

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2016 - Februari 2017 di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro untuk melakukan penelitian pendahuluan, pembuatan sari belimbing wuluh, pengambilan *whey* keju kedelai, pengukuran volume, uji pH dan total padatan, serta di UPT Laboratorium Terpadu, Universitas Diponegoro, Semarang untuk menguji kadar protein dan spektrum *whey* keju kedelai.

#### **2.1. Materi Penelitian**

Bahan - bahan yang digunakan adalah sari kedelai (Kedelai impor USA *Soybean* No. 1) yang diperoleh dari Pabrik Tahu Serasi Bandungan, Kabupaten Semarang, *vegetable rennet* merek Davigisco yang diperoleh dari CV. Bintang Makmur Surabaya, belimbing wuluh yang diperoleh dari pohon yang berlokasi dekat dengan tempat penelitian, yaitu daerah Kembang Arum, Semarang, *Coomassie Brilliant Blue G-250* (C.I. 42655, Merck), ethanol (Emsure, Merck), asam fosfat dan komersial ovalbumin yang diperoleh dari Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro.

Alat yang digunakan meliputi inkubator, blender, kertas saring, kain saring, gelas ukur, pH meter (Hanna HI 8424, USA), timbangan analitik, pipet hisap, mikropipet, cawan porselin, kuvet, tube, *microcentrifuge tubes*, oven (Mettler, Germany), dan spektrofotometer (Shimadzu UV-Vis 1280, Japan).

## **2.2. Metode Penelitian**

Prosedur penelitian terdiri dari penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Sebelum dilakukan penelitian utama, dilakukan penelitian pendahuluan berupa percobaan pembuatan *whey* keju kedelai untuk menentukan volume konsentrasi penambahan sari belimbing wuluh yang akan digunakan sebagai koagulan pada penelitian utama berdasarkan hasil rendemen *curd* tertinggi. Selanjutnya, dilakukan penelitian utama dimana sebelumnya dilakukan pra-penelitian utama masing-masing sebanyak 3 kali yang bertujuan agar tidak terjadi kesalahan atau kegagalan ketika penelitian utama dilakukan.

### **2.2.1. Rancangan Percobaan**

Penelitian ini dilakukan dengan variasi perlakuan yang berbeda, yaitu (T1) penambahan koagulan sari belimbing wuluh tanpa pengenceran dan (T2) penambahan koagulan sari belimbing wuluh dengan pengenceran (rasio sari belimbing wuluh dan air adalah 1:1), yang akan dibandingkan antara hasil dari kedua perlakuan tersebut. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 10 kali ulangan. Desain penelitian ini menggunakan uji t (*independent sample t*) dua arah (Sudjana, 2005), yaitu membandingkan ada atau tidaknya perbedaan karakteristik fisikokimiawi antara *whey* keju kedelai hasil koagulan sari belimbing wuluh tanpa pengenceran dan *whey* keju kedelai hasil koagulan sari belimbing wuluh dengan pengenceran.

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

H0 : tidak terdapat perbedaan karakteristik fisikokimiawi antara *whey* keju kedelai yang dihasilkan dari koagulan sari belimbing wuluh tanpa pengenceran dan dengan pengenceran.

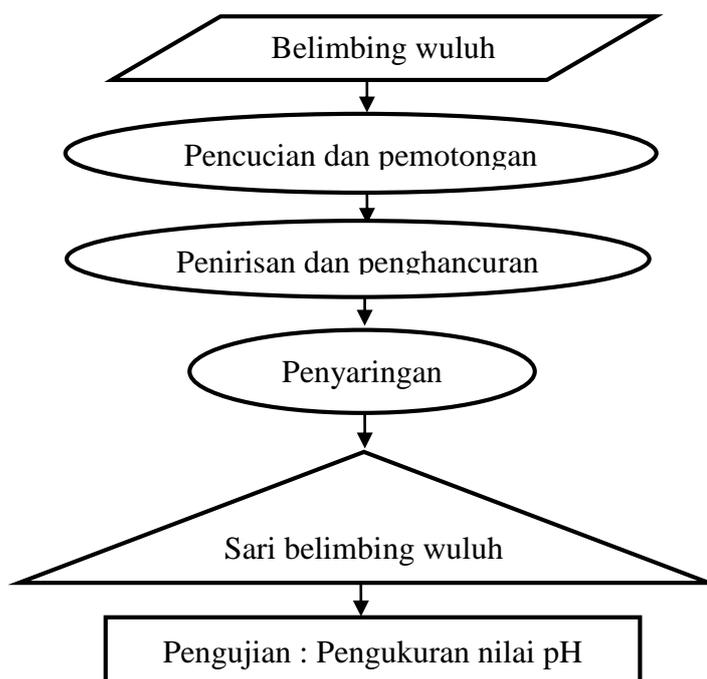
H1 : terdapat perbedaan karakteristik fisikokimiawi antara *whey* keju kedelai yang dihasilkan dari koagulan sari belimbing wuluh tanpa pengenceran dan dengan pengenceran.

