

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan pada bulan Maret hingga bulan April 2022 di Laboratorium Kimia Instrumen dan Laboratorium Riset Makanan Jurusan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia.

3.2 Alat

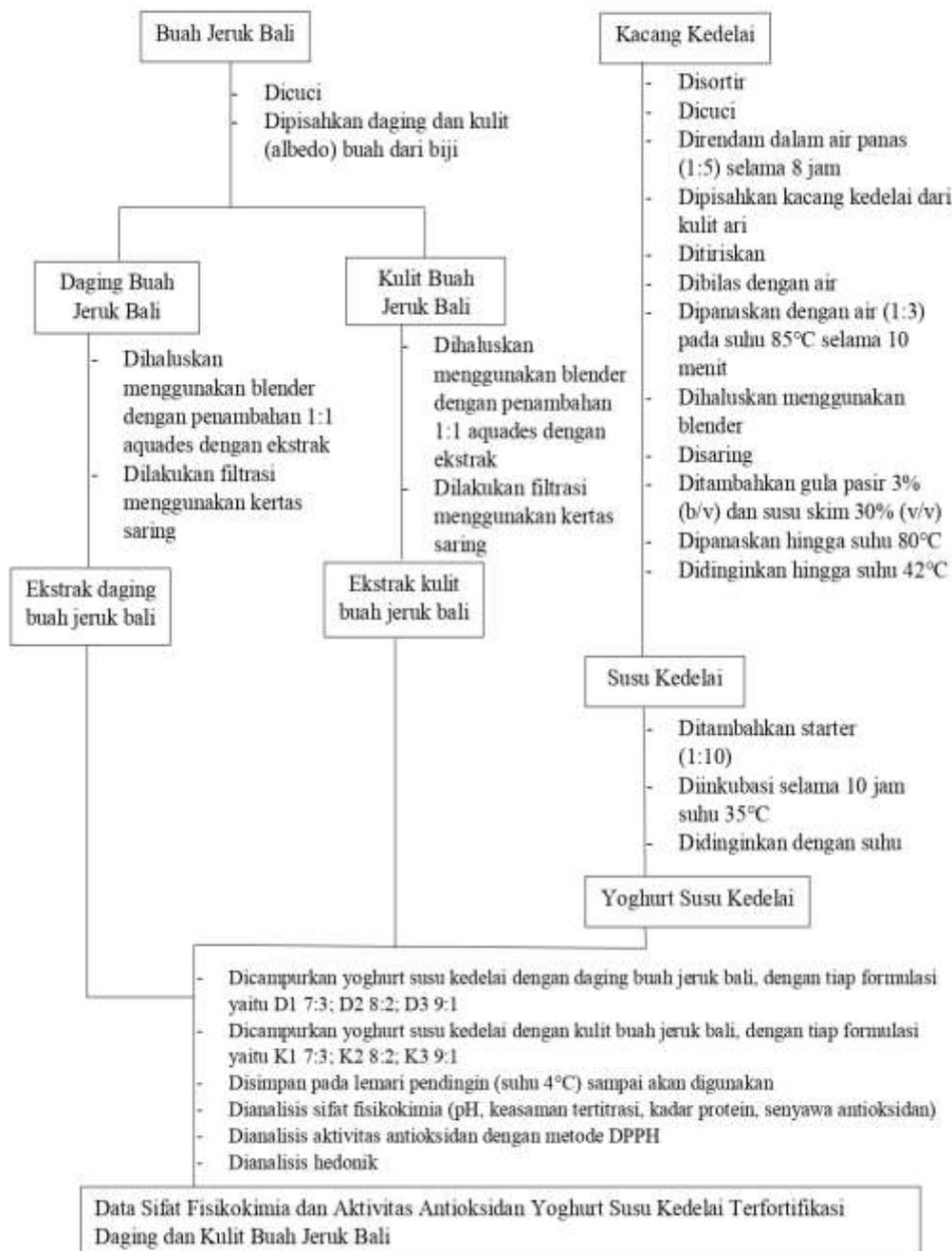
Alat yang digunakan pada penelitian ini berupa alat-alat laboratorium, yaitu labu ukur, blender, pH meter, spektrofotometer UV Vis, sentrifuse, buret, neraca analitik, inkubator, gelas ukur, pipet ukur, dan erlenmeyer.

