

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama 5 bulan, yaitu bulan Februari sampai Juni 2016. Lokasi penelitian dilakukan di Laboratorium Teknobiologi Pangan dan Laboratorium Produksi Teknobiologi Pangan Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Pengujian kadar etanol akan dilakukan di Laboratorium Teknologi Pertanian dan Hasil Pangan Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

B. Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, *refrigerator*, *freezer*, blender, saringan plastik, timbangan analitik, sendok plastik, toples kaca 250 ml, baskom plastik, gelas ukur, pH meter Lovibond pH110, pipet ukur, propipet, pipet tetes, corong, gelas beker, labu ukur, loyang, cawan petri, pengaduk, eksikator, tabung reaksi, rak tabung reaksi, tabung Eppendorf, Erlenmeyer, *Laminar Air Flow* Esco AVC-3A1, *Autoclave* Hirayama HIC LIVE/HVE-50, *Vortex* RS-VSA10, inkubator Memmert, *micropipet*, *microtips*, oven, spektrofotometer Shimadzu UV-1800, kuvet UV-Vis, *waterbath*, statif, buret, Kromatografi Gas Shimadzu 8A, *syringe* ukuran 10 μ L, tabung Durham, kompor, kertas saring, cawan timbang, termometer, penjepit kayu, gelas plastik, botol plastik, bunsen, spiritus, *aluminium foil*, sarung tangan karet.

masker, kertas sampul coklat, karet, kertas label, tisu, kalkulator, alat tulis, dan *microwave* Electrolux.

Bahan dasar yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji kefir. Biji kefir yang digunakan berasal dari perkembangbiakan oleh peneliti. Biji kefir ini akan difermentasikan selama 24 jam pada suhu ruang $\pm 27^{\circ}\text{C}$ dalam sari buah stroberi. Sari buah stroberi tersebut akan diolah oleh peneliti, dimana buahnya dibeli di Carrefour Maguwoharjo, Sleman, Yogyakarta dengan merek “Adenttig” dari Ciwidey, Bandung.

Bahan penunjang yang digunakan dalam penelitian ini adalah gula pasir merek “Gulaku”, air mineral AQUA, alkohol 70%, aquades, H_2SO_4 1,25%, indikator PP, etanol 96%, etanol 78%, etanol PA, alkohol 0,5%, glukosa anhidrat, reagen Nelson A dan B, reagen Arsenomolibdat, aseton, celite, NaOH 3,25%, medium *Brilliant Green Lactose Bile* (BGLB), medium *Man Rogosa and Sharpe Agar* (MRSA), CaCO_3 , dan NaOH 0,1N.

C. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang dilakukan terdiri dari 1 faktor yaitu variasi penambahan konsentrasi sukrosa. Tiap variabel penambahan sukrosa adalah konsentrasi 0% (kontrol), konsentrasi 5%, konsentrasi 10%, konsentrasi 15%, dan konsentrasi 20%. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) satu faktor. Tabel rancangan percobaan yang akan dilakukan dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Rancangan Percobaan dengan Variasi Penambahan Sukrosa dalam Kefir Sari Buah Stroberi (*Fragaria vesca*)

Ulangan	Variasi Penambahan Sukrosa				
	Kontrol 0% (A)	5% (B)	10% (C)	15% (D)	20% (E)
1	A1	B1	C1	D1	E1
2	A2	B2	C2	D2	E2
3	A3	B3	C3	D3	E3

Keterangan: huruf A, B, C, D, dan E adalah variasi perlakuan dan angka 1, 2, dan 3 adalah ulangan ke-

D. Tahapan Penelitian

1. Pembuatan Sari Buah Stroberi (modifikasi Pertiwi dan Susanto, 2014)

Buah stroberi mula-mula disortasi dari segi kenampakan dan kondisi masih segar agar diperoleh buah yang baik dan tidak busuk. Selanjutnya, buah dicuci dengan aquades agar kotoran seperti tanah dan sisa-sisa pestisida yang melekat hilang sebanyak 4 kali sambil dilepaskan dari daunnya. Kemudian, buah stroberi diblansir pada suhu 75°C selama \pm 3 menit. Setelah itu, buah stroberi dimasukkan ke dalam blender untuk memperoleh sari buah stroberi. Kemudian, hasil sari buah stroberi dari blender disaring dengan saringan plastik sebanyak 2 kali dan ditampung dalam toples plastik sebagai stok bahan baku untuk disimpan di dalam *freezer*.