### **2.2.2. Prosedur Penelitian**

Prosedur penelitian terdiri dari pembuatan sari belimbing wuluh, penentuan volume konsentrasi sari belimbing wuluh dan pengambilan *whey* keju kedelai.

#### **a) Pembuatan Sari Belimbing Wuluh**

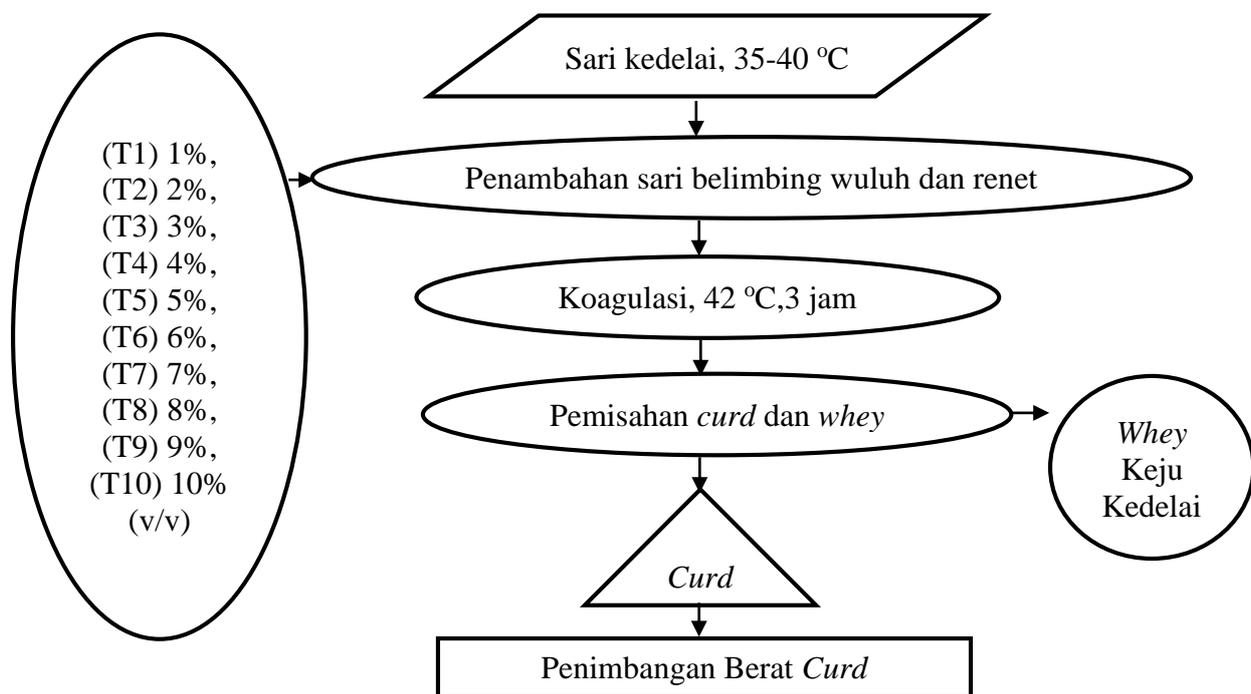
Buah belimbing wuluh yang digunakan mempunyai panjang 5-7 cm dan berwarna hijau. Pembuatan sari belimbing wuluh dilakukan berdasarkan metode Widarta *et al.* (2016) dengan modifikasi. Daging buah belimbing wuluh segar yang baru saja dipetik selanjutnya dicuci, ditiriskan, dihilangkan bagian pangkalnya dan dipotong kecil-kecil ukuran  $\pm 5$  mm. Potongan belimbing wuluh selanjutnya diblender lalu disaring menggunakan kain saring. Bagian yang cair diambil untuk digunakan sebagai larutan sari belimbing wuluh. pH sari belimbing wuluh selanjutnya diukur sebagai pH awal yang digunakan sebagai dasar pH koagulan. Diagram alir pembuatan sari belimbing wuluh disajikan pada Ilustrasi 3.



