

## **BAB III**

### **METODOLOGI PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Penelitian ini menggunakan metode penelitian deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui stabilitas penyimpanan terhadap viabilitas bakteri asam laktat dari permen probiotik sirsak gunung dengan menggunakan jenis bakteri asam laktat *Lactobacillus casei*. Rancangan penelitian ini meliputi tahap persiapan, tahapan penelitian, dan tahap akhir.

Tahap persiapan atau tahap sebelum dilakukannya penelitian 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 penelitian yaitu tahap pembuatan minuman probiotik sirsak gunung dan pembuatan permen probiotik sirsak gunung dengan tambahan bakteri *Lactobacillus casei*.

Tahap akhir yaitu menganalisa data untuk mengetahui jumlah stabilitas penyimpanan terhadap viabilitas bakteri asam laktat pada permen probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) dan kesimpulan.

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

##### **3.2.1 Populasi**

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah permen probiotik buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.).

##### **3.2.2 Sampel**

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagian dari permen probiotik buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) dengan menggunakan bakteri asam laktat *Lactobacillus casei*

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

Penelitian ini bertempat di Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang dan dilaksanakan pada 21 November 2020 – 21 Maret 2021.

### 3.4 Definisi Operasional Variabel

Adapun definisi variabel dari penelitian ini adalah viabilitas bakteri *Lactobacillus Casei* pada permen probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.)

Tabel 3.4 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi variable	Alat ukur	Hasil ukur	Skala ukur
Viabilitas bakteri asam laktat pada permen probiotik selama penyimpanan 1 minggu	kemampuan untuk hidup pada bakteri asam laktat pada permen probiotik yang disimpan selama masa simpan 1 minggu	perhitungan cawan / Angka Lempeng Total	Cfu / mL	Nominal

### 3.5 Instrumen Penelitian

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

#### 3.5.1 Alat

Alat yang digunakan yaitu timbangan analitik, blender, wadah alumunium, pengaduk, termometer, kompor, inkubator, erlenmeyer, gelas ukur, corong gelas, cetakan permen, cawan petri, tabung reaksi, pipet ukur, oven, autoklaf, kertas coklat, bunsen, kawat osse, stirrer, vortex, kain saring, dan hotplate.

#### 3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan yaitu buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.), produk X yang mengandung bakteri *Lactobacillus casei*, aquadest, *de Man Rogosa and Sharpe Agar*, spirtus, gula pasir, minyak, dan glucose cair.

### 3.6 Prosedur Penelitian

Pembuatan minuman probiotik dilakukan dalam beberapa tahapan antara lain :

#### 3.6.1 Pembuatan sari sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) (Fidyasari dkk., 2019)

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, kupas kulitnya, dan dibuang bijinya.
4. Ditimbang sebanyak 250 gram buah segar.
5. Dimasukkan dalam blender dan ditambahkan air sebanyak 500 mL.
6. Dipisahkan antara sari menggunakan kain saring.

#### 3.6.2 Fermentasi Minuman Probiotik Sari sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) (Fidyasari dkk., 2019)

1. Disiapkan sari buah sirsak gunung 200 mL.
2. Dimasukkan dalam wadah alumunium kemudian dilakukan proses pasteurisasi dengan suhu 72<sup>0</sup>C selama 15 menit
3. Ditambahkan gula sebanyak 10 gram ke dalam panci yang berisi sari sirsak gunung
4. Dimasukkan strain bakteri *Lactobacillus casei* sebanyak 90 mL
5. Diinkubasi pada suhu 37<sup>0</sup>C dengan dalam inkubator selama 24 jam

#### 3.6.3 Pembuatan Permen Probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.)

1. Disiapkan gula pasir sebanyak 60 gram
2. Dimasukkan ke dalam wadah alumunium
3. Ditambahkan sari buah sirsak gunung sebanyak 20 gram
4. Ditambahkan glucose cair 20 gram
5. Proses mixing pada suhu 105<sup>0</sup> C hingga mendidih
6. Dilakukan proses cooking suhu 140<sup>0</sup> C sampai hampir terjadi proses kristalisasi
7. Diturunkan suhu hingga 80<sup>0</sup> C

8. Dimasukkan minuman probiotik sebanyak 10 gram dan dihomogenisasi
9. Dilakukan proses cooling selama 10 menit
10. Dimasukkan dalam cetakan permen (cetakan karet) sebelumnya diolesi minyak
11. Dilakukan pengemasan jika sudah mengeras.

