

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di laboratorium Mikro-bio-genetika Jurusan Biologi FMIPA Undip Semarang pada bulan Juni 2003.

B. Alat dan Bahan

B. 1. Alat

Blender, “magnetic stirer”, autoklaf, oven, pipet ukur, gelas ukur, neraca “ohaus”, kertas pH, erlenmeyer, lampu spiritus, botol selai, jangka sorong dan “shaker “inkubator.

B. 2. Bahan

Buah belimbing manis (*Averrhoa carambola*) yang matang dan air kelapa diperoleh dari daerah Tembalang-Semarang, sukrosa, ekstrak khamir, $MgSO_4$, K_2HPO_4 , $(NH_4)_2SO_4$, asam asetat, biakan *Acetobacter xylinum* diperoleh dari PAU Pangan dan Gizi UGM Yogyakarta dan alkohol.

C. Cara Kerja

C. 1. Pembuatan Medium Kultur

1. Medium cair Hassid dan Backer (Alaban, 1962)

- 1 liter air kelapa ditambah sukrosa 100 g, ekstrak khamir 2,5 g, K_2HPO_4 5,0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0,6 g, $MgSO_4$ 0,2 g, lalu dilarutkan dengan pemanasan sampai larut sempurna.

- Medium disterilkan dengan autoklaf pada tekanan 2 atm, suhu 121°C, selama 15 menit.
2. Medium agar Hassid dan Backer (Alaban, 1962)
- 1 liter air kelapa ditambah sukrosa 100 g, ekstrak khamir 2,5 g, K_2HPO_4 5,0 g, $(NH_4)_2SO_4$ 0,6 g, $MgSO_4$ 0,2 g dan 15 g agar sebagai pematat, lalu dilarutkan dengan pemanasan sampai larut sempurna.
 - Medium yang masih panas dituang ke dalam tabung reaksi, kemudian disterilkan dengan autoklaf pada tekanan 2 atm, suhu 121°C, selama 15 menit.
 - Tabung reaksi yang berisi medium yang masih panas disimpan pada suhu kamar dalam keadaan miring, sehingga terbentuk agar miring.

C. 2. Pemeliharaan Biakan Murni

Biakan murni *Acetobacter xylinum* dipelihara dalam medium cair Hassid dan Backer pada suhu kamar selama 2 hari dan pada medium padat Hassid dan Backer pada suhu kamar selama 4-5 hari.

C. 3. Pembuatan Starter

- Buah belimbing manis diblender lalu diambil airnya.
- Air belimbing manis dan air kelapa disaring.
- Medium starter dibuat dengan komposisi 50% air belimbing, 50% air kelapa, ekstrak khamir (0,25%), K_2HPO_4 (0,5%), $(NH_4)_2SO_4$ (0,06%), $MgSO_4$ (0,02%) dan sukrosa (10%), lalu dilarutkan dengan pemanasan sampai larut sempurna.

- Medium tersebut kemudian diatur pHnya dengan menambahkan asam asetat glasial sampai pH 5,0.
- Medium disterilkan dengan autoklaf pada tekanan 2 atm, suhu 121°C, selama 15 menit, lalu didinginkan.
- Medium diinokulasi dengan biakan *A. xylinum*, kemudian diinkubasi pada “shaker” inkubator sampai diperoleh kepadatan sel 10^6 - 10^7 /ml.

C. 4. Pembuatan Medium Fermentasi

- Buah belimbing manis diblender lalu diambil airnya.
- Air belimbing manis dan air kelapa disaring.
- Medium fermentasi dibuat dengan komposisi 50% air belimbing, 50% air kelapa, ekstrak khamir (0,25%), K_2HPO_4 (0,5%), $(NH_4)_2SO_4$ (0,06%), $MgSO_4$ (0,02%) dan sukrosa sesuai perlakuan yaitu :
 - P₁ : kadar sukrosa 5%
 - P₂ : kadar sukrosa 7,5%
 - P₃ : kadar sukrosa 10%
 - P₄ : kadar sukrosa 12,5%
 - P₅ : kadar sukrosa 15%
- Campuran tersebut lalu dilarutkan dengan menggunakan magnetik stirer sampai larut sempurna.
- Medium tersebut kemudian diatur pHnya dengan menambahkan asam asetat glasial sampai pH 5,0.
- Medium disterilkan dengan autoklaf pada tekanan 2 atm, suhu 121°C, selama 15 menit, lalu didinginkan.

C. 5. Inokulasi

- Medium fermentasi steril dituang ke dalam botol selai sebanyak 100 ml secara aseptik.
- Medium diinokulasi dengan starter sebanyak 10 % (v/v) dari medium.

C. 6. Inkubasi

Medium fermentasi yang telah diinokulasi kemudian diinkubasi pada suhu kamar (28-31°C) selama 14 hari dalam keadaan statis.

C.7. Pengukuran Parameter

- Setelah diinkubasi selama 14 hari, dilakukan pemanenan, *nata* diambil dan dicuci bersih kemudian ditiriskan.
- Berat basah *nata* diukur dengan cara menimbanginya menggunakan timbangan “ohaus” sebanyak tiga kali kemudian hasil yang diperoleh di rata-rata.
- Ketebalan *nata* diukur dengan jangka sorong dari lima sisi yang berbeda kemudian hasil yang diperoleh dirata-rata.
- Rendemen *nata* diukur dengan metode gravimetrik dan dinyatakan dalam berat per volume medium cair yang digunakan.

$$\text{Rendemen} = (\text{berat } \textit{nata} / \text{volume bahan}) \times 100\% \quad (\text{Anonim, 1970}).$$

- Kadar air diukur dengan cara mengeringkan *nata* yang telah diketahui berat basah nya dalam oven pada suhu 105°C, lalu didinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang sampai diperoleh berat konstan.

$$\text{Kadar air} = \frac{(\text{berat sampel awal} - \text{berat sampel kering})}{\text{Berat sampel awal}} \times 100\%$$

(Anonim, 1970).

- Berat kering *nata* diukur dengan mengeringkan *nata* dalam oven pada suhu 105°C sampai diperoleh berat konstan (Anonim, 1970).
- Warna (derajat keputihan) diamati dengan membandingkan warna *nata* yang dihasilkan dari masing-masing perlakuan.
- Konsistensi *nata* diukur dengan cara menekan *nata* yang dihasilkan dari masing-masing perlakuan. Penekanan dilakukan dengan menggunakan tangan dan hasilnya dibandingkan satu sama lain.

D. Parameter

Parameter yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari parameter utama dan parameter pendukung. Parameter utama meliputi ketebalan, kadar air berat basah, rendemen dan berat kering *nata*. Parameter pendukung meliputi warna (derajat keputihan) dan konsistensi *nata*.

E. Rancangan percobaan dan Analisis Data

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap faktor tunggal yaitu kadar sukrosa dengan empat ulangan. Perlakuan kadar sukrosa yang dilakukan adalah :

P₁ : kadar sukrosa 5%

P₂ : kadar sukrosa 7,5%

P₃ : kadar sukrosa 10%

P₄ : kadar sukrosa 12,5%

P₅ : kadar sukrosa 15%

Data yang diperoleh dianalisis menggunakan ANOVA (“Analisis of Varians”) dengan taraf signifikansi 5%. Apabila dari masing-masing perlakuan menunjukkan adanya perbedaan, kemudian dilakukan uji lanjut dengan Uji Jarak Berganda Duncan (UJBD) dengan taraf signifikansi 5 (Gomez dan Gomez, 1995).

