

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yaitu untuk mengetahui aktivitas antibakteri minuman probiotik buah sirsak gunung terhadap bakteri *Salmonella sp* yaitu, dengan membuat minuman probiotik dari buah sirsak gunung (*Annona montana* Mafc.) dengan menggunakan starter dari kultur *Lactobacillus casei*. Pada penelitian sebelumnya telah diperoleh hasil konsentrasi terbaik untuk pembuatan minuman probiotik dari buah *Annona Montana* yaitu 90 ml starter *Lactobacillus casei* dalam 250 ml sari buah sirsak gunung (Boro, 2016). Pada penelitian ini dilakukan dua tahap.

Tahap pertama yaitu persiapan, pada tahapan ini dilakukan penentuan populasi dan sampel, menentukan lokasi dan waktu penelitian, menentukan kebutuhan bahan yang akan digunakan dan mempersiapkan alat yang akan digunakan dalam penelitian dan uji aktivitas antibakteri *Salmonella sp*.

Tahap kedua adalah tahapan akhir penelitian, pada tahapan ini dilakukan pengumpulan dan pengolahan data dan membuat kesimpulan dari hasil yang diperoleh dalam pengujian aktivitas antibakteri.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah minuman probiotik buah sirsak gunung (*Annona montana* Mafc.) dengan starter *Lactobacillus casei*

3.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagian dari hasil fermentasi minuman probiotik dari buah sirsak gunung (*Annona montana* Mafc.) yang telah di tambahkan dengan starter *Lactobacillus casei*.

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pembuatan minuman probiotik buah sirsak gunung dan pengujian aktivitas antibakteri dilakukan di laboratorium mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesi Malang pada bulan November 2018 sampai dengan Mei 2019.

3.4 Devinisi Operasional Variabel

Adapun Devinisi Variabel dari penelitian ini adalah aktivitas antibakteri *Salmonella sp.*

Tabel 3.1 Operasional Variabel

Variabel	Devinisi variabel	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Aktivitas antibakteri	Daya hambat yang dihasilkan dari minuman probiotik terhadap bakteri <i>Salmonella sp</i>	Jangka sorong	Adanaya zona bening di sekitar sumuran	Nominal

3.5 Instrumen Penelitian

Pada penelitian ini diperlukan peralatan dan bahan yang digunakan untuk proses penelitian. Adapun alat dan bahan yang digunakan dalam proses penelitian adalah sebagai berikut:

3.5.1 Alat

Timbangan analitik, tabung reaksi, erlenmyer, batang pengaduk, gelas ukur, cawan petri, tabung reaksi, jarum osse, bunsen, kaki tiga, kawat asbes, oven,

autoklaf, kertas coklat, panci, blender, kain saring, kompor, jangka sorong, bor pelubang media.

3.5.2 Bahan

Buah sirsak gunung (*Annona montana Macf*), media *Salmonella Sigella Agar* (SSA), bakteri *Salmonella sp* yang diperoleh dari Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya, NaCl 0,9%, starter *Lactobacillus casei* dari yakult, aquadest.

3.6 Prosedur penelitian

3.6.1 Pembuatan Sari Buah *Annona montana Macf*.

1. Dikumpulkan buah sirsak gunung yang telah berwarna kuning dan tampilan fisik baik.
2. Dibersihkan dari kotoran pada bagian luar buah sirsak kuning.
3. Dicuci buah hingga bersih dan kupas kulitnya.
4. Ditimbang sebanyak 250 gram buah segar.
5. Dimasukan dalam blender dan ditambahkan air sebanyak 500 mL.
6. Dipisahkan antara sari menggunakan kain saring dan biji dipisahkan dari ampas dan biji buah di buang (Boro,2016).