3.3 Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya yaitu kacang kedelai, susu skim, starter kultur *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus*, gula pasir, buah jeruk bali, logam Mg, HCl, FeCl₃, CuCO₃·5H₂O, Na K Tartarat, NaOH, indikator PP, kasein, dan DPPH (*1,1 diphenyl picryl-hydrazyl*), etanol, dan aquades.

3.4 Penelitian

Penelitian menggunakan beberapa tahapan sesuai bagan alir gambar 3.1, yaitu pembuatan ekstrak daging dan kulit buah jeruk bali, dilanjutkan dengan pembuatan yoghurt susu kedelai dan pencampuran yoghurt susu kedelai dengan ekstrak daging dan kulit buah jeruk bali dengan variasi rasio. Tahap pengujian yaitu analisis fisikokimia meliputi uji pH, keasaman total, kadar protein; analisis fitokimia uji flavonoid dan tanin. Selanjutnya yaitu pengujian aktivitas antioksidan menggunakan metode *1,1 diphenyl picryl-hydrazyl* (DPPH), dan uji organoleptik dengan metode hedonik.



Gambar 3. 1 Bagan Alir

3.4.1 Pembuatan Ekstrak Daging Buah Jeruk Bali

Buah jeruk bali dipilih dengan kualitas yang baik juga segar, lalu dibersihkan dengan air. Alat yang akan digunakan harus dipastikan dalam keadaan steril. Proses sterilisasi alat dapat dilakukan dengan sterilisasi basah selama 15 menit. Bagian yang digunakan untuk pembuatan ekstrak yaitu bagian daging (segmen) buah yang tidak rusak lalu dicuci, dipotong-potong, dan dibuang bijinya. Potongan buah 1 kg ditambahkan 100 mL aquades lalu dihaluskan menggunakan blender selama 5 menit untuk mendapatkan bubur buah hingga berbentuk pasta halus (Amin Gouda and Mervat Hamed, 2020b). Selanjutnya pasta daging buah difiltrasi menggunakan kain tipis. Ekstrak daging buah jeruk bali disimpan di ruang pendingin suhu 4°C sampai akan digunakan (Wibawanti et al., 2019b).

3.4.2 Pembuatan Ekstrak Kulit Buah Jeruk Bali

Buah jeruk bali dipilih dengan kualitas yang baik juga segar, lalu dibersihkan dengan air. Alat yang akan digunakan harus dipastikan dalam keadaan steril, proses sterilisasi alat dapat dilakukan dengan sterilisasi basah selama 15 menit. Bagian yang digunakan untuk pembuatan ekstrak yaitu bagian kulit (albedo) buah yang tidak terlihat rusak, dan selanjutnya potongan kulit buah ditambahkan 100 mL aquades lalu dihaluskan menggunakan blender hingga didapatkan berbentuk pasta halus (Amin Gouda and Mervat Hamed, 2020b). Selanjutnya pasta kulit buah difiltrasi menggunakan kain tipis. Ekstrak kulit buah jeruk bali disimpan di ruang pendingin suhu 4°C sampai akan digunakan (Wibawanti et al., 2019b).

3.4.3 Pembuatan Yoghurt Susu Kedelai

Proses pembuatan soyghurt atau yoghurt susu kedelai, dibagi menjadi dua tahapan utama, yaitu pembuatan susu kacang kedelai dan pembuatan yoghurt susu kedelai, dengan formulasi yoghurt susu kedelai sesuai dengan tabel 3.1. Tahapan pembuatan susu kacang kedelai adalah menyortir kacang kedelai dan mencuci. Kemudian, merendam kacang kedelai dengan air panas (1:5) selama 8 jam, lalu ditiriskan. Selanjutnya memisahkan kacang kedelai dengan kulit ari. Kemudian dibilas dengan air bersih. Kacang kedelai yang sudah dipisahkan dengan kulit ari, dipanaskan dengan air (1:3) pada suhu 85°C selama 10 menit, lalu dihaluskan kacang kedelai menggunakan blender. Setelah terbentuk menjadi bubur, kacang kedelai diambil ekstrak air nya (susu) menggunakan kain tipis. Susu kacang kedelai yang didapatkan,

ditambahkan gula pasir 3% (b/v) dan susu skim 30% (b/v) kemudian dipanaskan kembali dengan suhu 85°C selama 15 menit. Tahapan pembuatan yoghurt susu kedelai yaitu didinginkan hingga suhu 42°C kemudian ditambahkan starter *Streptococcus thermophilus* dan *Lactobacillus bulgaricus* (1:10) kemudian diaduk hingga merata. Inkubasi selama 10 jam pada suhu 40°C. Setelah inkubasi, yoghurt susu kedelai akan terlihat lebih kental, untuk menghentikan pertumbuhan bakteri, dapat diaduk dan disimpan pada lemari pendingin suhu 4°C hingga akan digunakan.