2. Uji Pendahuluan Sari Buah Stroberi sebagai Bahan Baku Kefir

Sari buah stroberi yang sudah dibuat dilakukan uji proksimat awal diantaranya pH, kadar gula pereduksi, dan kadar serat pangan larut.

a. Pengukuran pH (modifikasi Hadiwiyoto, 1994 dalam Aristya dkk., 2013)

pH meter dipersiapkan dan dilakukan kalibrasi (pH 7,00 dan pH 4,01). Sari buah stroberi diambil sebanyak ± 5 ml dan dimasukkan ke dalam gelas beker. Elektroda pH meter dibilas aquades, lalu diusap menggunakan tisu. pH meter dinyalakan dan elektroda dicelupkan pada sampel. Elektroda dibiarkan beberapa saat sampai angka pH meter stabil. Hasil yang ditunjukkan pH meter dicatat sebagai pH hasil. Perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

b. Pengukuran kadar gula pereduksi (modifikasi Sudarmadji dkk., 1989)

Larutan glukosa standar dibuat dengan penimbangan 10 mg glukosa anhidrat yang dilarutkan dalam 100 ml aquades. Larutan glukosa standar diencerkan sehingga diperoleh glukosa dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/100 ml. Tabung reaksi bersih disiapkan sebanyak 6 buah dan masing-masing diisi dengan 1 ml larutan glukosa standar. Satu tabung diisi aquades sebanyak 1 ml sebagai blanko.

Sampel sari buah stroberi diambil sebanyak 1 ml dan diencerkan ke dalam 9 ml aquades sebagai pengenceran 10^{-1} , lalu sampel dari pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dan diencerkan ke dalam 9 ml aquades sebagai pengenceran 10^{-2} . Pengenceran 10^{-3} dibuat dengan langkah yang sama. Kemudian, sampel dari pengenceran ketiga diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi.

Reagen Nelson sebanyak 1 ml ditambahkan ke dalam masing-masing tabung berisi standar, blanko, dan sampel. Kemudian, seluruh tabung reaksi tersebut dipanaskan pada *waterbath* pada suhu 100°C selama 20 menit. Reagen Nelson dibuat dengan mencampur 25 bagian reagen Nelson A dan 1 bagian reagen Nelson B. Tabung didinginkan bersama-sama dalam gelas beker yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C kemudian ditambahkan reagen Arsenomolibdat sebanyak 1 ml. Tabung digojog hingga semua endapan Cu₂O yang ada larut kembali.

Aquades sebanyak 7 ml ditambahkan dalam tabung setelah endapan Cu₂O larut sempurna, lalu dihomogenkan dengan *vortex*. Pengukuran densitas optik dilakukan pada masing-masing larutan dengan panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer. Kurva standar dibuat dengan menghubungkan antara konsentrasi glukosa dan absorbansi (*Optical Density*) menggunakan program Excel. Jumlah gula pereduksi pada sampel dapat ditentukan berdasarkan rumus yang dihasilkan dari kurva standar yang terbentuk ($y = a + bx$).

c. Pengukuran kadar serat pangan larut (modifikasi Badan Standarisasi Nasional, 1992; Asp dkk., 1983)

Kertas saring yang akan digunakan terlebih dahulu dikeringkan dalam oven pada suhu $\pm 110^\circ\text{C}$ selama ± 1 jam dan dimasukkan ke eksikator selama ± 10 menit. Sampel ditimbang sebanyak 2 gram, lalu dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml, ditambah H₂SO₄ 1,25%

sebanyak 200 ml, dipanaskan sampai mendidih, dan dididihkan selama 30 menit. Setelah itu, sampel tersebut disaring dengan kertas saring. Residu yang tersaring dibilas secukupnya dengan aquades panas sebanyak 200 ml, lalu dicuci NaOH 3,25% sebanyak 200 ml. Hasil pencucian (filtrat) ditampung dalam Erlenmeyer.

Setelah itu, filtrat dipanaskan sampai mendidih dan dididihkan selama 30 menit, lalu disaring kembali dengan kertas saring. Residu yang tersaring dibilas secukupnya dengan aquades panas sebanyak 200 ml, lalu filtrat selama pengujian ini ditampung dan ditambahkan 400 ml etanol 96% hangat ($\pm 60^{\circ}\text{C}$). Filtrat dibiarkan presipitasi selama ± 1 jam, lalu disaring dengan kertas saring yang sebelumnya sudah dioven dan ditimbang beratnya (A).

