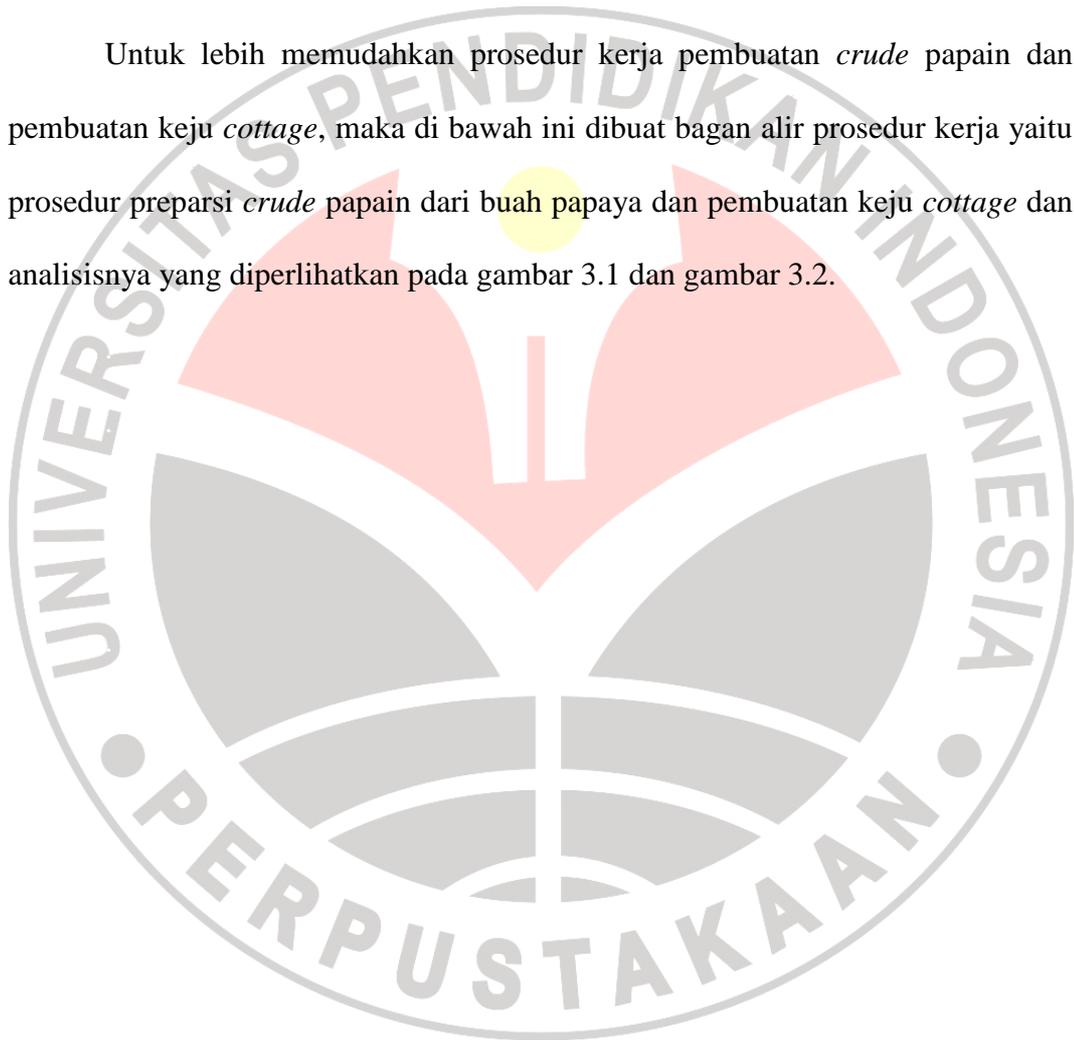


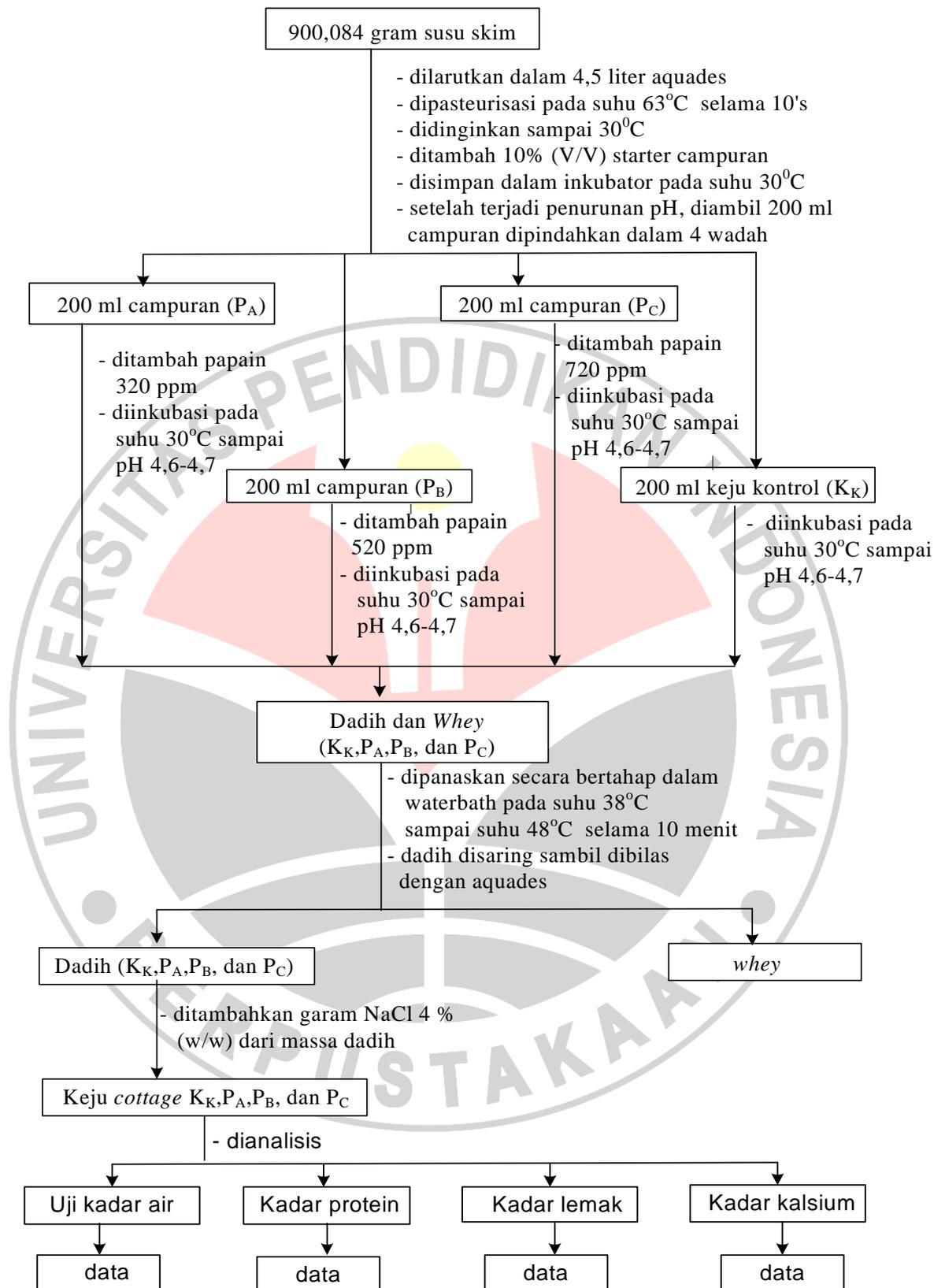
BAB III

METODOLOGI

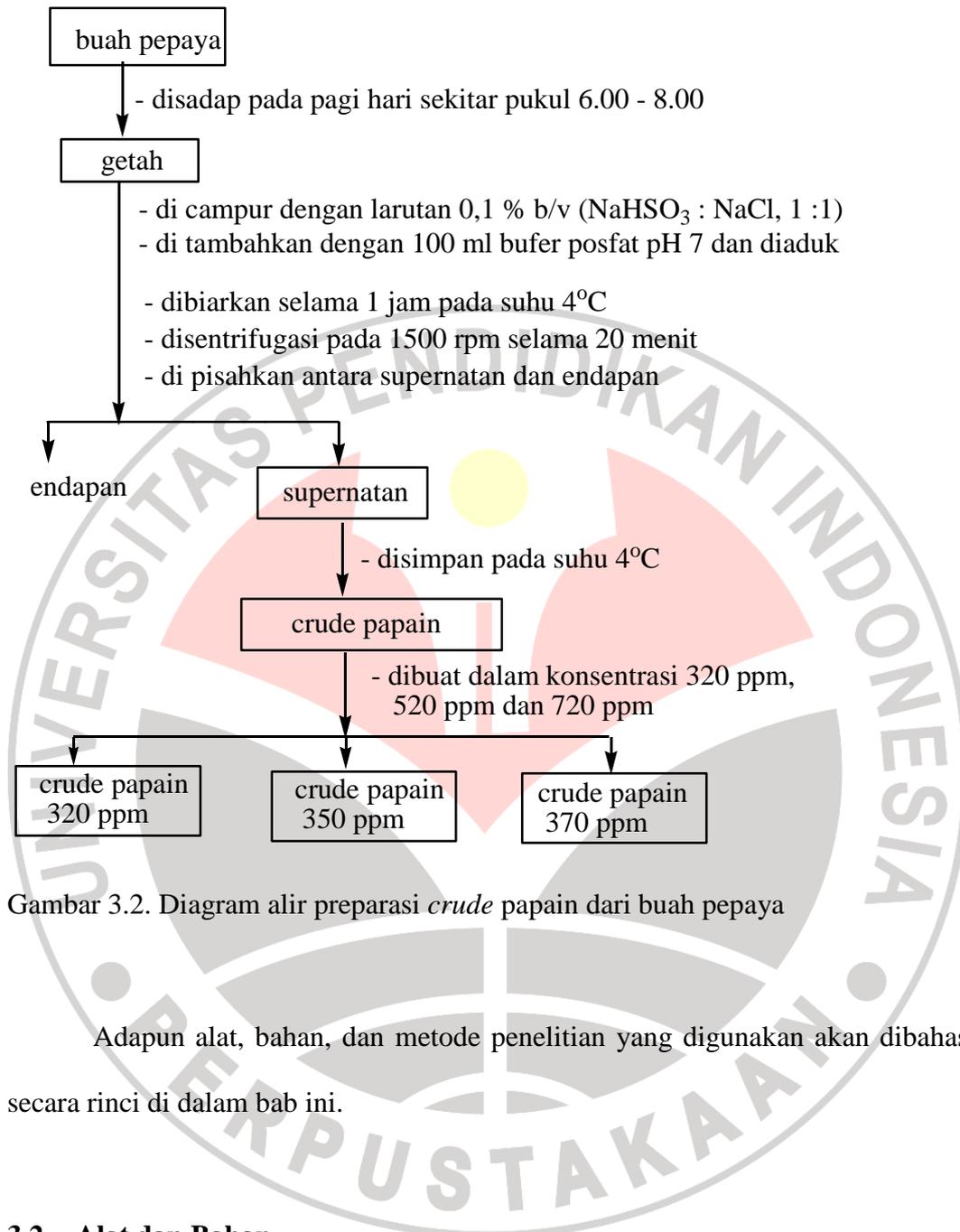
3.1 Bagan Alir Penelitian

Untuk lebih memudahkan prosedur kerja pembuatan *crude* papain dan pembuatan keju *cottage*, maka di bawah ini dibuat bagan alir prosedur kerja yaitu prosedur preparasi *crude* papain dari buah papaya dan pembuatan keju *cottage* dan analisisnya yang diperlihatkan pada gambar 3.1 dan gambar 3.2.





Gambar 3.1. Prosedur pembuatan keju *cottage* dan analisisnya



Gambar 3.2. Diagram alir preparasi *crude* papain dari buah pepaya

Adapun alat, bahan, dan metode penelitian yang digunakan akan dibahas secara rinci di dalam bab ini.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Dalam pembuatan keju cottage dan analisis kandungan gizinya digunakan peralatan : *waterbath*, set alat sentrifugasi, set alat kjedalh, oven dan autoclap, pH meter, spatula, saringan, shaker *waterbath*, inkubator, pemanas listrik,

magnetic stirrer, cawan krus, tang krus, neraca analitik, thermometer, botol semprot, pisau penyadap, mangkok, dan berbagai macam peralatan gelas seperti : gelas kimia, gelas ukur, kaca arloji, labu takar, batang pengaduk, tabung reaksi, pipet tetes dan buret mikro.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : susu skim, getah pepaya, larutan 0,1 v/v (NaHSO_3 : NaCl, 1:1), buffer fosfat pH 7, pereaksi biuret, bakteri stater (*Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, dan *Leuconostoc mesenteroides*), NaCl, air, asam sulfat pekat, amil alkohol, dan aqua regia.

