

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu Dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan dari bulan Maret sampai bulan Agustus 2014 di Laboratorium Riset, Laboratorium Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia dan Laboratorium Fisika Dasar Jurusan Pendidikan Fisika FPMIPA UPI.

3.2 Alat Dan Bahan

3.2.1 Alat

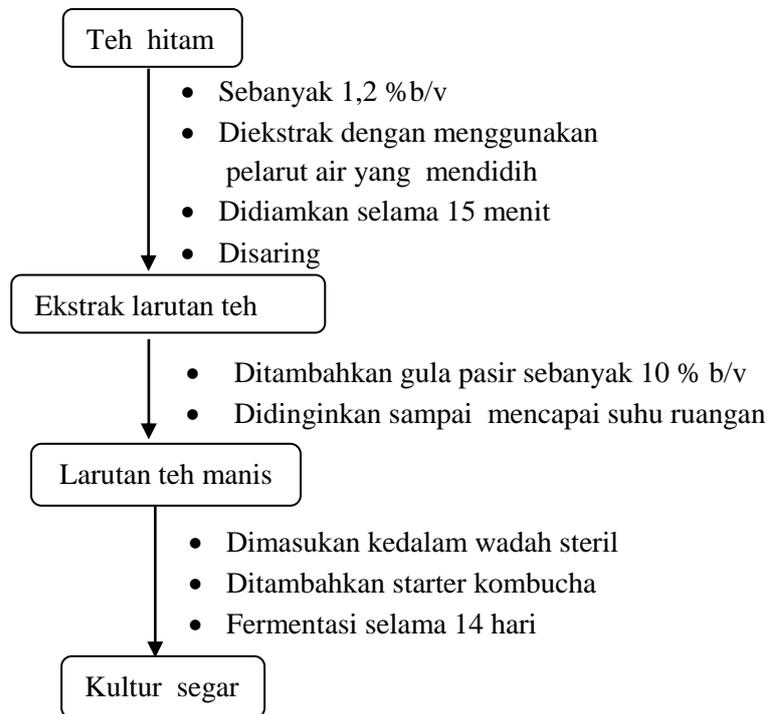
Alat-alat yang digunakan adalah neraca analitik, alat-alat gelas, saringan, pengaduk, termometer, toples, panci, kompor, oven/autoklaf, kain, karet, sliding mikroskop dan spektrofotometer UV-Vis MINI Shimadzu 1240.

3.2.2 Bahan

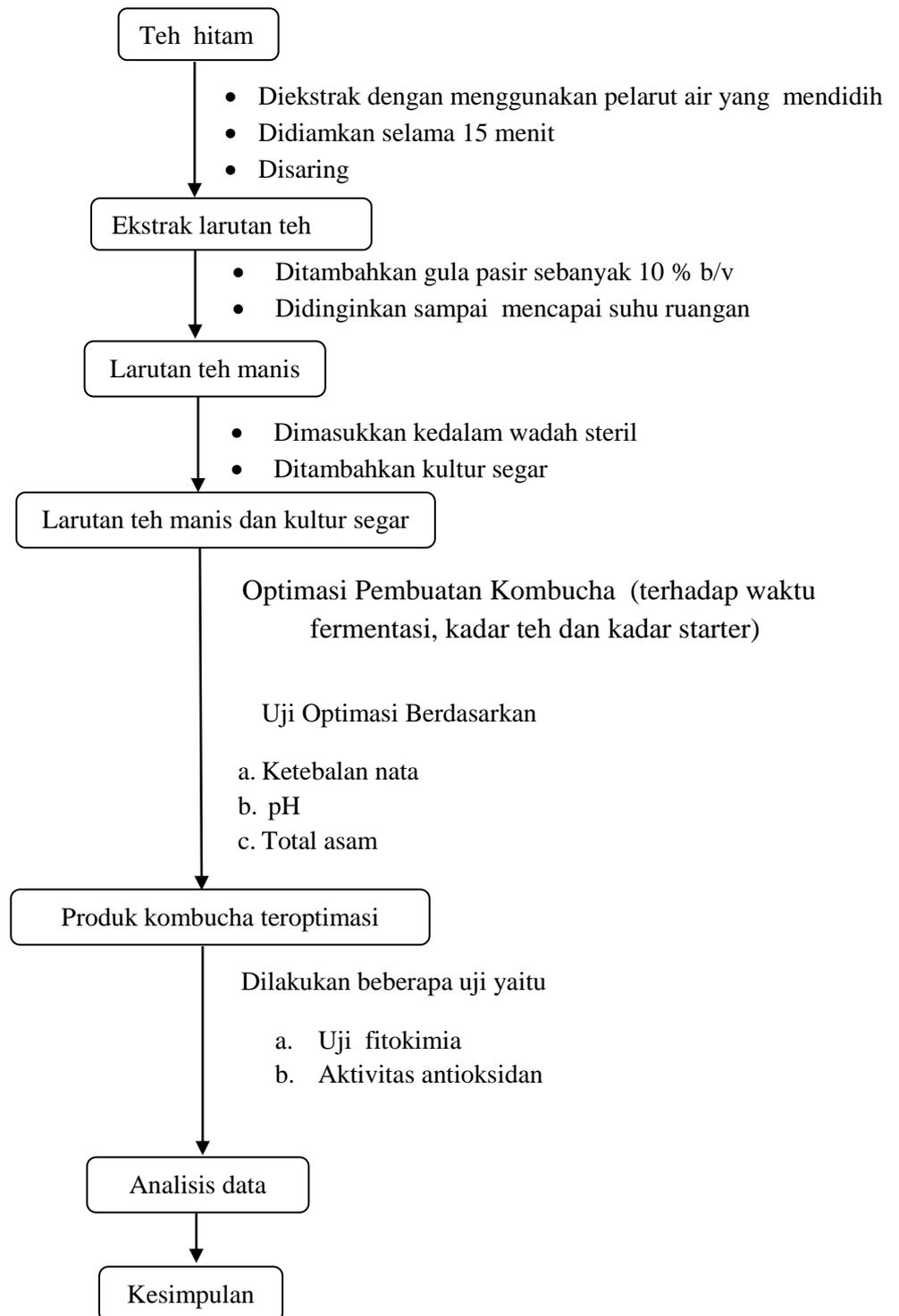
Bahan yang dipakai adalah teh hitam yang diperoleh dari Perkebunan Dayeuh Manggung PT.Perkebunan Nusantara VIII, gula pasir, starter kombucha yang diperoleh dari Indo kombucha, air, aquades, aquabides, etanol 70%, kloroform, pereaksi mayer, serbuk Mg, asam asetat glasial, H₂SO₄ pekat, FeCl₃, HCl pekat, H₂C₂O₄ 0,1 N, NaOH 0,1 N, PP 1%, metanol p.a dan DPPH.

