

## **BAB III**

### **METODELOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan pendekatan eksperimental yaitu dengan minuman probiotik dari sari buah sirsak gunung *Annona montana* Macf terhadap bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *streptococcus thermopiles* dengan menggunakan perbandingan jumlah strain bakteri dari 2 %, 4 % dan 6 %.

Penelitian ini meliputi dua tahap, pertama yaitu mempersiapkan populasi dan sampel penelitian, selanjutnya menentukan lokasi dan waktu penelitian, serta menyiapkan biakan murni *Lactobacillus bulgaricus*, menghitung kebutuhan bahan dan penimbangan, menyiapkan alat dan sterilisasi semua alat. Penelitian ii bertujuan untuk mengetahui uji mutu berupa organoleptis, uji pH, uji viskositas dan uji total Bakteri Asam Laktat (BAL) kemudian dilakukan uji Anova one way.

Tahap kedua merupakan tahap akhir yang dilakukan berupa pengolahan data membuat kesimpulan dari hasil uji mutu fisik dan mikrobiologi yang telah dilakukan.

## **3.2 Populasi dan Sampel**

### **3.2.1 Populasi**

Populasi dalam penelitian ini menggunakan sari buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.), yang dibuat sebagai minuman probiotik. Tanaman uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah tanaman sirsak gunung dimana bagian yang digunakan adalah buahnya. Buah sirsak gunung yang digunakan dalam penelitian ini di dapat dari pekarangan kampus di daerah barito 6.

Bakteri uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* didapatkan dari balai besar pelatihan peternakan batu.

### **3.2.2 Sampel**

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil minuman probiotik sari buah sirsak gunung.

## **3.3 Lokasi dan penelitian**

### **3.3.1 Lokasi penelitian**

Penelitian pembuatan sari buah (*Annona montana* Macf.), proses fermentasi dan pengujian minuman probiotik dilakukan dilaboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang. Proses pembuatan dan uji mutu fisik organoleptis (warna, rasa, aroma), uji pH, uji viskositas dan uji total Bakteri Asam Laktat.

### **3.3.2 Waktu Penelitian**

Waktu penelitian dimulai dari proses penyusunan proposal bulan November 2018 sampai dengan Mei 2019

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

**Tabel 3.1 Definisi Operasional**

Variabel	Sub Variabel	Defenisi Operasional	Alat ukur	Hasil Ukur
<b>Variabel Bebas</b>	Variasi Rasio Starter	Perbandingan volume starter dengan rasio 2 %, 4 %, 6 % pada fermentasi minuman probiotik dari sari <i>Annona montana</i> macf.	Visual	
<b>Variabel Terikat</b>	Uji Organoleptik	Pengujian dengan indra manusia sebagai alat utama untuk pengukuran daya terhadap produk yang dihasilkan meliputi warna, tekstur, aroma dan rasa	Panca Indra Bau, Rasa, Warna	
	Uji pH	Pengujian yang dilakukan untuk mengetahui derajat keasaman suatu zat	pH universal	
	Uji viskositas	Pengujian yang dilakukan untuk mengetahui kekentalan yang dihasilkan pada produk	Visko-meter Oswold	Centi pois (Cp)
<b>Mikro-Biologi</b>	Uji Total BAL	Pengujian yang dilakukan untuk mengetahui jumlah bakteri asam laktat yang dihasilkan produk.		Dengan hasil jumlah Total Bakteri

### 3.5 Instrumen Penelitian dan Bahan

Merupakan alat dan bahan yang digunakan selama berlangsungnya penelitian untuk dapat memperoleh suatu data.

#### 3.5.1 Alat

Juicer, kain saring, termometer, timbangan, kompor, inkubator, gelas ukur, erlemeyer, pengaduk, wadah, oven, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, pipet volume, pipet tetes, kapas, kertas coklat, rak tabung, bunsen, pipet volum.

#### 3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu media NA, strain *Lactobacillus bulgaricus* dan *streptococcus thermophilus*, aquadest.

### 3.6 Pengumpulan data

Dalam pembuatan minuman probiotik dilakukan dalam beberapa tahapan antara lain :

#### 3.6.1 Pembuatan sari buah sirsak gunung (*Annona montana Macf*) (Boro, 2017)

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 500g Buah segar.
5. Dimasukkan kedalam blender dan ditambahkan air 1 L
6. Dipisahkan antara sari menggunakan kain saring dan biji dipisahkan dari ampas dan biji dibuang

### 3.6.2 Pembuatan starter bakteri

1. Disiapkan kultur starter bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *streptococcus thermophilus*
2. Masing – masing dipipet sebanyak 3 mL
3. Dimasukkan kedalam media MRSB sebanyak 150 mL dalam Erlenmeyer
4. Media MRSB yang sudah dimasukkan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *streptococcus thermophilus* diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 24 jam
5. Dimasukkan starter kedalam Erlenmeyer yang telah disterilkan dengan perbandingan masing – masing 2 %, 4 % dan 6 % bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *streptococcus thermophilus*

### 3.6.3 Prosedur Sterilisasi

1. Sterilisasi basah (media)
  1. Media dimasukkan kedalam Erlenmeyer atau botol dan ditutup rapat dengan kapas atau aluminium foil
  2. Erlenmeyer lalu dimasukkan ke dalam alat sterilisasi (autoclave)
  3. Nyalakan sumber panas dan tunggu hingga thermometer menunjukkan 100<sup>0</sup> C kemudian hitung waktu mundur hingga 30 menit (Uap panas yang terbentuk akan mematikan mikroba)
  4. Setelah selesai alat sterilisasi dimatikan dan bahan yang steril dikeluarkan
  5. Setelah 24 jam, bahan atau media tersebut di sterilkan lagi dengan cara yang sama, fungsinya untuk memberi kesempatan spora atau sel vegetative yang belum mati untuk tumbuh sehingga mudah dibunuh.
- a. Sterilisasi kering (Inkubator)
  1. Alat dimasukkan kedalam incubator dan dibungkus menggunakan kertas coklat

2. Alat yang sudah dibungkus dengan kertas coklat dimasukkan dalam alat sterilisasi (inkubator)
3. Nyalakan tombol on dengan suhu
4. Setelah selesai alat sterilisasi dimatikan dan alat yang steril dikeluarkan

#### 3.6.4 Fermentasi minuman probiotik sari buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.)

1. Disiapkan sari buah sirsak gunung
2. Dimasukkan dalam panci kemudian dilakukan proses pasteurisasi dengan suhu 72<sup>0</sup> C selama 15 menit
3. Ditambahkan gula 2 % kedalam panci yang berisi sari buah sirsak gunung
4. Dimasukkan strain bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dengan perbandingan strain bakteri 2 %, 4 % dan 6 %
5. Diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C dalam inkubator selama 24 jam

**Tabel 3.2 Formula Minuman Probiotik Sari Buah Sirsak Gunung**

No.	Komposisi	Jumlah	Jumlah b/v
1.	Sari Buah	500mL	
2.	Gula	2 %	10 gram
3.	Starter	2 %	10 gram
		4 %	20 gram
		6 %	30 gram

#### 3.7 Prosedur Pengujian Minuman Probiotik Sari Buah Sirsak Gunung

##### (*Annona montana* Macf)

Berikut ini merupakan beberapa cara atau tahapan pengujian minuman probiotik sari buah sirsak gunung yaitu :

##### 3.7.1 Uji organoleptis

Uji sensoris yang dilakukan untuk menunjukkan hasil pengukuran objektif penulis terhadap atribut sensoris pada suatu produk. Atribut sensoris yang

dianalisa pada uji organoleptis menggunakan sistem indera manusia antara lain yaitu aroma (penciuman), rasa (pengecap), warna (pengelihatan), dan tekstur (peraba)