3.3 Metode Penelitian

Tahapan kegiatan yang akan dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Tahap produksi *crude* papain
2. Tahap preparasi bakteri starter *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, dan *Leuconostoc mesenteroides*
3. Tahap pembuatan keju *cottage*
4. Tahap pengujian kadar air dan kandungan gizi keju *cottage*

3.3.1 Produksi *crude* papain

Pada penelitian ini digunakan enzim papain dalam bentuk kasarnya (*crude* papain). Produksi *crude* papain diawali oleh penyadahan getah buah pepaya yang

berumur 2,5 – 3 bulan. Buah disadap pada pagi hari yaitu sekitar pukul 6.00 – 8.00. sebelum disadap, buah dibersihkan dari kotoran, debu, dan embun dengan kain. Penyadapan dilakukan dengan cara menorehkan alat sadap (pisau) pada kulit buah mulai dari pangkal menuju ujung buah. Kedalaman torehan sekitar 1-2 mm. setelah ditoreh, getah yang keluar ditampung dalam wadah (mangkok) yang telah disiapkan.

Getah papaya selanjutnya dicampur dengan larutan 0,1 % v/v (NaHSO_3 : NaCl , 1:1). Campuran larutan getah papaya ini diaduk sampai rata kemudian ditambahkan 100 ml buffer posfat pH 7. Campuran tersebut dibiarkan selama 1 jam pada suhu 4°C . kemudian untuk memisahkan bagian - bagian yang tidak terlarut dilakukan sentrifugasi pada 1500 rpm selama 20 menit, dan dipisahkan antara supernatant dan endapannya. Bagian yang diambil adalah bagian supernatant lalu disimpan pada suhu 4°C (Yuyun, 2005). Kemudian dibuat larutan enzim sesuai konsentrasinya yaitu 320 ppm, 520 ppm, dan 720 ppm.

3.3.2 Preparasi bakteri starter

Bakteri stater yang digunakan disiapkan berdasarkan umur inokulum yang telah ditentukan. Tahapan yang dilakukan dalam penumbuhan bakteri starter ini adalah menyiapkan media *panthotenate broth* sebagai media penumbuhan bakteri dan penumbuhan bakteri starter sesuai dengan umur inokulumnya. Media *panthotenate broth* dibuat dengan cara menimbang 5 gram glukosa, 5 gram natrium asetat dan 20 gram ekstrak ragi, kemudian di larutkan dalam 1 liter aquades. Campuran ini dipanaskan sambil diaduk dengan *magnetic stirer* selama

15 menit setelah mendidih. Kemudian media tersebut didinginkan, lalu dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer steril dan ditutup dengan kapas yang dibalut kain kassa. Langkah terakhir adalah sterilisasi media menggunakan autoklav dengan tekanan 1,5 atm dan suhu 121 °C selama 15 menit.

Tahap selanjutnya adalah penumbuhan bakteri starter sesuai dengan umur inokulumnya. Starter yang digunakan adalah starter campuran 3 bakteri yaitu 10 % starter *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, dan *Leuconostoc mesenteroides* dengan perbandingan 3:1:2. Masing – masing bakteri diinokulasi ke dalam 225 ml, 75 ml dan 150 ml *panthotenate broth* steril secara berurutan. Di inkubasi pada suhu 30°C selama 6 jam untuk bakteri *Streptococcus thermophilus*, 4 jam untuk bakteri *Lactococcus lactis* dan 8 jam untuk bakteri *Leuconostoc mesenteroides*. Kemudian bakteri – bakteri starter tersebut dicampurkan menjadi satu.

3.3.3 Pembuatan keju *cottage*

Keju *cottage* dibuat menjadi 3 jenis, dengan variabel konsentrasi papain yang berbeda yaitu:

- Keju P_A: merupakan keju *cottage* yang dibuat dengan penambahan bakteri starter *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesentroides* dengan perbandingan 3:1:2) dan umur masing-masing inokulum berturut-turut adalah 6 jam, 4 jam dan 8 jam, diinkubasi pada suhu 30°C dengan perbandingan tertentu, dan papain konsentrasi 320 ppm.