3.3 Bagan Alir penelitian

Penelitian diawali dengan proses perkembangbiakkan kultur yang dapat dimanfaatkan sebagai starter, selanjutnya dipakai kedalam proses pembuatan kombucha. Pembuatan kombucha tersebut, dilakukan optimasi terhadap waktu fermentasi, kadar teh dan kadar starter berdasarkan ketebalan nata. Kombucha yang dihasilkan pada kondisi optimum dilakukan pengujian yang terdiri uji fitokimia serta aktivitas antioksidan. Secara garis besar, tahapan proses penelitian tersebut dapat dilihat dalam dua skema bagan alir sebagai berikut :



Gambar 3.1 Bagan Alir Perkembangbiakkan Kultur



Gambar 3.2 Bagan Alir Pembuatan Kombucha

3.4 Prosedur Kerja

3.4.1 Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat sangat bermanfaat dalam proses kemajuan analisis secara baik dan benar, di mana semua peralatan berada dalam keadaan steril, maksudnya tidak didapatkan mikroba yang tidak diinginkan. Proses sterilisasi ini dapat dilakukan dengan menggunakan oven pada suhu 150 °C selama ±1,5 jam.

3.4.2 Perkembangbiakan Kultur Kombucha

Starter kombucha diperoleh secara komersil, dikembangkan dalam media selama 14 hari. Proses perkembangbiakan dilakukan dengan cara sebagai berikut yaitu membuat larutan ekstrak teh hitam yang ditambahkan dengan gula sebanyak 10 % b/v, kemudian larutan teh manis tersebut dimasukkan kedalam wadah steril dan dilakukan penambahan starter kedalamnya, lalu ditutup dengan kain dan diikat dengan karet selanjutnya didiamkan selama 14 hari pada suhu ruangan kamar.

3.4.3 Optimasi Kombucha

Optimasi teh kombucha dalam penelitian ini menggunakan jenis teh hitam, dalam prosesnya dilakukan optimasi terhadap waktu fermentasi, kadar teh, dan kadar starter. Optimasi terhadap waktu fermentasi, membuat larutan ekstrak teh hitam dengan kadar teh sebanyak 1,2 % b/v dengan pelarut yang digunakan air mendidih dan didiamkan selama 15 menit. Saring ekstrak larutan teh hitam dari ampasnya lalu ditambahkan dengan gula sebanyak 10 % b/v dan gula yang dipakai adalah gula pasir, larutan teh manis tersebut didinginkan sampai mencapai suhu kamar, selanjutnya dimasukkan kedalam wadah toples kaca/botol jar yang telah steril. Setelah larutan teh dimasukkan ke dalam toples kaca, ditambahkan starter kombucha sebanyak 3 % b/v dan 10 % v/v lalu tutup toples kaca dengan kain bersih dengan rongga-rongga kecil dan diikat dengan karet gelang lalu dilakukan proses fermentasi selama 16 hari yang disimpan pada suhu ruangan. Hasil optimasi ditentukan berdasarkan ketebalan nata, disertai pengecekan terhadap pH dan total asamnya, pengujian dilakukan per 2 hari dan

waktu fermentasi teroptimasi yang diperoleh akan dipakai dalam proses selanjutnya.