Yoghurt susu kedelai yang dihasilkan diformulasikan dengan variasi ekstrak daging dan kulit buah jeruk bali, juga disiapkan satu yoghurt susu kedelai sebagai kontrol. Yoghurt susu kedelai ditambahkan ekstrak buah jeruk bali dengan formulasi sesuai pada tabel 3.2 untuk formulasi yoghurt susu kedelai dan ekstrak daging buah jeruk bali, lalu pada tabel 3.3 untuk formulasi yoghurt susu kedelai dan ekstrak kulit daging buah jeruk bali. Setelahnya, kualitas yoghurt susu kedelai dianalisis (Zackiyah, et.al., 2014.; Noor Permadi et al., 2013; Nurkhasanah & Amelia, 2020).

Tabel 3. 1 Formulasi Yoghurt Susu Kedelai dan Ekstrak Daging Buah Jeruk Bali

Kode	Yoghurt Susu Kedelai (mL)	Ekstrak Daging Buah Jeruk Bali (mL)
D1 (30%)	70	30
D2 (20%)	80	20
D3 (10%)	90	10

Sumber: (Zackiyah, et.al., 2014)

Tabel 3. 2 Formulasi Yoghurt Susu Kedelai dan Ekstrak Kulit Buah Jeruk Bali

Kode	Yoghurt Susu Kedelai (mL)	Ekstrak Kulit Buah Jeruk Bali (mL)
K1 (30%)	70	30
K2 (20%)	80	20
K3 (10%)	90	10

Sumber: (Zackiyah, et.al., 2014)

3.4.4 Optimasi Susu Kedelai

Optimasi susu kedelai dilakukan untuk menguji kelayakan susu kedelai untuk digunakan lebih lanjut menjadi produk yoghurt. Optimasi susu kedelai dapat dilakukan dengan melakukan uji total padatan dan uji pH setelah produksi susu kedelai. Uji pH susu kedelai dilakukan dengan menggunakan pH meter. Uji total padatan susu kedelai dilakukan dengan menimbang ± 10 g susu kedelai pada botol timbang yang diketahui massa sebelumnya, lalu diuapkan hingga kering dan dilanjutkan pemanasan dengan oven pada suhu 105°C selama 3 jam. Setelah pemanasan 3 jam, didinginkan dalam eksikator dan ditimbang.

Hasil optimasi akan dinilai layak atau tidak sesuai standar nilai pada SNI sesuai dengan tabel 3.3

Tabel 3. 3 Persyaratan Total Padatan dan pH Susu

Kriteria Uji	Satuan	Persyaratan
Total padatan	% b/b	Min. 11,50
pH	-	6,5 – 7,0

Sumber: (Badan Standardisasi Nasional, 2009)

3.4.5 Analisis Fisikokimia

Analisis fisikokimia ditentukan langsung setelah produksi yoghurt. Nilai pH diukur menggunakan pH meter digital pada suhu 20°C . Keasaman total ditentukan dengan titrasi potensiometri dengan NaOH 0,1N sampai pH 4,1 – 4,5. Keasaman yang dapat dititrasi dinyatakan sebagai persentase asam laktat pada 100g yoghurt (Ścibisz et al., 2019).

Uji kadar protein dilakukan dengan menggunakan metode Biuret. Pereaksi biuret dibuat dengan melarutkan 3 gram $\text{CuCO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 9 gram Na K Tartarat dalam 500 ml larutan NaOH 0.2 N. Tambahkan 5 gram KI kemudian diencerkan sampai 1000 ml dengan menggunakan larutan NaOH 0.2 N. Selanjutnya dibuat larutan induk kasein dalam air dengan konsentrasi 5mg/ml. ukur kadar air serum albumin, nyatakan konsentrasi dengan dasar berat kering (agar lebih tepat). Pembuatan kurva standar yaitu dengan memasukkan ke dalam tabung reaksi 0 (blanko), 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 ml

larutan standar. Selanjutnya ditambahkan air sampai volume total masing-masing 4 ml. tambahkan 6ml pereaksi biuret ke dalam masing-masing tabung reaksi. Vortek masing-masing tabung reaksi. Simpan tabung reaksi pada suhu 37°C selama 10 menit atau pada suhu kamar (30°C) selama 30 menit sampai terbentuk warna ungu sempurna. Ukur absorbansi pada Panjang gelombang 520 nm. Pada penetapan sampel, pipet tepat 0,1 s.d 1 ml sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian dipelakukan seperti penetapan standar(Yenrina, 2015).

