

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan metode penelitian eksperimental yang bertujuan untuk mengetahui total bakteri asam laktat (BAL) permen probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.). Adapun tahap rancangan dalam penelitian ini meliputi tahap persiapan, tahap penelitian, dan tahap akhir.

Tahap persiapan atau tahap sebelum dilakukannya penelitian yaitu menentukan tempat dan waktu berlangsungnya penelitian, pengumpulan dan pemilihan sirsak gunung yang akan digunakan sebagai sampel, menimbang sirsak gunung yang dibutuhkan dalam pembuatan minuman probiotik dan permen probiotik.

Tahap penelitian yaitu tahap pembuatan sari buah sirsak gunung, pembuatan minuman probiotik sirsak gunung, pembuatan permen probiotik sirsak gunung, perhitungan total BAL permen probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) dengan metode *Total Plate Count* (TPC). Dilanjutkan pada tahap terakhir adalah penarikan kesimpulan dari hasil praktikum.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

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

3.2.2 Sampel

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

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Pembuatan permen probiotik sirsak gunung serta penelitian total bakteri asam laktat (BAL) dilakukan di laboratorium mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang dilaksanakan pada bulan Maret 2021 sampai dengan waktu yang ditentukan oleh pihak akademik.

3.4 Definisi Operasional Variabel

Adapun Definisi Operasional Variabel dari penelitian ini adalah total bakteri asam laktat (BAL) permen probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.).

Tabel 3.1 Operasional variabel

No	Variabel	Definisi Operasional	Alat Ukur	Hasil Ukuran	Skala Ukur
1.	Total Bakteri Asam Laktat (BAL) Permen Probiotik Sirsak Gunung (<i>Annona montana</i> Macf.)	Banyaknya koloni BAL probiotik yang dapat dihitung menggunakan metode <i>total plate count</i> (TPC)	Perhitungan Cawan	CFU/gram	Numerik

3.5 Instrumen Penelitian

Instrumen penelitian yang dimaksudkan adalah alat dan bahan yang digunakan pada penelitian ini.

3.5.1 Alat

Alat yang digunakan adalah panci, blender (Miyako), pengaduk, kain saring, termometer, autoclave (American Tipe 75X), timbangan analitik (Ohaus), kompor, incubator (Mettler IN30), gelas ukur, erlenmeyer, pengaduk, wadah, oven, cawan petri, tabung reaksi, jarum ose, pipet volume, pipet tetes, kapas, kertas coklat dan alat penunjang lainnya..

3.5.2 Bahan

Bahan yang digunakan adalah buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf.), media MRSA, strain *Lactobacillus casei* dari produk komersial (yakult), buah *Annona montana* Macf, aquadest, glukosa, dan bahan penunjang lainnya.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan Sari Buah *Annona montana* Macf. (Boro and Fidyasari, 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 250gram buah segar
5. Dimasukkan dalam blender dan ditambahkan air sebanyak 500 mL
6. Dipisahkan antara sari menggunakan kain saring.

3.6.2 Pembuatan Fermentasi Minuman Probiotik Sari Buah *Annona montana* Macf (Boro and Fidyasari, 2017)

1. Disiapkan sari buah sisak gunung sebanyak 250 mL
2. Dimasukkan dalam wadah alumunium kemudian dilakukan proses pasteurisasi dengan suhu 72°C selama 15 menit
3. Ditambahkan gula sebanyak 10 gram kedalam wadah alumunium yang berisi sari sirsak gunung
4. Dimasukkan strain bakteri *Lactobacillus casei* dari produk komersial (yakult) sebanyak 90 mL
5. Diinkubasi pada suhu 37°C dalam inkubator selama 24 jam.

3.6.3 Pembuatan Permen Probiotik *Annona montana* Macf

1. Disiapkan gula pasir sebanyak 60gram
2. Dimasukkan kedalam wadah aluminium
3. Ditambahkan sari buah sirsak gunung sebanyak 20gram
4. Ditambahkan glukosa cair 20gram
5. Proses mixing pada suhu 105°C hingga mendidih
6. Dilakukan proses *cooking* suhu 140°C sampai hampir terjadi proses kristalisasi
7. Diturunkan suhu hingga 80°C
8. Dimasukkan minuman probiotik sebanyak 10gram 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 Pengukuran Nilai pH (Suwetja, 2007)

1. Ditimbang permen probiotik sebanyak 1gram dihomogenkan dengan aquades steril menggunakan *vortex*
2. Diukur pH menggunakan pH meter
3. Sebelum pH meter digunakan harus ditera kepekaan jarum penunjuk dengan larutan *buffer* pH 7. Besarnya pH adalah pembacaan jarum penunjuk pH setelah jarum skala konstan kedudukannya.

3.6.5 Pembuatan Media MRSA (Hidayat *et al.*, 2013)

1. Disiapkan 60mL aquadest
2. Ditambahkan 4,092g MRSA serbuk
3. Dimasukkan kedalam gelas erlenmeyer
4. Dipanaskan sampai mendidih
5. Setelah media mendidih, erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan kertas coklat
6. Disterilkan didalam autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 1 ATM selama 15 menit.

3.6.6 Perhitungan Total Bakteri Asam Laktat (Boro *and* Fidyasari, 2017)

1. Disiapkan 3 tabung reaksi yang telah diisi dengan 9 mL aquades steril
2. Dilarutkan permen probiotik yang telah cetak sebanyak 1 gram dan dilarutkan menggunakan aquades steril sebanyak 9 ml. (pengenceran 10^{-1})
3. Dihomogenisasi dengan *vortex*
4. Dipipet 1 mL dari tabung reaksi 1 dan dimasukkan kedalam tabung reaksi 2 (pengenceran 10^{-2})

5. Dilakukan pengenceran dengan cara yang sama hingga tabung reaksi ke 3
6. Dipipet 1 mL sampel pada tiap tabung reaksi hasil pengenceran dan dimasukkan kedalam cawan petri
7. Pencawanan dilakukan duplo dari pengenceran $10^{-2} - 10^{-3}$
8. Ditambahkan media MRSA sebanyak ± 10 mL
9. Campuran dihomogenkan dengan cara digerakkan cawan petri membentuk angka delapan
10. Setelah agak mengeras, cawan petri diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam
11. Dihitung BAL

Syarat jumlah BAL dalam minuman fermentasi $\geq 10^6$ CFU/mL (SNI 7552, 2009). Untuk mengetahui jumlah bakteri per mL dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut: Jumlah bakteri = jumlah koloni x $\frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$

3.7 Analisis Data

Dari data yang diperoleh pada penelitian, maka data hasil penelitian ini akan diolah dengan menggunakan analisa data deskriptif untuk mengetahui total bakteri asam laktat (BAL) permen probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.).