

III METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung. Penelitian ini dilaksanakan pada bulan November 2014 sampai dengan Februari 2015.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam pembuatan minuman sinbiotik ini, yaitu buah bengkuang (*Pachyrrhizus erosus*) dan buah pisang yang sudah matang (*Musa paradisiaca*) yang diperoleh dari petani yang ada di Gedong Tataan dan starter bakteri *Lactobacillus bulgarius* dan *Streptococcus thermophilus* diperoleh dalam bentuk murni yang didapat dari PAU pangan dan gizi UGM. Bahan tambahan yang digunakan adalah glukosa, susu skim, dan sukrosa. Bahan untuk analisa antara lain aquades, media MRS Broth (*De Mann Rogoso Sharp*) dan MRS Agar untuk pertumbuhan kultur, larutan NaOH 0,1 N, Indikator pp, dan NaCl. Alat-alat yang digunakan antara lain timbangan, blender, baskom, plastik, kain saring, wadah botol, colony counter, inkubator, pH meter, autoklaf, pisau, spatula, stainless steel, aluminium foil, tabung reaksi, kapas, erlenmeyer, cawan petri, gelas ukur, bunsen, dan mikropipet.

3.3 Metode Penelitian

Percobaan dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan menggunakan faktor tunggal yaitu kombinasi buah yang dilakukan sebanyak 4 kali ulangan. Perlakuan perbandingan kombinasi buah bengkuang dan pisang (BP) terdiri dari 7 taraf, yaitu 1:1 (bengkuang:pisang) (B1P1), 1:2 (bengkuang:pisang) (B1P2), 1:3 (bengkuang:pisang) (B1P3), 2:3 (bengkuang:pisang) (B2P3), 3:2 (bengkuang:pisang) (B3P2), 2:1 (bengkuang:pisang) (B2P1), 3:1 (bengkuang:pisang) (B3P1). Data yang diperoleh diuji keragaman dengan uji Bartlett dan uji Tuckey. Data tersebut kemudian dianalisis ragam (ANARA) untuk mendapatkan penduga ragam galat dan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan antar perlakuan. Data diuji lanjut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada taraf 1% dan 5%.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

3.4.1 Persiapan Starter

Kultur murni *Lactobacillus bulgaricus* dan *Streptococcus thermophilus* dalam bentuk ampul dipindahkan ke dalam tabung reaksi berisi media MRS Broth, masing-masing diinokulasi 1 ml ke dalam 5% (10 ml) susu skim yang sudah disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit., kemudian diinkubasi selama 18 jam pada suhu pertumbuhan optimalnya yaitu 37°C. Kultur ini disebut kultur induk. Selanjutnya dari kultur induk diambil dan diinokulasi ke dalam media yang sama yaitu sebanyak 5% (v/v) dan diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C sehingga didapat kultur adaptasi. Selanjutnya dari kultur adaptasi diinokulasi

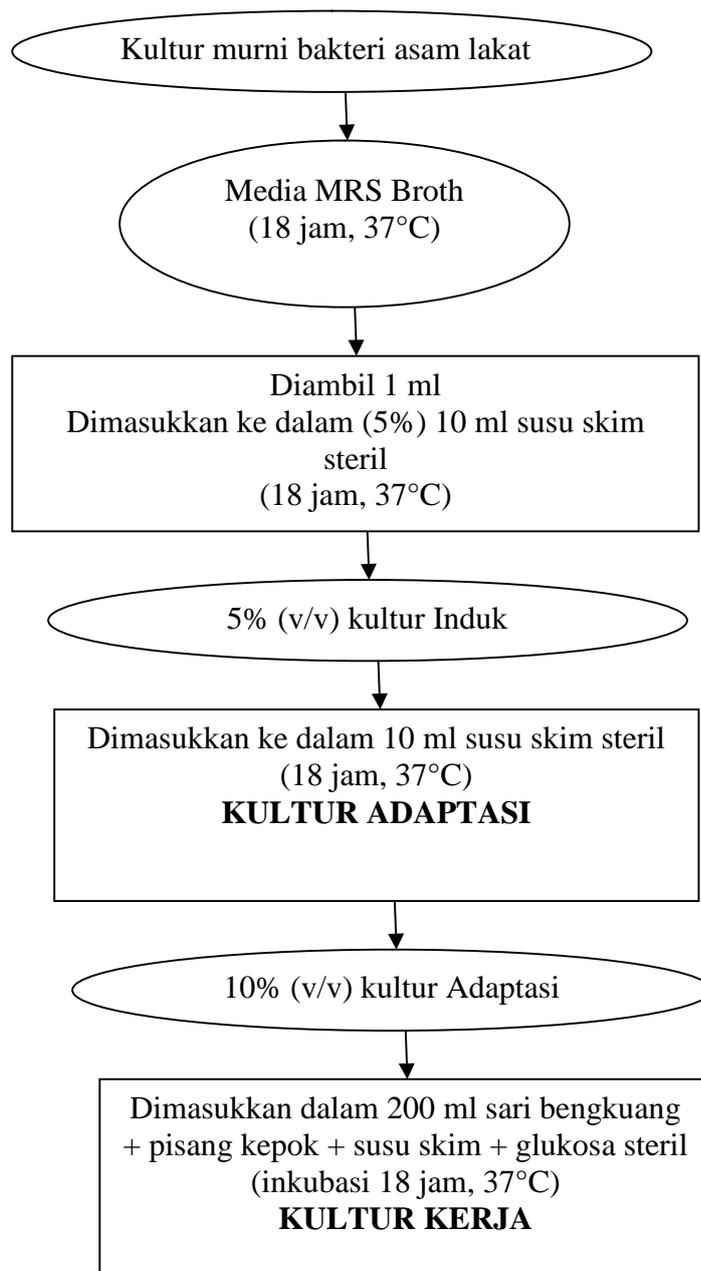
5% (v/v) ke dalam 200 ml campuran sari bengkuang dan sari pisang kepok yang ditambahkan dengan susu skim steril dan glukosa steril. Selanjutnya diinkubasi selama 18 jam pada suhu 37°C, maka kultur kerja siap digunakan. