

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui nilai perbedaan nilai  $IC_{50}$  dari minuman probiotik sirsak gunung dengan menggunakan jenis bakteri asam laktat *Lactobacillus casei* dan kedua campuran antara *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Rancangan penelitian ini meliputi tahap persiapan, tahapan penelitian, dan tahap akhir.

Tahap persiapan atau tahap sebelum dilakukannya praktikum seperti menentukan tempat dan waktu berlangsungnya penelitian, memilih sirsak gunung yang akan digunakan sebagai sampel, menimbang sirsak gunung yang dibutuhkan dalam pembuatan minuman probiotik.

Tahap praktikum yaitu tahap pembuatan sari sirsak gunung, pembuatan minuman probiotik sirsak gunung, pengujian antioksidan minuman probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) dengan metode DPPH. Tahap terakhir adalah penarikan kesimpulan dari hasil praktikum.

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

Populasi pada penelitian ini adalah minuman probiotik sirsak gunung, sedangkan sampel yang digunakan adalah sebagian dari minuman probiotik sirsak

gunung dengan menggunakan jenis BAL yang berbeda yaitu *Lactobacillus casei* dan kedua campuran antara *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*.

### **3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia yang dilaksanakan pada bulan Februari tahun 2020.

### **3.4 Definisi Operasional Variabel**

Pada penelitian ini terdapat 2 jenis variabel, yakni variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas yang akan mempengaruhi kadar antioksidan pada penelitian ini adalah variasi bakteri yang digunakan dalam minuman probiotik sirsak gunung yaitu *Lactobacillus casei* dan kedua campuran antara *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Sedangkan variabel terikat penelitian ini adalah kadar antioksidan. Penentuan kadar antioksidan dilakukan untuk mengetahui perbedaan nilai IC<sub>50</sub> dengan jenis starter yang berbeda pada minuman probiotik sirsak gunung dengan metode DPPH.

Tabel 3.1 Tabel Definisi Operasional

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukuran	Skala Ukur
1.	Starter <i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lactobacillus casei</i> yang ditambahkan pada sari sirsak gunung sebanyak 90 mL	Gelas ukur	mL	Nominal
	Starter campuran antara <i>Lactobacillus bulgaricus</i> dan <i>Streptococcus thermophilus</i>	Campuran <i>Lactobacillus bulgaricus</i> dan <i>Streptococcus thermophilus</i> yang ditambahkan pada sari sirsak gunung sebanyak 100 mL	Gelas ukur	mL	Nominal
2.	Kadar antioksidan minuman probiotik sirsak gunung	Pengukuran dan perhitungan inhibisi konsentrasi 50%	Spektro-foto-meter UV-Vis	IC <sub>50</sub> Dikatakan sangat aktif sebagai antioksidan jika <50 ppm, aktif 50-100 ppm, sedang 101-150 ppm, dan lemah 151-200 ppm, sangat lemah > 200 ppm	Nominal

### **3.5 Alat dan Bahan**

#### **3.5.1 Alat**

Timbangan (*Ohaus*), blender (*Panasonic*), panci, pengaduk, termometer, kompor (*Rinnai*), inkubator (*Memmert*), beaker glass, erlemeyer, wadah plastik, oven, tabung reaksi, corong gelas, labu ukur, saring, pipet tetes, autoclave (*American Tipe 75X*), cawan petri, mikropipet, bunsen, pH-meter, spektrofotometri UV-Vis (*Genesys 10S UV-VIS*).

#### **3.5.2 Bahan**

Bahan yang digunakan yaitu sirsak gunung (*Annona montana* Macf.), produk X yang mengandung bakteri *Lactobacillus casei* (*Yakult expired date : 3 Maret 2020*), produk Y yang mengandung campuran kedua bakteri antara *Latobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* (*Cimory Original expired date : 20 Agustus 2020*), aquadest, etanol p.a, media *MRSA* (*Merck*), serbuk DPPH.

