

BAB IV

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian *quasi experimental* dengan metode kuantitatif. Pada penelitian ini, peneliti dapat mengontrol beberapa variabel luar yang dapat mempengaruhi pelaksanaan eksperimen. Dengan menggunakan desain *post-test only control group* dimana desain ini membandingkan antara dua kelompok yakni kelompok kontrol dan kelompok sampel (Soegiyono, 2013). Adapun bagan dari desain penelitian ini yakni sebagai berikut:

R1	X	O1
R2		O2

Keterangan :

R1: Kelompok eksperimen

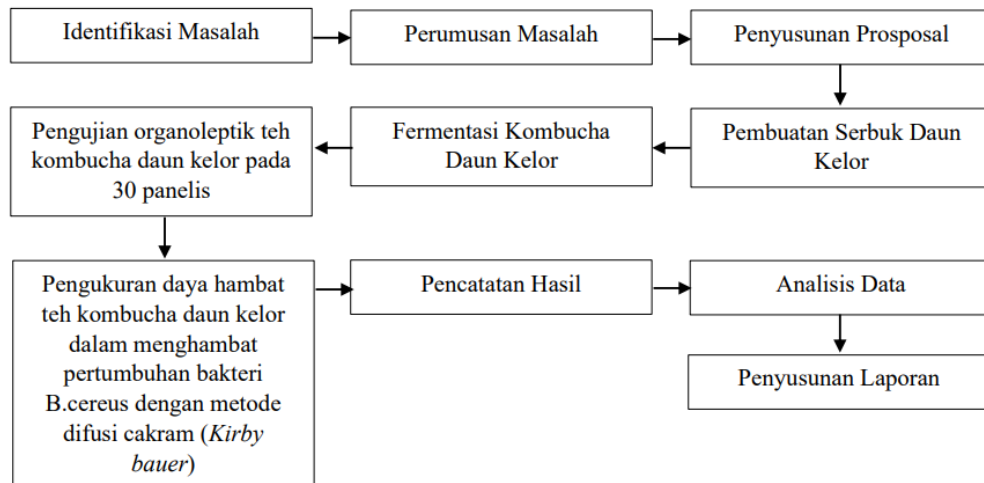
R2: Kelompok kontrol

X : Perlakuan

O1: Hasil observasi setelah perlakuan kelompok eksperimen

O2: Hasil observasi setelah perlakuan kelompok kontrol

B. Alur Penelitian



Gambar 5. Alur Penelitian

C. Tempat dan Waktu Penelitian

1. Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat (P4TO) Karangasem Provinsi Bali, Laboratorium Kimia Terapan Jurusan Teknologi Laboratorium Medis Poltekkes Kemenkes Denpasar dan Laboratorium Mikrobiologi Laboratorium Terpadu Poltekkes Kemenkes Denpasar.

2. Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan September 2024 sampai April 2025.

D. Populasi dan Sampel

1. Sampel

Sampel pada penelitian ini adalah kombucha daun kelor dengan variasi waktu fermentasi hari ke – 5, ke – 10, ke – 15, ke- 20, dan ke – 25.

2. Unit Analisis

Unit analisis dalam penelitian ini adalah zona hambat yang terbentuk dari hasil antibakteri kombucha daun kelor.

3. Jumlah dan Besaran Sampel

Untuk menentukan jumlah dan besaran sampel dalam penelitian ini didasarkan pada jumlah perlakuan dan replikasi yang dilakukan pada setiap perlakuan (Hasanah, 2017). Pada penelitian ini variasi waktu fermentasi kombucha daun kelor yang digunakan adalah hari ke – 5, ke – 10, ke – 15, ke – 20, dan ke – 25 serta kontrol positif dan negatif, sehingga rumus yang digunakan adalah *Federer* sebagai berikut:

$$(n - 1)(t - 1) \geq 15$$

Keterangan:

n : Jumlah sampel dalam setiap kelompok.

t : Jumlah kelompok perlakuan

Perhitungan :

$$(n-1)(t-1) \geq 15$$

$$(n-1)(7-1) \geq 15$$

$$(n-1)(6) \geq 15$$

$$n-1 \geq \frac{15}{6}$$

$$n-1 \geq 2,5$$

$$n \geq 3,5$$

Sehingga, jumlah sampel yang diperlukan dalam penelitian ini untuk setiap perlakuan adalah 4.

E. Jenis dan Teknik Pengumpulan Data

1. Jenis Data

a. Data Primer

Data primer adalah data yang diperoleh langsung dari peneliti, baik dari sumbernya sendiri maupun dari tempat subjek penelitian berada. Data primer penelitian ini adalah zona hambat yang terbentuk dari hasil uji aktivitas antibakteri *Bacillus cereus* dengan berbagai sampel kombucha daun kelor yang difermentasikan pada hari ke – 5, ke – 10, ke – 15, ke – 20, dan ke – 25.

b. Data Sekunder

Data sekunder dikumpulkan berdasarkan referensi yang berkaitan dengan penelitian. Data yang digunakan pada penelitian ini meliputi jurnal, dan buku-buku yang berkaitan dengan penelitian.

2. Teknik Pengumpulan Data

a. Analisis Laboratorium

Daun kelor dalam penelitian ini dipilih menggunakan teknik *purposive sampling* berdasarkan kriteria yang pengambilannya dilakukan di daerah Desa Jagapati, Abiansemal, Kabupaten Badung. Analisis laboratorium dengan metode *disk diffusion (Kirby bauer)* dilakukan untuk menilai kemampuan antibakteri kombucha daun

kelor dengan variasi waktu fermentasi yang telah ditentukan terhadap *Bacillus cereus*.

b. Kuesioner

Teknik kuesioner digunakan dalam pengujian organoleptik yang bertujuan untuk mengetahui karakteristik sensoris dan persepsi panelis terhadap rasa, aroma, serta tingkat keasaman kombucha daun kelor pada setiap waktu fermentasi.

3. Instrumen Pengumpulan Data

Instrumen yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Densichek* (Biomerieux), alat tulis, formulir uji tingkat kesukaan, dan kamera.

F. Pengolahan dan Analisa Data

1. Alat

Alat yang digunakan pada penelitian ini di antaranya neraca digital, neraca analitik (RADWAG AS220.R2), toples kaca, kain putih, karet gelang, saringan, kantong teh, *hot plate*, batang pengaduk, *beaker glass*, *erlenmeyer*, pipet ukur, *thermometer*, tabung serologis, rak tabung serologis merek Phynex Iwaki, *petri dish disposable* merek onemed, pinset steril, bunsen, jangka sorong, *magnetic stirrer*, *ball pipet*, mikropipet, *yellow tip*, ose, *autoclave* (TOMY SX-500), inkubator (ESCO Isotherm), *Densichek* (Biomerieux), *Bio Safety Cabinet* (BSC-1800 II B2-X), alat tulis.

2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun kelor, madu, air mineral, SCOBY, starter kombucha, *blank disc* (OXOID),

aquadest, media BAP (*Blood Agar Plate*), NaCl 0,9%, isolat bakteri *Bacillus cereus* kode ATCC 11778, alkohol 70%, dan standar Mc farland 0,5%.

3. Prosedur Kerja

Seluruh prosedur kerja dalam penelitian ini disusun berdasarkan acuan SNI 01-2891-1992 tentang Metode Pengujian untuk Makanan dan Minuman serta Peraturan BPOM Nomor 34 Tahun 2019 tentang Kategori Pangan. Kedua acuan tersebut digunakan sebagai standar mutu dan pedoman teknis dalam tahapan produksi, fermentasi, dan pengujian aktivitas antibakteri kombucha daun kelor.

a. Pembuatan Bubuk Daun Kelor

Menurut Zubaydah dkk (2019) prosedur pembuatan serbuk daun kelor terdiri dari:

1) Pre-Analitik

- a) Persiapan alat dan bahan yang digunakan
- b) Menggunakan APD (Alat Pelindung Diri)
- c) Daun kelor dipetik sesuai kebutuhan, kemudian dibersihkan dan dicuci dengan air mengalir untuk menghilangkan kotoran pada daun kelor.
- d) Sortasi basah dilakukan untuk memilih bahan sampel sesuai dengan kriteria yang digunakan dalam penelitian.
- e) Daun kelor ditiriskan untuk menghilangkan sisa air.

2) Analitik

- a) Proses pengeringan, pembuatan serbuk serta pengujian kadar air dan kapang khamir dilakukan di laboratorium P4TO (Pusat Pengolahan Pasca Panen Tanaman Obat).

3) Pasca Analitik

- a) Dilakukan packing dan labeling yang berisi informasi mengenai nama produk dan tanggal kadaluarsa.
- b) Pencatatan hasil dan pelaporan hasil.

b. Pembuatan Kombucha Daun Kelor

Prosedur pembuatan kombucha daun kelor dalam penelitian ini, berdasarkan modifikasi dari (Rosida, Sofiyah, & Putra, 2021) dan (Kusumiyati dkk., 2022)

1) Pre-Analitik

- a) Disiapkan 5 toples kaca dan diberikan label sesuai dengan variasi waktu fermentasi kombucha yakni hari ke – 5, ke – 10, ke – 15, ke – 20, ke – 25.

2) Analitik

- a) Bubuk daun kelor ditimbang sebanyak 30 gram untuk pembuatan 1,5 liter kombucha daun kelor.
- b) Direbus 1500 ml air mineral hingga mendidih, matikan, api kemudian diturunkan suhu hingga 80 – 90°C.
- c) Masukkan 30 gram bubuk daun kelor ke dalam air panas dan homogenkan.

- d) Saring daun kelor dari larutan teh, kemudian tambahkan 600 ml madu ke dalam larutan teh daun kelor diaduk hingga homogen lalu didinginkan hingga mencapai suhu ruang sekitar $25^{\circ}\text{C} - 28^{\circ}\text{C}$.
- e) Teh daun kelor yang sudah didinginkan dibagi ke dalam 5 toples kaca sebanyak 300 ml untuk setiap toples kemudian ditambahkan SCOBY dan 10% starter dari volume total wadah, tutup dengan kain dan ikat menggunakan karet gelang.
- f) Setiap toples kaca diberikan label sesuai dengan waktu fermentasi yakni hari ke – 5, ke – 10, ke – 10, ke – 15, ke – 20, dan ke – 25.
- g) Fermentasikan kombucha sesuai dengan label waktu fermentasi yang telah ditentukan pada suhu $25 - 30^{\circ}\text{C}$.
- h) Dilakukan pengujian pH dan organoleptik untuk menilai warna, rasa, aroma, dan keasaman menggunakan metode hedonik.

3) Pasca Analitik

- a) Mencatat dan menganalisis data

c. Uji Aktivitas Antibakteri

1) Pre-analitik

- a) Menggunakan alat pelindung diri (APD)

- b) Dilarutkan 40 gram TSA atau Columbia Agar Base dalam 1 liter air suling steril, kemudian panaskan sambil diaduk hingga larut sempurna.
- c) Sterilisasi larutan pada suhu 121°C selama 15 menit dengan menggunakan autoklaf.
- d) Larutan media didinginkan steril hingga mencapai suhu $45\text{--}50^{\circ}\text{C}$.
- e) Ditambahkan 5% (v/v) darah defibrinasi steril yang telah mencapai suhu kamar. Aduk perlahan untuk menghindari pembentukan gelembung udara.
- f) Dituangkan media ke dalam cawan petri sebanyak ± 15 ml. Kemudian biarkan mengeras pada suhu ruang (Prejish et al., 2024).
- g) Kombucha dari masing-masing waktu fermentasi diambil sebanyak ± 1 ml dimasukkan ke dalam *petri dish* yang telah berisi label *petri dish* I (hari ke-5) *petri dish* II (hari ke-10), *petri dish* III (hari ke-15), *petri dish* IV (hari ke-20), *petri dish* V (hari ke-25) dan petri dish VI (kontrol positif).
- h) Dibuat suspensi bakteri dengan mengambil 1 – 3 ose koloni bakteri *Bacillus cereus* dari biakan murni, kemudian dimasukkan ke dalam tabung serologis yang telah berisi NaCl 0,9% lalu dihomogenkan dan diukur konsentrasinya menggunakan *Densichek* hingga mencapai 0,5 McFarland (Handayani dkk., 2017).

2) Analitik

- a) Lidi kapas steril dicelupkan ke dalam suspensi bakteri yang telah disiapkan, diangkat dengan cara menekan dan memutar usap kapas pada dinding tabung sebanyak 2 kali.
- b) Diinokulasikan suspensi bakteri pada permukaan media BAP secara merata, diamkan selama 15 menit agar suspensi bakteri dapat menyerap dengan baik
- c) Cakram kertas yang telah dijenuhkan dengan kombucha daun kelor dari masing-masing waktu fermentasi ditempelkan pada media BAP menggunakan pinset steril.
- d) Kontrol positif dan kontrol negatif ditempelkan pada media BAP yang berbeda dengan sampel kombucha daun kelor.
- e) Diinkubasi pada suhu 37⁰C selama 24 jam.
- f) Setelah diinkubasi dilakukan pengukuran pada zona hambat yang terbentuk menggunakan jangka sorong (Handayani dkk., 2017).

3) Pasca Analitik

- a) Mencatat dan menganalisis hasil yang didapatkan.

d. Uji Organoleptik

Prosedur pengujian organoleptik dalam penelitian mengacu pada (Septiani Agustien, dkk. 2022)

1) Pre-analitik

- a) Pemilihan 30 panelis dengan rentang usia 17 – 50 tahun dan dalam keadaan sehat.

- b) Bersedia menjadi panelis dalam penelitian dengan menandatangani lembar *informed consent*.
- c) Disiapkan sampel kombucha daun kelor yang telah difermentasikan pada variasi waktu fermentasi hari ke-5, ke-10, ke-15, ke-20 dan ke-25, masing-masing sebanyak ± 30 ml untuk setiap 30 panelisnya.

2) Analitik

- a) Panelis diminta untuk mencicipi setiap sampel dan memberikan penilaiannya secara spontan terhadap beberapa parameter seperti warna, aroma, rasa, dan keasaman dengan mengisi tanda centang pada formulir uji tingkat kesukaan.

3) Pasca analitik

- a) Merekapitulasi dan menganalisis data hasil yang didapat.

4. Pengolahan Data

Pada penelitian ini, data primer yang diperoleh dari hasil pengukuran zona hambat dinyatakan dalam satuan mm dan uji organoleptik terhadap 30 panelis dikumpulkan, dicatat, serta dikelompokkan berdasarkan waktu fermentasinya yakni hari ke – 5, ke – 10, ke – 15, ke – 20, dan ke – 25. Data tersebut diolah menggunakan teknik sebagai berikut:

- a. *Editing* adalah proses menilai data yang digunakan dalam penelitian telah memenuhi kriteria kelengkapan, konsistensi, dan penerapan yang diperlukan.
- b. *Coding*, merupakan tahap pemberian kode pada data untuk mengubah informasi kualitatif menjadi format kuantitatif.

- c. *Data entry*, adalah proses memasukkan data yang telah diberi kode ke dalam program SPSS untuk dianalisis.
- d. *Tabulating data* merupakan penyajian data dalam bentuk tabel naratif yang disesuaikan dengan kebutuhan analisis penelitian.

5. Analisa Data

Analisa data yang digunakan dalam penelitian ini adalah analisa kuantitatif yang dilakukan dengan uji statistik.

a. Uji Normalitas

Pengujian pertama yang dilakukan adalah uji normalitas, yang bertujuan untuk mengetahui data yang didapatkan berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas yang digunakan pada penelitian ini adalah *Shapiro-wilk*. Karena pada penelitian ini jumlah sampel kurang dari 50 (Ma'ruf dkk., 2022).

b. Uji Korelasi

Uji korelasi, bertujuan untuk menganalisis hubungan antara waktu fermentasi dan aktivitas antibakteri. Dalam hal ini jika data berdistribusi normal digunakan korelasi *Pearson*, jika sebaliknya digunakan uji korelasi *Spearman* (Ma'ruf dkk., 2022).

c. Uji Statistik *One-Way ANOVA*

Setelah dilakukan uji korelasi dilanjutkan dengan analisis variansi, pada pengujian ini digunakan *One Way ANOVA* apabila data memenuhi asumsi parametrik jika, data berasumsi non-parametrik digunakan uji *Kruskal-Wallis*. Uji variansi digunakan untuk menentukan perbedaan

dalam aktivitas antibakteri pada tiap waktu fermentasi (Rezaldi dkk., 2022).

d. Uji *Post Hoc*

Analisis lanjutan dalam uji One-Way ANOVA apabila nilai $\text{sig} < 0,05$ yaitu *Tukey Test* untuk mengidentifikasi waktu fermentasi mana yang menunjukkan perbedaan signifikan (Rezaldi dkk., 2022).

G. Etika Penelitian

Menurut Amin (2017) di dalam penelitian adapun kode etik yang harus dilakukan antara lain:

1. *Informed consent*

Penelitian yang dilakukan diawali dengan penyampaian pernyataan sebelum penelitian disetujui. Sebelum memberikan persetujuan, calon panelis diberikan formulir persetujuan setelah menerima pernyataan yang memenuhi syarat kriteria untuk penggunaan potensial sebagai responden penelitian.

2. *Beneficence*

Penelitian harus bermanfaat bagi masyarakat. Berdasarkan prinsip etika, penelitian yang dilakukan harus memberikan manfaat sebesar-besarnya dan meminimalkan kerugian bagi masyarakat dan panelis penelitian.

3. *Non-Maleficence*

Peneliti wajib memastikan penelitian tidak menyebabkan kerugian atau membahayakan panelis baik secara fisik maupun psikologis.

4. *Justice*

Semua responden diperlakukan secara adil, tanpa memandang etnis, ras, agama, atau status sosial, sehingga memastikan hasil yang sama selama penelitian.

5. *Anonymity*

Anonimitas mengacu pada pengumpulan data panelis tanpa nama, untuk melindungi hak-hak mereka sebagai panelis, nama mereka tidak dipublikasikan.

6. *Confidentiality*

Memastikan bahwa semua hasil penelitian, informasi dan hal-hal lain dijaga kerahasiaannya. Peneliti akan menjamin kerahasiaan seluruh informasi sehingga hanya data tertentu yang akan muncul dalam hasil penelitian.