

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian pengaruh konsentrasi starter bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* terhadap kualitas yoghurt susu kambing ini menggunakan RAL (Rancangan Acak Lengkap) secara faktorial, terdiri dari dua faktor dengan 5 kali ulangan.

a. Faktor pertama: konsentrasi (A)

A₁ : Konsentrasi *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 0%

A₂ : Konsentrasi *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 2%

A₃ : Konsentrasi *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 4%

A₄ : Konsentrasi *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 6%

A₅ : Konsentrasi *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 8%

b. Faktor kedua: perbandingan (L)

L₁: Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 0:1 (0 ml *L. bulgaricus* + 1 ml *S. thermophilus*)

L₂: Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:0 (1 ml *L. bulgaricus* + 0 ml *S. thermophilus*)

L₃: Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:1 (1 ml *L. bulgaricus* + 1 ml *S. thermophilus*)

L₄: Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:2 (1 ml *L. bulgaricus* + 2 ml *S. thermophilus*)

L₅: Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 2:1 (2 ml *L. bulgaricus* + 1 ml *S. thermophilus*)

Berdasarkan kedua faktor tersebut diperoleh kombinasi perlakuan, sebagai berikut:

L \ A	A₁	A₂	A₃	A₄	A₅
L₁	L ₁ A ₁	L ₁ A ₂	L ₁ A ₃	L ₁ A ₄	L ₁ A ₅
L₂	L ₂ A ₁	L ₂ A ₂	L ₂ A ₃	L ₂ A ₄	L ₂ A ₅
L₃	L ₃ A ₁	L ₃ A ₂	L ₃ A ₃	L ₃ A ₄	L ₃ A ₅
L₄	L ₄ A ₁	L ₄ A ₂	L ₄ A ₃	L ₄ A ₄	L ₄ A ₅
L₅	L ₅ A ₁	L ₅ A ₂	L ₅ A ₃	L ₅ A ₄	L ₅ A ₅

L₁A₁ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 0:1 dengan konsentrasi 0%

L₁A₂ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 0:1 dengan konsentrasi 2%

L₁A₃ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 0:1 dengan konsentrasi 4%

L₁A₄ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 0:1 dengan konsentrasi 6%

L₁A₅ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 0:1 dengan konsentrasi 8%

L₂A₁ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:0 dengan konsentrasi 0%

L₂A₂ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:0 dengan konsentrasi 2%

L₂A₃ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:0 dengan konsentrasi 4%

L₂A₄ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:0 dengan konsentrasi 6%

L₂A₅ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:0 dengan konsentrasi 8%

L₃A₁ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:1 dengan konsentrasi 0%

L₃A₂ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:1 dengan konsentrasi 2%

L₃A₃ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:1 dengan konsentrasi 4%

L₃A₄ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:1 dengan konsentrasi 6%

L₃A₅ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:1 dengan konsentrasi 8%

L₄A₁ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:2 dengan konsentrasi 0%

L₄A₂ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:2 dengan konsentrasi 2%

L₄A₃ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:2 dengan konsentrasi 4%

L₄A₄ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:2 dengan konsentrasi 6%

L₄A₅ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 1:2 dengan konsentrasi 8%

L₅A₁ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 2:1 dengan konsentrasi 0%

L₅A₂ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 2:1 dengan konsentrasi 2%

L₅A₃ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 2:1 dengan konsentrasi 4%

L₅A₄ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 2:1 dengan konsentrasi 6%

L₅A₅ : Perbandingan *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* 2:1 dengan konsentrasi 8%

3.2 Variabel Penelitian

Variabel yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari 2 variabel meliputi:

1. Variabel bebas dalam penelitian ini adalah konsentrasi starter bakteri *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* dengan 5 perlakuan, yaitu 0%, 2%, 4%, 6% dan 8%.
2. Variabel terikat dalam penelitian ini adalah uji kualitas yoghurt susu kambing meliputi:
 - a. Sifat kimia, terdiri dari total keasaman, kadar lemak dan kadar protein.

