

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli 2015 – Desember 2015 di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan Fakultas Peternakan dan Pertanian dan Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

Bahan yang digunakan dalam pembuatan yogurt drink adalah susu segar dari peternakan sapi perah Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, karagenan didapat dari Laboratorium Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Diponegoro, starter bakteri *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus* dari Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, dan daun kopi dari kampung kopi Banaran. Alat yang digunakan meliputi *inkubator* (memmert, Germany), *autoclave* (goley, India), *refrigerator* (LG, Korea Selatan), cawan petri, *tube*, gelas beker, aluminium foil, *stirrer*, *stopwatch*, pipa *Ostwald*, *mikro pipet*, pH meter, *spektrofotometer*, *mixer*, *homogenizer*, *pipet*, *laminer* (esco, Germany), alat penepung dan *hot air dryer*.

3.2. Metode

Preparasi ekstrak daun kopi

Ekstrak daun kopi berasal dari daun kopi yang masih muda dan dipetik langsung dari kebun kopi banaran. Segera setelah dilakukan pemetikan, daun kopi

selanjutnya dibawa ke Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan Universitas Diponegoro. Langkah selanjutnya adalah pencucian bersih untuk menghilangkan kotoran maupun debu yang menempel pada daun. Daun kopi dipasteurisasi pada suhu 72°C selama 15 detik kemudian mengekstraknya dengan pelarut aquades menggunakan perbandingan 1 : 1. Proses pengestrakan dilakukan menggunakan mixer, selanjutnya disaring dengan kain saring dan disimpan di dalam suhu 4°C selama maksimal penyimpanan 2 hari.

Pembuatan Yogurt

Susu segar yang didapat dari peternakan sapi perah Fakultas Peternakan dan Pertanian Undip, selanjutnya langsung dilakukan proses pasteurisasi pada suhu 72°C selama 15 detik, kemudian dibiarkan dalam suasana aseptis hingga suhu 43°C, selanjutnya dimasukkan starter sebanyak 5% (v/v) dan penambahan ekstrak daun kopi sebanyak 5% (v/v) dari volume susu, secepatnya ditutup menggunakan aluminium foil steril, kemudian diinkubasi menggunakan inkubator selama 6 jam pada suhu 42°C (Allgeyer *et al.*, 2010). Yogurt yang dihasilkan kemudian ditambahkan karagenan dengan variasi konsentrasi 1, 2, dan 3 %, (b/v) kemudian dihomogenkan dengan *homogenizer* selama 2 menit.

Pengeringan Yogurt Powder

Proses pengeringan yogurt dilakukan setelah proses inkubasi selama 6 jam. Yogurt dikeringkan dengan *hot air dryer* pada suhu 50°C selama 20 jam. Setelah kadar air yogurt berkurang dan kering, yogurt disimpan dalam tempat yang kedap udara lalu dilakukan penepungan selama 45 detik. *Yogurt powder* yang telah

mengalami proses penepungan kemudian disimpan menggunakan plastik vakum dan kemudian disimpan dalam lemari pendingin. Untuk proses pengujian sampel maka yogurt yang telah menjadi *powder* perlu dilakukan proses rehidrasi menggunakan aquades. Rehidrasi yang dilakukan yaitu 1:10 antara yogurt dengan aquades.

3.2.1. Rancangan Percobaan

Penelitian disusun dengan menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan Split Plot. Main Plot adalah rasio daun kopi, sedangkan Sub Plot adalah konsentrasi karagenan. Sehingga didapatkan 6 kombinasi dengan 4 ulangan, sehingga terdapat 24 unit percobaan. Main Plot yang digunakan yaitu A1, dan A2 yang masing masing penggunaan daun kopi tanpa daun kopi. Sub Plot yang digunakan yaitu K1, K2, dan K3 yang masing masing penambahan karagenan 1, 2, dan 3%. Perincian rancangan percobaan dapat dilihat sebagai berikut.

| Dengan Daun Kopi | Tanpa Daun Kopi |
|------------------|-----------------|
| A1K1U1 | A2K1U1 |
| A1K1U2 | A2K1U2 |
| A1K1U3 | A2K1U3 |
| A1K1U4 | A2K1U4 |
| A1K2U1 | A2K2U1 |
| A1K2U2 | A2K2U2 |
| A1K2U3 | A2K2U3 |
| A1K2U4 | A2K2U4 |
| A1K3U1 | A2K3U1 |
| A1K3U2 | A2K3U2 |
| A1K3U3 | A2K3U3 |

A1K3U4

A2K3U4

A1K1 = *Yogurt powder* dengan daun kopi dan konsentrasi karagenan 1 %

A1K2 = *Yogurt powder* dengan daun kopi dan konsentrasi karagenan 2 %

A1K3 = *Yogurt powder* dengan daun kopi dan konsentrasi karagenan 3 %

A2K1 = *Yogurt powder* tanpa daun kopi dan konsentrasi karagenan 1 %

A2K2 = *Yogurt powder* tanpa daun kopi dan konsentrasi karagenan 2 %

A2K3 = *Yogurt powder* tanpa daun kopi dan konsentrasi karagenan 3 %

Model matematika rancangan percobaan yang digunakan adalah :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} : hasil pengamatan dari perlakuan dan ulangan ke-j

μ : nilai tengah seluruh perlakuan

τ_i : pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} : pengaruh galat yang timbul pada perlakuan ke-I dan ulangan ke-j

i : perlakuan (1,2,3,4,5,6)

j : ulangan (1,2,3,4)

3.2.2. Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang digunakan dalam pengujian antioksidan, pH, viskositas, dan viabilitas BAL tersaji dibawah ini :

H_0 : Tidak ada pengaruh nyata perlakuan terhadap aktivitas antioksidan, pH, viskositas, dan viabilitas BAL.

