

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 JENIS PENELITIAN

Pada penelitian ini merupakan penelitian deskriptif dengan uji laboratorium menggunakan teknik Angka Lempeng Total (ALT) dan Angka Kapang Khamir (AKK) untuk melihat adanya cemaran mikroba, kandungan kadar air, dan skrining flavonoid yang terkandung dalam formulasi madu.

3.2 WAKTU DAN TEMPAT PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari 2024 di Laboratorium Terpadu, Laboratorium Farmakognosi & Fitokimia, dan Laboratorium Makanan Jurusan Gizi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang dengan dukungan dosen pembimbing, sumber referensi dari berbagai jurnal, buku-buku perpustakaan, dan situs *website* yang ada di internet.

3.3 ALAT DAN BAHAN

Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu :

3.3.1 Alat :

Pisau, talenan, kain bersih, timbangan, corong plastik, botol plastik baru, blender, rak penyimpanan, tabung reaksi 10 ml, cawan petri, gelas ukur 100 ml, erlenmeyer 100 ml, beaker glass 100 ml, batang pengaduk, spatula, hotplate, neraca analitik, colony counter, stirrer, bunsen, pematik api, pipet volume, rak tabung, autoklaf, oven, incubator, LAF.

3.3.2 Bahan :

Kencur, jeruk nipis, maltodextrin, susu skim, sampel formulasi madu yang telah dibuat, media Plate Count Agar (PCA), media Potato Dextrose Agar (PDA), alcohol 70%, NaCl 0,9%, aluminium foil, kapas, HCl pekat.

3.4 VARIABEL PENELITIAN

3.4.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah kencur, jeruk nipis, dan madu.

3.4.2 Variabel Tetap

Variabel tetap pada penelitian ini adalah metode Angka Lempeng Total, Angka Kapang Khamir, Uji Kadar Air, dan Skrining Flavonoid.

3.5 DEFINISI OPERASIONAL VARIABEL

3.1 Tabel Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Operasional	Parameter	Alat Ukur	Hasil Ukur
Angka Lempeng Total dan Angka Kapang Khamir	Menentukan jumlah koloni dan bakteri aerob pada sampel madu.	Menghitung jumlah koloni dan bakteri aerob yang ada pada formulasi madu	-	Hasil koloni mengacu pada BPOM No 32 Tahun 2019
Kandungan kadar air	Mengidentifikasi kandungan kadar air	Presentase kandungan kadar air	Metode Gravimetri	Kadar air yang baik antara 17-21%
Uji Cemar	Menganalisa jenis bakteri yang terkandung dalam formulasi madu	ALT dan AKK	-	-
Skrining Flavonoid	Menganalisa kandungan flavonoid dalam formulasi madu	Perubahan warna setelah dipanaskan	Pemanasan	Positif mengandung flavonoid

3.6 PROSEDUR PENELITIAN

3.6.1 Ekstraksi Kencur

Memilih kencur yang masih baik dan segar. Kencur dikupas kemudian dicuci hingga bersih. Kemudian diblender hingga halus dan dilakukan pemerasan untuk diambil sari-sarinya menggunakan kain bersih

dan diletakkan pada wadah plastik. Sari dari kencur yang digunakan sebanyak 500 mL.

3.6.2 Ekstraksi Jeruk Nipis

Memilih jeruk nipis yang masih baik dan segar. Jeruk nipis dikupas kulitnya kemudian diblender kasar untuk mempermudah saat diperas. Jeruk nipis diperas dan diambil sari-sarinya menggunakan kain bersih. Diletakkan pada wadah corong plastik, ekstrak dari jeruk nipis yang digunakan sebanyak 500 mL.