### **3.6 Prosedur Penelitian**

Pembuatan minuman probiotik dilakukan dalam beberapa tahapan antara lain :

#### **3.6.1 Pembuatan sari sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) (Juwita, 2018)**

1. Dikumpulkan sirsak gunung yang telah berwarna kuning dan tampilan fisik baik
2. Dicuci buah hingga bersih dan dikupas kulitnya
3. Ditimbang sebanyak 500 g buah segar
4. Dimasukkan kedalam blender dan ditambahkan air 1 L
5. Diambil sari menggunakan kain saring

#### **3.6.2 Sterilisasi**

##### **3.6.2.1 Sterilisasi basah**

1. Media dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditutup rapat dengan kapas
2. Dimasukkan erlenmeyer ke dalam alat sterilisasi (autoclave)
3. Dinyalakan sumber panas dan ditunggu hingga termometer menunjukkan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dengan tekanan 1 atm, kemudian hitung waktu mundur hingga 15 menit
4. Setelah selesai alat sterilisasi dimatikan dan bahan yang steril dikeluarkan

#### 3.6.2.2 Sterilisasi kering

1. Cawan petri dibungkus menggunakan kertas coklat
2. Dimasukkan dalam alat sterilisasi (oven)
3. Dinyalakan tombol on dengan suhu  $170^{\circ}\text{C}$  selama 30 menit
4. Setelah selesai, alat sterilisasi dimatikan dan alat yang steril dikeluarkan

#### 3.6.3 Perhitungan Total Bakteri Asam Laktat (Hidayat *et al.*, 2013)

1. Disiapkan 7 tabung reaksi yang masing-masing telah diisi dengan 9 mL aquades steril
2. Dipipet starter bakteri sebanyak 1 mL (produk X yang mengandung *Lactobacillus casei* dan produk Y yang mengandung *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*), masing-masing dimasukkan ke dalam tabung reaksi 1 (pengenceran  $10^{-1}$ )
3. Dipipet 1 mL dari tabung reaksi 1 dan dimasukkan kedalam tabung reaksi 2 (pengenceran  $10^{-2}$ )
4. Dilakukan pengenceran dengan cara yang sama hingga tabung reaksi ke 7
5. Dipipet 1 mL sampel pada tiap tabung reaksi hasil pengenceran dan dimasukkan kedalam cawan petri
6. Pembiakan dilakukan duplo dari pengenceran  $10^{-6} - 10^{-7}$
7. Ditambahkan media MRSA sebanyak  $\pm 15$  mL

8. Campuran dihomogenkan dengan cara diputar cawan petri membentuk angka delapan
9. Setelah media mengeras, cawan petri berisi biakan diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup> C selama 24 jam
10. Dihitung BAL

Satuan yang digunakan untuk penghitungan jumlah bakteri adalah CFU/ml (Fardiaz, 1993). Syarat jumlah BAL dalam minuman fermentasi  $\geq 10^6$  CFU/mL (SNI 7552, 2009). Jumlah bakteri per ml dapat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah bakteri} = \text{jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

### 3.6.4 Pembuatan Minuman Probiotik

3.6.4.1 Fermentasi Sari Sirsak Gunung (*Annona montana* Macf.) dengan *Lactobacillus casei* (Boro, 2017)

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

3.6.4.2 Fermentasi Sari Sirsak Gunung (*Annona montana* Macf.) dengan *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* (Tutik, 2018)

1. Disiapkan sari sirsak gunung 390 mL

2. Dimasukkan dalam panci kemudian dilakukan proses pasteurisasi dengan suhu 72<sup>0</sup> C selama 15 menit
3. Ditambahkan gula 10 gram kedalam panci yang berisi sari sirsak gunung
4. Dimasukkan strain bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* sebanyak 100 mL
5. Diukur pH sampel sebelum dilakukan inkubasi
6. Diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C dalam inkubator selama 24 jam
7. Diukur pH sampel setelah dilakukan inkubasi

Proses fermentasi dari sari sirsak gunung oleh BAL dapat ditandai dengan terjadinya perbedaan pH antara sebelum dan sesudah dilakukan inkubasi. Maka perlu dilakukan pengukuran pH menggunakan pH meter.

