

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

#### **3.1. Materi Penelitian**

Materi yang digunakan adalah tomat buah matang yang berwarna merah, kultur *Lactobacillus fermentum* yang diperoleh dari Agrotekno Microbial Culture Collection Yogyakarta, media deMan Rogosa Sharpe (MRS) Agar, etanol 70%, DPPH (2,2-diphenil,1-pichylhydazyl), aquades, NaCl fisiologis, buffer pH 7, dan buffer pH 4. Peralatan yang digunakan adalah timbangan analitik, *laminar air flow*, *blender*, panci, pisau, botol kaca, termometer, inkubator, cawan petri, oven, *autoclave*, microtip, micro pipet, tabung reaksi, rak tabung, erlenmeyer, bunsen, aluminium foil, spektrofotometer, pH meter, pipet tetes, *beaker glass*, dan gelas ukur.

#### **3.2. Metode Penelitian**

Metode penelitian terdiri dari rancangan percobaan, hipotesis, preparasi minuman probiotik tomat, parameter uji minuman probiotik tomat, dan analisis data.

##### **3.2.1. Rancangan Percobaan**

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan penambahan kultur *Lactobacillus fermentum* dengan lama fermentasi yang berbeda yaitu T1 untuk 12

jam, T2 untuk 24 jam, T3 untuk 36 jam, dan T4 untuk 48 jam. Masing-masing perlakuan akan dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan.

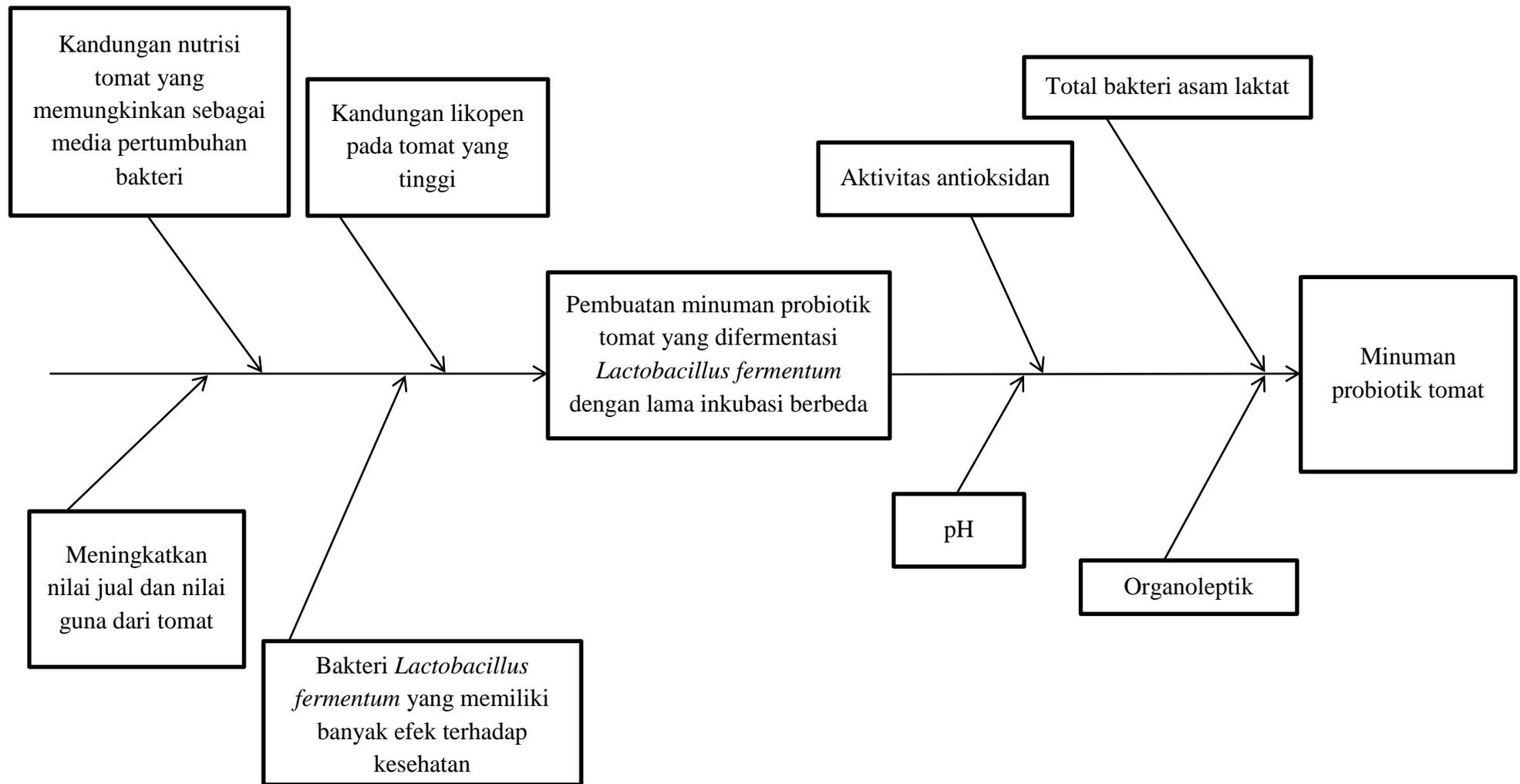
### 3.2.2. Hipotesis

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

H0 : Tidak terdapat pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas antioksidan, total bakteri asam laktat, pH, dan organoleptik minuman probiotik tomat.

H1 : Sekurang-kurangnya terdapat satu pengaruh lama inkubasi terhadap aktivitas antioksidan, total bakteri asam laktat, pH, dan organoleptik minuman probiotik tomat.

