

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Pada penelitian ini merupakan penelitian deskriptif yang bertujuan untuk mengetahui total bakteri asam laktat pada permen cokelat probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) yaitu dengan membuat permen cokelat probiotik dari minuman probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) dengan menggunakan starter *Lactobacillus casei*.

Tahap penelitian meliputi tiga tahap kerja, yaitu:

Tahap yang pertama adalah tahap persiapan yang meliputi persiapan alat dan bahan yang akan digunakan untuk pembuatan minuman probiotik, permen probiotik, dan pengujian viabilitas bakteri asam laktat pada permen cokelat probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.)

Tahap kedua adalah tahap pelaksanaan yakni dengan melakukan pembuatan minuman probiotik sirsak gunung, pembuatan permen probiotik sirsak gunung, dan pengujian viabilitas bakteri asam laktat pada permen cokelat probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.)

Tahap ketiga adalah tahap akhir penelitian yakni dengan melakukan pengolahan dan analisis data serta membuat kesimpulan dari hasil penelitian.

3.2 Populasi dan Sampel

3.2.1 Populasi

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

3.2.2 Sampel

Sampel yang digunakan pada penelitian ini adalah sebagian dari hasil permen coklat probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.)

3.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian tentang pembuatan permen coklat probiotik sirsak gunung dan pengujian viabilitas bakteri asam laktat pada permen coklat probiotik sirsak gunung (*Annona montana* Macf.) dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Akademi Farmasi Putra Indonesia Malang pada bulan November sampai dengan terselesainya penelitian di 2021.

3.4 Definisi Operasional Variabel

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

Tabel 3.1 Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi Variabel	Alat Ukur	Hasil Ukur	Skala Ukur
Total bakteri asam laktat pada permen cokelat probiotik sirsak gunung	Total bakteri asam laktat yang dapat bertahan hidup pada permen cokelat probiotik sirsak gunung	Perhitungan Cawan	Cfu/mL	Ratio

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

Panci, blender, batang pengaduk, kain saring, termometer, timbangan kue, timbangan analitik, kompor, inkubator, gelas ukur, erlemeyer, wadah, oven, cawan petri, tabung reaksi, pipet tetes, kapas, kertas cokelat, mikro pipet, blue tip, vortex, autoklaf, rak tabung reaksi, pH meter.

3.5.2 Bahan

Buah sirsak gunung (*Annona montana* Macf), sukrosa, glukosa cair, media MRS Agar, starter *Lactobacillus casei* yang didapatkan dari produk yakult, aquadest steril, minuman probiotik sirsak gunung, dan cokelat batang.

3.6 Prosedur Penelitian

3.6.1 Pembuatan Sari Buah *Annona montana* Macf (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 250 gram 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. (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 Coklat Probiotik *Annona montana* Macf.

1. Disiapkan gula pasir sebanyak 60 gram
2. Dimasukkan kedalam wadah aluminium

3. Ditambahkan sari buah sirsak gunung sebanyak 30 gram
4. Ditambahkan glukosa cair 30 gram
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. Ditambahkan coklat batang 5 gram dan dihomogenisasi
9. Dimasukkan minuman probiotik sebanyak 30 gram dan dihomogenisasi
10. Dilakukan proses cooling selama 10 menit
11. Dimasukkan dalam cetakan permen (cetakan karet) yang sebelumnya sudah diolesi minyak
12. Dilakukan pengemasan jika sudah mengeras.

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

1. Disiapkan 60 mL aquadest
2. Ditambahkan 4,092 g 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.

3.6.5 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 coklat probiotik yang telah dicetak sebanyak 1 gram dan dilarutkan menggunakan akuades 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

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