1. Dibuat media PCA berdasarkan komposisi dan perhitungan media sesuai standar (lihat Lampiran 2 dan Lampiran 3).

2. Diteteskan 1 mL suspensi sel (hasil pengenceran) kedalam cawan petri kosong yang telah steril secara aseptis.
3. Dituangkan media PCA yang hangat (suhu 40-45°C) sebanyak 10-15 mL ke cawan yang telah berisi suspensi bakteri tersebut dan tutup.
4. Dihomogenkan campuran media dan suspensi dengan cara goyangkan atau putar cawan petri secara perlahan membentuk angka delapan (8) di atas meja kerja dalam kondisi aseptis, didiamkan agar memadat.
5. Setelah agar memadat cawan petri diinkubasi pada suhu 35-37°C dengan posisi terbalik pada suhu kamar ataupun inkubator selama 18-24 jam.
6. Diamati pertumbuhan mikroba.

3.7 Analisis Data

Analisis data dalam penelitian ini untuk mengetahui stabilitas sensoris, pH, dan mikrobiologi kombucha daun tin pada penyimpanan suhu rendah selama 6 minggu. Pengujian stabilitas kombucha daun tin meliputi uji sensorik dengan metode uji hedonik (warna, rasa, dan aroma), uji pH dengan pH meter, dan uji mikrobiologi (perhitungan total mikroba) dengan metode TPC (*Total Plate Count*). Data hasil stabilitas sensoris kombucha daun tin akan dianalisa menggunakan metode deskriptif dengan perhitungan rumus uji hedonik. Data hasil stabilitas pH dan perhitungan total mikroba kombucha daun tin akan disajikan dalam bentuk tabel dan kesimpulan deskriptif.