

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini akan dilakukan di Laboratorium Pengolahan dan Analisis Hasil Pertanian Fakultas Pertanian. Waktu penelitian direncanakan berlangsung selama 2 bulan yaitu sekitar bulan November hingga September 2011.

3.2. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu kedelai, bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dengan perbandingan 1:1 yang diperoleh dari Fakultas Teknologi Pangan Institut Pertanian Bogor, inulin chicory merk Frutafit, gula pasir, MRS Agar, MRS Broth, NaOH, H₂SO₄, K₂SO₄, H₃BO₃, phenolptalein, larutan tashiro CMC, dan akuades.

Alat-alat yang digunakan adalah baskom, panci, kompor gas, blender, saringan, lemari es (*refrigerator*), timbangan analitik, tabung reaksi, *autoclave*, termometer, pH meter, botol jar, inkubator, oven, desikator, inkubator, *water bath*, *colony counter*, *laminar flow cabinet*, labu kjedahl, alat titrasi, pipet tetes, *micropipette*, lampu spritus, kain penyaring, batang pengaduk, *magnetic stirrer*, jarum ose, dan alat-alat gelas.

3.3. Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode percobaan (*Experimental Method*) dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktorial dengan 2 faktor. Faktor pertama adalah konsentrasi sukrosa (S) (2%, 5%, dan 7%) dan faktor kedua adalah konsentrasi inulin (T) (0%, 3%, dan 6%) sehingga diperoleh 9 kombinasi dan masing masing diulang 3 kali. Kombinasi perlakuan dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 4.Kombinasi perlakuan

Konsentrasi Sukrosa	Konsentrasi inulin		
	I1	I2	I3
S1	S1I1	S1I2	S1I3
S2	S2I1	S2I2	S2I3
S3	S3I1	S3I2	S3I3

Model matematis yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

$$Y_{ijk} = \mu + A_i + B_k + AB_{ik} + \Sigma_{ijk}$$

Keterangan :

Y_{ijk} : nilai pengamatan

M : nilai tengah populasi

A_i : pengaruh perlakuan konsentrasi sukrosa pada taraf ke-i

B_k : pengaruh perlakuan konsentrasi inulin pada taraf ke-k

AB_{ik} : pengaruh interaksi perlakuan konsentrasi sukrosa pada taraf ke-i dengan konsentrasi inulin pada taraf ke-k

Σ_{ijk} : pengaruh galat percobaan konsentrasi sukrosa pada taraf ke-i, konsentrasi inulin pada taraf ke-k, ulangan ke-j

Data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik dengan menggunakan uji Anova. Jika F hitung $>$ F tabel maka dilanjutkan dengan Uji Tukey pada taraf 5%.

3.4. Pelaksanaan Penelitian

3.4.1. Sterilisasi Peralatan

Semua peralatan yang akan digunakan disterilkan terlebih dahulu dengan cara mencuci peralatan dengan detergen sampai bersih, kemudian dilakukan pengeringan dan dihindarkan dari debu atau kotoran lain. Setelah dikeringkan semua peralatan disterilkan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 15 lb. Jarum ose disterilkan dengan membakarnya diatas api bunsen sampai membara, dibiarkan beberapa saat dan digunakan untuk setiap kali pemakaiannya.

3.4.2. Pembuatan Media

Setelah semua peralatan yang akan digunakan dibersihkan dan disterilisasikan, maka MRS Agar ditimbang sebanyak 2,6 g kemudian dimasukkan ke dalam erlemeyer yang telah diisi 50 ml akuades dan Medium MRS Broth ditimbang sebanyak 3,12 g kemudian dimasukkan ke dalam erlemeyer yang telah diisi 60 ml akuades. Selanjutnya larutan diaduk dengan *magnetik stirrer* sampai homogen. Medium dipanaskan di atas kompor listrik sampai mendidih dengan hati-hati agar medium tidak melimpah dari erlemeyer. Selanjutnya dilakukan sterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 15 lb. Medium didinginkan sampai hangat dan dituangkan ke dalam tabung reaksi yang telah disterilkan sebelumnya dan ditutup dengan kapas penutup dan aluminium foil. Setelah medium membeku (MRS Agar) dan MRS Broth diinkubasi pada suhu 37°C selama 18 jam.

