

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian ini dilakukan dari bulan Maret sampai dengan bulan Mei 2015 di Laboratorium Kimia Riset Makanan dan Laboratorium Kimia Instrumen Departemen Pendidikan Kimia Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu berbagai macam alat gelas, neraca analitik, panci, *blender*, saringan, *heater*, inkubator, pompa *vaccum*, corong Buchner, *centrifuge* Kokusan H-103n, botol vial, pH meter Mettler Toledo dan spektrofotometer UV-Vis Mini Shimadzu 1240.

3.2.2 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kacang kedelai dan buah lemon. Bahan lainnya yang akan digunakan pada proses pembuatan yoghurt kedelai adalah susu skim dan starter yoghurt mengandung bakteri *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*. Bahan yang akan digunakan untuk pengujian adalah bubuk Mg, HCl pekat, aquades, kloroform, asam sulfat pekat, KMnO_4 0,1%, CH_3COOH glasial, amilum, padatan KIO_3 , padatan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, padatan KI, padatan I_2 , metanol dan DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*).

3.3 Tahapan Penelitian

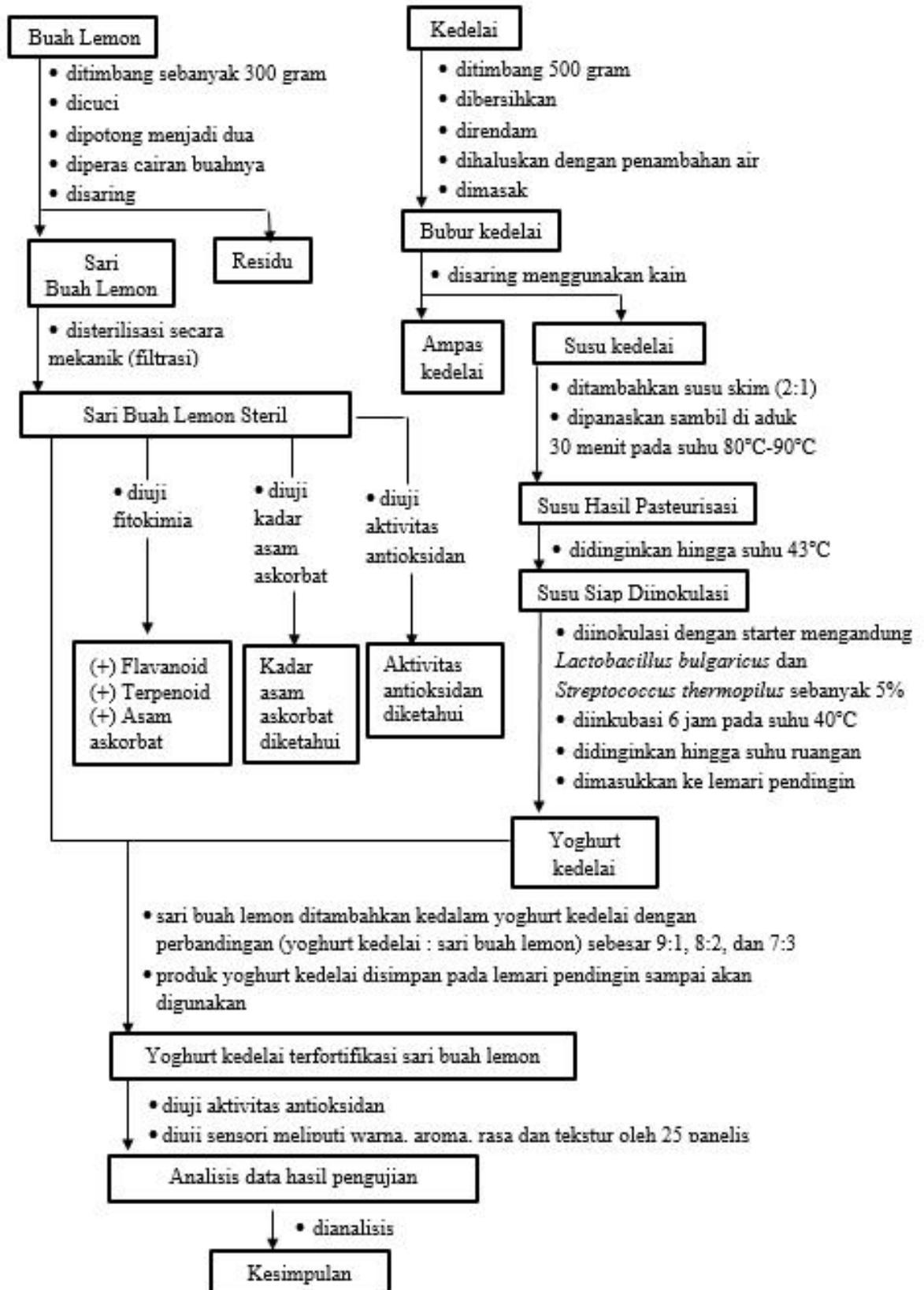
Tahapan penelitian yang akan dilakukan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tahap determinasi tumbuhan lemon
2. Tahap pembuatan sari buah lemon
3. Tahap uji fitokimia dan penentuan kadar asam askorbat
4. Tahap uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH

5. Tahap pembuatan yoghurt kedelai
6. Tahap fortifikasi sari buah lemon ke dalam yoghurt kedelai
7. Tahap uji sensori yoghurt kedelai terfortifikasi sari buah lemon

3.4 Bagan Alir Penelitian

Penelitian yang akan dilakukan meliputi tujuh tahapan, yaitu determinasi tumbuhan lemon, pembuatan sari buah lemon, uji fitokimia dan penentuan kadar asam askorbat, uji aktivitas antioksidan dengan metode DPPH, pembuatan yoghurt kedelai, fortifikasi sari buah lemon ke dalam yoghurt kedelai dan uji sensori yoghurt kedelai terfortifikasi sari buah lemon. Bagan alir penelitian dapat dilihat sebagai berikut:



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Determinasi Tumbuhan

Tumbuhan lemon yang akan diteliti, dideterminasi di Laboratorium Struktur Tumbuhan Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI untuk mengetahui spesies dan *family* tumbuhan yang diteliti.

3.5.2 Pembuatan Sari Buah Lemon

Buah lemon ditimbang terlebih dahulu sebanyak 300 gram kemudian dicuci dan dipotong menjadi dua bagian. Buah lemon diperas cairan buahnya dengan alat pemeras jeruk. Sari buah lemon disaring untuk memisahkan bulir jeruknya. Kemudian dilakukan sterilisasi sari buah lemon untuk menghilangkan bakteri patogen secara mekanik (filtrasi) menggunakan saringan *millipore* dari membran berpori sangat kecil (0,2 μm -0,45 μm), corong Buchner dan vakum.

3.5.3 Uji Fitokimia dan Penentuan Kadar Asam Askorbat

Uji fitokimia dan penentuan kadar asam askorbat dilakukan pada sari buah lemon. Uji fitokimia dilakukan menggunakan metode menurut Sangi (2008), sampel sari buah lemon diidentifikasi komponen fitokimianya dengan metode pereaksi warna yang bertujuan untuk mengetahui senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam sari buah lemon. Uji fitokimia yang dilakukan hanya pada senyawa yang berpotensi sebagai antioksidan seperti isoflavonoid (Flavonoid), limonen (terpenoid), dan asam askorbat. Sedangkan penentuan kadar asam askorbat dilakukan menggunakan metode titrasi iodimetri.

1. Uji Flavanoid

Sebanyak 1 mL sampel sari buah lemon ditambah 0,2 g bubuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Campuran didiamkan dan diamati. Timbulnya warna kuning menunjukkan adanya flavonoid.

2. Uji Terpenoid

Sebanyak 1 mL larutan sampel sari buah lemon ditambah 1 mL asam asetat glasial dan H₂SO₄ pekat. Hasil positif terpenoid adalah warna cokelat kemerahan.

3. Uji Asam Askorbat

Sebanyak 1 mL sampel sari buah lemon ditambah 5 mL aquades dan 10 mL KMnO_4 0,1%. Hasil positif ditunjukkan dengan perubahan warna larutan menjadi cokelat.

4. Penentuan Kadar Asam Askorbat

Sebelum melakukan penentuan kadar asam askorbat, dilakukan pembuatan larutan baku terlebih dahulu. Kemudian dilakukan standarisasi $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dengan KIO_3 dan standarisasi iodium dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Setelah itu ditentukan kadar asam askorbat dengan metode titrasi iodimetri. Larutan KIO_3 0,01 N dibuat dari padatan KIO_3 sebanyak 0,0356 g dalam 100 mL, sedangkan untuk membuat $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,01 N dibuat dari padatan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ sebanyak 0,2482 g dalam 100 mL. Untuk pembuatan larutan iodium 0,01 N, sebanyak 1 g KI dan 0,6345 g I_2 dilarutkan dengan aquades dan dimasukkan dalam labu ukur 500 mL, kemudian campuran ditambahkan aquades hingga tanda batas dan dihomogenkan. Larutan tersebut dimasukkan ke dalam botol kaca berwarna gelap dan didiamkan selama 24 jam agar iodium larut sempurna.

