

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1. Rancangan Penelitian**

Penelitian ini merupakan penelitian eksperimental dengan pendekatan *post test-control design* untuk menguji toksisitas akut minuman probiotik buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) terhadap larva *Artemia salina* Leach. Adapun rancangan dalam penelitian ini meliputi pengumpulan bahan, pembuatan minuman probiotik buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.), penyiapan larva udang, pengujian toksisitas akut menggunakan metode *Brine Shrimp Lethality Test* (BSLT). Dan Tahap terakhir adalah penarikan kesimpulan dari hasil analisis.

Jumlah hewan uji (*Artemia salina* Leach) yang digunakan berjumlah 10 ekor tiap konsentrasi. Pada penelitian ini dibuat delapan konsentrasi minuman probiotik buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) dan satu kontrol negatif. Setiap konsentrasi dan kontrol negatif dilakukan triplo. Sehingga jumlah total hewan uji yang diperlukan adalah 270 ekor larva *Artemia salina* Leach.

#### **3.2. Populasi dan Sampel**

##### **3.2.1. Populasi**

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

### 3.2.2. Sampel

Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagian Minuman probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) dengan konsentrasi tertentu yang digunakan untuk mengukur toksisitas berdasarkan nilai LC<sub>50</sub>.

### 3.3. Lokasi dan Waktu Penelitian

Pembuatan minuman probiotik sirsak gunung dan pengujian toksisitas dilakukan di laboratorium farmakognosi dan mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang dilakukan pada bulan Februari 2019 sampai dengan waktu yang ditentukan oleh pihak akademik.

### 3.4. Definisi Operasional Variabel

Penelitian ini memiliki dua variabel, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu konsentrasi minuman probiotik buah sirsak gunung. Hal tersebut dikarenakan konsentrasi dapat mempengaruhi hasil uji toksisitas yang akan dilakukan. Sedangkan variabel terikat dalam penelitian ini yaitu kematian larva *Artemia salina* Leach, hal tersebut dikarenakan kematian larva mempengaruhi nilai LC<sub>50</sub>.

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukuran	Skala Ukur
1	Minuman Probiotik	Konsentrasi minuman probiotik sirsak gunung terhadap larva <i>Artemia salina</i> Leach	Pipet volume	mL	Rasio
2	Toksisitas akut	Jumlah kematian larva <i>Artemia salina</i> Leach	Visual	Jumlah	Rasio

### 3.5. Alat dan Bahan

#### 3.5.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah timbangan analitik (Ohaus), kain saring, blender (Miyako), peralatan gelas (Pyrex), panci, termometer, incubator (Mammert IN30), kompor, lampu neon (Philips), lakban, aluminium foil, pipet volume, jarum ose, kertas coklat, kapas, pepet ukur, beaker glass, autoclave (American Tipe 75X) dan aerator.

#### 3.5.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.), starter *Lactobacillus casei* yang didapatkan dari produk komersial, aquadest, larva udang *Artemia salina* Leach dan air laut.

### 3.6. Prosedur Penelitian

#### 3.6.1 Pembuatan Sari Buah *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, dikupas kulitnya, dan dibuang bijinya
4. Ditimbang sebanyak 500 g buah segar
5. Dimasukan dalam blender dan ditambahkan air sebanyak 1 L
6. Diambil sari menggunakan kain saring

#### 3.6.2 Pembuatan Minuman Probiotik Buah Sirsak Gunung (Boro, 2017)

1. Disiapkan sari buah sisak gunung sebanyak 400 mL
2. Dimasukkan dalam dalam panci kemudian dilakukan proses pasteurisasi dengan suhu 72<sup>0</sup>C selama 15 menit
3. Ditambahan gula sebanyak 10 gram kedalam panci yang berisi sari sirsak gunung
4. Dimasukan starter bakteri *Lactobacillus casei* 90 mL
5. Diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C dalam inkubator selama 24 jam.

#### 3.6.3 Penyiapan Larva Udang (*Artemia salina* Leach) (Setyowati and Cahyanto, 2016)

1. Dimasukkan air laut sebanyak 600 mL kedalam beaker glass berukuran 2 L.
2. Dimasukkan larva udang sebanyak 500 mg kedalam air laut.

3. Bagian atas diberi penerangan lampu neon 40 watt untuk menghangatkan suhu ruang.
4. Diberikan aerator untuk proses penetasan larva
5. Setelah 48 jam telur udang menetas
6. Larva udang dipindahkan ke wadah kedua

#### 3.6.4 Konsentrasi Minuman Minuman Probiotik Buah Sirsak Gunung *Annona montana* Macf (Hasanah and Wijayanti, 2020)

1. Dilakukan Uji Trial and Error
2. Larutan induk yang digunakan yaitu Minuman probiotik sirsak gunung dengan konsentrasi 100%
3. Dibuat larutan uji dengan mengencerkan larutan induk dengan konsentrasi 100%, 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,7%, 0,5%, 0,3%, 0,1% menggunakan air laut
4. Didapatkan larutan uji yang dapat mematikan lebih dari 50% larva *Artemia salina*
5. Dibuat konsentrasi larutan uji sebenarnya yaitu konsentrasi 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% dan 1%.

#### 3.6.5 Pembagian Kelompok Perlakuan (Irnawati *et al.*, 2016)

Dalam penelitian ini dibagi menjadi 8 kelompok perlakuan. Adapun pembagian kelompok menurut sebagai berikut:

1. Kelompok kontrol (K) tidak diberikan minuman probiotik sirsak gunung, hanya diberi air laut saja.

2. Kelompok perlakuan 1 (1%) dibuat minuman probiotik sirsak gunung dengan 1 ml minuman probiotik (konsentrasi 10 %) + 9 ml air laut.
3. Kelompok perlakuan 2 (2%) dibuat minuman probiotik sirsak gunung dengan 2 ml minuman probiotik (konsentrasi 10 %) + 8 ml air laut
4. Kelompok perlakuan 3 (3%) dibuat minuman probiotik sirsak gunung dengan 3 ml minuman probiotik (konsentrasi 10 %) + 7 ml air laut
5. Kelompok perlakuan 4 (4%) dibuat minuman probiotik sirsak gunung dengan 4 ml minuman probiotik (konsentrasi 10 %) + 6 ml air laut
6. Kelompok perlakuan 5 (5%) dibuat minuman probiotik sirsak gunung dengan 5 ml minuman probiotik (konsentrasi 10 %) + 5 ml air laut
7. Kelompok perlakuan 6 (6%) dibuat minuman probiotik sirsak gunung dengan 6 ml minuman probiotik (konsentrasi 10 %) + 4 ml air laut
8. Kelompok perlakuan 7 (7%) dibuat minuman probiotik sirsak gunung dengan 7 ml minuman probiotik (konsentrasi 10 %) + 3 ml air laut
9. Kelompok perlakuan 8 (8%) dibuat minuman probiotik sirsak gunung dengan 8 ml minuman probiotik (konsentrasi 10 %) + 2 ml air laut

#### 3.6.6 Pelaksanaan Uji Toksisitas (Setyowati and Cahyanto, 2016)

1. Dimasukkan larutan uji dengan konsentrasi yang telah ditentukan
2. Dimasukkan 10 ekor larva udang (*Artemia salina* Leach) kedalam tiap-tiap tabung uji, diamati selama 24 jam
3. Dilakukan pengulangan triplo setiap larutan uji
4. Dihitung larva udang yang mati, dengan ciri-ciri tidak adanya pergerakan selama 10 detik pengamatan.

5. Dicatat larva udang yang mati setiap konsentrasi
6. Aktivitas toksik dinyatakan dalam nilai  $LC_{50}$  yang dihitung dengan analisis probit

### 3.6.7 Prosedur Perhitungan Nilai $LC_{50}$

Nilai  $LC_{50}$  dapat ditentukan dengan menggunakan metode analisis probit. Dilakukan dengan cara menghitung persen kematian hewan uji *Artemia salina* Leach tiap-tiap konsentrasi. Persen kematian didapatkan dari hasil perkalian rasio 100% yaitu larva yang mati dibagi jumlah larva awal dikali 100% pada masing-masing konsentrasi.

$$\text{Presentase kematian} = \frac{\text{jumlah larva mati}}{\text{jumlah larva total awal}} \times 100\%$$

Dilanjutkan analisis dengan membandingkan hasil tersebut dengan kontrol negatif sehingga didapatkan nilai  $LC_{50}$ . Untuk mendapatkan nilai probit dilakukan dengan mengkonversi nilai persen kematian pada tiap konsentrasi ke nilai probit dalam tabel probit. Kemudian dilanjutkan dengan menggunakan bantuan software SPSS atau Microsoft Excel

### 3.7. Analisis Data

Data hasil penelitian akan diolah dengan microsoft excel dengan analisis probit. Kemudian data yang diperoleh akan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik.