

BAB III

MATERI DAN METODE

3.1. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari – Maret 2017 di Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian untuk uji nilai pH. Pengujian kadar protein dan kekeruhan dilaksanakan di Laboratorium Terpadu Universitas Diponegoro. Sementara pengujian kadar serat pangan dilakukan di Balai Besar Industri Agro (BBIA) Bogor.

3.2. Alat dan Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang kedelai yang diperoleh dari Pasar Jati Banyumanik, umbi bengkuang yang diperoleh dari Superindo Sukun Banyumanik, bakteri asam laktat (starter), aquades, air mineral, gula, larutan Bradford, petroleum eter, Na_2PO_4 , enzim termamyl, air destilat, HCl, enzim pepsin, NaOH, enzim pankreatin, celite kering, etanol 95%, aseton, larutan buffer dengan pH 4, pH 7 dan pH 10. Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah aluminium foil, penangas air, *crucible*, desikator, tanur, pisau, timbangan analitik, blender, kain saring, panci, tang penjepit, erlenmeyer, gelas ukur, inkubator, timbangan, pH meter, gelas beker, tip mikropipet, mikropipet, dan spektrofotometer UV-1280.

3.3. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu rancangan percobaan, hipotesis, pembuatan soyghurt, parameter uji, dan analisis data.

3.3.1. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan penambahan sari umbi bengkuang dengan konsentrasi 0%, 15%, 25%, dan 35%. Setiap perlakuan dilakukan sebanyak 5 kali pengulangan. Desain penelitian pembuatan soyghurt dengan penambahan sari umbi bengkuang dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Desain Penelitian Pembuatan Soyghurt dengan Penambahan Sari Umbi Bengkuang

Ulangan (U)	Perlakuan Penambahan Sari Umbi Bengkuang (T)			
	T0	T1	T2	T3
1	T0U1	T1U1	T2U1	T3U1
2	T0U2	T1U2	T2U2	T3U2
3	T0U3	T1U3	T2U3	T3U3
4	T0U4	T1U4	T2U4	T3U4
5	T0U5	T1U5	T2U5	T3U5

Keterangan :

T0, T1, T2, dan T3 : penambahan sari umbi bengkuang masing-masing : 0%, 15%, 25%, dan 35%.

U1, U2, U3, U4, dan U5 : pengulangan masing-masing : pertama, kedua, ketiga, keempat, dan kelima.

3.3.2. Hipotesis

Hipotesis empirik yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- H0 : Tidak terdapat pengaruh penambahan sari umbi bengkuang terhadap kadar serat pangan, kadar protein, nilai pH, dan i tingkat kekeruhan soyghurt.
- H1 : Paling tidak terdapat satu pengaruh penambahan sari umbi bengkuang terhadap kadar serat pangan, kadar protein, nilai pH, dan tingkat kekeruhan soyghurt.

Hipotesis empiris tersebut di atas dapat dijabarkan menjadi hipotesis statistik sebagai berikut:

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \dots = \mu_n$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \neq \dots \neq \mu_n$$