Uji kualitatif kandungan senyawa antioksidan dilakukan meliputi uji flavonoid, tanin, dan fenolik. Pada uji flavonoid, pengujian dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 5 mL sampel, kemudian dipanaskan kurang lebih 5 menit. Setelah dipanaskan masing-masing ditambahkan dengan 0,1 gram logam Mg dan 1:1 HCl:etanol, 5 tetes. Jika masing-masing larutan terbentuk warna kuning jingga sampai merah, maka positif mengandung flavonoid. Uji tanin dilakukan dengan cara mengambil masing-masing sebanyak 5 ml sampel ditetesi FeCl₃ 1%. Adanya tanin ditandai dengan munculnya warna biru kehitaman atau hijau kecoklatan (Muhammad Nur Fauzi, 2021; Yuningtyas et al., 2021).

3.4.6 Analisis Aktivitas Antioksidan Metode DPPH

Sebanyak 1mL sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 25 mL dan ditambahkan metanol sampai tanda batas. Sebanyak 4 mL sampel tersebut kemudian dipindahkan ke dalam botol vial berwarna gelap, lalu ditambahkan 2mL larutan DPPH 20 ppm kemudian botol tersebut ditutup rapat dan campuran diinkubasi pada suhu ruang selama 30 menit. Campuran yang telah diinkubasi selanjutnya dimasukan ke dalam kuvet untuk pengujian nilai absorbansinya pada Panjang gelombang maksimal 516nm. Perlakuan yang sama dilakukan untuk menguji blanko (larutan DPPH tanpa sampel). (Zackiyah, et.al., 2014)

Aktivitas antioksidan dapat ditentukan dengan persamaan (1).

$$\%AA = \frac{Abs\ DPPH\ kontrol - Abs\ DPPH\ sisa}{Abs\ DPPH\ kontrol} \times 100\% \quad (1)$$

Keterangan:

% AA	: Persen aktivitas antioksidan
Abs DPPH kontrol	: absorbansi DPPH tanpa penambahan sampel
Abs DPPH sisa	: absorbansi DPPH setelah penambahan sampel

3.4.7 Uji Hedonik

Uji hedonik dilakukan oleh 25 panelis yang terdiri dari masyarakat Bandung. Uji ini dilakukan dengan penilaian sifat fisik yoghurt susu kedelai terfortifikasi seperti warna, rasa, dan aroma sebagai keberterimaan produk pada konsumen. Syarat panelis yang mengikuti uji hedonik yaitu dalam keadaan sehat dan tidak dalam keadaan lapar. Adapun tahapan yang dilakukan dalam uji hedonik yaitu:

- Meminta dan mengumpulkan panelis sebanyak 25 orang.
- Membagikan formulir kepada panelis, peneliti menjelaskan cara pengisian formulir penilaian produk.
- Peneliti meminta panelis untuk mencoba yoghurt susu kedelai terfortifikasi dan memberikan penilaiannya.
- Setelah dicoba, panelis mengisi formulir yang sudah diberikan.

Uji hedonik sendiri dilakukan untuk mengetahui keberterimaan produk pada konsumen, sehingga uji hedonik terdiri dari uji rasa, warna, dan aroma.

➤ Uji Warna

Sampel yoghurt diambil secukupnya, kemudian diletakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering. Dilihat sampel yoghurt beberapa saat, kemudian memberi skor pada masing-masing perlakuan oleh 25 panelis.

➤ Uji Bau

Sampel yoghurt diambil sebanyak 1 sendok teh dan diletakkan di atas gelas arloji yang bersih dan kering. Sampel yoghurt dicium pada jarak kira-kira 3 cm dari hidung untuk mengetahui baunya oleh 25 panelis.

➤ Uji Rasa

Sampel yoghurt diambil kira-kira 1 sendok teh dan dirasakan dengan lidah. Dilakukan pengerjaan oleh 25 panelis (Aznury et al., 2019.).