**Ilustrasi 3.** Diagram Alir Pembuatan Sari Belimbing Wuluh

**b) Penentuan Volume Konsentrasi Sari Belimbing Wuluh**

Prosedur ini merupakan penelitian pendahuluan yang dilakukan untuk menentukan konsentrasi volume koagulan yang akan digunakan pada penelitian utama. Sari kedelai sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam masing-masing *tube* selanjutnya ditambahkan sari belimbing wuluh murni sebanyak 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% dan 10% (v/v) serta 0,01% renet (w/v) setiap perlakuan. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Sampel diinkubasi pada suhu 42°C selama tiga jam. *Whey* keju kedelai dipisahkan dari *curd* menggunakan kain saring. *Curd* dari setiap perlakuan selanjutnya ditimbang, dan hasil berat *curd* tertinggi dijadikan sebagai konsentrasi volume sari belimbing wuluh yang akan digunakan pada penelitian utama. Diagram alir penentuan volume konsentrasi sari belimbing wuluh disajikan pada Ilustrasi 4.



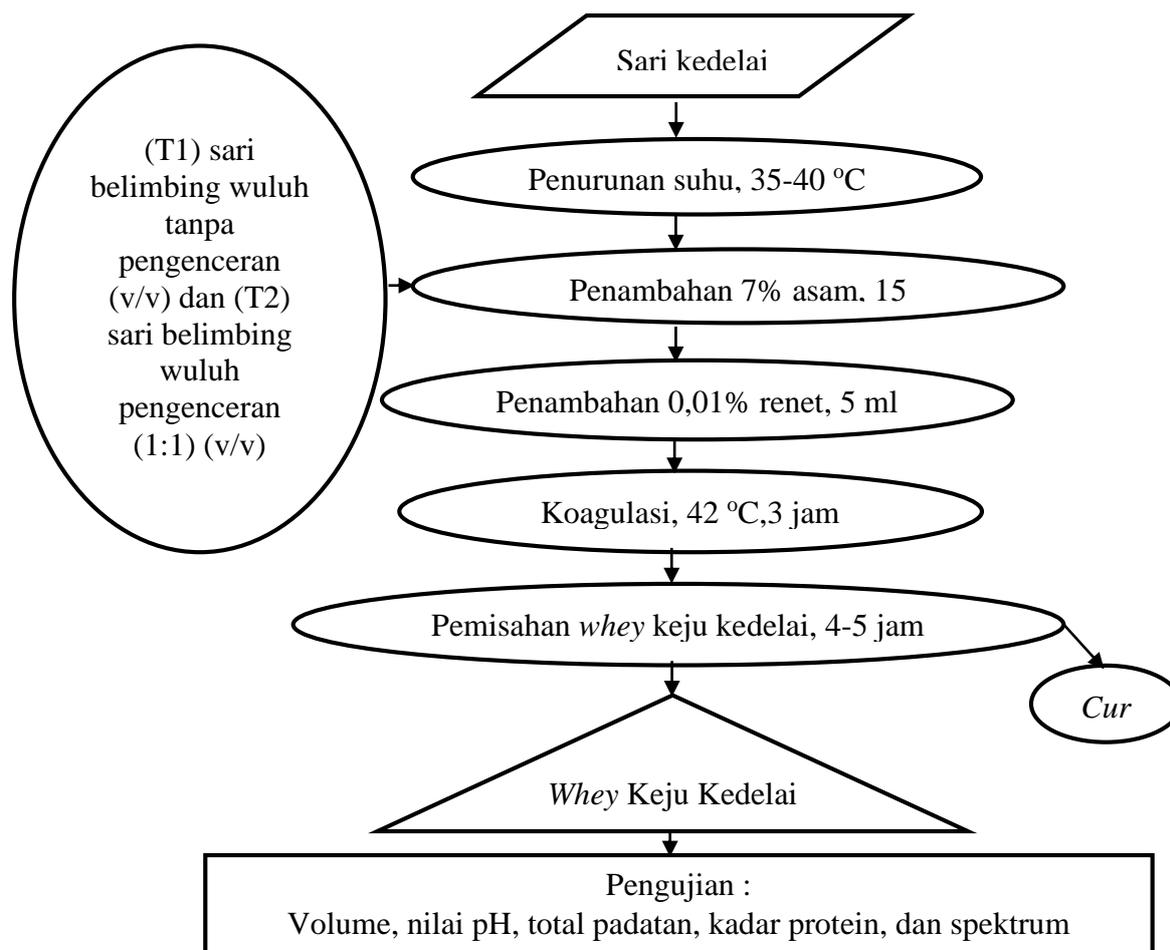
**Ilustrasi 4.** Diagram Alir Penentuan Konsentrasi Koagulan Sari Belimbing Wuluh

