

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan Laboratorium Kimia Universitas Brawijaya Malang pada bulan September sampai Desember 2013.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah hot plate, beacker glass, panci, kompor, pengaduk, blander, penyaring, termometer, gelas plastik, erlenmeyer, mikropipet, tabung reaksi, oven, laminar flow, jarum ose, bunsen, cawan petri, desikator dan pH meter.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah sari (susu) kedelai hasil pembuatan sendiri, starter bakteri *L. acidophilus* dan *B. bifidum*, larutan NaOH, aquades, alkohol 95%, indikator fenolftalin 1%, NaOH 0,1 N, kertas label, tissue, kapas dan kain kasa.

3.3 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan variasi 2 faktor, yaitu faktor I adalah Komposisi (P) dan faktor II adalah Konsentrasi (K), yang dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali.

Berdasarkan kedua faktor tersebut di atas, maka diperoleh kombinasi perlakuan sebagai berikut:

Tabel 3.1 Kombinasi Perlakuan Komposisi dan Konsentrasi

P	K		
	K ₁	K ₂	K ₃
P ₁	P ₁ K ₁	P ₁ K ₂	P ₁ K ₃
P ₂	P ₂ K ₁	P ₂ K ₂	P ₂ K ₃
P ₃	P ₃ K ₁	P ₃ K ₂	P ₃ K ₃

Keterangan:

P₁ : Komposisi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dengan perbandingan 1:1

P₂ : Komposisi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dengan perbandingan 2:1

P₃ : Komposisi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dengan perbandingan 1:2

K₁ : Konsentrasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* 1,0 % dari total berat sampel

K₂ : Konsentrasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* 1,5 % dari total berat sampel

K₃ : Konsentrasi *L. acidophilus* dan *B. bifidum* 2,0 % dari total berat sampel

Penentuan Komposisi dan Konsentrasi sebagaimana tercantum pada lampiran 9.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Starter (Koroleva, 1991)

Prosedur pembuatan starter bakteri untuk soyghurt adalah sebagai berikut:

1. Dimasukkan isolat bakteri *L. acidophilus* dan *B. bifidum* dari biakkan murni pada media MRSA sebanyak 100 ml dalam tabung reaksi dengan cara goresan menggunakan jarum ose.
2. Media kultur diinkubasi selama 48 jam dalam inkubator.
3. Disuspensi dengan aquades steril.

4. Dilakukan penggojokan dengan *vortex mixer* selama 1-2 menit.
5. Kerapatan sel suspensi bakteri dihitung dengan menggunakan haemocytometer.
6. Starter dibuat dengan menggunakan media MRS broth dan menggunakan kultur bakteri *L. acidophilus* dan *B. bifidum* yang telah dipersiapkan pada media MRS agar miring.
7. Media MRS broth steril masing-masing sebanyak 100 ml dalam erlenmeyer steril diinokulasi dua ose kultur bakteri *L. acidophilus* dan *B. bifidum*.
8. Media kultur diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C pada shaker dengan putaran 125 rpm.
9. Dibuat kurva pertumbuhan bakteri hingga kerapatan mencapai 10^7 sel/ml.
10. Kultur induk siap digunakan untuk pembuatan *feed starter* dan *bulk starter* soyghurt.
11. Pembuatan *feed starter* dimulai dengan menambahkan 3 % kultur induk ke dalam media tumbuh baru (bahan dasar soyghurt sebanyak 97 mL), kemudian diinkubasi selama 29 jam pada suhu 37 °C sampai terkoagulasi.
12. Pembuatan *bulk starter* dimulai dengan menambahkan 3 % *feed starter* ke dalam media tumbuh baru (bahan dasar soyghurt sebanyak 97 mL) kemudian dinkubasi selama 9 jam pada suhu 37 °C.