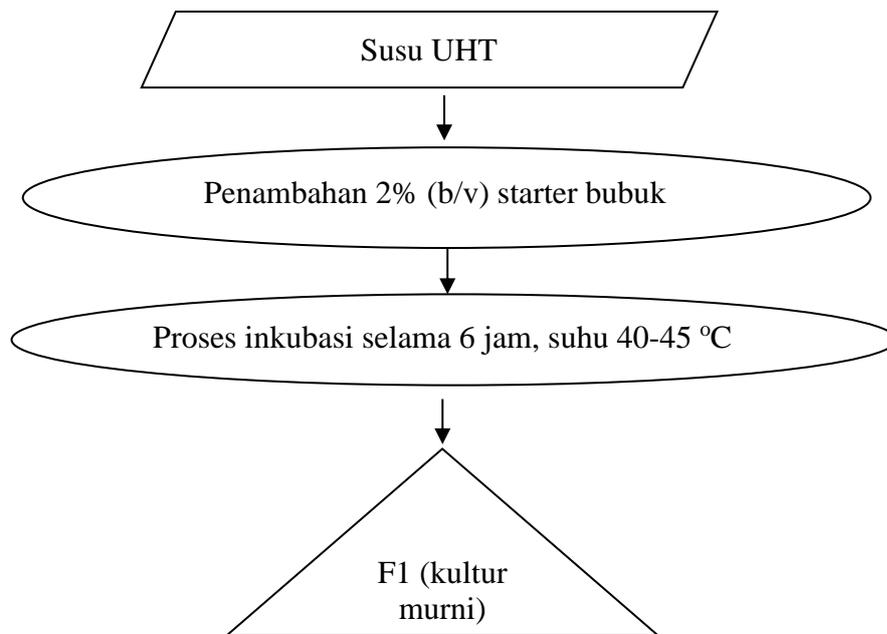
3.3.3. Pembuatan Soyghurt

Proses pembuatan soyghurt meliputi pembuatan F1 (kultur murni), pembuatan F2 (kultur kerja), pembuatan sari umbi bengkuang, pembuatan sari kedelai, dan pembuatan soyghurt.

3.3.3.1. Pembuatan F1 (kultur murni)

Proses pembuatan F1 diawali dengan starter bubuk yaitu bakteri asam laktat (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*) ditambahkan ke dalam susu *Ultra High Temperature* (UHT) sebanyak 2% (v/v). Selanjutnya susu *Ultra High Temperature* tersebut dimasukkan

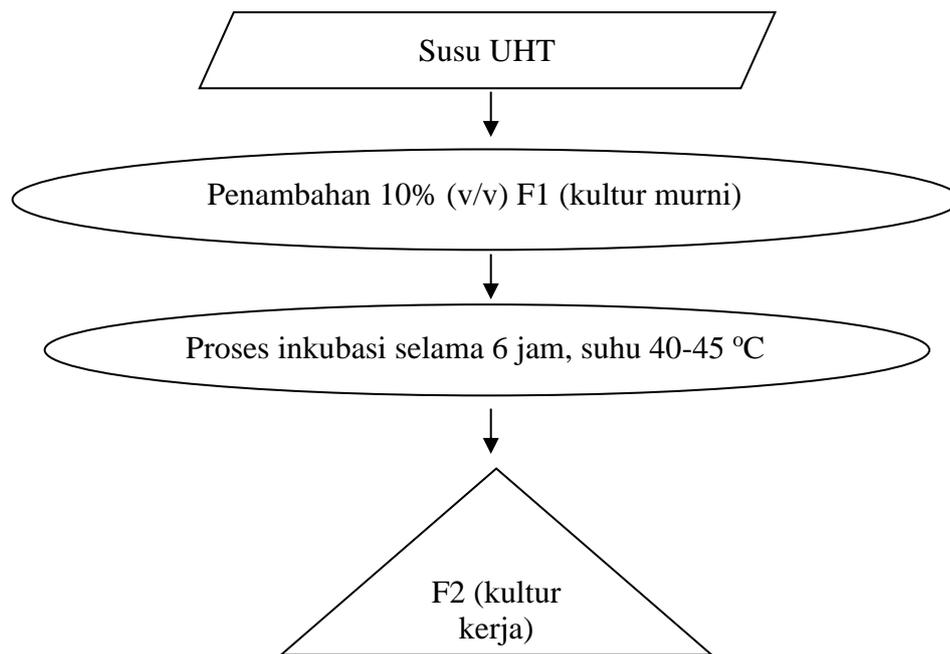
ke dalam inkubator dengan suhu 40-45 °C selama 6 jam, kemudian dikeluarkan dari inkubator dan terbentuklah F1 sebagai kultur murni (Hapsari, 2011). Diagram alir proses pembuatan F1 (kultur murni) dapat dilihat pada Ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Diagram Alir Proses Pembuatan F1 (kultur murni)