Berdasarkan hasil penelitian pendahuluan dan perhitungan secara statistik, didapatkan hasil bahwa penambahan 7% sari belimbing wuluh mempunyai berat *curd* tertinggi ( $27,97 \pm 0,84\%$ ), sehingga dijadikan volume konsentrasi koagulan pada penelitian utama. Hasil penentuan konsentrasi sari belimbing wuluh sebagai koagulan berdasarkan berat *curd* tertinggi disajikan pada Lampiran 1.

### c) Pengambilan *Whey* Keju Kedelai

Pengambilan *whey* keju kedelai diawali dengan pembuatan keju segar dengan metode *direct acidification* berdasarkan Widarta *et al.* (2016) dengan modifikasi. Sari kedelai dibuat dengan perbandingan kedelai kering dengan air yaitu 1:10 (Suhaedi, 2003). Tujuh persen sari belimbing wuluh ditambahkan pada 500 ml sari kedelai yang sudah dipasteurisasi. Perlakuan penambahan koagulan

yaitu T1 menggunakan sari belimbing wuluh tanpa pengenceran (pH 1,60) (v/v) dan T2 menggunakan sari belimbing wuluh dengan pengenceran, rasio sari belimbing wuluh dan air adalah 1:1 (pH 2,04) (v/v). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 10 kali. Setelah 15 menit, 5 ml larutan renet (0,01% w/v) ditambahkan pada masing-masing perlakuan, diaduk perlahan dan diinkubasi pada suhu 42°C selama 3 jam. *Whey* keju kedelai dipisahkan dengan cara digantung selama 4-5 jam menggunakan kain saring. *Whey* keju kedelai kemudian dilakukan pengujian yaitu pengukuran volume, pH, total padatan, kadar protein dan spektrum. Diagram alir pengambilan *whey* keju kedelai disajikan pada Ilustrasi 5.



**Ilustrasi 5.** Diagram Alir Pengambilan *Whey* Keju Kedelai

### 2.2.3. Uji Variabel

Variabel pengujian pada penelitian ini yaitu *whey* keju kedelai dari tiap perlakuan meliputi volume, pH, total padatan, kadar protein dan spektrum.

#### a) Volume

Pengukuran volume dilakukan dengan metode Murti (2008) dengan modifikasi. *Whey* keju kedelai dimasukkan dalam gelas ukur lalu diukur dan dicatat volume *whey* keju kedelai yang dihasilkan. Volume *whey* keju kedelai yang dihasilkan dari masing-masing perlakuan pada setiap ulangan selanjutnya dimasukkan rumus perhitungan. Produksi *whey* dicari dengan perhitungan berdasarkan AOAC (1995) :

$$\text{Produksi } \textit{whey} \text{ keju kedelai (\%)} = \left( \frac{\text{Volume } \textit{whey} \text{ keju kedelai}}{\text{Volume sari kedelai awal}} \times 100\% \right)$$

#### b) Total Padatan

Uji total padatan menggunakan metode oven sesuai metode yang digunakan Nawangsari *et al.* (2012) dengan modifikasi. Sampel ditimbang sebanyak 4 g dalam cawan porselin yang telah diketahui beratnya dan telah dioven. Sampel yang sudah ditimbang selanjutnya dimasukkan ke dalam oven pada suhu 105°C selama 4-6 jam. Sampel dikeluarkan dari oven lalu dimasukkan ke dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang. Sampel yang telah ditimbang selanjutnya dimasukkan lagi ke dalam oven selama 2 jam hingga tercapai berat sampel konstan (selisih berat kurang dari

0,2 mg). Total padatan dicari dengan rumus yaitu: Total padatan (%) = 100 % - kadar air.

