**BAB III**

**METODE PENELITIAN**

**3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan jenis penelitian deskriptif kualitatif dan kauntitatif. Penelitian kualitatif meliputi uji organoleptik dan pengamatan secara makroskopis, mikroskopis dan uji biokimia pada isolat bakteri asam laktat yang telah terpilih dan berhasil di isolasi dari minuman *classic enzyme*, sedangkan penelitian kuantitaif dengan menetapkan % kadar asam laktat pada sampel *classic enzyme* serta menguji isolat bakteri asam laktat yang digunakan sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dengan mangukur zona hambat yang terbentuk.

**3.1.1 Variabel Penelitian**

Variabel bebas merupakan variabel yang menjadi sebab timbulnya perubahan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah sampel minuman *classic enzyme*.

Variabel terikat merupakan variabel yang dipengaruhi atau yang menjadi akibat karena adanya variabel bebas. Variabel terikat pada penelitian ini adalah karakteristik *classic enzyme,* pH, % kadar asam laktat pada sampel *classic enzyme*, identifikasi bakteri asam laktat, isolasi bakteri asam laktat dan aktivitas bakteri asam laktat.

Variabel kontrol dalam penelitian ini terdiri dari media penanaman dan isolat bakteri dalam *classic enzyme* yaitu media MRSA (*De Man Rogosa Sharpe Agar),* MRSB (*De Man Rogosa Sharpe Broth)*, *Staphylococcus aereus* menggunakan media penanaman yaitu *Nutrient Agar* (NA) dan *Muller Hinton Agar* (MHA) suhu inkubasi 37ºC.

### 3.1.2 Parameter Penelitian

Parameter uji karakteristik penampakan, bau, rasa, konsistensi, pH dan % kadar asam laktat pada sampel. Identifikasi bakteri asam laktat dengan pengamatan makroskopik (morfologi koloni berdasarkan bentuk, warna dan ukuran), pengamatan mikroskopik (pewarnaan Gram dan uji endospora), uji biokimia (uji katalase dan uji tipe fermentasi) dan zona hambat yang didapatkan pada aktivitas antibakteri *Staphylococcus aureus*.

### 3.2 Jadwal dan Lokasi Penelitian

### 3.2.1 Lokasi Penelitian

 Penelitian dilakukan di Laboratorium Kesehatan Daerah Sumatera Utara Jl. Williem Iskandar Pasar V Barat I No.4 Medan.

### Jadwal Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Maret 2024 – Juni 2024

* 1. **Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel minuman *classic enzyme*, produk *classic enzyme* Dr.Rose, isolat bakteri *Staphylococcus aereus,* media *de Mann Ragosa Sharpe Agar* (MRSA), media *de Mann Ragosa Sharpe Broth* (MRSB), media *Nutrient Agar* (NA), *Mueller Hinton Agar* (MHA), NaOH 0,05 N, indikator phenolptalein (PP), asam oksalat 0,05 N, aquades steril, alkohol 70%, spirtus, pewarnaan Gram dan endospora (larutan kristal violet, iodium, etanol 96%, safranin, *malachite* hijau, H2O2 3%) alumunium foil, kertas label, tissue, kertas cakram, kapas dan cotton swab steril.

* 1. **Alat**

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah buret, labu ukur, *hot plate,* autoklaf, timbangan analitik, pipet volume, mikroskop, lemari es, tabung durham, vortex, inkubator, *Laminar Air Flow* (LAF) dan peralatan mikroiologi seperti bunsen, *beaker glass*, gelas ukur, spatula, batang pengaduk, korek api, jarum ose, pinset, erlenmeyer, cawan petri, *magnetic stirer,* tabung reaksi, rak tabung reaksi dan kamera untuk dokumentasi.

* 1. **Sampel**

Sampel yang digunakan minuman *classic enzyme* hasil fermentasi alami dari 14 macam buah-buahan segar yang didapat dari beberapa pedagang buah di sekitar kecamatan hamparan perak.