3.6.3 Pembuatan Formulasi Madu

Pembuatan formulasi madu yang mengandung ekstrak kencur dan jeruk nipis menggunakan metode ekstraksi cair-cair. Tujuan menggunakan metode ini yaitu untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan masa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut. Setelah didapatkan ekstrak sebanyak 500 mL, kemudian ekstrak yang ditambahkan dengan susu skim dan maltodextrin masing-masing sebanyak 7 gram. Diaduk hingga tercampur rata dan memiliki tekstur kental. Tujuan diberi susu skim dan maltodextrin adalah agar tekstur lebih kental untuk mempermudah proses pengeringan diatas teflon.

Setelah tercampur dengan rata, dilakukan pengeringan diatas teflon secara tipis-tipis supaya keringnya lebih maksimal. Setelah kering, kemudian diremukkan hingga halus dan diberi madu sebanyak 100 mL. Kemudian dimasukkan kedalam wadah botol plastik yang sudah disiapkan. Diberi stiker atau label untuk memperindah penampilan dari formulasi tersebut.

3.6.4 Persiapan Sampel Uji

Menimbang sebanyak 5 gram formulasi madu, dimasukkan ke dalam beaker glass 50 mL, ditambahkan dengan 10 mL NaCl steril, dan diaduk hingga madu larut seluruhnya. Setelah larut sampel dipindahkan kedalam tabung reaksi 10 mL untuk mempermudah saat pemipetan.

3.6.5 Homogenisasi Sampel

Homogenisasi sampel adalah salah satu tindakan yang harus dilakukan pada sampel supaya diperoleh distribusi mikroba yang merata didalam sampel sehingga mudah untuk diamati. Tujuan homogenisasi sampel adalah untuk membebaskan bakteri atau jamur yang masih terlindungi oleh partikel dari sampel yang akan dilakukan pengujian.

Sampel madu diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 10 ml kemudian ditambahkan larutan pengencer NaCl 0,9% sebanyak 10 mL sehingga diperoleh pengenceran 1:10 (10^{-1}). Homogenisasi dilakukan dengan menggunakan vortex dengan kecepatan 300 rpm selama 30 detik.

3.6.6 Preparasi Sampel

Sampel formulasi madu dengan kandungan ekstrak kencur dan jeruk nipis yang digunakan adalah berasal dari madu murni yang beredar dikalangan masyarakat dengan merk "El-Fathan". Kemudian sampel dikocok hingga larut dan didiamkan selama beberapa menit.

3.6.7 Sterilisasi Alat

Proses sterilisasi yang dilakukan kali ini yaitu cawan petri, tabung reaksi, batang pengaduk, beaker glass, spatula, gelas ukur, erlenmeyer, stiter ditutup dengan kapas kemudian dibungkus rapat menggunakan kertas perkamen atau aluminium foil dan diikat. Lalu dimasukkan kedalam oven dengan suhu 180°C selama 2 jam. Tujuan dilakukannya sterilisasi alat ini untuk menghilangkan mikroorganisme lain yang dapat menjadikan pengaruh pada bagian hasil penelitian (Rohmi, H. A., *et al* (2014)).

3.6.6 Uji CEMARAN MIKROBA

3.6.6.1 Angka Lempeng Total

Formulasi madu dilakukan pengenceran dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% mulai dari pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} . Masing-masing dari sampel pengenceran diambil sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibuat secara duplo. Media Plate Count Agar (PCA) yang telah dibuat sebanyak 15-25 ml diambil dan dituangkan ke dalam cawan petri. Cawan petri yang berisi media kemudian diputar ke depan dan ke belakang dengan tujuan agar sampel dapat tercampur dengan homogen dan dibiarkan hingga memadat. Setelah media menjadi padat, cawan petri berisi media kemudian di inkubasi selama 24-48 jam pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$ dengan posisi terbalik. Apabila terdapat koloni yang tumbuh maka koloni diamati dan dihitung menggunakan *colony counter* (Noviawati, *et al* (2018)).