**c) Nilai pH**

Pengukuran pH dilakukan dengan metode Rukmi *et al.* (2015) menggunakan pH meter yang sudah dikalibrasi. Katoda indikator pH meter dimasukkan kedalam 10 ml masing-masing tabung reaksi yang berisi sari kedelai, koagulan sari belimbing wuluh, pH sari kedelai setelah ditambah koagulan dan *whey* keju kedelai yang dihasilkan dari masing-masing perlakuan. Pengujian dilakukan bergantian pada setiap perlakuan. Nilai pH diamati pada layar pH meter dan angka yang sudah konstan dicatat sebagai nilai pH.

**d) Kadar Protein**

Pengukuran kadar protein menggunakan metode *Bradford* (Owusu-Apenten, 2002) dengan modifikasi dilakukan dengan dua tahap. Tahap pertama adalah pembuatan larutan *Kit Bradford* yang terdiri dari campuran 50 ml ethanol dan 10 mg *Commassie Brilliant Blue*. Campuran tersebut dilarutkan pada 100 ml asam fosfat lalu diencerkan dengan aquades perbandingan 1:2. Tahap kedua adalah analisis sampel *whey* keju kedelai yaitu masing-masing sebanyak 20 µl dimasukkan ke dalam *microcentrifuge* tube dan setiap ulangan dilakukan secara duplo. Masing-masing sampel ditambahkan 1 ml larutan *Kit Bradford* lalu diinkubasi selama satu jam. Sampel sebanyak 1 ml dari masing-masing sampel dimasukkan ke dalam kuvet secara bergantian pada spektrofotometer dengan pengaturan fotometer (UV Mini

Shimadzu 1280, Japan). Absorbansi sampel dibaca pada panjang gelombang 595 nm. Kadar protein ditetapkan menggunakan kurva standar Ovalbumin murni kadar 0,5-5,0%. Absorbansi yang dihasilkan dari masing-masing sampel dimasukkan dalam persamaan matematik dari kurva standar, lalu didapatkan kadar protein terlarut yang terkandung dalam sampel.

#### e) **Spektrum**

Pengujian spektrum menggunakan metode Copriady *et al.* (2011) dengan modifikasi. Pengujian ini dilakukan pada masing-masing ulangan setiap perlakuan. Spektrofotometer diatur untuk uji spektrum lalu *base core line* dibuat dengan aquades. Sampel sebanyak 1 ml dimasukkan ke dalam kuvet, lalu dimasukkan ke dalam spektrofotometer dan selanjutnya dilakukan pengujian dengan spektrum (UV Mini Shimadzu 1280, Japan) secara bergantian pada panjang gelombang 190 nm sampai 750 nm.

#### **3.2.4. Analisis Data**

Data hasil penelitian pengukuran volume, pH, total padatan dan kadar protein dari masing-masing *whey* keju kedelai yang dihasilkan selanjutnya dilakukan uji perbedaan dua rata-rata atau dua pihak (Sudjana, 2005), untuk mengetahui pengaruh hasil penambahan koagulan sari belimbing wuluh tanpa dan dengan pengenceran terhadap karakteristik fisikokimiawi *whey* keju kedelai. Data diolah dengan bantuan komputer program SPSS for Windows versi 20.0. Uji normalitas data dilakukan menggunakan uji Shapiro-Wilk (Shapiro *et al.*, 1968).

Selanjutnya, dilakukan uji homogenitas berdasarkan *Levene's test* dan kemudian data dianalisis menggunakan uji t (*independent sample test*) pada selang kepercayaan 95% untuk mengetahui ada atau tidaknya perbedaan antar perlakuan (Sudjana, 2005). Maka, kriteria pengujian analisis data yang digunakan adalah sebagai berikut :

Jika nilai p pada *significant (2-tailed)*  $\leq \alpha$  , maka H0 ditolak dan H1 diterima, atau nilai p pada *Significant (2-tailed)*  $> \alpha$ , maka H0 diterima dan H1 ditolak.

Data hasil pengujian spektrum dianalisis secara deskriptif. Fenomena yang tampak pada data yang diperoleh akan dideskripsikan dengan menghubungkan sejumlah variabel atau parameter lain yang berkaitan dengan parameter yang diteliti.