- b. Sifat fisika, terdiri dari warna, aroma, rasa

3.3 Waktu dan Tempat Pengambilan Data

Pengambilan data dilaksanakan pada bulan Juni - Agustus 2009. Bertempat di laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan laboratorium kimia Universitas Muhammadiyah Malang.

3.4 Alat dan Bahan

3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah stering hot plate, beacker glass, pengaduk, erlenmeyer, inkubator, pipet ukur, tip, mikropipet, spektrofotometer, kertas saring, tabung reaksi, gelas ukur, gunting, timbangan analitik, water bath, oven, labu ukur, labu takar, labu kjeldahl shaker, haemocytometer, kaca benda, preparat, botol Babcock.

3.4.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah starter bakteri *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus*, media MRS broth dan MRSA, susu kambing, aquades, indikator fenolftalin 1%, NaOH 0,1 N, gelas plastik, kapas, kain kasa, plastik, kertas label, H_2SO_4 , Na_2SO_4 , HgO, Na_2SO_3 , butiran zink, asam borat, metilen biru, HCl.

3.5 Prosedur Kerja

3.5.1 Pembuatan Starter

Prosedur pembuatan starter bakteri berdasarkan Joentono (1980) dalam Nur (2005) sebagai berikut: diagram alir yang tercantum pada lampiran 1,

1. Sterilisasi alat yang akan digunakan (tujuannya untuk menghindari terjadinya kontaminasi) dalam autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 15 psi (pounds square inch) selama 15 menit, dicantumkan dalam Gambar 1 pada lampiran 2, kemudian membuat media MRSA, lalu disterilisasi.
2. Isolat bakteri *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* dari biakkan murni dimasukkan pada media MRSA dengan posisi dimiringkan masing-masing sebanyak 100 ml dalam tabung reaksi dengan cara goresan menggunakan jarum ose. Tujuannya untuk stock kultur bakteri, sebagaimana yang dicantumkan dalam Gambar 2 pada lampiran 2.
3. Media kultur diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37°C dalam inkubator.
4. Buat media MRS broth (untuk membuat starter bakteri) sebanyak 100 ml dalam erlenmeyer steril, lalu disterilisasi dalam autoklaf.
5. Kultur bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dari media MRS agar miring tadi diinokulasikan ke dalam media MRS broth steril menggunakan jarum ose, kemudian kultur bakteri *Streptococcus thermophilus* dari media MRS agar miring, diinokulasikan ke dalam media MRS broth steril menggunakan jarum ose.
6. Media kultur kedua bakteri tersebut diinkubasi selama 24 jam dalam shaker dengan putaran 125 rpm.

7. Disiapkan susu kambing murni sebagaimana dicantumkan pada Gambar 3 dalam lampiran 2. Setelah itu dihomogenisasi (proses homogenisasi dimaksudkan untuk mencegah timbulnya lapisan lemak pada permukaan) dengan cara 1/2 liter susu ditempatkan dalam erlenmeyer 1000 ml diaduk sampai homogen.
8. Susu kambing dipasteurisasi selama 15 menit sampai mencapai suhu 70 - 75°C dengan tujuan untuk mencegah penularan penyakit dan mencegah kerusakan karena mikroorganisme, sekaligus untuk mempertahankan semaksimal mungkin rupa dan cita rasa susu segar.
9. Didinginkan hingga mencapai suhu 45 - 50°C untuk menghindari terjadinya kontaminasi oleh bakteri.
10. Inokulasi starter bakteri dalam susu, yaitu proses penambahan starter bakteri *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* masing-masing dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 ml yang telah berisi susu kambing hasil pasteurisasi.
11. Di inkubasi (fermentasi) yang dilakukan pada suhu 45°C dalam inkubator selama 3 jam. Hasil inkubasi starter bakteri dapat dilihat pada Gambar 3 dalam lampiran 2.

3.5.2 Pembuatan Yoghurt

Proses pembuatan yoghurt yang dimodifikasi dengan penambahan starter bakteri *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* sebagai berikut: diagram alir yang tercantum pada lampiran 1.

