

BAB III

METODE PENELITIAN

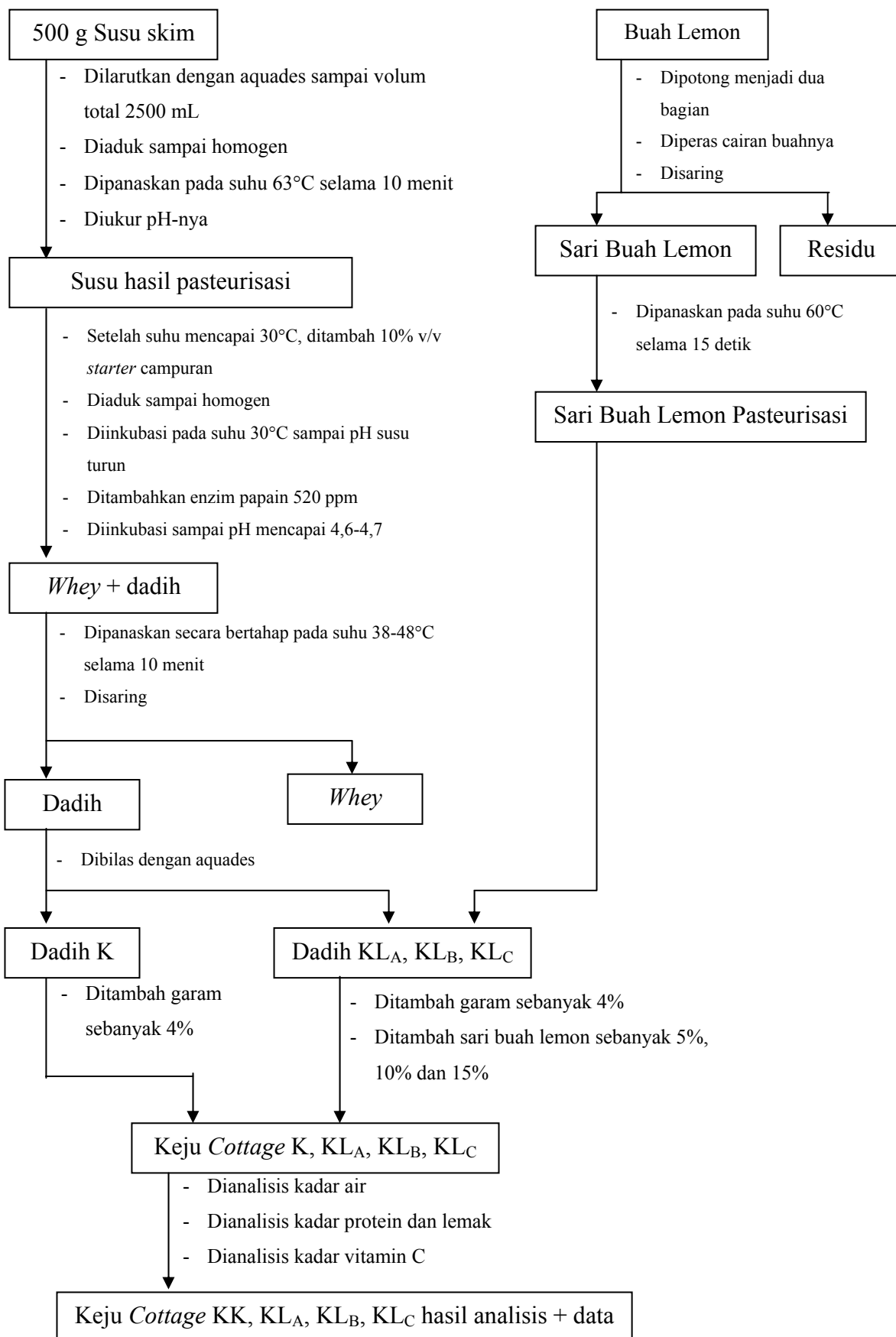
3.1 Alat dan Bahan

Pada penelitian ini digunakan berbagai jenis alat antara lain berbagai macam alat gelas, labu Kjeldahl, set alat Soxhlet, timble ekstraksi, *autoclave*, waterbath, oven, inkubator, pH meter, *shaker*, dan set alat HPLC Hitachi.

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan baku dan bahan kimia. Bahan baku yang digunakan adalah susu skim, buah lemon dan bakteri *starter* (*Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* dan *Leuconostoc mesentroides*). Bahan kimia yang digunakan adalah buffer fosfat pH 7, natrium hidroksida, asam sulfat, asam klorida, asam borat, indikator Tashiro (campuran metil merah 0,2 % dan metilen biru 0,1 %), garam Kjeldahl (campuran $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan K_2SO_4 p.a dengan perbandingan massa 1:3), garam dapur, glukosa, agar, natrium asetat, *yeast extract*, petroleum eter dan perak nitrat.

