

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan mulai pada bulan Februari 2016 sampai dengan bulan Agustus 2016. Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Teknobiopangan, Laboratorium Teknobiologi-Industri, dan Laboratorium Produksi Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan antara lain wadah plastik, gelas plastik, plastik, panci, sendok, pisau, erlenmeyer, gelas beker, corong, labu ukur, pipet ukur, propipet, pipet tetes, gelas ukur, mikropipet, mikrotip, termometer, jarum ose, *stopwatch*, buret, statif, labu kjedhal, labu ekstraksi, gelas pengaduk, pinggan aluminium, kuvet, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas benda, jarum enten, cawan petri, kompor *Electrolux*, blender *Rinnai Grande RI 71-2A*, pH meter, *colour reader*, alat destilasi, eksikator, inkubator *Memmer*, *Laminar Air Flow (LAF) SV 1200 SG Omega*, timbangan analitik *Phoenix Instrument*, lemari asam, *waterbath Memmert*, *magnetic stirrer*, spektrofotometer *Thermo Scientific*, refrigerator *SHARP*, *microwave Electrolux*, *autoclave*, *handcounter*, sentrifugasi, *moisture balancing*, *vortex Phoenix Instrument*, bunsen, kain saring, kertas saring, saringan, kertas payung, karet, kapas, korek api, masker, dan *glove*.

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini antara lain kacang tunggak lokal yang berasal dari Pasar Bringharjo, buah markisa kuning yang diperoleh dari Desa Wisata Karang Tengah Imogiri, dan isolat bakteri *L. acidophilus* dan *S. thermophilus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU Pangan dan Gizi, Universitas Gadjah Mada. Bahan lain yang digunakan antara lain, susu skim *Lactona Skim*, gula pasir *Gulaku*, aquades, air bersih, celite, pengental CMC, larutan alkohol 96 %, etanol 96 %, larutan nigrosin (tinta cina), larutan *crystal violet*, larutan *iodin mordant*, larutan safranin, larutan hidrogen peroksida (H_2O_2), label, spidol marker, tisu, larutan petroleum eter, larutan dietil eter, larutan DPPH (*1,1-Diphenil-2-Picrylhydrazyl*), larutan aseton, indikator *phenolphthalin*, indikator metil red, larutan asam borat 3 %, larutan Na_2CO_3 7 %, larutan Folin-Ciocalteu, larutan $CaCO_3$, larutan NH_3 pekat, larutan HCl 0,1 N, larutan H_2SO_4 , larutan $K_2S_2O_8$, larutan $CaSO_4$, larutan NaOH 50 %, larutan asam galat, medium MRS (*deMan Rogosa and Sharpe*) agar, medium MRS *broth*, medium LB (*Lactose Broth*), medium SCB (*Selenite Cysteine Broth*), dan medium SSA (*Salmonella-Shigella Agar*).

C. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang menggunakan kombinasi konsentrasi sari kacang tunggak dan sari buah markisa kuning sebesar 95 : 5 %, 90 : 10 %, 85 : 15 %, dan 80 : 20 % dalam pembuatan *yoghurt* dengan tiga kali ulangan.

Kontrol yang digunakan adalah *yoghurt* berbahan baku susu dan *yoghurt* berbahan baku sari kacang tunggak. Rancangan percobaan yang digunakan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rancangan Percobaan *Yoghurt* dari Kombinasi Sari Kacang Tunggak dan Buah Markisa Kuning

Ulangan	Sari Kacang Tunggak : Buah Markisa (%)				Kontrol	
	95 : 5 (A)	90 : 10 (B)	85 : 15 (C)	80 : 20 (D)	Susu (E)	Kacang Tunggak (F)
I	B ₁	C ₁	D ₁	E ₁	F ₁	A ₁
II	B ₂	C ₂	D ₂	E ₂	F ₂	A ₂
III	B ₃	C ₃	D ₃	E ₃	F ₃	A ₃

Keterangan:

A, B, C, D = Variasi Perlakuan

F = *Yoghurt* Kacang (kontrol)

E = *Yoghurt* Susu (Kontrol)

1, 2, 3 = Pengulangan

D. Cara Kerja

1. Pembuatan Sari Kacang Tunggak (Santoso, 1994 dengan Modifikasi)

Pembuatan sari kacang tunggak mengikuti pembuatan sari kacang kedelai pada umumnya. Mula-mula biji kacang tunggak disortasi yang tidak rusak dan bebas kotoran selanjutnya dilakukan perendaman kacang tunggak selama 8 – 10 jam. Setelah dilakukan perendaman dilanjutkan dengan pencucian biji kacang tunggak menggunakan air bersih.