### 3.7.2 Uji pH

1. Disiapkan alat dan sampel
2. Dinyalakan pH meter dengan larutan buffer pH 4, pH 7
3. Dibilas elektroda pH meter dengan menggunakan akuades lalu dikeringkan dengan tisu
4. Diukur sampel fermentasi minuman probiotik sari buah sirsak gunung setelah pH meter dikalibrasi
5. Dichelup pH meter pada sampel lalu biarkan angka pH meter stabil

### 3.7.3 Uji Total Bakteri Asam Laktat

1. Diambil dan ditimbang media NA
2. Dimasukkan dalam erlenmeyer kemudian dipanaskan diatas bunsen dan diaduk hingga homogen kemudian ditutup dengan kapas lalu bungkus dengan kertas coklat
3. Dimasukkan dalam autoclaf disterilkan dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  selama 15 menit
4. Disiapkan larutan Aquadest steril 9 ml untuk setiap tabung reaksi, dibuat pengenceran  $10^{-1}$  hingga pengenceran  $10^{-8}$
5. Diambil sampel 1 ml masukkan dalam aquadest steril 9 ml
6. Diambil 1 ml larutan pengenceran  $10^{-1}$ , dimasukkan dalam tabung reaksi pengenceran  $10^{-2}$
7. Diambil 1 ml larutan dari pengenceran  $10^{-1}$  hingga  $10^{-8}$

8. Dituang dalam cawan petri steril lalu dituang media NA hangat hingga dasar cawan terisi, dilakukan dengan metode Pour Plate
9. Dilakukkan pada perbandingan 2 %, 4 %, dan 6 %
10. Didiamkan hingga memadat, kemudian diinkubasi selama 24 jam dalam inkubator
11. Dicatat pertumbuhan koloni pada setiap cawan yang mengandung koloni
12. Dihitung angka *Total Plate Count* (TPC) dalam 1 mL dengan mengalikan jumlah koloni dengan faktor pengenceran yang digunakan satuan *colony forming unit/mL* atau koloni/mL

#### 3.7.4 Uji Viskositas

##### 3.7.4.1 Perhitungan Bobot Jenis

1. Disiapkan alat viskometer Oswald, piknometer, thermomter dan sampel fermentasi minuman probiotik
2. Dikeringkan pikno dan tabung viskositas oswold dengan menggunakan etanol 70%
3. Ditimbang Piknometer kosong, catat hasil timbangan
4. Diisi aquadest dengan suhu 25<sup>0</sup>C, catat hasil timbangan
5. Dibersihkan dan dikeringkan piknometer isi dengan sampel, timbang kemudian catat hasil timbangan

##### 3.7.4.2 Hitung bobot jenis air dan zat

1. Disiapkan alat dan bahan yang akan digunakan
2. Dipasang secara tegak lurus menggunakan statif dan klem
3. Dimasukkan cairan dalam tabung hingga setengah terisi



4. Pasang bola hisa pada tabung 2, hisap cairan hingga cairan berada pada permukaan tanda batas
5. Dibuka bola hisap dari tabung 2, lalu tutup dengan jari dan hitung menggunakan stopwatch
6. Dihitung viskositas dengan menggunakan rumus :

$$\eta_{\text{cairan}} = \eta_{\text{air}} \frac{t_{\text{air}} \times d_{\text{air}}}{t_{\text{cairan}} \times d_{\text{cairan}}}$$

### 3.8 Analisa Data

Dari hasil penelitian ini mutu fisik berupa organoleptis, pH dan viskositas dianalisa secara deskriptif. Sedangkan total BAL akan diolah dalam bentuk tabel dan analisis data menggunakan *One Way ANOVA* untuk mengetahui perbandingan total BAL pada minuman probiotik. Apabila terdapat perbedaan maka akan dilanjutkan dengan menggunakan *Post Hoc Test* untuk mengetahui perbedaan antara strain bakteri 2%, 4% dan 6%.