Kadar asam askorbat ditentukan dengan titrasi iodimetri, sebanyak 10 gram sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, kemudian dihomogenkan dan ditandabatkan dengan aquades. Setelah itu, sebanyak 10 mL dari sampel tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, ditambah beberapa tetes indikator amilum, kemudian larutan sampel dititrasi dengan larutan I_2 hingga terbentuk larutan berwarna biru yang stabil. Diamati volume I_2 yang terpakai dalam buret, sehingga kadar asam askorbat dalam sampel dapat dihitung melalui persamaan:

$$\text{Kadar asam askorbat} = V \text{ titer (mL)} \times \text{mg asam askorbat (mg/ml)} \times fp$$

Keterangan:

Vol titer = volume iodium yang terpakai (mL)

Fp = faktor pengenceran

Mg asam askorbat didapat dari 1 mL larutan iodium 0,01 N ekuivalen dengan 0,88 mg asam askorbat

3.5.4 Uji Aktivitas Antioksidan dengan Metode DPPH

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan menggunakan metode menurut (Gracia, 2012) yang dilakukan melalui beberapa tahapan. Pertama yaitu pembuatan larutan DPPH dengan cara melarutkan 4,9 mg DPPH dalam 25 mL metanol. Selanjutnya sari buah lemon dan yoghurt kedelai diuji aktivitas antioksidannya dengan cara pembuatan larutan sampel, blanko, dan kontrol. Pembuatan larutan sampel dilakukan dengan memipet ekstrak sampel sebanyak 0,5 mL ditambahkan 3 mL metanol dan 0,3 mL DPPH 0,5 mM. sebagai blanko dicampurkan 3,3 mL metanol dengan 0,5 mL sampel. Sedangkan untuk kontrol dibuat dengan mencampurkan 3,5 mL metanol dengan 0,3 mL DPPH 0,5 mM. Pembuatan larutan sampel dan kontrol ditempatkan pada botol vial yang telah dilapisi aluminium foil. Setelah pemipetan selesai masing-masing larutan dikocok dan diinkubasi selama 100 menit. Selanjutnya dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan instrumen spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 517 nm.

Aktivitas Antioksidan dihitung menggunakan rumus sebagai berikut,

$$\% \text{ Aktivitas Antioksidan} = 100 - \left[\frac{(\text{Abs sampel} - \text{Abs blanko}) \times 100}{\text{Abs kontrol}} \right]$$

Keterangan :

Abs sampel = absorbansi yang diukur pada larutan sampel

Abs blanko = absorbansi yang diukur pada larutan blanko

Abs kontrol = absorbansi yang diukur pada larutan kontrol

3.5.5 Pembuatan Yoghurt Kedelai

Sebelum pembuatan yoghurt kedelai, terlebih dahulu dilakukan pembuatan susu kedelai. Kacang kedelai ditimbang sebanyak 500 gram kemudian dibersihkan, setelah itu direndam selama semalam. Kedelai selanjutnya dihaluskan dengan ditambahkan air 3,5 liter lalu dimasak dengan suhu 70-90°C. Bubur kedelai tersebut disaring menggunakan kain halus sehingga menghasilkan residu dan filtrat yang berupa susu kedelai.

Sebanyak 1 L susu kedelai ditambahkan susu skim dengan perbandingan (2:1) kemudian dipasteurisasi pada suhu antara 80°C dan 90°C selama 30 menit.

Hasil campuran ini didinginkan sampai 43°C, kemudian diinokulasikan (ditambahkan) starter campuran mengandung *L. bulgaricus* dan *S. thermophilus* yang telah diadaptasi sebanyak 5 persen dari volume susu kedelai dan susu skim (1:1). Lalu diinkubasi pada suhu 40°C selama 6 jam atau pada suhu ruang selama 12 jam kemudian hasilnya berupa yoghurt kedelai dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin hingga akan digunakan.

3.5.6 Fortifikasi Sari Buah Lemon ke dalam Yoghurt Kedelai

Sari buah lemon yang telah diketahui kadar asam askorbat dan aktivitas antioksidannya, difortifikasi ke dalam yoghurt kedelai dengan perbandingan antara yoghurt kedelai dan sari buah lemon sebesar 9:1 (L1); 8:2 (L2); 7:3 (L3). Campuran selanjutnya diaduk hingga merata dan disimpan dalam lemari pendingin sampai akan digunakan. Produk tanpa penambahan sari buah lemon digunakan sebagai yoghurt kedelai kontrol (L0).

3.5.7 Uji sensori Yoghurt Kedelai Terfortifikasi Sari Buah Lemon

Sampel yoghurt yang telah difortifikasi sari buah lemon disajikan dalam wadah yang diberi kode dengan tiga digit angka secara acak untuk L1 (9:1) yaitu 668, L2 (8:2) yaitu 685, dan L3 (7:3) yaitu 831. Sedangkan produk L0 sebagai kontrol diberi kode 449. Kemudian keempat sampel tersebut dianalisis warna, aroma, rasa dan tekstur oleh 25 panelis. Dan hasilnya diuji rating hedonik (kesukaan) pada keempat sampel yoghurt kedelai terfortifikasi sari buah lemon.