Biji kacang tunggak yang telah bersih kemudian direbus sekitar 30 menit pada suhu ± 70 °C. Biji dihancurkan dengan menggunakan blender sambil sedikit demi sedikit ditambahkan air panas dengan perbandingan volume 1 : 8. Setelah itu, bubur kacang tunggak disaring dengan menggunakan kain saring, filtrat yang diperoleh inilah yang disebut sari kacang tunggak.

2. Uji Kimiawi Sari Kacang Tunggak

a. Pengujian Kadar Protein dengan Metode Semi-Mikro Kjeldhal (Sudarmadji dkk., 1997)

Sampel diambil sebanyak 10 ml dan dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, kemudian diencerkan dengan aquades sampai dengan tanda batas. Sebanyak 10 mL larutan dari labu ukur dimasukkan ke dalam labu kjeldhal, lalu ditambahkan 10 mL larutan H₂SO₄. Selanjutnya larutan ditambahkan dengan 5 g campuran Na₂SO₄-HgO (20 : 1) untuk katalisator.

Larutan kemudian dididihkan sampai jernih, kemudian dilanjutkan pendidihan selama 30 menit. Setelah dingin, dinding dalam pada labu Kjeldhal dicuci dengan aquades dan dididihkan lagi selama 30 menit. Setelah dingin, campuran ditambahkan dengan 140 mL aquades, 35 mL NaOH-Na₂S₂O₃ dan beberapa butiran zink. Selanjutnya dilakukan distilasi dan disilat ditampung sebanyak 100 mL dalam erlenmeyer yang berisi 25 mL larutan jenuh asam borat dan beberapa tetes indikator metilen merah atau biru. Perhitungan N total dilakukan dengan rumus sebagai berikut,

$$\text{Jumlah N total} = \frac{(\text{mL HCl} - \text{N HCl})}{\text{mL larutan sampel}} \times 14,008 \times f \text{ mg/mL}$$

Keterangan:

f = faktor pengenceran yaitu 10

b. Pengujian Kadar Lemak (Sudarmadji dkk., 1983 dalam Oktaviani, 2014 dengan Modifikasi)

Sampel diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Selanjutnya ditambahkan 1,25 mL larutan NH_3 pekat dan dipanaskan menggunakan *waterbath* dengan suhu 70°C selama 15 menit sambil diaduk beberapa kali, lalu didinginkan. Setelah dingin, ditambahkan 10 mL larutan alkohol 96 % dan 25 mL larutan dietil eter. Larutan dipindahkan ke corong pemisah lalu dikocok dengan kencang selama 1 menit. Setelah itu, ditambahkan larutan 25 mL petroleum eter dan dikocok kembali selama kurang lebih 1,5 menit. Pada tahap ini disebut tahap ekstraksi pertama.

Hasil ekstraksi pertama (lapisan eter yang berada di atas) dipindahkan ke cawan porselen yang telah ditimbang untuk diuapkan menggunakan *waterbath*. Sisa larutan ekstraksi pertama (lapisan bawah) diekstraksi kembali dengan cara dimasukkan kembali ke corong pemisah dan ditambahkan beberapa larutan yaitu 5 mL alkohol 96 % dan 15 mL larutan dietil eter, kemudian dikocok kencang selama 1 menit. Larutan ditambahkan larutan petroleum eter sebanyak 15 mL, dan dikocok dengan kencang selama 1,5 menit. Pada tahap ini disebut tahap ekstraksi kedua.

Hasil ekstraksi kedua berupa lapisan eter (atas) digabungkan dengan hasil ekstraksi pertama, lalu diuapkan menggunakan *waterbath* dengan suhu 100°C sampai pelarut menguap habis. Setelah itu, dipanaskan menggunakan oven dengan suhu 100°C selama 30 menit.