3.2 Diagram Alir Penelitian

Untuk mempermudah pemahaman tentang penelitian yang dilakukan, singkatnya dapat dilihat pada diagram alir berikut :



Gambar 3.1 Diagram alir penelitian

3.3 Langkah Kerja Penelitian

3.3.1 Pembuatan Bakteri *Starter*

3.3.1.1 Pembuatan Media

Bahan-bahan yang dibutuhkan dalam membuat 1 liter media *Pantothenate broth* yaitu glukosa 5 g, Natrium asetat 5 g dan *yeast extract* sebanyak 20 g. Semua bahan dilarutkan dengan aquades sampai volum total mencapai 1 liter. Campuran tersebut dipanaskan pada pemanas listrik disertai pengadukan. Pemanasan dilakukan sampai mendidih selama 15 menit. Media ditempatkan dalam labu Erlenmeyer yang ditutup rapat dengan kapas dan kain kassa steril, kemudian disterilisasi menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

3.3.1.2 Preparasi Bakteri *Starter*

Masing-masing bakteri asam laktat yang telah dibiakkan pada media padat kemudian diinokulasi pada volum media cair *panthotenate brot*. Inokulum bakteri *Streptococcus thermophilus* diinkubasi selama 6 jam, *Lactococcus lactis* selama 4 jam dan *Leuconostoc mesentroides* selama 8 jam pada suhu 30°C. Kemudian ketiganya dicampurkan dengan perbandingan *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* dan *Leuconostoc mesentroides* yaitu 3:1:2. *Starter* campuran dapat disimpan dalam ruangan 4°C.

3.3.2 Pembuatan Keju *Cottage*

3.3.2.1 Preparasi Sari Buah Lemon

Buah lemon sebelumnya dicuci terlebih dahulu, kemudian dipotong menjadi dua bagian. Buah lemon tersebut diperas cairan buahnya dengan alat pemeras jeruk. Sari buah lemon disaring dengan kain untuk memisahkan bulir jeruknya. Pasteurisasi sari buah lemon dilakukan pada suhu 63°C selama 15 detik dengan tujuan untuk menghilangkan bakteri patogen.

3.3.2.2 Pembuatan Keju *Cottage* Fortifikasi

Dalam penelitian ini dibuat 4 jenis keju *Cottage* dengan perlakuan berbeda, yaitu keju *Cottage* dengan fortifikasi lemon 5%, 10%, 15% dan tanpa fortifikasi sebagai kontrol (keju KL_A , KL_B , KL_C dan KK).

Pembuatan keju diawali dengan melarutkan susu skim dengan aquades dan pasteurisasi pada susu pada suhu 63°C selama 10 menit disertai pengadukan. Setelah suhu susu turun sampai 30°C pH susu diukur lalu ditambahkan bakteri *starter* campuran dan diinkubasi pada suhu 30°C sampai pH campuran turun. Langkah selanjutnya yaitu penambahan enzim papain 520 ppm dan campuran diinkubasi lagi pada suhu 30°C sampai pH-nya mencapai 4,6-4,7.

Campuran dipanaskan secara bertahap pada suhu 38-48°C selama 10 menit lalu disaring dan dadih yang diperoleh dibilas dengan aquades sampai *whey* benar-benar terpisah. Dadih kemudian dibagi menjadi 4, masing-masing ditambahkan garam 4% dan lemon sebanyak 5%, 10%, 15% dan 0%. Dadih diaduk sampai semua bahan merata.

3.3.3 Analisis Susu dan Keju *Cottage*

3.3.3.1 Analisis Kadar Air

Metode yang digunakan dalam penentuan kadar air yaitu metode pengeringan atau thermogravimetri. Prinsipnya adalah menguapkan air yang ada dalam bahan dengan jalan pemanasan. Sampel sebanyak 1-2 gram ditempatkan dalam cawan krus yang telah diketahui massanya. Sampel tersebut dipanaskan pada suhu 105°-110°C selama 3 jam. Sampel didinginkan dalam desikator, dan setelah dingin sampel beserta cawan ditimbang. Pemanasan diulang dengan lama 1 jam sampai didapat massa yang konstan. Penentuan kadar air dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Kadar air sampel} = \frac{W_1 - W_2}{W_s} \times 100\%$$

Keterangan : W1 = massa cawan dan sampel sebelum pengeringan (g)

W2 = massa cawan dan sampel setelah pengeringan (g)

Ws = massa sampel (g)

3.3.3.2 Analisis Kadar Protein

Penentuan kadar protein susu bubuk dan keju *Cottage* dilakukan dengan menggunakan metoda Kjeldahl. Analisa protein dengan cara Kjeldahl pada dasarnya dapat dibagi menjadi tiga tahapan yaitu tahap destruksi, tahap destilasi dan tahap titrasi.

a. Tahap Destruksi

Pada tahap ini sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl yang berisi beberapa batu didih. Kemudian ditambahkan 5 gram garam