3.3.3.2. Proses Pembuatan F2 (kultur kerja)

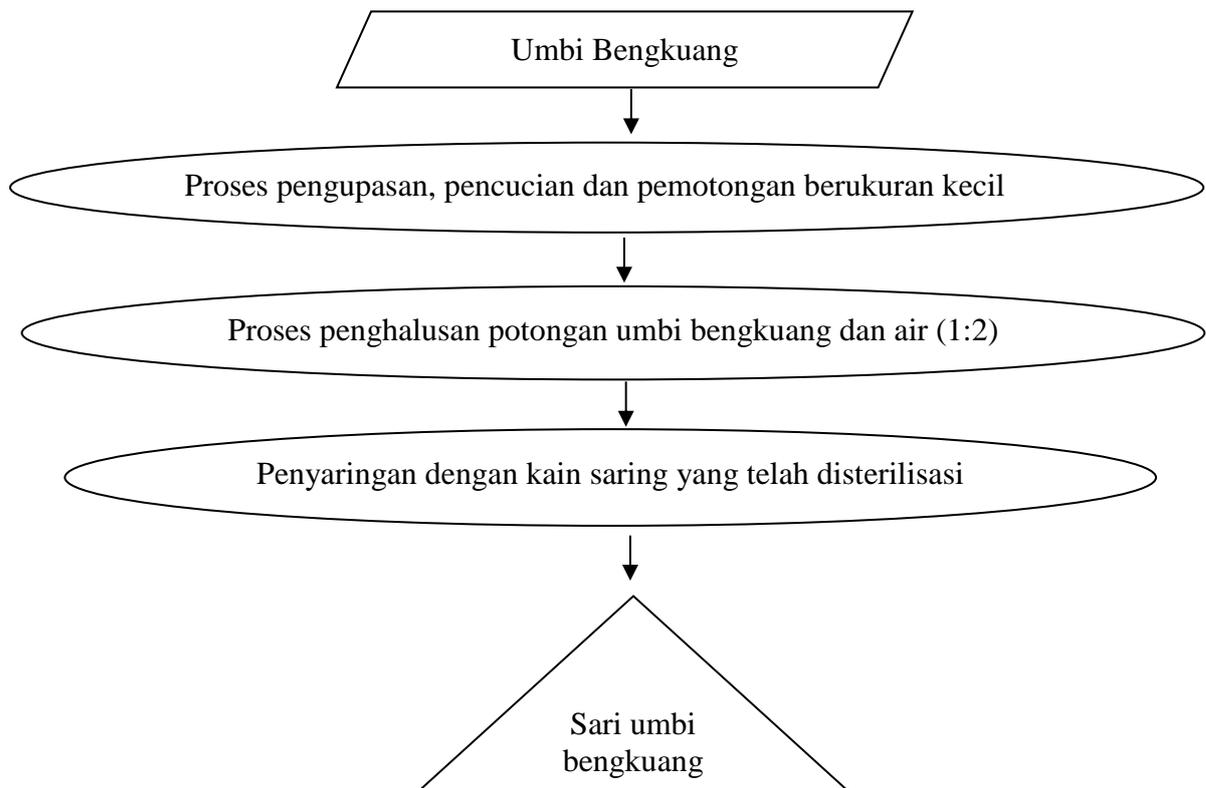
Proses pembuatan F2 (kultur kerja) yaitu F1 (kultur murni) ditambahkan sebanyak 10 % (v/v). Selanjutnya susu UHT tersebut dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu 40-45 °C selama 6 jam, kemudian dikeluarkan dari inkubator dan terbentuklah F2 sebagai kultur kerja (Nizori, 2008). Diagram alir proses pembuatan F2 (kultur kerja) dapat dilihat pada Ilustrasi 2.



Ilustrasi 2. Diagram Alir Proses Pembuatan F2 (kultur kerja)

3.3.3.3. Proses Pembuatan Sari Umbi Bengkuang

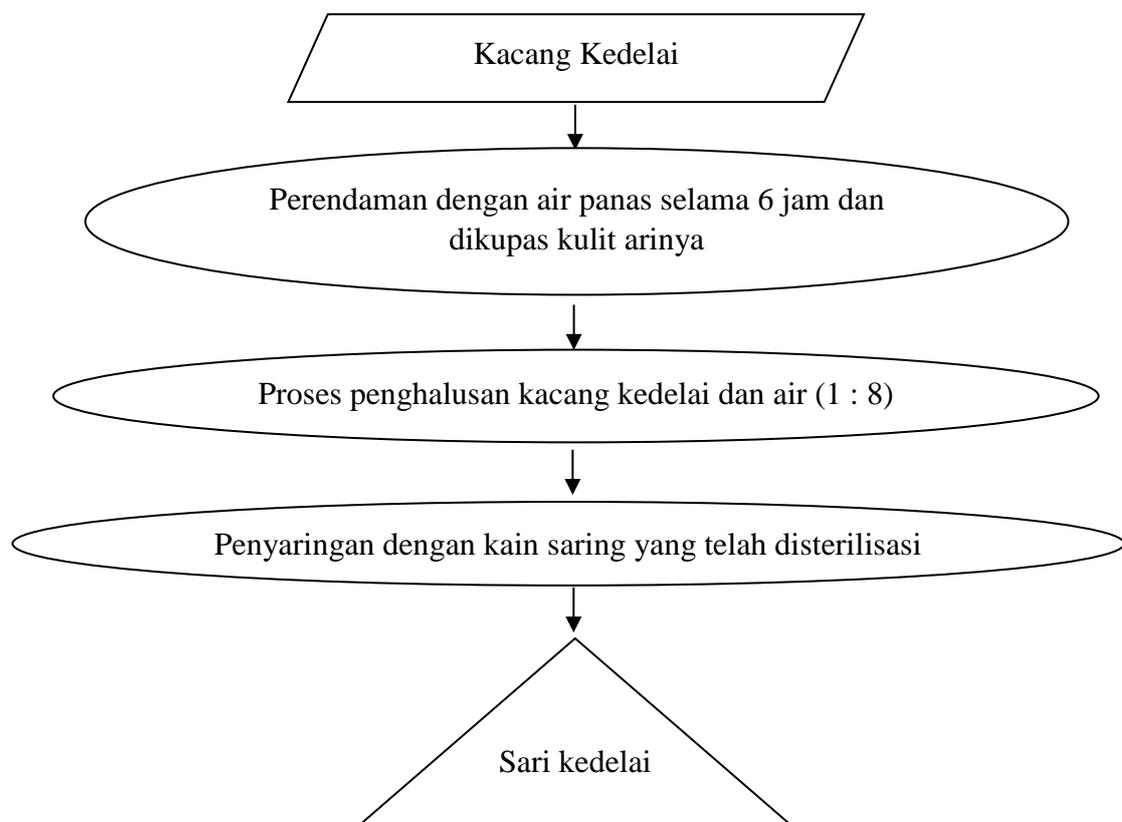
Proses pembuatan sari umbi bengkuang, yaitu umbi bengkuang dikupas, dicuci dan dipotong menjadi berukuran kecil. Kemudian umbi bengkuang dan air dihaluskan dengan blender dengan perbandingan 1 : 2 dan disaring dengan kain saring yang telah disterilisasi terlebih dahulu. Sari umbi bengkuang yang telah jadi, disimpan dalam botol kaca (Indiaresty, 2016). Diagram alir proses pembuatan sari umbi bengkuang dapat dilihat pada Ilustrasi 3.