#### 3.6.4 Sterilisasi (Andriani, 2016)

##### 3.6.4.1 Sterilisasi Basah

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

##### 3.6.4.2 Sterilisasi Kering

1. Alat dimasukkan dibungkus menggunakan kertas coklat
2. Alat yang sudah dibungkus 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

#### 3.6.5 Pembuatan Media MRSA (Pangestu *et al.*, 2017).

1. Dilarutkan 68,2 gram media agar dalam 1 L aquadest
2. Diaduk dengan menggunakan stirrer sambil dilakukan pemanasan diatas hotplate
3. MRS agar disterilisasi dalam autoklaf pada suhu  $121^{\circ}\text{C}$  pada selama 15 menit
4. Setelah selesai, alat sterilisasi dimatikan, dan media MRS agar dikeluarkan

#### 3.6.6 Penyimpanan Permen Probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.)

(Yogeswara *et al.*, 2014)

1. Permen probiotik yang sudah dicetak, dilanjutkan dengan penyimpanan pada suhu kulkas  $4^{\circ}\text{C}$
2. Penyimpanan dilakukan selama 7 hari

3. Dan Analisa mikrobiologi dilakukan pada hari ke 3,5, dan hari ke 7

#### 3.6.7 Pembuatan Seri Pengenceran (Pangestu *et al.*, 2017).

1. Diisi 7 tabung reaksi dengan aquadest sebanyak 9 mL
2. Dilarutkan permen probiotik yang telah dicetak sebanyak 1 gram dan dilarutkan menggunakan NaCl fisiologis 0,9% sebanyak 9 mL (pengenceran  $10^{-1}$ )
3. Dilakukan homogenisasi dengan vortex
4. Diambil 1 mL dari pengenceran  $10^{-1}$  dan dimasukkan kedalam tabung reaksi dengan pengenceran  $10^{-2}$  secara aseptis dan dihomogenisasi
5. Dilakukan hal yang sama pada pengenceran  $10^{-3}$  sampai diperoleh pengenceran  $10^{-7}$

#### 3.6.8 Perhitungan Total Bakteri Asam Laktat pada Permen Probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) ((Pangestu *et al.*, 2017).

1. Dipipet sebanyak 1 mL pada tiap tabung reaksi hasil pengenceran dan dimasukkan ke dalam cawan petri
2. Pencawanan dilakukan duplo dari pengenceran  $10^{-6}$  sampai  $10^{-7}$
3. Dituangkan medium MRS agar steril sebanyak 10 mL ke dalam cawan tersebut
4. Selama penuangan medium, tutup cawan tidak boleh dibuka terlalu lebar untuk mengurangi kontaminasi dari luar
5. Segera setelah penuangan, cawan petri digerakkan diatas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel-sel bakteri asam laktat secara merata, yaitu digerakkan melingkar atau digerakkan seperti angka 8
6. Setelah agar memadat cawan-cawan tersebut diinkubasi di dalam inkubator dengan posisi terbalik pada suhu  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam.
7. Dilakukan perhitungan jumlah mikroba (cfu/mL)

#### 3.7 Analisis Data

Dalam penelitian ini digunakan analisis data secara deskriptif. Data diambil dari hasil perhitungan cawan yang ditumbuhi koloni dengan menggunakan perhitungan cawan / Angka Lempeng Total.