3.6.2 Fermentasi Minuman Probiotik Sari Buah *Annona montana Macf*.

1. Disiapkan sari buah sisak gunung.
2. Dimasukkan dalam panci kemudian dilakukan proses pasteurisasi dengan suhu 72⁰C selama 15 menit.
3. Dimasukan starin bakteri *Lactobacillus casei* dengan konsentrasi 90 ml.
4. Diinkubasi pada suhu 37⁰C dengan dalam inkubator selama 24 jam (Boro, 2016).

3.6.3 Pembuatan Media *Salmonella Sigella Agar*

1. Timbang media SSA, lalu masukkan media SSA ke dalam tabung Erlenmeyer yang telah di sterilisasi dan ditambahkan aquades, kemudian dipanaskan pada api bunsen selama hingga mendidih.
2. Setelah itu tuang media kedalam cawan petri dan tabung reaksi.
3. Bila telah mengeras masukkan kedalam kulkas bersuhu 3°C (Romadhon, 2016).

3.6.4 Karakterisasi Bakteri *Salmonella sp*

1. Diambil bakteri *Salmonella sp* dengan menggunakan jarum ose.
2. Diinokulasikan pada media *Salmonella Sigella Agar* (SSA).
3. Diinkubasi pada temperatur 35°C selama 24 jam.
4. Setelah itu amati koloni *Salmonella sp* yang tumbuh pada media SSA.
5. Koloni yang terbentuk pada media SSA adalah berwarna bening berbintik hitam (Yuswananda, 2015).

3.6.5 Pewarnaan Bakteri *Salmonella sp*

1. Sterilisasi meja kerja dengan menggunakan alkohol.
2. Difiksasi kaca preparat.
3. Diambil bakteri *Salmonella sp* pada cawan petri yang telah di isolasi menggunakan jarum ose bundar.
4. Setelah itu goreskan koloni mikroba diatas kaca preparat, kemudian fiksasi dan tambahkan larutan Kristal violet sebanyak 2 tetes dan diamkan selama 1 menit.
5. Setelah itu fiksasi dan bilas dengan aquades, tambahkan larutan iodine sebanyak 2 tetes dan diamkan selama 30 detik. Setelah itu bilas dengan aquades, lalu fiksasi dan tambahkan alkohol kemudian bilas kembali dengan aquades.

6. Tambahkan larutan safranin sebanyak 2 tetes dan bilas dengan aquades. Setelah itu tempelkan kaca objektif diatas kaca preparat, kemudian diamati menggunakan mikroskop (Malik, 2017).

3.6.6 Pembuatan Suspensi Bakteri Menggunakan Metode Transmittan

1. Diambil bakteri *Salmonella sp* pada media miring dengan jarum osse.
2. Disuspensikan dengan bantuan larutan NaCl fisiologis 0,9% steril.
3. Suspensi kemudian dituang ke dalam cuvet berdiameter 13 mm.
4. Penentuan kepadatan suspensi biakan diatur sehingga diperoleh pengenceran yang diharapkan pada panjang gelombang 580 nm yang memiliki transmittan 25% (setara dengan kepadatan 10^8) terhadap blanko NaCl 0,9% steril dengan menggunakan alat spektrofotometer (Litaay 'dkk', 2017).

3.6.7 Pengujian Antimikroba Dengan Difusi Sumuran

1. Suspensi bakteri sebanyak 1 ml ditumbuhkan pada media SS Agar dengan metode pour plate.
2. Media yang telah berisi suspensi bakteri dilubangi dengan bor dengan diameter 5 mm dan kedalaman 4 mm, kemudian diisi dengan larutan antibiotik / antimikroba.
3. Inkubasi selama 24 jam. Amati dan ukur diameter zona hambat atau zona bening yang terbentuk (Nurjannah, 2017).

3.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini digunakan analisis data secara deskriptif. Data diambil dari hasil pengukuran zona bening yang terbentuk pada sekitar area sumuran uji dengan menggunakan jangka sorong, kemudian data yang di peroleh dimasukkan

dalam dalam kategori lemah, sedang, kuat, atau tidak ada daya hambat berdasarkan diameter zona bening yang terbentuk.