- Keju P_B : merupakan keju *cottage* yang dibuat dengan penambahan bakteri starter *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesentroides* dengan perbandingan 3:1:2) dan umur masing-masing inokulum berturut-turut adalah 6 jam, 4 jam dan 8 jam, diinkubasi pada suhu 30⁰C dengan perbandingan tertentu, dan papain konsentrasi 520 ppm.
- Keju P_C: merupakan keju *cottage* yang dibuat dengan penambahan bakteri starter *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesentroides* dengan perbandingan 3:1:2) dan umur masing-masing inokulum berturut-turut adalah 6 jam, 4 jam dan 8 jam, diinkubasi pada suhu 30⁰C dengan perbandingan tertentu, dan papain konsentrasi 720 ppm.
- Keju K_K: merupakan keju *cottage* yang dibuat dengan penambahan bakteri starter *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesentroides* dengan perbandingan 3:1:2) dan umur masing-masing inokulum berturut-turut adalah 6 jam, 4 jam dan 8 jam, diinkubasi pada suhu 30⁰C dengan perbandingan tertentu, tanpa penambahan enzim papain.

Pembuatan keju *cottage* dilakukan dengan metode *setting* pendek. Sebanyak 900,084 gram skim yang merupakan bahan dasar keju dilarutkan dalam 4,5 liter aquades dan dipasteurisasi pada suhu 63⁰C selama 10 menit, didinginkan sampai 30⁰C sebagai suhu inkubasi, kemudian ditambah 10% (V/V) starter campuran dan disimpan dalam inkubator pada suhu 30⁰C. Setelah terjadi penurunan keasaman, enzim papain dengan kadar bervariasi (320 ppm, 520 ppm, dan 720 ppm) ditambah ke dalam 200 ml campuran. Setelah keasaman mencapai pH 4,6-4,7 dilakukan pemasakan *curd* di waterbath pada suhu 110 F (38⁰C) yang

dipanaskan secara bertahap sampai suhu 120 F (48°C) lalu dipanaskan selama 10 menit. Setelah itu *whey* dibuang dengan cara disaring sambil dibilas dengan aquades. Kemudian ditambahkan garam NaCl 4 % (w/w) dari massa dadih dan terbentuklah keju *cottage*.

3.3.4 Penentuan kadar air dan kualitas susu skim dan keju *cottage*

Pada pengujian kadar air dan kualitas yang meliputi kadar lemak, kadar protein dan kadar mineral kalsium ini diperlakukan pada susu skim sebagai bahan dasar dan keju *cottage* yang sudah terbentuk. Dalam analisis ini digunakan metode SNI sebagai bahan acuan.

3.3.4.1 Penentuan kadar air

Metode yang digunakan dalam penentuan kadar air ini adalah metode oven dengan menghitung kehilangan bobot sampel setelah pengovenan. Sampel ditimbang sebanyak 1-2 gram di dalam cawan porselen bertutup yang sebelumnya telah diketahui beratnya. Sampel dikeringkan menggunakan cawan porselen dalam oven pada suhu 105°C selama 3 jam (tutup botol ditimbang). Sampel didinginkan dalam desikator, kemudian ditimbang sampai diperoleh berat yang konstan. Perhitungan dalam menentukan kadar air dapat ditentukan melalui persamaan berikut:

$$\text{Kadar air} = \frac{W - W_1}{W} \times 100\%$$

Keterangan : W = berat sampel awal (g)

W₁ = berat sampel setelah pengeringan (g)

3.3.4.2 Penentuan kadar lemak

Dalam penentuan kadar lemak ini digunakan metode Gerber dengan cara hidrolisis oleh asam sulfat pekat dan amil alkohol menggunakan alat butirometer. Hidrolisis sampel ditunjukkan untuk membebaskan lemak yang terikat.