3.4.2 Pembuatan Susu Kedelai

Pembuatan susu kedelai dilakukan sesuai tahapan-tahapan sebagai berikut (Herawati dan Arif, 2011):

1. Dilakukan penyortiran pada kedelai, kemudian dicuci dengan air.

2. Dilakukan perebusan pada kedelai tersebut selama 15 menit, kemudian direndam dalam air bersih selama 8-12 jam.
3. Dicuci hasil perendaman kedelai tersebut sampai kulit arinya terkelupas.
4. Dilakukan penggilingan pada kedelai tersebut dengan air panas (80-100 °C), perbandingan kedelai dan air adalah 1:8, artinya kedelai seberat 1 Kg digiling dan dilarutkan air sebanyak 8 Liter.
5. Disaring hasil campuran tersebut dengan kain, sehingga didapatkan sari kedelai.
6. Direbus pada suhu 85-90 °C selama 30 menit dan diperoleh produk susu kedelai.

3.4.3 Pembuatan Soyghurt

Tahapan pembuatan soyghurt sama dengan prinsip dalam pembuatan yoghurt. Perbedaannya adalah bahan dasar yang digunakan untuk membuat yoghurt berasal dari susu murni (sapi atau kambing), sedangkan soyghurt bersasal dari sari kedelai atau sering disebut susu kedelai.

Tahapan dalam pembuatan soyghurt adalah sebagai berikut:

1. Sterilisasi Peralatan

Untuk menghindari terjadinya kontaminasi, maka sebelum melakukan kerja semua alat harus disterilkan terlebih dahulu dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (pounds square inch) selama 15 menit (Waluyo, 2008).

2. Homogenisasi

Proses homogenisasi dimaksudkan untuk mencegah timbulnya lapisan lemak (*cream layer*) pada permukaan (Wahyudi dan Sri, 2008). Dilakukan dengan cara menuangkan 2000 ml sari kedelai ke panci dan di aduk sampai homogen.

3. Pasteurisasi

Pasteurisasi dilakukan dengan memanaskan susu di stering kompor gas dengan suhu 80°C selama 15 menit. Tujuan pasteurisasi susu adalah untuk mencegah penularan penyakit dan mencegah kerusakan karena mikorganisme (Buckle *et al*, 1985). Selain itu, pasteurisasi dapat mengurangi waktu koagulasi akibat penurunan pH (Herawati dan Arif, 2011).

4. Pendinginan

Setelah dilakukan pasteurisasi, susu kedelai dimasukkan ke dalam botol berkapasitas 100 ml, kemudian dilakukan pendinginan sampai suhu susu kedelai mencapai 37-45°C.

5. Inokulasi *starter*

Setelah perlakuan pasteurisasi dan pendinginan, maka dilakukan proses inokulasi, yaitu proses penambahan kultur bakteri (Hidayat, dkk, 2006). Starter bakteri yang digunakan adalah dengan konsentrasi 1 %, 1,5 %, dan 2 %. Inokulasi starter dilakukan setelah suhu susu kedelai mencapai 37-45°C.

6. Inkubasi

Fermentasi dilakukan pada suhu ruang 14-16 jam. Perlakuan pada masing-masing konsentrasi dilakukan dengan 5 kali ulangan.

7. Uji Kualitas Sifat Fisika dan Kimia

Sesudah 14-16 jam, soyghurt dianalisis tingkat warna, rasa, aroma, total asam laktat, kadar lemak dan berat kering tanpa lemak.

3.4.4 Uji Organoleptik (Penampakan, Aroma dan Rasa)

Untuk mengetahui tingkat penerimaan konsumen terhadap produk soyghurt yang dihasilkan perlu dilakukan uji organoleptik. Uji organoleptik dilakukan berdasarkan uji hedonik oleh panelis sebanyak 15 orang dengan 5 taraf, yaitu taraf 1-5: Taraf 1 (sangat tidak suka), taraf 2 (tidak suka), taraf 3 (biasa), taraf 4 (suka), taraf 5 (sangat suka). Penilaian organoleptik dilakukan terhadap warna, aromadan rasa (Darwis dan Soekara, 1989).

Teknik pengujian sifat fisika yoghurt meliputi uji penampakan aroma dan rasa dengan prosedur sebagai berikut:

1. Tahap Persiapan
 - a. Dipersiapkan panelis sebanyak 15 orang.
 - b. Dipersiapkan bahan yang diujikan.
 - c. Bahan diletakkan dalam gelas plastik berukuran kecil.
2. Tahap Pelaksanaan
 - a. Diberi penjelasan kepada panelis tentang hal prosedur pengujian.
 - b. Panelis dipersilahkan mencicipi rasa, mencium aroma dan melihat penampakan soyghurt yang disediakan.
 - c. Uji organoleptik ini menggunakan pilihan nilai dalam bentuk skala dengan menguji penampakan, aroma dan rasa.