Optimasi kadar teh, langkah pembuatan kombucha hampir sama dengan sebelumnya, dimana waktu fermentasi yang dipakai merupakan waktu fermentasi teroptimum. Variabel tetap yang digunakan adalah kadar gula sebanyak 10 % b/v dan kadar starter sebanyak 3 % b/v dan 10 % v/v, optimasi kadar teh yang dipakai sebanyak 0,4 % b/v, 0,8 % b/v, 1,2 % b/v, 1,6 % b/v dan 2 % b/v. Kadar teh teroptimasi yang diperoleh akan dipakai dalam proses selanjutnya.

Optimasi kadar starter, dilakukan dengan menggunakan waktu fermentasi dan kadar teh hasil teroptimasi dengan kadar gula tetap sebanyak 10% b/v, optimasi kadar starter yang dipakai sebanyak 1 %b/v + 10 %v/v, 2 %b/v + 10 %v/v, 3 %b/v + 10 %v/v, 4 %b/v + 10 %v/v dan 5 %b/v + 10 %v/v. Setelah diketahui kondisi optimum, maka untuk selanjutnya pembuatan kombucha dilakukan dengan kadar teh, kadar starter dan lama waktu fermentasi teroptimum.

3.4.4 Pengujian pH

Pengujian dilakukan dengan menggunakan alat pH meter yang telah dikalibrasi dengan buffer pH 4 dan pH 7. Pengukuran sampel dilakukan sebanyak 3 kali.

3.4.5 Pengujian Total Asam Sebagai Asam Asetat

Pengujian dilakukan dengan metoda titrasi asam-basa. Total asam yang terukur dianggap sebagai asam asetat. Diambil 10 mL sampel dan ditimbang, lalu diencerkan menjadi 100 mL. Kemudian diambil 10 mL lalu ditambahkan 3 tetes indikator pp 1% , kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N yang telah distandarisasi terlebih dahulu sampai terbentuk warna merah muda. Total asam tertitrasi (TAT) dinyatakan dalam % asam asetat. Total asam tertitrasi dapat dinyatakan dengan rumus:

$$\text{TAT (\% Asam asetat)} = \frac{V \times N \times P \times \text{BM Asam asetat}}{B} \times 100\%$$

Dimana : V = Jumlah larutan NaOH tertitrasi (mL)

N = Normalitas NaOH

P = Jumlah pengenceran

BM = Berat molekul asam asetat (60)

B = berat sampel (mg)

3.4.6 Pengujian Ketebalan Nata

Pelikel nata yang telah diperoleh diukur ketebalannya dengan cara memisahkan nata tersebut dari medianya kemudian diletakkan di atas plastik mika berwarna yang telah dibersihkan terlebih dahulu. Pengukuran dilakukan dengan menggunakan sliding mikroskop.

3.4.7 Pengujian Fitokimia

3.4.7.1 Pemeriksaan Alkaloid

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambah 5 tetes kloroform dan beberapa tetes pereaksi Mayer. Jika terbentuk endapan putih, maka ekstrak positif mengandung alkaloid.

3.4.7.2 Pemeriksaan Flavonoid

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambah 1 g serbuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid

3.4.7.3 Pemeriksaan Terpenoid dan Steroid

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambah 1 mL asam asetat glasial dan 1 mL H₂SO₄ pekat. Timbulnya warna merah menunjukkan adanya terpenoid. Sedangkan timbulnya perubahan warna violet menjadi biru atau hijau menunjukkan adanya steroid.

3.4.7.4 Pemeriksaan Tanin

Sebanyak 1 mL ekstrak ditambah beberapa tetes FeCl₃ 1 %. Timbulnya warna biru tua menunjukkan adanya tanin.

3.4.8 Pengujian Aktivitas Antioksidan

Uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH dapat dilakukan berdasarkan acuan prosedur dari Garcia, E José *et al* (2012). Pengukuran aktivitas antioksidan pada sampel dapat dilakukan dengan cara memasukan 0,5 mL sampel kedalam botol vial kemudian ditambahkan dengan 3 mL metanol p.a dan 0,3 mL DPPH 0,5 mM. Untuk blanko, terdiri dari 3,3 mL metanol p.a dan 0,5 mL sampel sedangkan kontrol terdiri dari 3,5 mL metanol p.a dan 0,3 mL DPPH 0,5 mM, ketiga tersebut, ditutup lalu diinkubasi selama 100 menit. Proses pengukuran absorbansi dapat terukur dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang maksimal 517 nm.

$$AA \% = 100 - \left\{ \frac{(Abs\ sampel - Abs\ blanko) \times 100}{Abs\ kontrol} \right\}$$

Abs sampel : absorbansi DPPH setelah direaksikan dengan sampel

Abs kontrol : absorbansi DPPH tanpa direaksikan dengan sampel

Abs blanko : absorbansi sampel sebelum direaksikan dengan DPPH