Cara kerja penentuan kadar lemak ini mula-mula sampel ditimbang, keju sebanyak 10 gram sedangkan untuk susu ditimbang sebanyak 3 gram lalu dilarutkan dalam 10 ml aquades. Butirometer diisi dengan asam sulfat pekat sebanyak 10 mL, lalu sampel dimasukkan dan ditambahkan amil alkohol sebanyak 1 mL, butirometer ditutup dengan prop karet lalu dikocok hingga semua gumpalan larut. Butirometer berisi sampel tersebut dipanaskan dalam penangas air pada suhu 65- 70⁰C selama lima menit dan disentrifuse pada kecepatan 1100 rpm selama 3 menit. Butirometer disimpan kembali dalam penangas air pada suhu 65- 70⁰C dengan posisi terbalik (tutup/ prop karet dibagian bawah) selama 2-3 menit. Lapisan yang terbentuk pada butirometer diatur sehingga ada di dalam garis butirometer, skala yang menunjukkan persentase kandungan lemak dibaca pada butirometer.

3.3.4.3 Penentuan kadar Protein

Proses penentuan kadar protein susu skim dan keju cottage ini menggunakan metode mikro Kjeldahl yang terdiri dari dua tahap yaitu tahap destruksi dan tahap penentuan kadar protein.

Pada destruksi sampel, sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan dalam labu kjeldahl dan ditambahkan 5 gram garam kjeldahl yang terdiri dari campuran $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan K_2SO_4 dengan perbandingan massa 1:3, garam ini berfungsi sebagai katalis. Kemudian dimasukkan beberapa batu didih dan dipanaskan dalam 10 mL H_2SO_4 pekat sehingga destruksi berlangsung sampai larutan menjadi jernih, lalu didinginkan.

Dalam tahap penentuan kadar protein, larutan sampel dipindahkan kedalam labu takar 50 mL dan diencerkan hingga tanda batas. Ke dalam labu destilasi yang telah berisi 10 mL NaOH 30% ditambahkan 5 mL sampel. Campuran tersebut didestilasi sampai diperoleh destilat sebanyak 75 mL, destilat ini ditampung dalam 10 mL H_3BO_3 3 % dan 2 tetes indikator tashiro. Selanjutnya, destilat dititrasi dengan HCL 0,1 N sampai warna destilat berubah dari hijau menjadi ungu.

Penentuan kadar protein ini dilakukan di Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Bandung.

Kadar protein dapat ditentukan dengan persamaan dibawah ini :

$$\% \text{ Protein} = \frac{B}{C} \times \frac{D \times E \times F \times G}{A \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan : A = Berat sampel (g)

B = Volum pelarutan hasil destruksi (mL)

C = Volum yang dipipet untuk destilasi (mL)

D = Volum larutan penitrasi / HCl (mL)

E = Normalitas penitrasi / HCL (mL)

F = Faktor konversi untuk susu (6,38)

$G = \text{Berat Molekul Nitrogen (14)}$

3.3.4.4 Penentuan Kadar Mineral Kalsium

Kadar kalsium ditentukan menggunakan teknik Spektroskopi Serapan Atom (SSA). Pada penentuan kadar mineral kalsium dalam sampel susu skim dan keju cottage ini dilakukan dalam dua tahapan, yaitu tahap destruksi sampel dan tahap pengukuran.

Tahapan destruksi sampel dimulai dengan mengabukan sampel dalam *puvish*. Abu sampel yang telah dingin ditimbang sebanyak 0,045 gram, kemudian abu didestruksi menggunakan 10 mL aqua regia (air raja) yang merupakan campuran dari HCl pekat dan HNO₃ pekat dengan perbandingan volume 3:1. Larutan abu dikisatkan dengan pemanasan sampai volumenya ± 1 mL, kemudian dipipet dan dimasukkan kedalam labu ukur 25 mL dan diencerkan menggunakan aquades sampai tanda batas, lalu dihomogenkan.

Tahapan selanjutnya pengukuran kadar kalsium. Tahapan ini dimulai dengan pembuatan larutan standar kalsium dalam beberapa konsentrasi. Kemudian absorbansi dari masing-masing larutan standar ini diukur pada panjang gelombang maksimum untuk kalsium, yaitu 422,7 nm. Larutan sampel hasil destruksi lalu diukur pada panjang gelombang yang sama. Kadar kalsium dalam sampel ditentukan dengan mencocokkan absorbansi larutan sampel terhadap kurva kalibrasi yang diperoleh dari pengukuran larutan standar kalsium pada beberapa konsentrasi.