H_1 : Ada pengaruh nyata perlakuan terhadap aktivitas antioksidan, pH, viskositas, dan viabilitas BAL.

Kriteria pengujian analisis yang digunakan adalah sebagai berikut :

$P \geq 0,05 = H_0$ diterima dan H_1 ditolak

$P < 0,05 = H_0$ ditolak dan H_1 diterima

3.2.3. Analisis Antioksidan

Aktivitas antioksidan dianalisis berdasarkan kemampuannya menangkap radikal bebas (*radical scavenging activity*) DPPH menurut metode yang disarankan oleh Yen dan Chen (1995). Analisis aktivitas antioksidan pada penelitian ini menggunakan 2 metode yaitu DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). Metode DPPH bertujuan untuk mengetahui berapa konsentrasi yang dipakai untuk menghambat radikal bebas pada suatu sampel (Sari *et al.*, 2013).

Sampel sebanyak 0,5 ml ditambahkan ke 2 ml larutan 0,125 mM DPPH metanol. Larutan kemudian dicampur dan dibiarkan pada suhu kamar dengan kondisi gelap selama 30 menit. Kemudian, absorbansi larutan diukur pada 517 nm. Kontrol dibuat dengan cara yang sama dengan menggunakan aquades sebagai pengganti sampel (Sun *et al.*, 2006). Besarnya aktivitas antioksidan atau penangkapan radikal dihitung dengan rumus : Absorbansi kontrol dikurangi dengan Absorbansi sampel kemudian dibagi dengan absorbansi kontrol dan dikalikan dengan 100 %.

3.2.4. Uji Nilai pH

Pengujian nilai pH menggunakan pH meter, pengujian ini dilakukan untuk mengetahui jumlah ion hidrogen pada yogurt. Cara penyiapan bahan yaitu dengan 10 g yogurt bubuk ditambahkan 90 ml aquades. pH meter dikalibrasi dengan larutan buffer pada pH 4 dan 7 pengujian ini dilakukan untuk mengetahui jumlah ion hydrogen pada yogurt. Menurut Marshall (1997) terbentuknya asam laktat menyebabkan yogurt memiliki rasa asam dan pH antara 3,8 - 4,6 berbentuk semi solid. Nilai pH yogurt akan mempengaruhi rasa pada yogurt, apabila nilai pH semakin rendah maka yogurt yang dihasilkan akan semakin asam.

3.2.5. Uji Viskositas

Viskositas dapat diukur dengan alat viskosimeter Ostwald dan satuan yang digunakan adalah “poise” (P). Viskositas dapat dihitung dengan cara rehidrasi yogurt terlebih dahulu kemudian menghitung viskositas. Pengujian viskositas dimulai dengan pengujian berat jenis yogurt menggunakan piknometer. Piknometer kosong ditimbang kemudian dimasukkan aquades kedalamnya 10 ml, kemudian ditimbang lagi. Lalu menimbang ulang piknometer yang telah terisi yogurt sebanyak 10 ml. Untuk pengukuran viskositas menggunakan pipa ostwald (Sutiah *et al.*, 2008). Aquades dimasukkan kedalam pipa ostwald kemudian dihisap hingga aquades naik pada garis merah atas. Waktu turun aquades sampai tera bawah merupakan (t_{aquades}). Kemudian lalu mencuci pipa ostwald sampai bersih kemudian memasukkan ulang yogurt dan melakukan hal yang sama. Penghitungan viskositas dilakukan dengan rumus : berat jenis yogurt (g/ml) dikalikan dengan waktu aliran yogurt (detik) dikalikan lagi dengan viskositas air (1 cP) kemudian dibagikan dengan berat jenis air (g/ml) yang telah dikalikan dengan waktu aliran air (detik).

3.2.6. Viabilitas BAL

Uji viabilitas BAL dilakukan dengan penghitungan menggunakan *Total Plate Count*. Pengujian viabilitas BAL dilaksanakan dengan sampel diambil sebanyak 1 mL ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 mL 0,88% NaCl, larutan ini disebut pengenceran 10^{-1} , kemudian diambil sampel 1 mL dari pengenceran 10^{-1}

untuk dimasukkan ke dalam tabung reaksi selanjutnya, perlakuan ini dilakukan terus menerus sampai didapatkan pengenceran 10^{-7} . Sebanyak 1 mL dari 3 pengenceran terakhir, kemudian di masukkan ke cawan petri, setelah itu dituangkan media medium de Man Rogosa and Sharpe (MRS) steril sebanyak 10 mL, lalu digoyang-goyang perlahan serta dibiarkan hingga memadat. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 48 jam dengan posisi terbalik, pertumbuhan koloni pada setiap cawan dihitung. Hanya cawan yang mempunyai koloni sebanyak 30-300 yang dihitung jumlahnya (Boczek *et al.*, 2014).

3.2.7. Analisis Data

Data hasil uji antioksidan, pH, viskositas, dan viabilitas BAL dianalisis statistik dengan Anova. Apabila hasil uji Anova signifikan, maka dilakukan uji lanjut Duncan (Gomez dan Gomez, 1995).