### 3.5.1 Pembuatan *Classic Enzyme*

 Pembuatan *classic enzyme* menggunakan perbandingan komposisi 1:3:10 yaitu 1 bagian madu murni, 3 bagian buah-buahan segar dan 10 bagian air minum yang telah dimasak. Buah-buahan segar terdiri dari 14 macam yaitu : Nenas, apel, pir, anggur, plum, jeruk, strawberry, semangka, buah naga, mangga, papaya, manggis, melon dan jeruk sunkis. Untuk takaran perbandingan 1:3:10 yaitu 1 kg madu murni, 3 kg buah-buahan segar dan 10 liter air masak.

 Buah-buahan segar yang telah dikupas dan dipotong kecil-kecil dibersihkan dicuci lalu ditiriskan samapi air nya kering, kemudian di timbang seluruh campuran buah sebanyak 600 gram dibagi sama rata berat dari 14 macam buah tersebut masing-masing buah ditimbang 43 gram. selanjutnya dimasukkan ke dalam wadah fermentor ditambahkan dengan 2 liter air yang sudah dimasak dan 200 gram madu murni lalu difermentasi dalam keadaan anaerob disimpan di ruangan yang gelap tidak terkena sinar matahari kemudian didiamkan selama 1 tahun. *Classic enzyme* siap dipanen.

* 1. **Prosedur Penelitian**
		1. **Sterilisasi Alat**
1. Oven berfungsi sebagai pengering maupun sterilisasi peralatan dan bahan di laboratorium. Prinsip kerja Oven adalah menggunakan sistem panas kering melalui udara panas pada tekanan atmosfer. Beberapa hal yang harus diperhatikan dalam menggunakan sistem udara panas adalah bahan pengemas, suhu, lama penggunaan, dan tekanan udara. Alat-lat yang akan disterilkan pada oven yaitu alat-alat gelas seperti erlenmeyer, beaker glass, cawan petri, tabung reaksi, gelas ukur, serta alat-alat lainnya yang tahan pemanasan kering disterilkan pada temperatur suhu 160-170°C selama 1 jam (Sulistiyawan, 2019).
2. Autoklaf adalah suatu bejana yang dapat ditutup, yang diisi dengan uap panas dengan tekanan tinggi. Suhu didalamnya dapat mencapai 115°C hingga 125°C dan tekanan uapnya mencapai 2 - 4 atm. Pada prinsipnya, sterilisasi autoklaf menggunakan panas dan tekanan dari uap air. Biasanya untuk mensterilkan media menggunakan temperatur 121°C dengan tekanan 2 bar selama 15 menit. Alasan mengapa digunakan temperatur 121°C karena pada saat itu menunjukkan tekanan 2 bar yang akan membantu membunuh mikroorganisme dalam suatu benda. Untuk tekanan pada atmosfer pada ketinggian di permukaan laut air mendidih pada temperatur 100°C, sedangkan autoklaf yang diletakkan pada ketinggian yang sama, menggunakan tekanan 2 bar maka air akan mendidih pada temperatur 121°C.Alat- alat yang biasa di sterilkan pada autoklaf yaitu alat-alat yang terbuat dari plastik, karet serta alat-alat yang tidak tahan pemanasan. Media yang telah diisi kedalam erlenmeyer dan kedalam tabung reaksi disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit.
	* 1. **Pembuatan Media**
			1. **Media MRSA**

Media *de Mann Ragosa Sharpe Agar* (MRSA) dibuat dengan mengencerkan 13.64 gram *de Mann Ragosa Sharpe Agar* (MRSA) dalam 200 ml aquades. Kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer. Selanjutnya, Media MRSA dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk menggunakan stirer hingga bubuk larut merata. Setelah itu media MRSA ditutup menggunakan alumunium foil. Terakhir media MRSA disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121ºC (HiMedia, 2020).

* + - 1. **Media MRSB**

Media *de Mann Ragosa Sharpe Broth* (MRSB) dibuat dengan mengencerkan 15,66 gram MRSB dalam 200 ml aquades, selanjutnya media MRSB dimasukkan kedalam erlenmeyer. Setelah itu, media dipanaskan sampai mendidih sambil diaduk menggunakan stirer hingga bubuk larut merata. Lalu media tersebut ditutup menggunakan alumunium foil. Terakhir media disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit pada suhu 121ºC (HiMedia, 2020).