Selanjutnya dipindahkan ke dalam eksikator selama 10 menit dan berat akhir cawan dan minyak ditimbang. Kadar lemak dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Kadar Lemak (\%)} = \frac{(\text{Berat cawan akhir} - \text{Berat cawan kosong})}{\text{Berat sampel}} 100 \%$$

c. Pengujian Kadar Serat Pangan Larut Air (Badan Standarisasi Nasional, 1992 dengan Modifikasi)

Kertas saring yang digunakan terlebih dahulu dikeringkan menggunakan oven pada suhu 105 – 110 °C selama kurang lebih 1 jam dan dimasukkan ke dalam eksikator selama kurang lebih 10 menit. Sampel diambil sebanyak 2 mL, lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan larutan H₂SO₄ 1,25 % sebanyak 200 mL. Selanjutnya campuran dipanaskan sampai mendidih dan dididihkan selama 30 menit. Setelah itu, campuran tersebut disaring menggunakan kertas saring. Residu yang tersaring dibilas secukupnya dengan air panas sebanyak 200 mL, lalu dicuci dengan larutan NaOH 3,25 % sebanyak 200 mL. Hasil pencucian ditampung dalam erlenmeyer.

Setelah itu, hasil pencucian dipanaskan sampai mendidih dan dididihkan selama 30 menit. Selanjutnya, hasil pencucian disaring lagi menggunakan kertas saring. Residu yang tersaring dibilas dengan air panas sebanyak 200 mL. Selanjutnya filtrat tersebut ditambahkan 400 mL larutan etanol 95 % hangat (60 °C) dan dibiarkan presipitasi selama 1 jam (waktu dapat diperpendek atau diperpanjang), lalu disaring menggunakan kertas saring yang sudah dioven dan ditimbang

beratnya (A). Celite sebanyak 0,5 g ditambahkan ke dalam kertas saring dan dicuci dengan larutan etanol 78 % 2 x 1 mL, larutan etanol 95 % 2 x 10 mL, dan larutan aseton 2 x 10 mL. Selanjutnya, dikeringkan menggunakan oven sampai berat konstan dan dimasukkan ke dalam eksikator kurang lebih 10 menit, lalu beratnya ditimbang (B). Kadar serat larut dihitung menggunakan rumus dibawah ini.

$$\text{Kadar Serat Larut Air} = \frac{B - A - \text{berat celite}}{\text{Berat sampel}} \times 100 \%$$

d. Pengujian Kadar Abu (Askar dan Sugiarto, 2005 dengan modifikasi)

Sampel sebanyak 5 mL dipipet dan dimasukkan ke dalam cawan porselen yang diketahui bobot kosongnya (a) kemudian dimasukkan ke dalam oven dan dikeringkan pada suhu 105 °C selama 24 jam. Setelah itu, cawan yang berisi sampel kering tersebut dimasukkan ke dalam tanur pada suhu 550 °C selama 6 jam. Selanjutnya cawan didinginkan menggunakan desikator dan ditimbang (c). Kadar abu dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\text{Kadar Abu (\%)} = \frac{c - a}{b - a} 100 \%$$

Keterangan:

a = Berat cawan kosong

b = Berat sampel dan cawan

c = Berat cawan dan abu

3. Pembuatan Sari Buah Markisa Kuning (Silalahi dkk, 2014 dengan Modifikasi)

Buah disortasi yang telah masak optimal lalu dicuci dengan air bersih. Buah dibelah dua dan bagian dalam isi markisa diambil.

Selanjutnya, bulir buah dipisahkan dengan bijinya dengan menggunakan penyaring. Sari yang diperoleh ini yang akan digunakan untuk kombinasi dalam pembuatan *yoghurt* kacang tunggak.

