

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

1.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian minuman probiotik dari fermentasi sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) sebagai antidiare dengan pemberian dosis secara oral pada mencit yang diinduksi bakteri *Salmonella sp.* Pengamatan dilakukan terhadap 5 kelompok masing-masing 5 ekor hewan uji dengan perlakuan kontrol normal, kontrol negatif, kontrol positif, dan dosis 0,169mL/kgBB, 0,338mL/kgBB, 0,676mL/kgBB.

Tahap penelitian meliputi tiga tahap kerja, yaitu:

Tahap persiapan yang meliputi persiapan alat, bahan, dan menyiapkan sampel yang akan digunakan untuk pengujian yaitu minuman probiotik hasil dari fermentasi buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.).

Tahap pelaksanaan dengan melakukan pegujian keefektivan minuman probiotik sebagai antidiare pada mencit jantan yang diinfeksi bakteri *Salmonella sp* dengan melihat diameter rembesan feses dan frekuensi diare yang terjadi .

Tahap akhir penelitian dengan melakukan pengolahan dan analisis data serta membuat kesimpulan dan hasil penelitian. Dengan adanya rancangan penelitian yang baik, maka pelaksanaan diharapkan bisa berjalan sesuai dengan keinginan peneliti.

1.2 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi dalam penelitian ini adalah minuman probiotik dari sirsak gunung

(*Annona montana* Macf.) sedangkan sampel dalam penelitian ini adalah sebagian minuman probiotik dengan dosis 0,169 mL/kgBB, 0,338 mL/kgBB, 0,676 mL/kgBB yang diinduksikan pada mencit.

1.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Lokasi penelitian ini dilakukan di Laboratorium Farmakognosi dan Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Sedangkan waktu mulai penyusunan proposal bulan November 2018 sampai terselesainya Karya Tulis Ilmiah.

1.4 Definisi Operasional Variabel

Definisi Operasional Variabel dalam penelitian ini terdiri dari variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas penelitian ini adalah dosis minuman probiotik dari fermentasi buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.). Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini adalah efek antidiare minuman probiotik yang meliputi konsistensi feses yang dilihat dari diameter rembesan feses pada kertas saring dan frekuensi defekasi feses mencit.

Tabel 3.1. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Sub Variabel	Definisi Operasional	Hasil Ukuran	Alat	Skala
Minuman Probiotik	Dosis 0,169ml/kgBB	Pemberian minuman probiotik dengan dosis 0,169ml/kgBB	Volume (mL)	Sonde	Nominal
	Dosis 0,338ml/kgBB	Pemberian minuman probiotik dosis 0,338ml/kgBB	Volume (mL)	Sonde	Nominal
	Dosis 0,676ml/kgBB	Pemberian minuman probiotik dosis 0,676ml/kgBB	Volume (mL)	Sonde	Nominal
Efek Antidiare	Konsistensi Feses	Karakteristik yang dilihat dari bentuk dan diameter dari feses	0 = tidak BAB 1 = feses keras (K) dengan diameter rembesan pada kertas saring <0,5 cm 2 = feses lembek (L) dengan diameter rembesan pada kertas saring 0,5 – 1 cm 3 = feses lembek cair (LC) dengan diameter rembesan pada kertas saring <1 cm	Kertas saring	Nominal
	Frekuensi Defekasi	Banyaknya proses Buang Air Besar yang dilihat setelah 1 jam pemberian selama 1 sampai 5 jam		Indra Penglihatan	Nominal

1.5 Instrumen Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini membutuhkan alat dan bahan. Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah peralatan glass, oven, autoklaf, inkubator, sonde, timbangan kasar, timbangan analitik, kertas saring.

Adapun bahan yang dibutuhkan dalam penelitian ini adalah mencit umur 5-6 minggu, suspensi *Salmonella sp*, NaCl, glukosa, *Ciprofloxacin*, minuman probiotik hasil fermentasi buah sirsak gunung, alkohol 70 %, aquades.

1.6 Prosedur Kerja

Teknik pengumpulan data pada penelitian ini adalah sebagai berikut:

3.6.1 Pembuatan Sari Buah *Annona montana* Macf.

1. Mengumpulkan buah sirsak gunung yang telah berwarna kuning dan tampilan fisik baik.
2. Membersihkan dari kotoran pada bagian luar buah sirsak gunung.
3. Mencuci buah hingga bersih dan kupas kulitnya.
4. Menimbang sebanyak 500 gram buah segar.
5. Memasukkan buah ke dalam juicer dan ditambahkan air sebanyak 1 L.
6. Memisahkan antara sari menggunakan kain saring dipisahkan dari ampas dan biji buah di buang.

3.6.2 Fermentasi Minuman Probiotik sari buah *Annona montana* Macf.

1. Menyiapkan sari buah sisak gunung.
2. Memasukkan sari buah sirsak gunung kedalam panci kemudian dilakukan proses pasteurisasi dengan suhu 72°C selama 15 menit
3. Memasukkan starin bakteri *Lactobacillus casei* dengan perbandingan 1: 90, 500 mL sari buah sirsak ditambah 90 mL strain bakteri *Lactobacillus casei*

4. Menginkubasi minuman probiotik dengan *incubator* pada suhu 37°C selama 24 jam.

3.6.3 Persiapan suspensi bakteri

1. Mengambil satu ose biakan bakteri *Salmonella sp* yang telah diremajakan pada media SSA disuspensikan ke dalam tabung berisi 5 ml media SSA dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C.
2. Mengencerkan suspensi bakteri menggunakan NaCl 0,9% steril
3. Menyiapkan spektrofotometri dengan setting panjang gelombang 600 nm
4. Menyiapkan blanko dan sampel kultur (biakan cair) masing-masing sebanyak 2 mL ke dalam kuvet steril hingga mencapai %T25
5. Menyondekan hasil suspensi bakteri sebanyak 0,4 mL pada mencit 20 gram/BB

3.6.4 Persiapan dan pemilihan hewan uji

Adapun jumlah keseluruhan hewan uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah 25 ekor. Dimana 25 ekor mencit putih tersebut dibagi dalam 5 kelompok uji, yang masing- masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit putih.

Perhitungan besar sampel dihitung dengan rumus federers Dekker (1991) sebagai berikut:

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

$$(5-1)(n-1) \geq 15$$

$$4n-4 \geq 15$$

$$4n \geq 19$$

$$n \geq 4,75 = 5$$

Keterangan :