1. Sterilisasi peralatan dalam autoklaf

2. Disiapkan susu kambing murni sebanyak 5000 ml yang tercantum dalam Gambar 4 pada lampiran 8. Selanjutnya dihomogenisasi yang dilakukan dengan cara susu sebanyak 5000 ml masing- masing ditempatkan dalam erlenmeyer 1000 ml diaduk sampai homogen.
3. Pasteurisasi dilakukan dengan memanaskan susu distering hot plate hingga suhunya mencapai 70 - 75°C selama 15 menit.
4. Pendinginan dilakukan setelah proses pasteurisasi hingga mencapai suhu 45 - 50°C.
5. Inokulasi starter bakteri yang digunakan adalah dengan konsentrasi 0%, 2%, 4%, 6% dan 8%. Inokulan dalam pembuatan penelitian ini adalah inokulan bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan ditambahkan dengan bakteri *Streptococcus thermophilus* dengan masing-masing perbandingan 0:1, 1:0, 1:1, 1:2 dan 2:1.
6. Inkubasi pada suhu 45°C dalam inkubator selama 3 jam dengan perlakuan pada masing-masing konsentrasi sebanyak 5 kali ulangan.
7. Sesudah 3 jam, yoghurt dianalisa tingkat warna, aroma, rasa, total keasaman, kadar lemak dan kadar protein.

3.5.3 Pengujian Total Keasaman

Prosedur analisa total keasaman menurut Ranggana (1997) dalam Resmanto (2006) menjelaskan, bahwa prosedur pengujian total keasaman yoghurt sebagai berikut: diagram alir pada lampiran 1.

1. 10 ml susu sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, ditambahkan

aquades sampai tanda batas lalu dihomogenkan dan disaring.

2. Filtrat di ambil 10 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
3. Ditambahkan 2 – 3 tetes larutan 1% indikator fenolftelin.
4. Dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai titik akhir titrasi tercapai, yaitu terbentuk warna merah muda dan warna tersebut tidak hilang selama 30 detik.
5. Pada akhir titrasi dihitung jumlah NaOH yang digunakan.

$$\text{Total asam (\%)} = \frac{V \text{ NaOH} \times N \text{ NaOH} \times fp \times \text{BM asam laktat}}{W} \times 100\%$$

Dimana: V = Volume larutan NaOH ml NaOH 0,01 N

Fp = faktor pengenceran (100/10)

N = Normalitas larutan NaOH

W= Berat cuplikan (mg)

Standarisasi larutan NaOH 0,1 N

3.5.4 Pengujian Kadar Protein

Sudarmadji (1997) menjelaskan bahwa untuk prosedur pengujian kadar protein adalah menggunakan metode semi mikro Kjeldahl, sebagai berikut: diagram alir pada lampiran 1.

1. Ambil 10 ml susu dan masukkan ke dalam labu takar 100 ml dan encerkan dengan aquades sampai tanda.
2. Ambil 10 ml dari larutan tadi dan masukkan ke dalam labu Kjeldahl 500 ml dan tambahkan 10 ml H₂SO₄ (93 – 98% bebas N). Tambahkan 5 gram campuran Na₂SO₄ – HgO (20 : 1) untuk katalisator.

3. Didihkan sampai jernih dan lanjutkan pendidihan 30 menit lagi. Setelah dingin, cucilah dinding dalam labu Kjeldahl dengan aquades dan didihkan lagi selama 30 menit.
4. Setelah dingin tambahkan 140 ml aquades dan tambahkan 35 ml larutan NaOH – Na₂S₂O₃ (500 g NaOH + 500 ml H₂O + 125 g Na₂S₂O₃.5 H₂O, gojog sampai larut semua.
5. Kemudian lakukan distilasi; distilasi ditampung sebanyak 100 ml dalam erlenmeyer yang berisi 25 ml larutan jenuh asam borat dan beberapa tetes indikator metilen merah/metilen biru (100 mg metil merah + 30 mg metilen biru dilarutkan dalam 60 ml alkohol 95%. Encerkan menjadi 100 ml dengan aquades yang telah didihkan.
6. Titrasilah larutan yang diperoleh dengan 0,02 HCl.
7. Hitunglah total N atau % protein dalam contoh, dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah N total} = \frac{\text{ml HCl} \times \text{N HCl} \times 14,008 \times f}{\text{ml larutan contoh}} \text{ mg/ml}$$