3.4.3. Perbanyakkan Bakteri

Perbanyakkan bakteri dilakukan dengan menggunakan 50 ml medium MRS Agar dan 60 ml medium MRS Broth. Medium MRS Agar sebanyak 50 ml dibuat dari 2,6 g MRS Agar yang diencerkan dengan akuades hingga 50 ml. Kemudian medium sebanyak 50 ml tadi dibagi menjadi 4 bagian dengan masing-masing bagian sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Sedangkan Medium MRS Broth sebanyak 60 ml dibuat dari 3,12 g MRS Broth yang diencerkan dengan akuades hingga 60 ml dan dibagi menjadi 6 bagian dengan masing-masing bagian 10 ml dan juga dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kedua medium yang telah dimasukkan ke dalam tabung reaksi ditutup rapat dengan menggunakan kapas penutup dan aluminium foil dan dimasukkan ke dalam erlemeyer dan disterilkan dengan *autoclave* selama 15 menit dengan suhu 121°C.

Selanjutnya medium tersebut didinginkan hingga mencapai kisaran suhu 43-45°C lalu diinokulasi dengan *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*, kultur murni yang telah diinokulasikan tersebut lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sehingga diperoleh kultur aktif.

3.4.4. Pembuatan Susu Kedelai

Proses pembuatan susu kedelai menurut Cahyadi (2006) dengan modifikasi adalah sebagai berikut : kedelai dibersihkan dari segala kotoran, lalu dicuci. Kemudian kedelai yang telah bersih direbus selama 15 menit, lalu direndam dalam air bersih dengan perbandingan yaitu 3:1 selama 12 jam. Setelah itu kedelai dicuci sampai kulit arinya terkelupas, kemudian digiling (dihancurkan) menggunakan blender sambil ditambahkan air panas (80-100°C) dengan perbandingan air dan kedelai sebanyak 5:1. Kemudian disaring dengan kain saring, sehingga diperoleh larutan susu kedelai. Kemudian larutan susu kedelai dipanaskan hingga mendidih. Pembuatan susu kedelai dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.4.5. Persiapan Starter

Starter yang digunakan dibuat secara bertahap, pertama susu sapi segar 100 ml dimasukkan ke dalam botol dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 10 menit. Setelah agak dingin (43-45)°C medium susu sapi segar diinokulasi dengan kultur *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* sebanyak 2% dari 100 ml volume medium susu sapi segar, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Selanjutnya dibuat medium kedua yang terdiri dari 75 bagian susu sapi segar dan 25 bagian susu kedelai dan diperlakukan sama dengan medium pertama, hanya saja bakteri yang digunakan adalah bakteri dari medium pertama. Demikian seterusnya hingga bakteri dapat ditumbuhkan pada medium yang terdiri dari 100 bagian susu kedelai. Persiapan starter dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.4.6. Pembuatan Soyghurt

Proses pembuatan *soyghurt* mengacu pada metode Kanda *et al.* (1976). Susu kedelai yang telah disiapkan sebanyak 900 ml untuk 1 kali ulangan. Kemudian dibagi menjadi 9 bagian dan masing-masing bagian sebanyak 100 ml dimasukkan ke dalam botol jar. Kemudian masing-masing botol jar ditambahkan sukrosa dan inulin sesuai kombinasi perlakuan. Agar *soyghurt* stabil dan baik teksturnya maka dilakukan penambahan CMC sebanyak 0,75% dari volume susu kedelai. Selanjutnya susu disterilisasi pada suhu 115°C selama 10 menit. Kemudian susu

kedelai didinginkan sampai suhu 45°C. Setelah itu diinokulasikan starter sebanyak 2% dari volume susu kedelai. Selanjutnya diinokulasi dengan starter susu kedelai diinkubasi selama 12 jam pada suhu 43°C. *Soyghurt* yang dihasilkan dilakukan pengamatan sesuai parameter yang dianalisis. Pembuatan *soyghurt* dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.4.7. Pengmatan

3.4.6.1. pH

Derajat keasaman (pH) ditentukan dengan menggunakan pH meter. Sebelum dilakukan pengukuran, pH meter harus dikalibrasi terlebih dahulu dengan menggunakan larutan Buffer 7,0 dan 4,0. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap sampel dengan mencelupkan elektrodanya ke dalam larutan sampel dan dibiarkan beberapa saat sampai diperoleh pembacaan yang stabil.

3.4.6.2. Total Asam Laktat

Penghitungan total asam laktat dilakukan dengan titrasi alkalimetri menggunakan NaOH 0,1 N menurut Fardiaz (1992). Sebanyak 15 ml sampel dimasukkan ke dalam erlemeyer 50 ml lalu ditetesi dengan indikator phenolptalein 1-2 tetes, kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N hingga terbentuk warna merah muda yang bertahan 10 detik lalu titrasi dapat dihentikan dan catat volume NaOH 0,1 N yang berkurang. Kadar asam laktat dapat ditentukan dengan rumus :

$$\text{Asam Laktat (\%)} = \frac{\text{VolumeNaOH} \times N(\text{NaOH}) \times 90/1000}{\text{VolumeSampel}} \times 100\%$$