t = jumlah kelompok uji

n = besar sampel per kelompok

3.6.1 Uji aktivitas antidiare minuman probiotik buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.)

1. Mencit diadaptasikan dengan lingkungan selama 1 minggu dengan diberikan ransum sesuai dengan tabel.

Tabel 3.2. Komposisi Ransum Aklimatisasi

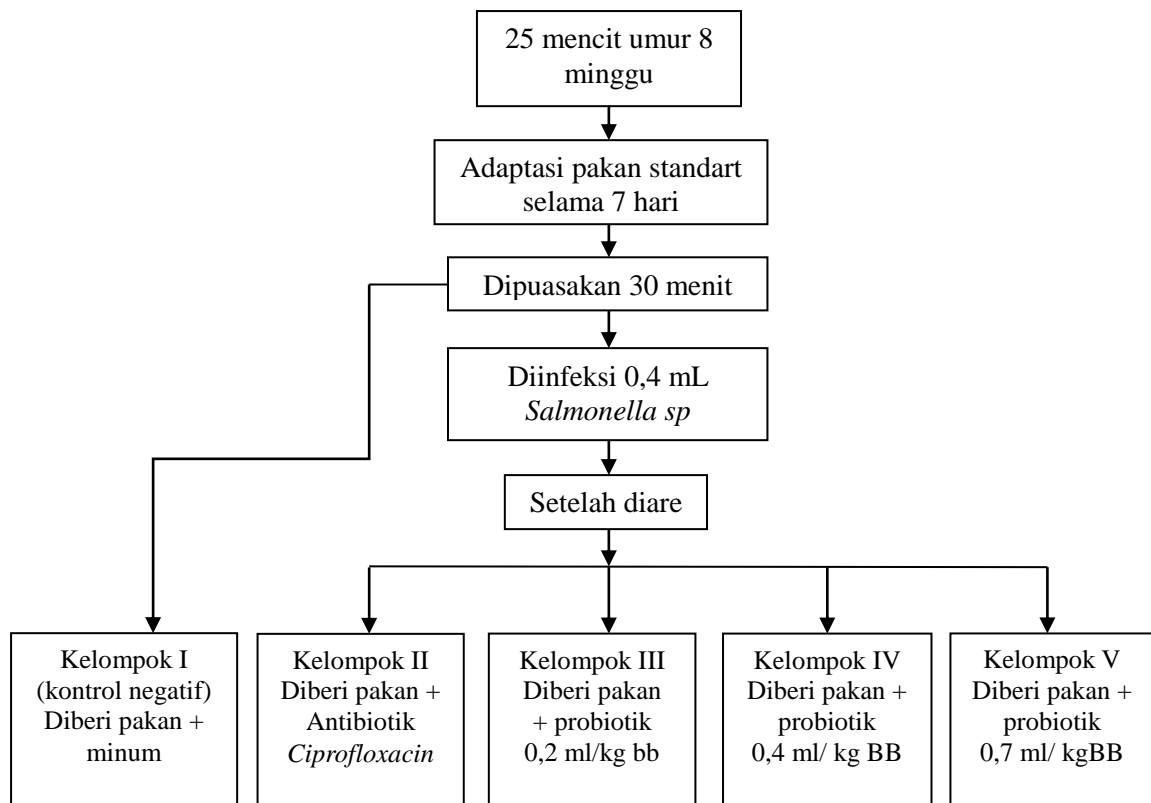
Ransum	Kelompok negatif	Kelompok I	Kelompok II	Kelompok III	Kelompok Positif
Confed PARs	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
Tepung terigu (gr)	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
Air (ml)	20	20	20	20	20

2. Tiga puluh menit sebelum penelitian, mencit dipuasakan, selanjutnya 25 mencit dikelompokkan menjadi 5 kelompok, masing-masing kelompok terdiri dari 5 ekor mencit.
3. Semua mencit di infeksi *Salmonella sp* yang diberikan dengan populasi 10^8 cfu/mL sebanyak 0,4 mL/ekor mencit secara oral menggunakan sonde, kecuali kontrol negatif.
4. Setelah diare , masing-masing kelompok diberi perlakuan, yaitu:

Tabel 3 3. Perlakuan Pengujian Antidiare

Kelompok	Perlakuan
Kontrol positif	Diberi Ciprofoxacin
Kontrol negatif	Diberi air minum
Kontrol perlakuan ke-I	Probiotik dosis 0,169 mL/kgBB
Kelompok perlakuan ke-II	Probiotik dosis 0,338 mL/kgBB
Kelompok perlakuan ke-III	Probiotik dosis 0,676 mL/kgBB

5. Pengamatan dilakukan sejak mencit diberi suspensi *Salmonella sp* hingga mencit mengalami diare, kemudian pengamatan dilanjutkan setelah mencit dari tiap kelompok mendapat perlakuan sesuai dengan kelompok perlakuan:



Gambar 3.1. Bagan Alur Penelitian

3.7 Analisa Data

Dalam penelitian ini analisis data dilakukan dengan cara mengukur keefektivan antidiare pada minuman probiotik dari fermentasi sirsak gunung (*Annona montana macf.*) apakah terdapat perbedaan signifikan antara dosis 0,169 mL/kgBB, 0,338 mL/kgBB, dan 0,676 mL/kgBB dengan perbandingan kontrol positif *Ciprofloxacin*. Data yang diperoleh diolah dan dianalisa dengan menggunakan sistem komputerisasi program SPSS. Data dilakukan uji normalitas dan uji homogenitas. Jika sebaran data menunjukkan normal dan homogen maka

dapat dilakukan uji lanjut untuk mengetahui adanya perbedaan yang signifikan yaitu statistik *One Way Anova*. Jika pada uji anova menunjukkan adanya perbedaan maka dilanjutkan uji *Post Hoc Tukey* untuk mengetahui perbedaan yang signifikan dari setiap kelompok perlakuan. Masing-masing uji statistic dengan tingkat kepercayaan 95%.