**3.6.2.3 Media *Nutrient Agar* (NA) dan *Muller Hinton Agar* (MHA)**

Media NA ditimbang sebanyak 2,3 gram, kemudian dilarutkan dengan aquades 100 mL. Sedangkan media MHA ditimbang sebanyak 7,6 gram dalam 200 mL aquades. Kemudian masing – masing media ditutup dengan kapas dan kasa setelah itu, diletakkan di atas *hot plate* hingga mendidih dan dihomogenkan menggunakan *magnetic stirer* dan disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada tekan 1 atm dengan suhu 121ºC (HiMedia, 2020).

* + 1. **Uji Organoleptik *Classic Enzyme***

Uji organoleptik, uji indra atau uji sensori merupakan cara pengujian dengan menggunakan indra manusia sebagai alat utama untuk pengukuran daya penerimaan terhadap produk. Pengujian organoleptik adalah cara menilai dengan panca indera untuk mengetahui perubahan atau penyimpangan pada produk (Kartika dkk, 1988).

Uji organoleptik dilakukan pada sampel *classic enzyme* yang telah dibuat dan produk *classic enzyme* merk Dr.Rosdengan menentukan karakteristiknya yang meliputi aroma, rasa, warna dan tekstur. Pada uji aroma dilakukan langsung dengan alat indra penciuman hidung dan rasa dilakukan dengan merasa menggunakan alat pengecap lalu dilakukan pengamatan dengan melihat warna dan teksturnya.

* + 1. **Pengukuran pH**

Pengukuran nilai pH dilakukan menggunakan pH meter (Fardiaz, 1989). Sebelum dilakukan pengukuran, pH meter harus dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan penyangga (*buffer*) 7,0. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap sampel larutan *classic enzyme* dan produk *classic enzyme* merk Dr.Ros dengan mencelupkan elektroda pada pH meter ke dalam larutan sampel dan biarkan beberapa saat sampai diperoleh pembacaan yang stabil.

* + 1. **Penetapan Kadar Asam Laktat Pada Sampel *Classic enzyme***

Penetapan kadar asam laktat menggunakan metode titrasi alkalimetri yaitu dengan pentiter NaOH 0,05 N dan indikator phenolphthalein. Dibuat NaOH 0,05 N dari NaOH 0,5 N yang tersedia dengan memipet 2 ml NaOH 0,5 N ke dalam labu ukur 200 ml lalu di ad kan dengan aquades sampai garis tanda batas dan dibolak balik agar homogen.

 Selanjutnya dibuat larutan asam oksalat 0,05 N dengan menimbang oksalat 0,315 g masukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan tambahkan aquadest hingga garis tanda batas, lalu dibolak balik agar homogen.

Kemudian dilakukan standarisasi NaOH 0,05 N yang telah dibuat dengan larutan asam oksalat 0,05 N yang telah dibuat tersebut dengan cara titrasi. Dipipet 10 ml larutan asam oksalat 0,05 N masukkan ke dalam elenmeyer, tambahkan 3 tetes indikator phenolpthalein (PP) titrasi dengan NaOH 0,05 N sampai terbentuk larutan asam oksalat berwarna merah muda yang konstan lalu dibaca berapa NaOH yang terpakai di buret lalu hitung normalitas NaOH.