f = faktor pengenceran dalam contoh peunjuk ini besarnya f = 10

3.5.5 Pengujian Kadar Lemak

Penentuan kadar lemak berdasarkan metode Babcock (Sudarmadji, 1997), sebagai berikut: diagram alir pada lampiran 1.

1. Timbang 18 gram susu dalam botol Babcock dan tambahkan lebih kurang 17,5 ml H₂SO₄ ± 95% (B.J.= 1,82 – 1,83). Campurkan baik-baik dengan

menggoyang-goyangkan botol sampai gumpalan-gumpalan susu tercampur semua.

2. Pasanglah botol Babcock dalam sentrifugasi dan jangan lupa pasang botol Babcock yang sama beratnya untuk keseimbangan. Putarlah sampai 5 menit.
3. Tambahkan air panas (60°C atau lebih) sampai labu dari botol Babcock terisi penuh. Lanjutkan sentrifugasi selama 2 menit lagi. Kemudian tambahkan air panas lagi sampai lemak cair terletak dalam leher botol (kolom) yang berskala. Sentrifugasi lagi selama 1 menit.
4. Masukkan botol dalam air hangat (55 - 60°C) selama 3 menit atau lebih.
5. Usahakan permukaan lemak dalam botol sama dengan permukaan air pemanas.
6. Ambil dan keringkan botol dan ukurlah kolom lemak dari ujung bawah sampai meniskus atas dengan pengukur kaliper atau lainnya. Nyatakan kadar lemak dalam % berat.

3.5.6 Pengujian Organoleptik

Untuk mengetahui tingkat penerimaan konsumen terhadap produk yoghurt susu kambing yang dihasilkan perlu dilakukan uji organoleptik. Uji organoleptik ini diujikan pada panelis sebanyak 15 orang dengan taraf 5 tingkat, yaitu taraf 1 – 5: taraf 1 (sangat tidak suka), taraf 2 (tidak suka), 3 (biasa), 4 (suka), 5 (sangat suka). Penilaian organoleptik dilakukan terhadap warna, rasa, aroma (Soekara, 1985; Widowati dan Misgiyarta, 2002). diagram alir pada lampiran 1.

Teknik pengujian sifat fisika yoghurt meliputi warna, aroma dan rasa dengan prosedur sebagai berikut:

1. Tahap persiapan
 - a. Dipersiapkan panelis sebanyak 15 orang
 - b. Dipersiapkan bahan yang akan diujikan
 - c. Bahan penguji 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 warna yoghurt yang telah disediakan Gambar 6 dalam lampiran 8.
 - c. Uji organoleptik ini menggunakan pilihan nilai dalam bentuk skala 3 dengan menguji warna, aroma dan rasa.
 - d. Setelah itu, panelis dipersilahkan mengisi angket yang telah disediakan yang tercantum dalam lampiran 7.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dari pengujian yoghurt susu kambing ini dianalisis dengan menggunakan ANAVA dua jalur dan untuk mengetahui kombinasi perlakuan terbaik, maka dilanjutkan dengan Uji fisher (Least Significant Difference (LSD) atau biasa disebut juga dengan BNT(0.05) (beda nyata terkecil) (Iriawan dan Septin, 2006). Pengujian organoleptik dilakukan dengan menggunakan analisis sidik ragam dengan taraf signifikan $F_{hitung} > F_{tabel}$ (0.05). Apabila antara perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata, maka dilanjutkan dengan Uji Duncan (Idris, 1994: 26).