3.6.6.2 Angka Kapang Khamir

Formulasi madu dilakukan pengenceran dengan larutan NaCl fisiologis 0,9% mulai dari pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Masing-masing dari pengenceran diambil sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri dan dibuat duplo. Media Potato Dextrose Agar (PDA) yang telah dibuat diambil sebanyak 15-25 ml dimasukkan ke dalam cawan petri. Cawan petri diputar ke depan dan ke belakang dengan tujuan agar sampel dapat tercampur dengan homogen dan kemudian dibiarkan hingga memadat. Setelah media PDA menjadi padat, cawan petri kemudian di inkubasi dengan posisi terbalik pada suhu $35-37^{\circ}\text{C}$ selama 1-3 hari. Jika sudah terdapat pertumbuhan koloni pada media setelah 1-3 hari inkubasi, maka jumlah koloni dapat diamati dan dihitung menggunakan *colony counter*.

3.6.7 Uji Kadar Air

Dilakukan penimbangan cawan krus untuk diketahui berat awal cawan. Kemudian dilakukan pemanasan cawan krus replikasi 1 kedalam

oven dengan suhu 105°C selama 1 jam, ditimbang dan dicatat hasilnya. Dilakukan pemanasan kembali pada replikasi 2 hingga diperoleh bobot tetap selama 30 menit. Ditimbang sebanyak 2 gram sampel formulasi madu dalam krus porselin yang sudah diketahui berat konstan. Sampel dalam krus dipanaskan dalam oven suhu 105°C selama 4-5 jam atau sampai diperoleh berat konstan. Setelah didinginkan dalam desikator selama 15 menit, kemudian krus ditimbang. Dilakukan pengeringan lanjutan kedalam oven, dan ditimbang lagi. Pada jarak 1 jam, sampai terdapat perbedaan antara dua penimbangan berturut-turut tidak lebih dari 0,25% (Kartika, E. Y., (2014).

3.6.8 Uji Skrining Flavonoid

Ditimbang sebanyak 2 gram sampel formulasi madu, dimasukkan kedalam tabung reaksi 10 ml. Kemudian diberi larutan HCl pekat sebanyak 10 ml. Menyiapkan aquades kedalam gelas beaker sebanyak 30 ml. Formulasi madu yang telah diberi HCl dimasukkan kedalam gelas beaker yang sudah berisi aquades, kemudian dipanaskan diatas hotplate dengan suhu 100°C selama 15 menit. Diamati perubahan warna yang terjadi dan dilakukan analisis hasil (Farida, *et al* (2021).

3.7 PENGOLAHAN, PENYAJIAN, DAN ANALISIS DATA

3.7.1 Uji Cemar Mikroba

Nilai Angka Kapang Khamir (AKK) yang telah diteliti dapat dianalisis berdasarkan ketentuan BPOM (2014) yang menyatakan bahwa 150 dari satu pengenceran dipilih kemudian jumlah koloni dihitung dari cawan petri tersebut lalu dikalikan dengan faktor pengenceran, sedangkan untuk perhitungan Angka Lempeng Total (ALT) menunjukkan jumlah koloni antara 25-250.

$$ALT / AKK = \text{Jumlah Koloni} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

3.7.2 Uji Kadar Air

Dari hasil penelitian diperoleh bahwa kadar air pada madu nektar karet baik pada suhu ruang maupun suhu menunjukkan diatas kadar maksimal menurut SNI, 2004, yaitu sebesar 22%. Hal ini bisa dipengaruhi oleh beberapa faktor. Kadar air madu dipengaruhi kelembaban lingkungan yang ada. Hal ini disebabkan karena madu mempunyai sifat higroskopis, yaitu mudah menyerap air. Semakin tinggi kelembaban lingkungan maka kadar air madu akan semakin tinggi pula. Kadar air yang rendah akan menjaga madu dari kerusakan untuk jangka waktu yang relatif lama. Prasetya and Andi (2014) menjelaskan bahwa kandungan kadar air yang tinggi pada madu akan merangsang aktifitas khamir untuk tumbuh dan berkembang dalam madu (Kartika, E. Y. (2014).

$$\text{Kadar Air} = \frac{\text{Berat Bahan (awal-akhir)}}{\text{Berat Bahan Awal}} \times 100\%$$