### **3.6.5 Uji Aktivitas Antioksidan (Juwita, 2018)**

#### 3.6.5.1 Pembuatan larutan DPPH

1. Ditimbang serbuk DPPH sebanyak 10 mg
2. Dilarutkan serbuk DPPH dengan etanol p.a dalam labu ukur hingga 100 ml

#### 3.6.5.2 Penentuan panjang gelombang maksimum DPPH

1. Dipipet larutan DPPH 2 mL, dimasukkan dalam tabung reaksi
2. Ditambahkan 2 mL etanol p.a
3. Etanol p.a digunakan sebagai blanko
4. Divortex agar homogen
5. Diinkubasi selama 30 menit pada inkubator dengan suhu 37 °C dan terhindar dari sinar matahari
6. Diukur serapan larutan dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 500-560 nm

### 3.6.5.3 Preparasi Sampel

1. Ditimbang sampel minuman probiotik pada tiap perlakuan sebanyak 1.000 mg untuk minuman probiotik sirsak gunung menggunakan starter *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dan 2.000 mg untuk minuman probiotik sirsak gunung menggunakan starter *Lactobacillus casei*.
2. Dilakukan replikasi dalam penimbangan sampel sebanyak tiga kali
3. Masing-masing dilarutkan dalam etanol p.a hingga 100 mL
4. Dilakukan pembuatan larutan seri 4.000 ppm, 8.000 ppm, 12.000 ppm dan 16.000 ppm untuk starter *Lactobacillus casei*, sedangkan untuk starter *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dibuat larutan seri dengan konsentrasi 1.500 ppm, 2.500 ppm, 4.000 ppm dan 8.000 ppm

### 3.6.5.4 Penentuan Aktivitas Antioksidan

1. Dipipet sebanyak 2 mL dari masing-masing konsentrasi larutan seri sampel
2. Dimasukkan dalam tabung reaksi
3. Ditambahkan larutan DPPH sebanyak 2 mL
4. Digunakan etanol sebagai blanko
5. Diinkubasi selama 30 menit dalam inkubator dengan suhu 37 °C dan terhindar dari sinar matahari
6. Diukur absorbansi masing-masing konsentrasi sampel pada panjang gelombang maksimum yang telah diperoleh
7. Dicatat absorbansi yang diperoleh
8. Dihitung persen inhibisi dari masing-masing perlakuan
9. Digunakan kurva baku untuk menetapkan IC<sub>50</sub>



Persentase inhibisi serapan DPPH dihitung menggunakan rumus (Prasetiorini *et al.*, 2014):

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{absorbansi kontrol} - \text{absorbansi sampel}}{\text{absorbansi kontrol}} \times 100\%$$

Setelah didapatkan persentase inhibisi dari masing-masing konsentrasi, kemudian ditentukan persamaan  $y = a + bx$  dengan perhitungan secara regresi linear dimana  $x$  adalah konsentrasi dan  $y$  adalah persentase inhibisi. Nilai  $IC_{50}$  didapatkan dari nilai  $x$  setelah mengganti  $y = 50$ .

$$IC_{50} = \frac{50 - a}{b}$$

### 3.7 Analisis Data

Dari data yang diperoleh pada penelitian dengan menggunakan variabel bebas yaitu jenis bakteri yang berbeda yaitu *Lactobacillus casei* dan kedua campuran antara *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dan variabel terikatnya yaitu kadar antioksidan, maka data hasil penelitian ini akan diolah dengan menggunakan metode uji- $t$  1 sampel independen untuk mengetahui pengaruh jenis starter pada minuman probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) terhadap kadar antioksidan.