Celite sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam kertas saring. Selanjutnya, dicuci berturut-turut dengan 2x1 ml etanol 78%, 2x10 ml etanol 96%, dan 2x10 ml aseton. Kemudian, dikeringkan dalam oven sampai berat konstan dan dimasukkan ke dalam eksikator ± 10 menit, lalu beratnya ditimbang (B). Kadar serat larut dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Kadar serat larut} = \frac{B - A - \text{berat celite}}{\text{Berat sampel}} \times 100\%$$

3. Pembuatan Kefir Sari Buah Stoberi (modifikasi Fratiwi dkk., 2008 dan Pakbin dkk., 2014)

Toples kaca 250 ml sebagai wadah fermentasi yang sudah disterilisasi panas basah disiapkan sebanyak 5 buah. Tiap toples kaca

tersebut ditambahkan sari buah stroberi yang telah dipasteurisasi pada suhu 80°C selama ± 5 menit sebanyak 200 ml (1 sari buah murni : 1 air mineral) dan sukrosa sebanyak variabel perlakuan 0%, 5%, 10%, 15%, dan 20% (b/v). Biji kefir disaring dan ditiriskan sampai tidak menetes menggunakan kertas saring, kemudian ditimbang 10% (b/v) sebanyak 20 gram (dalam 200 ml sari buah stroberi). Biji kefir tersebut dimasukkan ke dalam masing – masing toples kaca berisi sari buah stroberi yang telah disiapkan. Selanjutnya, kelima sari buah stroberi dalam toples kaca dengan penambahan sukrosa di inkubasi selama 24 jam pada suhu ruang ± 27 °C.

4. Uji Kualitas Kimia Produk Kefir Sari Buah Stroberi

Uji kualitas kimia yang dilakukan meliputi pengukuran pH, kadar gula reduksi, kadar serat pangan larut, kadar total asam, dan kadar etanol.

a. Pengukuran pH (modifikasi Hadiwiyoto, 1994 dalam Aristya dkk., 2013)

Cara pengujian sesuai dengan pengukuran pH pada halaman 24.

b. Pengukuran kadar gula pereduksi (modifikasi Sudarmadji dkk., 1989)

Cara pengujian sesuai dengan pengukuran kadar gula pada halaman 24.

c. Pengukuran kadar serat pangan larut (modifikasi Badan Standarisasi Nasional b, 1992; Asp dkk., 1983)

Cara pengujian sesuai dengan pengukuran kadar serat pada halaman 25.

d. Pengukuran kadar total asam laktat tertitrasi (modifikasi Buckle dkk., 1987)

Kefir sari buah stroberi sebanyak 10 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml, lalu ditambah 3 tetes indikator fenolftalein (PP)

dan dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda yang tetap, pembacaan skala buret pada saat warna merah muda tersebut terbentuk. Kadar total asam dihitung sebagai total asam laktat diperoleh dari rumus perhitungan di bawah ini:

$$\text{Kadar total asam(\%)} = \frac{V. \text{NaOH (ml)} \times N. \text{NaOH(N)} \times 0,09 \times 10}{\text{Volume sampel (ml)}} \times 100\%$$

e. Pengukuran kadar etanol dengan instrumen Kromatografi Gas diujikan oleh Laboratorium Teknologi Pertanian dan Hasil Pangan Universitas Gadjah Mada

Kromatografi gas disiapkan pada suhu inisial 140°C dan akhir 150°C, kecepatan inj/det 230, *range* 102, dan atenuasi 1. Kolom yang digunakan adalah GP 10% SP-1200/1% H₃PO₄ on 80/100 mes chromosorb W AW. Standar yang digunakan adalah alkohol 0,5% yang dibuat dengan melarutkan etanol PA dalam aquades. Sampel diencerkan 10⁻¹ dengan aquades, lalu diambil dengan *syringe* sebanyak 1 µL dan diinjeksikan ke dalam kromatografi gas. Kadar etanol (%) ditentukan dengan rumus (konsentrasi standar = 0,5%):

$$\frac{\text{area sampel}}{\text{area standar}} \times \text{konsentrasi standar} \times \text{faktor pengenceran} \times 100\%$$

5. Uji Kualitas Mikrobiologi Produk Kefir Sari Buah Stroberi

Uji mikrobiologi yang dilakukan meliputi perhitungan jumlah *coliform* dengan metode MPN dan jumlah bakteri asam laktat.

a. Perhitungan jumlah *Coliform* dengan metode MPN (modifikasi Fardiaz, 1992)

Sampel kefir sari buah stroberi masing-masing diambil sebanyak 5 ml dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 ml. Aquades yang telah disterilisasi sebanyak 45 ml dituang secara aseptis ke dalam Erlenmeyer berisi sampel kefir sari buah stroberi. Larutan dihomogenkan dengan digoyangkan hingga larut sempurna dan diberi label pengenceran 10^{-1} . Pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril sebanyak 9 ml dan diberi label pengenceran 10^{-2} . Pengenceran 10^{-2} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril 9 ml dan diberi label pengenceran 10^{-3} .