3.4.6.3. Total Bakteri Asam Laktat

Metode sebar (*spread surface plate*) digunakan untuk menentukan jumlah BAL pada uji mikrobiologis. Jumlah bakteri akan dianalisis setelah medium diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Perhitungan jumlah BAL akan dilakukan dengan mengambil 0,1 ml sampel *soyghurt* menggunakan pipet tetes lalu ditambahkan dengan 0,9 ml garam fisiologis 0,85% untuk pengenceran 10^{-1} dan dilanjutkan sampai pengenceran 10^{-9} . Kemudian diambil 0,1 ml dari pengenceran terakhir untuk diinokulasi pada medium MRS-agar dengan cara

meneteskan sampel pada cawan petri yang berisi MRS-agar dan sampel diratakan pada seluruh permukaan medium dengan batang gelas melengkung yang telah disterilkan dengan cara dibakar di atas api bunsen.

Proses inokulasi dilakukan di dalam ruangan steril yaitu *Laminar Flow Cabinet*. Cawan petri yang telah diinokulasi selanjutnya diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu 37°C dalam keadaan terbalik dengan tujuan untuk menghindari menetesnya air yang mungkin melekat pada dinding dalam pada tutup cawan. Koloni BAL yang tumbuh akan dihitung menggunakan *colony counter*. Perhitungan koloni BAL dapat dihitung dengan rumus :

$$\text{Jumlah BAL per ml} = \text{Jumlah koloni} \times \frac{1}{\text{Pengenceran}}$$

Keterangan : Total BAL dinyatakan dalam koloni/ml

3.4.6.4. Total Padatan

Penentuan total padatan mengacu pada Sudarmadji dkk (1997). Cawan porselen dipanaskan pada suhu 105°C selama satu jam, kemudian didinginkan dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang beratnya. Sebanyak lebih kurang 5 ml sampel ditimbang dan ditempatkan ke dalam cawan porselen kemudian dimasukkan ke dalam oven yang bersuhu 105°C selama satu jam (pengukuran dimulai saat oven tepat bersuhu 105°C), setelah itu cawan porselen dimasukkan ke dalam desikator selama 30 menit dan ditimbang dengan timbangan analitik. Perlakuan pemanasan cawan porselen dan penimbangan dilakukan berulang kali hingga diperoleh berat konstan. Sisa sampel dihitung sebagai total padatan dan berat yang hilang sebagai kadar air, dengan perhitungan :

$$\text{Total Padatan} = 100\% - \frac{\text{BSAw} - \text{BSAk}}{\text{BSAw}} \times 100\%$$

Keterangan : BSAw = Berat sampel awal

BSAk = Berat sampel akhir

3.4.6.5. Kadar Protein

Penentuan kadar protein dilakukan pada sampel yang mempunyai total BAL dengan jumlah terbanyak. Penentuan kadar protein mengacu pada

Sudarmadji dkk. (1997). Sampel ditimbang sebanyak 3 g dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl. Kemudian ditambahkan 1 g K_2SO_4 dan 25 ml H_2SO_4 , selanjutnya dikocok agar homogen. Sampel didestruksi dengan cara mendidihkan campuran tersebut selama 45 menit sampai terbentuk cairan jernih tidak berwarna dan didinginkan. Hasil destruksi dipindahkan ke dalam labu ukur 100 ml yang berisi lebih kurang 50 ml akuades dengan membilas labu Kjeldahl tiga kali dengan 10 ml akuades. Akuades bilasan dimasukkan ke dalam labu ukur dan volumenya ditepatkan hingga 100 ml lalu dihomogenkan.

Sampel sebanyak 25 ml diambil dari labu ukur, kemudian dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl dan ditambahkan dengan 8 ml larutan NaOH 50%. Destilat ditampung dengan menggunakan erlenmeyer yang berisi 15 ml larutan H_3BO_3 dan 3 tetes larutan tashiro campuran dari metil merah dan metil biru (larutan berwarna biru). Kemudian dilakukan destilasi sampai diperoleh destilat lebih kurang 30 ml dan larutan penampung berubah warnanya menjadi hijau. Hasil destilasi dititrasikan dengan larutan HCl 0,1 N sampai terbentuk warna biru kembali (warna semula). Selanjutnya dibuat juga larutan blanko dengan menggunakan akuades tanpa menambahkan sampel, namun cara mengerjakannya sama dengan mengerjakan pada sampel. Kandungan protein dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\% N = \frac{(V_{HCl} - N_{HCl}) \times AR \text{ Nitrogen } (14.007)}{1000 \times \text{volume sampel}} \times 100\%$$

$$\% \text{ protein} = \% N \times \text{faktor protein untuk kacang-kacangan } (5,75)$$