Penelitian ini dimulai dengan penentuan latar belakang, menganalisis masalah hingga penyelesaian dengan pelaksanaan penelitian yang dapat dilihat pada diagram *fishbone* pada Ilustrasi 1.

Ilustrasi 1. Diagram *Fish Bone* Minuman Probiotik Tomat

### 3.2.3. Preparasi Minuman Probiotik Tomat

Metode percobaan ini terdiri dari dua tahapan, tahapan yang pertama adalah pembuatan sari tomat dan tahapan yang kedua adalah proses fermentasi minuman probiotik tomat. Pada pembuatan sari tomat tahapannya terdiri dari tomat segar dicuci bersih dengan menggunakan air. Setelah dicuci, tomat dipotong-potong dan dikukus selama 5 menit. Tomat yang telah dikukus, dihancurkan lalu disaring dengan menggunakan kain saring. Sari tomat yang diperoleh dipasteurisasi pada suhu 80°C selama 20 menit. Sari tomat yang telah dipasteurisasi didinginkan hingga suhu mencapai 37°C. Sari tomat yang telah mencapai suhu 37°C ditambahkan kultur bakteri probiotik yaitu *Lactobacillus fermentum* sebanyak 4% dengan jumlah koloni sebanyak  $7,5 \times 10^7$  cfu/ml. Sari tomat yang telah diberi kultur bakteri probiotik diinkubasi selama 12, 24, 36, dan 48 jam pada suhu 42°C (Kusharyati *et al.*, 2012 dengan modifikasi). Produk minuman probiotik yang telah jadi, dilakukan beberapa pengujian meliputi aktivitas antioksidan, uji total bakteri asam laktat, uji pH, dan uji organoleptik. Diagram alir dari proses pembuatan minuman probiotik tomat dapat dilihat pada Lampiran 1.

### 3.2.4. Uji Parameter Minuman Probiotik Tomat

Pengujian parameter yang dilakukan pada minuman probiotik tomat adalah uji aktivitas antioksidan, uji total bakteri asam laktat, uji pH, dan uji organoleptik.

### 3.2.4.1. Uji Aktivitas Antioksidan

Pengujian aktivitas antioksidan dilakukan dengan cara sampel dipipet menggunakan mikropipet sebanyak 40, 80, 120, 160, dan 200  $\mu\text{L}$ . Dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 3,8 ml DPPH  $\mu\text{M}$  lalu divortex dan dibiarkan selama 30 menit di tempat gelap. Larutan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 515 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-VIS. (Andayani *et al.*, 2008). Pengujian dilakukan pada sampel buah tomat segar serta produk minuman probiotik tomat. Aktivitas antioksidan ( $\text{IC}_{50}$ ) dihitung menurut persamaan linier antara konsentrasi dan absorbansi sampel.

### 3.2.4.2. Uji Total Bakteri Asam Laktat

Pengujian total bakteri asam laktat dilakukan dengan cara sampel diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml larutan NaCl fisiologis steril. Pengenceran dilakukan hingga  $10^{-9}$ . Diambil masing-masing 1 ml dari tiga pengenceran terakhir yaitu  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ , dan  $10^{-9}$  dan dituang ke dalam cawan petri steril serta dituang media MRS Agar. Tiap pengenceran dibuat duplo. Setelah media memadat, diinkubasi pada suhu  $42^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam (Primurdia dan Kusnadi, 2014). Jumlah koloni per ml dapat dihitung dengan menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Koloni per ml} = \text{Koloni rata-rata} \times \frac{1}{\text{Faktor pengenceran}}$$

### 3.2.4.3. Uji pH

Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan pH meter. Sampel diambil sebanyak 30 ml dan ditempatkan pada *beaker glass* ukuran 50 ml. sebelum digunakan, pH meter dikalibrasi menggunakan larutan buffer pH 7 dan pH 4 lalu elektroda dibersihkan dengan aquades selanjutnya dilakukan pengukuran pH sampel (AOAC, 2005).

### 3.2.4.4. Uji Organoleptik

Pengujian cita rasa asam dan warna merah dilakukan secara organoleptik. Parameter cita rasa asam dinilai dengan cara memberi skor 1-5 dengan atribut sangat tidak asam, tidak asam, agak asam, asam, dan sangat asam. Parameter warna merah dinilai dengan cara memberi skor 1-5 dengan atribut sangat tidak merah, tidak merah, agak merah, merah, sangat merah. Pengujian tingkat kesukaan *overall* dilakukan dengan menggunakan uji hedonik (kesukaan) dan dinilai dengan cara memberikan skor 1-5 dengan atribut sangat tidak suka, tidak suka, netral, suka, dan sangat suka. Pengujian dilakukan dengan menggunakan 25 orang panelis agak terlatih. Panelis memberikan penilaian berupa skor pada formulir uji organoleptik minuman probiotik tomat (Soekarto dan Hubets, 2008). Pada uji organoleptik dilakukan penambahan gula pasir sebanyak 3% pada masing-masing sampel yang sudah diberi kode acak.

### 3.2.5. Analisis Data

Data hasil pengukuran aktivitas antioksidan diuji secara deskriptif. Data hasil pengujian total bakteri asam laktat dan pH yang diperoleh diuji dengan menggunakan uji *Analysis of Variance* (ANOVA) pada taraf signifikansi 5% dan jika terdapat pengaruh dilanjutkan dengan Uji Wilayah Ganda Duncan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan (Naifular *et al.*, 2014). Data hasil pengujian organoleptik dianalisis dengan menggunakan uji *Kruskal-Wallis* pada taraf 5% dan apabila terdapat pengaruh akan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney* (Yanti, 2010).