Ilustrasi 3. Diagram Alir Proses Pembuatan Sari Umbi Bengkuang

3.3.3.4. Pembuatan Sari Kedelai

Proses pembuatan sari kedelai yaitu kacang kedelai direndam dengan air panas selama 6 jam lalu dikupas hingga bersih agar terpisah dari kulit arinya. Kacang kedelai dan air dihaluskan menggunakan blender dengan perbandingan 1 : 8. Kemudian disaring menggunakan kain saring yang telah steril. Sari kedelai yang telah jadi disimpan didalam botol kaca (Herawati dan Andang, 2011). Diagram alir proses pembuatan sari kedelai dapat dilihat pada Ilustrasi 4.

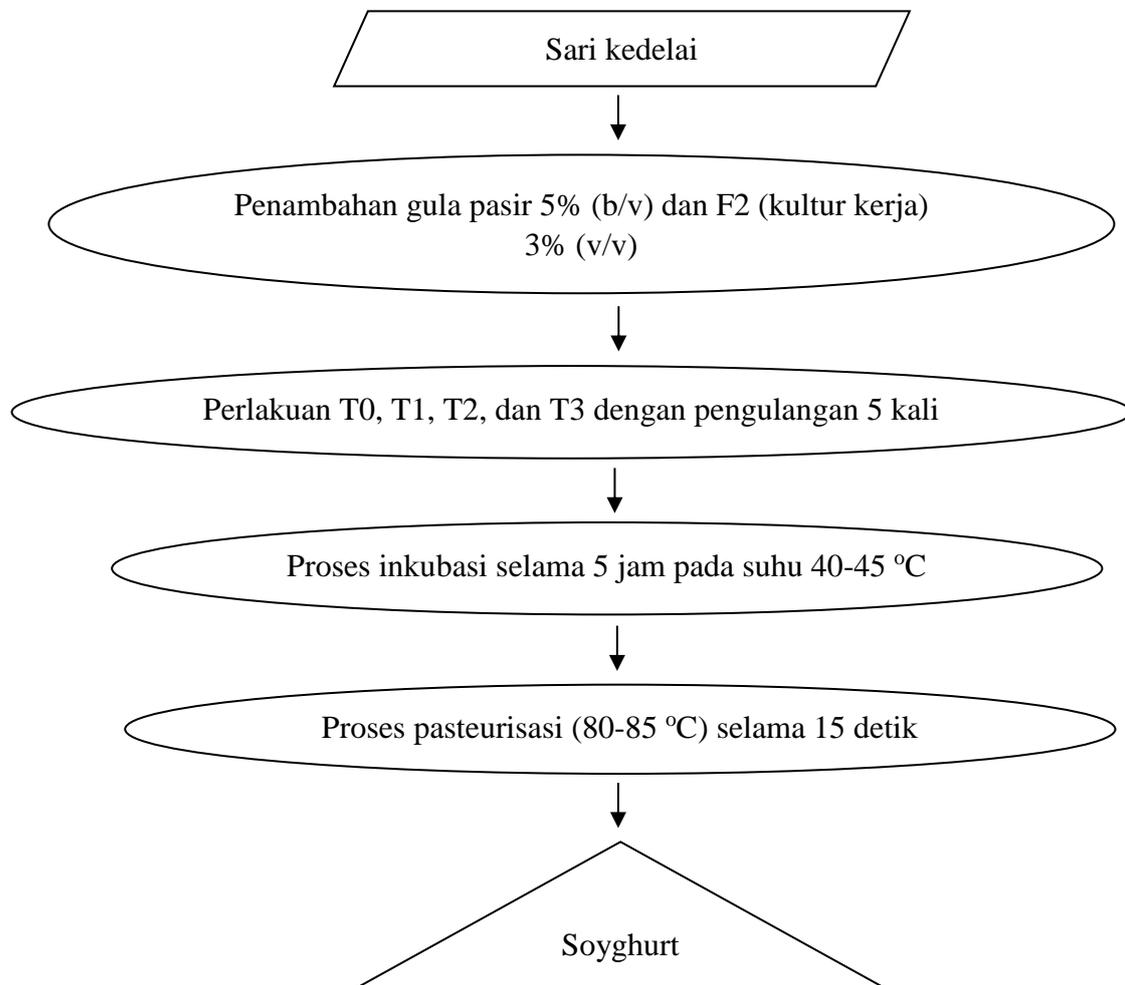


Ilustrasi 4. Diagram Alir Proses Pembuatan Sari Kedelai

3.3.3.5. Pembuatan Soyghurt

Proses pembuatan soyghurt, yaitu gula pasir sebanyak 5% (b/v) dan F2 (kultur kerja) sebanyak 3% (v/v) ditambahkan kedalam sari kedelai. Kemudian diberi perlakuan T0 yaitu penambahan 0% (v/v) sari umbi bengkuang, T1 yaitu penambahan 15% (v/v) sari umbi bengkuang, T2 yaitu penambahan 25% (v/v) sari umbi bengkuang, dan T3 yaitu penambahan 35% (v/v) sari umbi bengkuang. Setiap perlakuan dan pengulangan, dipasteurisasi pada suhu 80-85 °C selama 15 detik. Selanjutnya semua sampel diinkubasi di dalam inkubator pada suhu 40-45 °C selama 5 jam (Herawati dan Andang, 2011). Soyghurt yang telah jadi kemudian

dianalisis dengan parameter uji kadar serat pangan, kadar protein, nilai pH, dan kekeruhan. Diagram alir proses pembuatan soyghurt dapat dilihat pada Ilustrasi 5.



Ilustrasi 5. Diagram Alir Proses Pembuatan Soyghurt

3.3.4. Parameter Uji

Parameter uji dalam penelitian ini ada empat yaitu uji serat pangan, uji protein, nilai pH, dan kekeruhan, sebagaimana dijelaskan secara ringkas sebagai berikut.