Kjeldahl yang berupa campuran $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan K_2SO_4 dengan perbandingan massa 1:3 dan ditambahkan pula 10 mL asam sulfat pekat. Campuran dipanaskan sampai cairan dalam labu menjadi jernih.

b. Tahap Destilasi

Pada tahap ini hasil destruksi didestilasi. Larutan contoh diencerkan dengan aquades sampai volum 50 mL secara kuantitatif. Larutan contoh hasil pengenceran dipipet sebanyak 5 mL, dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambah larutan NaOH 30%. Campuran didestilasi, pada labu penampung destilat ditambahkan 10 mL asam borat 3% dan 2 tetes indikator tashiro. Destilasi dilakukan sampai memperoleh 75 mL destilat.

c. Tahap Titrasi

Destilat pada labu penampung selanjutnya dititrasi dengan larutan HCl 0,1N. Akhir titrasi ditandai dengan perubahan warna larutan hijau menjadi ungu. Tahap titrasi dilakukan sebanyak 2-3 kali.

Penentuan kadar N total (protein) dapat dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ Protein} = \frac{50 \times \text{mL HCl} \times \text{N HCl} \times 6,25 \times 14}{5 \times \text{Massa contoh} \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan :

Faktor 50 : larutan contoh yang telah didestruksi diencerkan sampai 50 mL dalam labu takar

Faktor 5 : volum larutan contoh yang didestilasi

mL HCl : volum HCl yang dipakai untuk menitrasi larutan contoh

6,25 : faktor protein untuk sampel umum

14 : BM nitrogen

3.3.3.3 Analisis Kadar Lemak

Metode yang digunakan dalam menentukan kadar lemak dalam susu bubuk dan keju *cottage* yaitu metode Soxhletasi. Sampel sebanyak 5 gram dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 300 mL, kemudian ditambah 45 mL aquades panas disertai pengadukan. Ditambahkan 55 mL HCl 25% pada sampel juga beberapa batu didih. Labu Erlenmeyer ditutup dengan pendingin, kemudian larutan campuran dididihkan secara perahan selama 30 menit. Kondensor dibilas dengan 100 mL aquades. Larutan hasil pemanasan disaring dengan kertas saring bebas lemak yang telah dibasahi. Endapan pada kertas saring dibilas dengan aquades sampai filtrat tidak mengandung Cl lagi dengan mereaksikan filtrat dengan larutan perak nitrat 0,1 M. Kertas saring berisi endapan dimasukkan ke dalam timble dan ditutup dengan glass wool. Endapan dikeringkan pada suhu 100-101°C selama 6-18 jam.

Endapan kering dalam kertas timble dimasukkan ke dalam alat Soxhlet dengan labu penampung dengan massa konstan yang berisi batu didih. Sampel diekstraksi dengan petroleum eter selama 4 jam lalu biarkan diluar selama 5 menit. Setelah ekstraksi selesai, pelarut dievaporasi. Lemak yang diperoleh dikeringkan pada suhu 100°-101°C selama 1 jam, dimasukkan ke dalam eksikator selama 15 menit. Lemak kering ditimbang. Pengeringan lemak dilakukan sampai diperoleh massa yang konstan. Kadar lemak dapat diketahui dengan perhitungan berikut :

$$\text{Kadar lemak} = \frac{\text{Berat lemak}}{\text{Berat contoh}} \times 100\%$$

3.3.3.4 Analisis Kadar Vitamin C

Penentuan kadar vitamin C pada sari buah lemon tanpa pasteurisasi, sari buah lemon pasteurisasi, susu bubuk dan keju *Cottage* dilakukan dengan menggunakan teknik kromatografi cair kinerja tinggi (HPLC). Tahapan dalam penentuan kadar vitamin C terdiri dari pembuatan kurva kalibrasi asam askorbat, tahapan preparasi sampel dan tahapan pengukuran sampel.

Sampel berupa keju dan susu ditimbang sebanyak 0,1 gram, sedangkan untuk sampel sari buah lemon sebanyak kurang lebih 0,02 gram, kemudian masing-masing dilarutkan dengan larutan asam oksalat 0,5% sampai volum 10 mL. Larutan sampel disaring dengan kertas saring, kemudian disaring lagi dengan membran selulosa.

Larutan sampel hasil penyaringan didegassing lalu diambil dengan syringe sebanyak 10 μ L, lalu diinjeksikan pada alat HPLC. Pada analisis kadar vitamin C, digunakan kondisi HPLC sebagai berikut :

- Fasa diam : kolom C-18
- Fasa gerak berupa metanol : asam oksalat 0,5% (27 : 73)
- Panjang gelombang detektor UV : 243 nm.
- Laju alir : 0,75 mL/menit

Data hasil analisis dapat dibaca pada komputer. Luas area sampel akan dibandingkan dengan kurva kalibrasi untuk mengetahui kadar vitamin C nya.