- d. Setelah itu, panelis dipersilahkan panelis mengisi angket yang telah disediakan.

Data yang diperoleh dari uji tersebut kemudian dianalisis secara kualitatif dan dibuat diagram untuk mengetahui persentase penilaian tertinggi.

3.4.5 Penentuan Kadar Asam Laktat (Ranggana dkk, 1977)

Tahapan-tahapan dalam menentukan kadar asam laktat pada soyghurt adalah sebagai berikut:

1. 10 ml sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, ditambahkan aquades sampai tanda batas kemudian dihomogenkan dan disaring.
2. Filtrat diambil 10 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
3. Ditambahkan 2-3 tetes indikator pp.
4. Dititrasi dengan larutan 0,1 N NaOH sampai warna tersebut tidak hilang selama 30 detik.
5. Pada akhir titrasi dihitung jumlah NaOH yang digunakan dengan rumus:

$$\text{Kadar Asam Laktat (\%)} = \frac{V \text{ NaOH} \times N \text{ NaOH} \times fp \times \text{BM Asam laktat}}{W} \times 100\%$$

3.4.6 Pengukuran Kadar Lemak (Soedarmadji, 1977)

Tahapan-tahapan pengujian kadar lemak adalah sebagai berikut:

1. Ditimbang 18 gram soyghurt dalam botol Babcock dan tambahkan lebih kurang 17,5 ml H₂SO₄ ± 95 % (BJ= 1,82-1,83). Dicampurkan baik-baik dengan menggoyang-goyangkan botol sampai gumpalan-gumpalan susu tercampur semua.

2. Dipasang botol Babcock dalam sentrifugasi dan jangan lupa pasang botol Babcock yang sama beratnya untuk keseimbangan. Putarlah sampai 5 menit.
3. Ditambahkan air panas (60 °C atau lebih) sampai labu dari botol Babcock terisi penuh. Dilanjutkan sentrifugasi selama 2 menit, kemudian ditambahkan air panas sampai lemak cair terletak dalam leher botol (kolom) yang berskala, kemudian disentrifugasi lagi selama 1 menit.
4. Masukkan botol dalam air hangat (55-60 °C) selama 3 menit atau lebih.
5. Disamakan permukaan lemak dalam botol sama dengan permukaan air pemanas.
6. Diambil, botol keringkan dan diukur kolom lemak dari ujung bawah sampai meniskus atas dengan pengukur kaliper atau lainnya, kemudian kadar lemak dinyatakan dalam % berat.

3.4.7 Pengukuran Berat Kering Tanpa Lemak (AOAC, 1984)

Langkah-langkah dalam penentuan berat kering tanpa lemak adalah sebagai berikut:

1. Ditimbang soyghurt sebanyak 2 gram pada sebuah botol yang sudah diketahui bobotnya.
2. Dikeringkan pada oven yang bersuhu 105 °C selama 3 jam.
3. Ditimbang, diulangi pekerjaan ini sampai diperoleh bobot tetap.
4. Dilakukan perhitungan dengan rumus:

$$\% \text{ Air} = \frac{W}{W_1} \times 100 \%$$

Keterangan:

W = Bobot soyghurt sebelum dikeringkan

W₁ = Kehilangan bobot setelah dikeringkan

Perhitungan berat kering tanpa lemak = 100 % - kadar air - kadar lemak

3.4.8 Teknik Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis secara statistik dengan Two-Way ANOVA.

Jika F hitung > F tabel 0,05%, yang berarti terdapat pengaruh komposisi dan konsentrasi *L. acidophilus* – *B. bifidum* terhadap kualitas susu kedelai fermentasi (soyghurt), maka dilakukan uji BNJ 5 %. Sedangkan uji organoleptik warna, aroma dan rasa dilakukan secara kualitatif untuk mendapatkan persentase dari total penilaian, sehingga dapat diketahui persentase penilaian yang tertinggi.