3.3.4.1. Uji Serat Pangan

Pengujian serat pangan dilakukan dengan metode enzimatis (AOAC, 1995). Sampel digiling menggunakan petroleum eter pada suhu kamar selama 15 menit (40 ml petroleum eter per g sampel). Lalu ditimbang 1 g sampel dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan 25 ml 0,1 M buffer Na_2PO_4 pH 6 dan diaduk merata. Enzim termamyl ditambahkan 0,1 ml dan erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil. Lalu diinkubasi di dalam penangas air pada suhu 100 °C selama 15 menit. Campuran dibiarkan dingin dan ditambahkan 20 ml air destilat, pH diatur menjadi 1,5 menggunakan HCl. Kemudian ditambahkan 100 mg pepsin, erlenmeyer ditutup dan diinkubasi di dalam penangas air bergoyang pada suhu 40 °C selama 60 menit. Setelah itu 20 ml air destilat ditambahkan dan diatur pH menjadi 6,8 menggunakan NaOH. Sebanyak 100 mg pankreatin ditambahkan, erlenmeyer ditutup dan diinkubasi di dalam penangas air bergoyang pada suhu 40 °C selama 60 menit. Lalu pH diatur menggunakan HCl. Campuran kemudian disaring menggunakan *crucible* (*porosity* 2) yang telah diketahui beratnya dan mengandung 0,5 celite kering, lalu dibilas dengan 2x10 ml air destilat.

Dari prosedur di atas, selanjutnya residu (serat yang tidak larut) dibilas dengan 2x10 ml etanol 95% dan 2x10 ml aseton. Kemudian dikeringkan pada suhu 105 °C sampai mencapai berat konstan (semalam). Lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang (D1). Selanjutnya diabukan pada suhu 550 °C selama 5 jam. Lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang (I1).