Setiap pengenceran dihomogenkan kembali dengan vortex, kemudian tiap pengenceran diinokulasikan sebanyak 1 ml ke dalam sebuah tabung reaksi yang telah berisi tabung Durham (tabung kecil yang letaknya terbalik, digunakan untuk menangkap gas yang terjadi akibat fermentasi laktosa menjadi asam dan gas) dan medium *Brilliant Green Lactose Bile* (BGLB) sebanyak 9 ml. Warna awal medium BGLB adalah hijau jernih. Setiap pengenceran diberi label, dibungkus rapi, lalu diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 37°C .

Apabila setelah diinkubasi sampel di dalam tabung reaksi tersebut mengalami perubahan warna menjadi hijau keruh dan timbul gelembung pada tabung Durham, maka dikatakan positif mengandung *coliform*. Hasil pengujian dicocokkan dengan tabel MPN. Penentuan

nilai angka paling mungkin atau *most probable number* (MPN) seri sembilan tabung dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\text{MPN contoh} = \text{nilai MPN dari tabel} \times \frac{1}{\text{Pengenceran tabung ditengah}}$$

b. Jumlah bakteri asam laktat (modifikasi Fardiaz, 1992)

Penentuan jumlah bakteri asam laktat (BAL) dilakukan dengan metode hitung cawan (*Total Plate Count*). Jumlah BAL yang tumbuh dihitung pada media biakan *Man Rogosa and Sharpe* (MRS). Penghitungan total BAL diawali dengan sampel kefir sari buah stroberi diencerkan dalam aquades steril. Pengenceran dilakukan dari 10^{-1} - 10^{-8} , pada pengenceran pertama sebanyak 1 ml sampel diencerkan ke dalam 9 ml aquades steril, pengenceran kedua dilakukan dengan 1 ml yang sudah diencerkan pada pengenceran sebelumnya (pertama) dimasukkan ke dalam 9 ml aquades steril, pengenceran ketiga dan seterusnya dilakukan dengan cara yang sama seperti pengenceran kedua.

Pencawanan dilakukan dengan media biakan MRS agar. Pembuatan MRS agar 1000 ml dilakukan dengan cara MRS agar sebanyak 62 gram dilarutkan ke dalam 1000 ml aquades, kemudian larutan MRS agar tersebut disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Pencawanan dilakukan dengan 1 ml sampel hasil pengenceran 10^{-4} - 10^{-8} dimasukkan ke dalam cawan petri, lalu ditambahkan agar cair MRS steril yang telah dingin (47 - 50°C) sebanyak 15-20 ml dan digoyangkan atau digerak-gerakkan membentuk

angka 8 sehingga tersebar merata (homogen) seperti metode *pour plate*. Setelah padat, cawan tersebut diinkubasi dengan posisi terbalik pada suhu 37°C selama 48 jam.

$$\text{Koloni per ml} = \text{jumlah koloni per cawan} \times \frac{1}{\text{faktor pengenceran}}$$

6. Uji Organoleptik Produk Kefir Sari Buah Stroberi

Uji ini dilakukan untuk mengetahui tingkat kesukaan konsumen terhadap produk kefir sari buah stroberi. Pengujian dilakukan pada 30 orang responden dengan syarat panelis suka dengan minuman yang asam. Panelis akan mengisi lembar uji organoleptik yang berisi penilaian terhadap aroma, rasa, homogenitas, dan warna. Hasil uji lalu diurutkan sesuai tingkatan yang paling tidak disukai. Skor yang digunakan adalah 4=sangat suka, 3=suka, 2=tidak suka, dan 1=sangat tidak suka.

7. Analisa Data (Gaspersz, 1991)

Data yang diperoleh akan dianalisis dengan menggunakan metode *Analysis of Variance* (ANOVA) dan untuk mengetahui letak beda nyata antara perlakuan digunakan uji *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) pada tingkat kepercayaan 95%. Program yang digunakan untuk analisa data ini adalah SPSS versi 15.