4. Uji Kimiawi Sari Buah Markisa Kuning

a. Penentuan pH Sari Buah Markisa Kuning menggunakan pH meter (Masykur dan Kusnadi, 2015 dengan Modifikasi)

pH meter terlebih dahulu dikalibrasi dengan menggunakan larutan Buffer pH 7 dan pH 4. Setelah dilakukan kalibrasi, pH meter dapat digunakan. Sampel dimasukkan ke dalam gelas beker kemudian dilakukan pengukuran pH dan dicatat hasilnya. Setiap kali akan mengukur pH sampel yang lain, probe dibersihkan terlebih dahulu dengan aquades dan dikeringkan menggunakan tisu.

b. Pengujian Total Fenolik Sari Buah Markisa Kuning dengan Metode Folin-Ciocalteu

1. Pembuatan Kurva Standar Asam Galat (Lee dkk., 2003 dalam Alfonsius, 2015 dengan modifikasi)

Asam galat sebanyak 0,05 g ditimbang secara analitis dalam kertas timbang lalu dimasukkan ke dalam labu ukur. Larutan Etanol 96 % sebanyak 0,2 mL ditambahkan ke labu ukur. Aquades ditambahkan ke dalam labu ukur hingga volumenya mencapai 100 mL (didapatkan larutan asam galat 250 ppm). Larutan dikocok atau dihomogenisasi menggunakan *vortex*. Larutan standar asam galat dengan berbagai konsentrasi 1; 5; 10; 15; 20 ppm dibuat dengan mengambil masing-masing larutan induk asam galat

sebanyak 0,04 ; 0,2 ; 0,4 ; 0,6 ; 0,8 mL ke dalam gelas ukur. Aquades ditambahkan ke gelas ukur hingga volumenya mencapai 10 mL.

Larutan asam galat masing-masing konsentrasi sebanyak 0,4 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi bertutup. Reagen Folin-Ciocalteu sebanyak 0,4 mL ditambahkan ke larutan. Larutan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Setelah 5 menit, 4 mL larutan Na_2CO_3 7 % (b/v) ditambahkan ke campuran. Selanjutnya, larutan dihomogenkan menggunakan *vortex*. Larutan diinkubasi selama 60 menit pada ruang gelap dan dengan suhu ruang. Masing-masing konsentrasi diukur absorbansinya pada spektrofotometer 750 nm untuk menentukan kurva standar asam galat.

2. Pengukuran Kandungan Total Fenolik (Dungir dkk., 2012; Lee dkk., 2003 dengan modifikasi)

Sampel sebanyak 0,4 g dilarutkan dengan metanol 96 % sebanyak 10 mL. Selanjutnya campuran diambil sebanyak 0,4 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambah 0,4 mL reagen Folin-Ciocalteu. Larutan dihomogenkan menggunakan *vortex* selama 3 menit. Larutan Na_2CO_3 7 % sebanyak 4 mL ditambahkan ke dalam campuran. Aquades ditambahkan hingga volumenya mencapai 10 mL.

Selanjutnya, larutan disimpan dalam ruangan gelap selama 60 menit pada suhu ruang. Absorbansinya dibaca pada panjang

gelombang 750 nm dengan spektrofotometer UV-VIS. Larutan blanko yang digunakan adalah etanol 96 %. Hasilnya diplotkan terhadap kurva standar asam galat yang dipersiapkan menggunakan asam galat. Kandungan total fenol dinyatakan sebagai mg GAE/L ekstrak. Kandungan total fenolik dihitung menggunakan rumus:

$$Y = ax + b$$

Keterangan:

Y = Variabel terikat

X = Variabel bebas

a = Intersep

b = Koefisien regresi

c. Pengujian Aktivitas Antioksidan Sari Buah Markisa Kuning dengan Metode DPPH ($\alpha, \alpha, \text{diphenyl picryl hidrazil}$) (Sasaki dkk., 2007 dalam Alfonsius, 2015 dengan Modifikasi)

1. Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

Serbuk DPPH sebanyak 7,88 mg (0,00788 g) dilarutkan dalam 100 mL metanol 96 %, kemudian disimpan dalam ruang gelap 30 menit.

2. Pembuatan Blanko

Larutan DPPH 0,2 mM diambil sebanyak 1 mL lalu ditambahkan 4 mL larutan metanol 96 %, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm.