Penetapan kadar asam laktat dengan memipet 10 ml sampel *classic enzyme* ke dalam erlenmeyer lalu diencerkan dengan 50 ml aquades, tambahkan 3 tetes indikator phenolphthalein (PP). Selanjutnya sampel dititrasi dengan NaOH 0,05 N hingga titik akhir warna merah muda yang konstan. Kadar asam laktat dihitung (AOAC,1980). Pada titrasi dilakukan 3 x pengulangan dan dihitung masing-masing dengan rumus:

Kadar Asam Laktat % = Volume NaOH x Normalitas NaOH x BEAsam laktat x 100%

 Volume sampel x 1000

* + 1. **Isolasi Bakteri Asam Laktat**

Bakteri Asam Laktat dari *classic enzyme* diisolasi dengan menggunakan media pertumbuhan spesifik yaitu *Man Rogosa Sharpe* (MRS) broth dan MRS agar. Sebanyak 1ml *classic enzyme* dilarutkan ke dalam 9 ml media pertumbuhan spesifik MRS broth, divortex hingga homogen lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam kondisi anaerob sehingga larutan menjadi keruh yang menandakan BAL telah tumbuh. Proses ini dinamakan proses *enrichment*.

Setelah inkubasi, dilanjutkan dengan pengenceran bertingkat. Sebanyak 1 mL kultur BAL dicampurkan dengan 9 mL MRS broth steril dan dihomogenkan dengan cara dibolak balik. Ini merupakan pengenceran 10-1. Pengenceran dilanjutkan hingga 10-7. Kemudian diambil 0,1 ml kultur BAL pada pengenceran 10-7 digoreskan pada petri yang berisi 15 ml media MRSA diinkubasi suhu 370C 48 jam.

**3.6.7 Karakterisasi Bakteri Asam Laktat (BAL)**

Karakterisasi yang dilakukan meliputi identifikasi secara makroskopis yaitu mengamati bentuk morfologi koloni. Identifikasi secara makroskopis dilakukan dengan cara mengamati secara langsung bentuk dan morfologi koloni yang tumbuh meliputi bentuk, warna, tepi, permukaan dan elevasi. Secara mikroskopis bakteri asam laktat dapat kita amati: bentuk sel, susunan sel menggunakan mikroskop pada perbesaran 1000x. Sedangkan uji biokimia BAL dilakukan dengan uji gram, uji katalase, uji endospora serta uji fermentasi (Arsy dkk., 2022).

Sebanyak 6 koloni BAL dipilih secara acak lalu dikultur pada 6 media MRS agar dengan cara di-streak dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C. Isolat diberi nama BAL1, BAL2, BAL3, BAL4, BAL5 dan BAL6. Karakteristik biokimia yang ditentukan meliputi uji katalase, pewarnaan gram, pewarnaan endospore dan tipe fermentasi (Aloysius dkk., 2019).

**3.6.7.1 Pewarnaan Gram**

Pewarnaan Gram adalah salah satu teknik yang paling penting yang digunakan untuk membedakan antara bakteria Gram positif dan bakteri Gram negatif. Prinsip pewarnaan Gram yaitu saat bakteri diwarnai dengan kristal violet, bakteri Gram positif akan menyerap zat warna tersebut sehingga berwarna ungu. Sedangkan bakteri Gram negatif akan melepas zat warna kristal violet setelah dicuci dengan alkohol dan kemudian akan menyerap zat warna terakhir yang diberikan yaitu safranin sehingga berwarna merah (Arsy dkk., 2022).

Isolat diambil satu ose dan digoreskan di permukaan kaca preparat dan difiksasi di atas bunsen. Preparat kemudian diberi kristal violet 1 tetes dan didiamkan 1 menit**.** Preparat dibilas menggunakan akuades**.** Kaca preparat dikeringkan di atas bunsen**.** Preparat diberi larutan iod 1 tetes dan didiamkan hingga 1 menit**.** Preparat kemudian dibilas dengan alkohol 70% hingga warna luntur dan kembali dicuci menggunakan akuades**.** Preparat diberi 1 tetes safranin dan didiamkan selama 45 detik**.** Preparat lalu diberi aquades dan dikeringkan dengan tissue. Preparat diberi minyak emersi 1 tetes dan pengamatan dilakukan pada mikroskop perbesaran 100x (Azhara dkk., 2022).

