

BAB IV

METODOLOGI PENELITIAN

A. Tempat Penelitian:

Laboratorium Mikrobiologi Fakultas MIPA Universitas Diponegoro
Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober-Desember 1995.

B. Bahan dan Alat:

1. Bahan:

Kedelai lokal, gula pasir (sukrosa), biakan murni *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus* diperoleh dari Universitas Gajah Mada Yogyakarta, agar, aquadest, pepton, NaOH 1 N, Ekstrak yeast, NaCl, NaHCO₃, indikator pp 1%, buffer asetat pH 4 dan 7, reagen Lowry A (Folin), reagen Lowry B (Formula: 500 ml natrium karbonat 2% dalam NaOH 0,1 N, ditambah dengan 1 ml tembaga sulfat 0,5% dalam natrium kalium tartrat 1%), BSA (Bovine Serum Albumin), Amonium sulfat kristal, asam asetat methilen biru.

2. Alat:

Erlenmeyer 100 ml, gelas piala 500 ml, tabung reaksi, 'hot plate', almari es, timbangan, inkubator, blender, jerigen, termometer, haemositometer,

mikroskop, dispenser, sentrifuger, titrimeter, spektrofotometer, shaking water bath, autoklaf, timer, kapas, label, corong, ose, panci, wadah plastik, kompor, kain saring, pipet 1 ml, gelas ukur, aluminium foil, bunsen dan kaki tiga.

C. Cara Kerja

1. Pembuatan susu kedelai

Kedelai sejumlah 1500 gram dibersihkan dari kotoran dan biji kedelai yang busuk, kemudian direndam dalam air bersih suhu 40-45°C selama 8-12 jam. Setelah dicuci bersih kedelai direbus hingga empuk selama kurang lebih 20 menit, kemudian dikuliti. Kedelai yang telah direbus dibagi menjadi empat bagian, satu bagian untuk kontrol dan tiga bagian diberi perlakuan pertama yaitu pemberian NaHCO_3 dengan kadar berbeda-beda, kadar 1 (A1) 0,20% NaHCO_3 ; kadar 2 (A2) 0,35% NaHCO_3 ; dan kadar 3 (A3) 0,50% NaHCO_3 , kedelai yang telah diperlakukan direndam dalam air panas bersuhu 60-70°C selama 15 menit. Kemudian kedelai dicuci dan ditiriskan, dihaluskan dengan blender sambil sedikit demi sedikit ditambah dengan air panas. Bubur kedelai yang diperoleh ditambah dengan air panas hingga jumlah air keseluruhan yang ditambahkan menjadi 10 kali berat kedelai kering. Bubur kedelai

disaring dan diambil susu kedelai sejumlah 2500 ml untuk masing-masing perlakuan. Perlakuan kedua adalah pemberian gula (sukrosa) dengan kadar yang berbeda-beda, kadar 1 (B1) 4% sukrosa, kadar 2 (B2) 8% sukrosa, kadar 3 (B3) 12% sukrosa. (Saraswati,1986)

2. Pembuatan starter.

Starter yang digunakan sebagai inokulum adalah biakan murni dalam Nutrien agar tegak yaitu *S. thermophilus* dan *L. bulgaricus*. Disiapkan sembilan buah erlenmeyer volume 100 ml (sesuai dengan jumlah perlakuan yaitu faktorial dari 3 kadar pemberian NaHCO_3 dan 3 kadar pemberian sukrosa) dan diisi dengan susu kedelai masing-masing 50 ml, kemudian disumbat dengan kapas dan dipasteurisasi pada suhu 60°C selama 10 menit. Selanjutnya susu kedelai dalam erlenmeyer diinokulasi dengan 1 tabung biakan murni *S. thermophilus*, dihomogenkan dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu kamar. cara yang sama dilakukan pula dengan inokulan *L. bulgaricus*

3. Menghitung jumlah total bakteri /ml starter

Starter yang berumur 24 jam diambil dan dibuat pengenceran sampai konsentrasi 10^{-3} , kemudian setiap konsentrasi diambil 1 ml dengan pipet haemositometer untuk ditetaskan pada haemositometer dan diberi methilen biru serta ditutup dengan gelas penutup. Jumlah sel dihitung dengan

bantuan mikroskop. Jumlah total bakteri/ml starter dapat ditentukan dengan rumus:

$$\text{Jumlah sel per kotak besar} \times 25 \times 50 \times 10^3$$

Starter baru dapat digunakan apabila jumlah total bakteri /ml starter mencapai $10^6 - 10^8$, ulangan perhitungan sebanyak tiga kali. (Fardiaz, 1922)

4. Inokulasi media fermentasi (susu kedelai)

dengan starter.

Media (susu kedelai setelah dipasteurisasi, dibagi dalam erlenmeyer volume 100 ml sesuai dengan kelompok perlakuannya, setelah suhunya turun menjadi kurang lebih 43°C , diinokulasi dengan starter kultur bakteri yoghurt sebanyak 5% (V/V) (2,5% *S. thermophilus* dan 2,5% *L.bulgaricus*). Kemudian disumbat dengan kapas steril dan ditutup aluminium foil, diinkubasi pada suhu 44°C selama 4 jam. Setelah waktu inkubasi cukup, semua erlenmeyer diambil dan didinginkan pada suhu kamar (37°C), selanjutnya disimpan dalam almari es (4°C) untuk persiapan pengukuran parameter. Dibuat kontrol, 100 ml susu kedelai tanpa penambahan NaHCO_3 dan sukrosa setelah dipasteurisasi diinokulasi dengan starter kultur bakteri yoghurt sebanyak 5% (V/V), disumbat dengan kapas dan diinkubasi pada suhu 44°C selama 4 jam, setelah waktu inkubasi cukup kontrol diambil dan didinginkan pada suhu kamar (37°C), selanjutnya disimpan dalam almari es (4°C) untuk pengukuran parameter.

5. Analisis Total asam

Sebanyak 25 ml substrat fermentasi dimasukkan ke dalam erlenmeyer (volume 50 ml) dicampur dengan sedikit aquadest (5 ml) dan ditambah dengan 2 tetes cairan indikator pp 1% kemudian dititrasi dengan larutan 0,1 N NaOH sampai timbul warna merah muda. Total asam dihitung sebagai persen dengan rumus :

$$\text{Total asam} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times 90}{\text{ml Sampel}} \times 100\%$$

Total atau kadar asam ini dihitung dari setiap media yang difermentasi setelah inkubasi dengan periode waktu 24 jam di dalam almari es (suhu kurang lebih 4°C)

6. Pengukuran kadar protein awal dan akhir pada soyghurt. Cara Lowry (Spektrofotometer)

Penyapan kurva standart larutan protein.

Larutan protein (misalnya BSA/ Bovine Serum Albumin), sejumlah 300 ug/ml disiapkan, larutan tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi, dan dibuat pengenceran bertingkat dari 30-300 ug/ml. Delapan ml reagen Lowry B ditambahkan dalam masing-masing pengenceran kemudian dibiarkan paling sedikit 10 menit. Satu ml reagen Lowry A juga ditambahkan ke dalam masing-masing pengenceran, kemudian digojog, dan dibiarkan

selama 20 menit. OD ('Optical Density') dibaca pada panjang gelombang 600 nm dengan spektrofotometer. Kurva standart dibuat pada kertas grafik yang menunjukkan hubungan antara OD (pada ordinat) dan konsentrasi (pada absis). (Sudarmadji, 1984)

Penyiapan sampel

Sampel (soyghurt) diendapkan terlebih dahulu dengan amonium sulfat kristal (jumlahnya tergantung dari jenis proteinnya, kalau perlu sampai mendekati kejenuhan amonium sulfat dalam larutan). Protein yang mengendap kemudian dipisahkan dengan sentrifugasi selama 10 menit dan dipisahkan supernatannya. Presipitat yang merupakan protein sebanyak 1 ml kemudian dilarutkan kembali dengan buffer asam asetat pH 5 sampai 10 ml. Kemudian diambil volume tertentu dari larutan protein sampel dan dilakukan prosedur seperti pada penyiapan kurva standart, mulai dengan penambahan reagen Lowry B dan seterusnya. Kadar protein dibaca dari OD yang didapat dari larutan sampel dengan menggunakan kurva standart yang dibuat. (Sudarmadji, 1984)

7. Pengukuran pH.

pH soyghurt diukur menggunakan pH meter elektrik, sebagai berikut : Kalibrasi dengan larutan standart pH 7. Larutan standart dituang dalam gelas piala sebanyak 25ml, pH meter dihidupkan dan kepala elektroda dicelupkan dalam larutan standart tersebut, ditunggu hingga nilai pH

konstan. pH meter siap digunakan untuk mengukur pH soyghurt, dengan cara kepala elektroda dicelupkan ke dalam sampel soyghurt, kemudian ditunggu sampai didapatkan nilai pH yang konstan. Kalibrasi dilakukan setiap kali sehabis pengukuran sampel soyghurt dan pengukuran dilakukan tiga kali ulangan. (Hadiwiyoto, 1982)

8. Uji Organoleptik tingkat Bau dan Rasa

Uji kesukaan untuk bau dan rasa dilakukan terhadap 25 panelis, panelis dimintakan tanggapan pribadinya tentang kesukaan atau ketidaksukaannya terhadap produk soyghurt dibandingkan dengan produk susu asam lain yang banyak beredar di pasaran. Tingkat- tingkat kesukaan atau skala hedonik direntangkan menurut skala yang ada dan ditransformasi menjadi skala numerik dengan angka menaik menurut tingkat kesukaan. Masing-masing panelis mencicipi sembilan sampel soyghurt, kemudian tanggapan ditulis dalam formulir uji organoleptik (Tabel Lampiran 04)

Gambar 2 : Bagan Susunan Percobaan

	NaHCO ₃	A1 (0,2%)	A2 (0,35%)	A3(0,5%)
	Gula			
	B1 (4%)			
	B2 (8%)			
	B3 (12%)			
	Ulangan I	ulangan II		ulangan III
	A1B1 A1B2 A1B3	A1B1 A1B2 A1B3	A1B1 A1B2 A1B3	A1B1 A1B2 A1B3
	A2B1 A2B2 A2B3	A2B1 A2B2 A2B3	A2B1 A2B2 A2B3	A2B1 A2B2 A2B3
	A3B1 A3B2 A3B3	A3B1 A3B2 A3B3	A3B1 A3B2 A3B3	A3B1 A3B2 A3B3

Parameter yang diamati

1. Total asam soyghurt
2. Total protein soyghurt
3. pH soyghurt
4. Kadar bau dan rasa langu dengan uji organoleptik.

Metoda

Penelitian menggunakan metode percobaan faktorial dengan rancangan acak kelompok (RAK) perlakuan yang dicobakan adalah:

1. pemberian NaHCO_3 3 kadar : A1 (0,20%)
A2 (0,35%)
A3 (0,50%)
2. pemberian sukrosa 3 kadar : B1 (4%)
B2 (8%)
B3 (12%)

Masing-masing faktor perlakuan diulang sebanyak 3 kali dan data hasil penelitian dianalisa menggunakan analisis sidik ragam melalui uji F, perbedaan nyata dari nilai F, dilanjutkan dengan uji beda nyata jujur.