3. Pengukuran Serapan Sampel

Sampel diambil sebanyak 0,5 mL dan diencerkan dengan larutan metanol 96 % hingga 5 mL. Setelah itu, campuran diambil sebanyak 4 mL dan ditambahkan dengan larutan DPPH 0,2 mM

sebanyak 1 mL. Campuran diinkubasi dalam keadaan gelap selama 2 jam. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Persen inhibisi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut.

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{Abs } t_0 - \text{Abs } t}{\text{Abs } t_0} 100 \%$$

Keterangan:

Abs t_0 = absorbansi DPPH pada waktu ke-nol

Abs t = absorbansi DPPH pada t menit

5. Uji Kemurnian Bakteri *Lactobacillus acidophilus* dan *Streptococcus thermophilus*

a. Pengamatan Morfologi Sel (Cappucinno dan Sherman, 2011 dalam Khudry, 2014 dengan Modifikasi)

Gelas benda dibersihkan secara aseptis menggunakan alkohol. Larutan nigrosin (tinta cina) ditetaskan pada ujung gelas benda kemudian diambil satu ose biakan mikrobia dan dicampurkan pada larutan nigrosin. Gelas benda yang lain digunakan untuk meratakan larutan nigrosin yang sudah dicampur dengan biakan mikrobia dengan cara menarik larutan menggunakan ujung gelas benda ke bagian lain dari gelas benda hingga terbentuk lapisan. Setelah itu, ditunggu hingga mengering dan diamati di bawah mikroskop perbesaran 100 – 400 kali.

b. Pengecatan Gram Bakteri (Cappucinno dan Sherman, 2011 dalam Khudry, 2014 dengan modifikasi)

Gelas benda dibersihkan secara aseptis menggunakan alkohol. Aquades ditetaskan sebanyak satu tetes di atas gelas benda. Satu ose biakan mikrobia diambil dan dicampur tetesan aquades yang ada di gelas benda, kemudian difiksasi menggunakan pengering udara atau

pemanasan dengan api. Biakan yang telah difiksasi ditetaskan secara hati-hati dengan larutan *crystal violet* (Gram A) dan dibiarkan selama satu menit. Setelah selesai dibersihkan dengan aquades, kemudian ditetaskan larutan *iodin mordant* (Gram B) dan dibiarkan selama satu menit, kemudian dibersihkan dengan aquades. Alkohol 96 % (Gram C) dialirkan tetes demi tetes untuk menghilangkan pewarnaan (*decolorize*) sampai menunjukkan noda biru, kemudian dibersihkan dengan aquades. Dilakukan pewarnaan kembali dengan larutan safranin (Gram D) selama 45 detik, kemudian dibersihkan dengan aquades dan dikeringkan dengan kertas saring. Hasil pewarnaan diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 100 – 400 kali.

c. Pengujian Motilitas Bakteri (Cappucinno dan Shermen, 2011 dalam Khudry, 2014; Yulvizar, 2013 dengan Modifikasi)

Biakan mikrobial diambil menggunakan jarum steril dan diinokulasikan dengan cara ditusukkan pada medium agar padat (*Nutrient Agar*) pada tabung reaksi, kemudian diinkubasi selama 24 hingga 72 jam pada suhu 37 °C. Setelah 24 atau 72 jam dilakukan pengamatan dengan melihat pola pertumbuhan dan penyebaran mikrobial pada agar padat. Menurut Sudarsono (2008) dalam Yulvizar (2013), uji positif ditandai dengan pertumbuhan bakteri yang menyebar, maka bakteri tersebut bergerak (*motil*) dan bila pertumbuhan bakteri tidak menyebar hanya berupa satu garis, maka bakteri tersebut tidak bergerak (*non motil*).

d. Pengujian Katalase Bakteri (Cappucinno dan Shermen, 2011 dalam Khudry, 2014)

Gelas benda dibersihkan secara aseptis menggunakan alkohol. Satu ose biakan mikrobial diambil dari koloni biakan dan dipindahkan pada gelas benda yang sudah dibersihkan. Biakan diteteskan larutan hidrogen peroksida (H_2O_2) kemudian diamati adanya gelembung udara atau tidak. Hasil positif menunjukkan adanya gelembung udara sedangkan hasil negatif tidak menunjukkan adanya gelembung udara.

6. Pembuatan Stater Yoghurt *Lactobacillus acidophilus* dan *Streptococcus thermophilus* (Ouwehand dkk., 2001 dalam Stella, 2014 dengan modifikasi)

Biakan murni *L. acidophilus* dibiakkan ke dalam medium *deMan Rogosa Sharpe* (MRS) *broth* yang telah disterilisasi. Sengkelit biakan murni *L. acidophilus* dimasukkan ke dalam MRS *broth*, lalu diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Kultur yang telah diperbanyak kemudian digunakan untuk persiapan *stater*. Tahapan ini dilakukan pula pada biakan murni *S. thermophilus*.

Selanjutnya sari kacang tunggak sebanyak 90 % (v/v) dipasteurisasi pada suhu 80 – 90 °C selama 10 menit yang sebelumnya telah ditambahkan gula 5 %, susu skim 10 %, dan pengental CMC 0,25 % (b/v). Campuran ditunggu hingga dingin lalu biakan *L. acidophilus* dan *S. thermophilus* sebanyak 10 % (v/v) diinokulasikan ke dalam campuran. Setelah itu, campuran diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam sehingga terbentuk *curd*. Stater siap untuk diinokulasikan ke dalam kombinasi perlakuan dan kontrol yang akan difermentasi.

7. Pembuatan *Yoghurt* dari Sari Kacang Tunggak dan Buah Markisa Kuning (Herawati dan Wibawa, 2007; Rum, 2010; Tamaroh dan Slamet, 2011; Lullung dkk., 2012 dengan modifikasi)

Sari kacang tunggak diambil sesuai dengan perlakuan (100, 95, 90, 85, dan 80 %) (v/v) lalu ditambah gula pasir 5 %, susu skim bubuk 10 %, dan pengental CMC 0,25 % dari bahan baku (b/v). Bahan tadi dipanaskan menggunakan *magnetic stirrer* dengan suhu 80 – 90 °C selama 10 menit kemudian didinginkan. Setelah dingin, stater bakteri diinokulasi sebanyak 10 % dari volume bahan baku (v/v) dan diaduk merata. Selanjutnya bahan diinkubasi dengan suhu 37 °C selama 3 jam. Bahan yang telah diinkubasi selama 3 jam kemudian ditambahkan sari buah markisa dengan konsentrasi 5, 10, 15, dan 20 % (v/v). Adapun untuk *yoghurt* 100 % kacang tunggak tidak ditambahkan sari buah markisa. Semua bahan kemudian diinkubasi kembali pada suhu 37 °C selama 3 jam. Setelah itu, *yoghurt* disimpan di refrigerator.

Pada pembuatan *yoghurt* 100 % susu diacuh dari Chotimah (2009) dengan modifikasi, yaitu susu *full cream* 90 %, gula 5 %, susu skim bubuk 10 %, dan pengental CMC 0,25 % dipanaskan dengan suhu 80 – 90 °C selama 10 menit. Setelah dipanaskan, susu didinginkan hingga mencapai suhu 37 – 40 °C lalu diinokulasikan stater sebanyak 10 %. Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 6 jam. Setelah diinkubasi *yoghurt* disimpan di refrigerator.

8. Pengujian Kualitas *Yoghurt*

a. Pengujian Mikrobiologi

a.1. Pengujian Viabilitas BAL *Yoghurt* (Jutono dkk., 1980 dalam Stella, 2014)

Dalam pengujian viabilitas BAL, bahan yang akan diukur total BAL harus diencerkan terlebih dahulu hingga diperoleh pengenceran 10^{-8} . Pengenceran dilakukan dengan cara *yoghurt* diambil 1 mL dan dimasukkan ke dalam aquades steril sebanyak 9 mL (pengenceran 10^{-1}) lalu *divortex*. Selanjutnya, larutan dari pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam aquades steril sebanyak 9 mL (pengenceran 10^{-2}) lalu *divortex*. Setelah itu, pengenceran 10^{-2} diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam aquades steril sebanyak 9 mL (pengenceran 10^{-3}) lalu *divortex*. Pengenceran dilakukan hingga diperoleh pengenceran 10^{-8} dengan cara yang sama dengan pengenceran sebelumnya.

Yoghurt yang telah diencerkan hingga pengenceran 10^{-8} diambil masing-masing sebanyak 1 mL hogenat pada tingkat pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} , dan 10^{-8} dan diinokulasikan ke dalam medium MRS agar yang telah ditambahkan CaCO_3 dengan metode *pour plate* lalu cawan diputar membentuk angka 8. Selanjutnya agar diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Viabilitas BAL dihitung dengan cara menghitung total BAL hidup pada medium MRS dikalikan faktor pengenceran yang digunakan. Jumlah koloni yang

memenuhi persyaratan untuk dihitung yaitu mempunyai jumlah antara 30 – 300 koloni per cawan.

a.2. Pengujian *Salmonella* spp. (Fardiaz dan Margiono, 1993 dalam Stella, 2014)

Yoghurt diambil sebanyak 1 mL lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang telah berisi medium *Lactosa Broth* (LB). Selanjutnya suspensi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Suspensi dari LB diambil sebanyak 1 mL lalu diinokulasikan ke dalam medium *Selenite Cysteine Broth* (SCB) sebanyak 9 mL. Setelah itu, suspensi diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam.

Pada tahap isolasi, suspensi pada medium SCB diambil sengkeli dengan menggunakan ose steril kemudian digoreskan pada lempengan medium *Salmonella-Shigella Agar* (SSA). Selanjutnya diinkubasi pada suhu 37 °C selama 48 jam. Adapun ciri bakteri *Salmonella* sp. pada medium SSA adalah koloni transparan dengan bagian tengah berwarna hitam.

b. Pengujian Fisik

b.1. Pengujian Warna dengan Kromatometer (deMan, 1997 dalam Alfonsius, 2015)

Sampel ditempatkan ke dalam plastik kemudian ujung alat *colour reader* ditempelkan pada plastik sehingga muncul angka pada *display colour reader*. Pengukuran warna pada sampel menggunakan sistem L, a, b, dan pengukuran dilakukan dengan pengulangan sebanyak 3 kali. Hasil berupa L, a, dan b dimasukkan ke dalam

rumus untuk mencari nilai x dan y, lalu dibandingkan pada diagram kromatisasi CIE untuk memperoleh warna produk. Adapun rumus X dan Y sebagai berikut:

$$X = \frac{a + (1,750 \times L)}{(5,645 \times L) + a - (3,012 \times b)} \quad Y = \frac{1,7860 \times L}{(5,645 \times L) + a - (3,012 \times b)}$$

c. Pengujian Kimiawi

c.1. Pengujian Kadar Abu (Askar dan Sugiarto, 2005 dengan modifikasi)

Tahapan pengujian kadar abu *yoghurt* sama dengan pengujian kadar abu sari kacang tunggak (halaman 34).

c.2. Pengujian Kadar Lemak (Sudarmadji, 1983 dalam Oktaviani, 2014)

Tahapan pengujian kadar lemak *yoghurt* sama dengan pengujian kadar lemak sari kacang tunggak (halaman 32).

c.3. Pengujian Serat Pangan Larut Air (Badan Standarisasi Nasional, 1992 dengan modifikasi)

Tahapan pengujian serat pangan *yoghurt* sama dengan pengujian kadar serat pangan sari kacang tunggak (halaman 33).

c.4. Penentuan pH *Yoghurt* dengan menggunakan pH meter (Masykur dan Kusnadi, 2015)

Tahapan penentuan pH *yoghurt* sama seperti penentuan pH sari buah markisa kuning (halaman 35).

c.5. Uji Total Asam Laktat (Badan Standarisasi Nasional, 2009 dengan modifikasi)

Sampel diambil sebanyak 10 mL lalu dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditetaskan larutan indikator *phenopthalin* 1 %

sebanyak 2 – 3 tetes. Larutan dititrasi dengan larutan NaOH 0,1N hingga terjadi perubahan warna menjadi merah muda. Total asam dapat diperoleh dengan perhitungan sebagai berikut.

$$\text{Total Asam 100\%} = \frac{V \times N \times 90}{\text{Berat Sampel}} \times 100 \%$$

Keterangan:

V = Volume titran

N = Normalitas larutan NaOH

P = Banyak *phenophthalin*

c.6. Pengujian Kadar Protein dengan Metode Semi-Mikro Kjeldhal (Sudarmadji dkk., 1997)

Tahapan pengujian kadar protein *yoghurt* sama dengan pengujian kadar protein sari kacang tunggak (halaman 31).

c.7. Pengujian Total Padatan (Askar dan Sugiarto, 2005)

Penetapan total padatan merupakan hasil perhitungan dari kadar air. Adapun pengukuran kadar air menggunakan alat *moisture balancing* kemudian dilakukan perhitungan total padatan dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Total Padatan (\%)} = 100 \% - \text{Kadar Air}$$

c.8. Pembuatan Ekstrak *Yoghurt* (Cossu dkk., 2009 dengan Modifikasi)

Yoghurt diambil dan dilarutkan dengan methanol 96 % dengan perbandingan 1 : 2. Selanjutnya dilakukan homogenisasi dengan menggunakan *vortex* selama 15 detik. Campuran disentrifugasi dengan kecepatan 4.000 rpm selama 10 menit. Larutan yang telah terpisah menjadi 2 fase (fase supernatan yang diambil) tersebut dapat digunakan sebagai larutan uji DPPH dan fenolik.

c.9. Pengujian Total Fenolik (Dungir dkk., 2012; Lee dkk., 2003 dalam Alfonsius, 2015 dengan modifikasi)

Tahapan pengujian fenolik produk *yoghurt* sama dengan pengujian fenolik sari buah markisa (halaman 35).

c.10. Pengujian Antioksidan *Yoghurt* dengan Metode DPPH (α , α , *diphenyl picryl hidrazil*) (Sasaki dkk., 2006 dalam Alfonsius, 2015 dengan Modifikasi)

1. Pembuatan Larutan DPPH 0,2 mM

Serbuk DPPH sebanyak 7,88 mg (0,00788 g) dilarutkan dalam 100 mL metanol 96 %, kemudian disimpan dalam ruang gelap 30 menit.

2. Pembuatan Blanko

Larutan DPPH 0,2 mM diambil sebanyak 1 mL ditambahkan dengan 3 mL larutan metanol 96 %, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm.

3. Pengukuran Serapan Sampel

Sampel diambil dan diencerkan dengan metanol 96 % dengan perbandingan 1 : 6 dan *divortex* selama 15 detik. Selanjutnya campuran diambil sebanyak 3 mL dan ditambahkan dengan larutan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 mL. Campuran diinkubasi dalam keadaan gelap selama 30 menit. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang

gelombang 517 nm. Persen inhibisi dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut

$$\% \text{ penghambatan} = \frac{\text{Abs } t_0 - \text{Abs } t}{\text{Abs } t_0} 100 \%$$

Keterangan:

Abs t_0 = absorbansi DPPH pada waktu ke-nol

Abs t = absorbansi DPPH pada t menit

d. Uji Organoleptik (Lamond, 1997 dengan Modifikasi)

Uji organoleptik dilakukan bertujuan untuk mengetahui angka kesukaan konsumen terhadap produk. Uji ini dilakukan dengan cara menyebarkan kuisioner kepada 30 orang. Uji yang dilakukan meliputi uji rasa, uji aroma, uji kekentalan, dan uji warna. Hasil uji lalu diurutkan sesuai tingkatan yang paling disukai hingga paling tidak sukai. Nilai yang digunakan adalah 4 = sangat suka, 3 = suka, 2 = kurang suka, 1 = tidak suka.

e. Analisis Data Hasil Penelitian (Gasperz, 1991)

Data yang telah diperoleh kemudian dianalisis. Kontrol *yoghurt* susu dan kontrol *yoghurt* kacang tunggak dianalisis dengan menggunakan T-Test Independen Sampel sedangkan analisis perlakuan dengan kontrol *yoghurt* kacang menggunakan uji ANAVA. Apabila pada uji ANAVA terdapat beda nyata dilanjutkan uji DMRT (*Duncan Multiple Range Test*) dengan tingkat kepercayaan 95 % untuk mengetahui perbedaan nyata antar perlakuan. Data diproses statistik menggunakan program komputer SPSS versi 17.