Volume filtrat diatur menjadi 100 ml. Selanjutnya 400 ml etanol 95% hangat (60 °C) ditambahkan dan dibiarkan mengendap selama 1 jam. Larutan

disaring menggunakan *crucible* (*porosity* 2) yang telah diketahui beratnya dan mengandung 0,5 celite kering. Serat yang larut dibilas dengan 2x10 ml etanol 78%, 2x10 ml etanol 95% dan 2x10 ml aseton. Kemudian dikeringkan pada suhu 105 °C selama semalam. Lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang (D2). Selanjutnya diabukan pada suhu 550 °C selama 5 jam. Lalu didinginkan dalam desikator dan ditimbang (I2).

Blanko untuk serat yang tidak larut dan serat larut diperoleh melalui cara yang sama dengan prosedur untuk sampel, tapi tanpa sampel (B1 dan B2). Nilai blanko ini sewaktu-waktu harus dicek (AOAC, 1995).

Perhitungan:

$$\% \text{ serat pangan tidak larut} = \frac{D1-I1-B1}{W} \times 100$$

$$\% \text{ serat pangan larut} = \frac{D2-I2-B2}{W} \times 100$$

$$\% \text{ serat pangan total} = \frac{D-I-B}{W} \times 100$$

Keterangan:

W = berat sampel (g)

D = berat setelah pengeringan (g)

I = berat setelah pengabuan (g)

B = berat blanko bebas abu (g)

3.3.4.2. Uji Kadar Protein

Analisis protein dengan metode Bradford menggunakan spektrofotometer UV-Vis yang didasarkan atas pembentukan ikatan antara pewarna coomassie dengan beberapa asam amino seperti arginin dan residu asam amino hidrofobik

yang ada pada protein. Pembentukan ikatan menghasilkan warna biru dan memiliki spektrum absorbansi maksimum sebesar 595 nm (Praira, 2008). Tahap pertama adalah membuat 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. Kemudian masing-masing sebanyak 20 µl soyghurt dicampur dengan pereaksi Bradford sebanyak 1 ml. Campuran ini didiamkan pada suhu kamar selama satu jam. Sampel dimasukkan ke dalam kuvet secara bergantian pada spektrofotometer. 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 kurva standar. Hasil dari uji protein Bradford adalah nilai absorbansi yang dapat dikonversikan ke dalam persen (Bradford, 1976).

3.3.4.3. Uji Nilai pH

Pengukuran nilai pH menggunakan pH meter yang telah diatur menggunakan larutan penyangga barulah sampel diukur (Wahyudi, 2006). Pertama-tama, pH meter dikalibrasi dengan pH 4, 7, dan 10. Kemudian sampel disiapkan sebanyak 20 ml yang diletakkan di gelas beker. pH meter dihidupkan dan katoda indikator dicelupkan kedalam sampel. Lalu skala dibaca pada monitor digital (AOAC, 1995).

3.3.4.4. Uji Kekeruhan

Tingkat kekeruhan diukur menggunakan spektrum dengan panjang gelombang 190 nm hingga 950 nm. Spektrofotometer diatur untuk pengujian spektrum kemudian *base core line* dibuat dengan aquades. Kuvet dibersihkan, diganti dan diisi dengan sampel yang digunakan hingga garis hitam pada kuvet dan diukur kekeruhan sampel dengan cara scan panjang gelombang 190 nm hingga 950 nm. Hasil dari uji kekeruhan ini adalah kurva spektrum UV (AOAC, 1995).

3.3.5. Analisis Data

Data hasil pengujian kadar serat pangan dan kekeruhan dianalisis secara deskriptif kualitatif. Data hasil pengujian kadar protein dan nilai pH yang diperoleh, dianalisis dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) pada taraf signifikansi 5% dan jika terdapat pengaruh perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Wilayah Ganda Duncan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan (Naifular *et al.*, 2014).