**3.6.7.2 Uji Katalase**

Uji katalase dilakukan dengan meneteskan dua tetes H2O2 3% pada isolat bakteri yang berumur 24 jam di atas kaca objek. Reaksi positif katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung udara. Terbentuk gelembung udara menunjukkan bahwa bakteri menghasilkan enzim katalase yang dapat mengubah H2O2 menjadi H2O dan O2 bakteri tersebut bersifat aerobik (Arsy dkk., 2022).

Larutan H2O2 3% diteteskan pada kaca preparat steril sebanyak satu tetes*.* Isolat diambil satu ose dan digores-goreskan di kaca preparat yang telah ditetesi H2O2 3%*.* Pengamatan dilakukan pada kaca preparat (Azhara dkk., 2022).

**3.6.7.3 Uji Fermentasi**

Uji tipe fermentasi digunakan untuk menggolongkan bakteri asam laktat ke dalam kelompok homofermentatif atau kelompok heterofermentatif.

Media MRSA sebanyak 9 ml dimasukkan dalam tabung reaksi sebagai media pertumbuhan. Tabung Durham dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan kondisi terbalik agar dapat menangkap gas. Isolat 1 ml diambil dan dipindahkan ke media cair MRSB yang berisi tabung Durham yang kemudian disimpan pada suhu 37 °C selama 48 jam. Tabung Durham kemudian diamati untuk melihat gelembung udara (oksigen) yang dihasilkan oleh isolat tersebut (Azhara dkk., 2022).

Menurut jay dalam (Sasmita, 2018) BAL yang menghasilkan asam laktat, karbondioksida (CO2), dan etanol termasuk dalam kelompok bakteri heterofermentatif sedangkan BAL yang menghasilkan asam laktat sebagai hasil utama dari fermentasi glukosa disebut homofermentatif.

**3.6.7.4 Pewarnaan Endospora**

Isolat diambil satu ose digoreskan di permukaan preparat dan difiksasi**.** *Malachite green* ditambahkan satu tetes di kaca preparat dan dipanaskan selama 2-3 menit. Jika terjadi penguapan, *malachite green* kembali ditetesi dikaca preparat. Setelah itu, kaca preparat kembali dibilas menggunakan akuades dan dikeringkan menggunakan tissue. Safranin diteteskan ke permukaan preparat kemudian didiamkan hingga 1 menit. pengamatan isolate dilakukan dengan mikroskop perbesaran 100x. Endospora akan berwarna hijau sedangkan sel vegetatif akan berwarna merah ( Azhara dkk., 2022).

**3.6.8 Uji Antibakteri**

Uji aktivitas antimikroba BAL terhadap bakteri patogen dilakukan dengan metode difusi cakram. Sebanyak 1 ose yang terdiri dari 3-5 koloni BAL masing-masing isolat dikultur ke 10 mL media MRS broth steril dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dalam kondisi anaerob. Sebanyak 3-5 koloni bakteri patogen yang meliputi *S. aureus* dikultur ke dalam 10 mL media nutrient broth steril di dalam tabung reaksi dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam pada kondisi aerob. Setelah inkubasi, bakteri patogen disebar ke permukaan nutrient agar menggunakan *cotton swab* steril. Kertas cakram (diameter 5 mm) dicelupkan ke dalam masing-masing isolat BAL menggunakan pinset, dan diletakkan ke permukaan nutrient agar dan diinkubasi selama 48 jam suhu 37°C. Setelah inkubasi, zona hambat yang terbentuk diukur menggunakan jangka sorong (Aloysius dkk., 2019).

**3.7 Teknik Analisis Data**

Data yang diperoleh dari hasil identifikasi disajikan berupa kualitatif dan kuantitatif. Kualitatif antara lain pengamatan makroskopis (warna, bentuk, ukuran koloni) dan pengecekan pH larutan sampel. Pengamatan mikroskopis (pewarnaan Gram dan pewarnaan endospora) dan uji biokimia (uji katalase dan uji tipe fermentasi), sedangkan kuantiatifnya meliputi Tabel uji kadar asam laktat dan grafik uji aktivitas antibakteri oleh isolat BAL yang diperoleh dengan mengukur zona bening yang terlihat di sekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong.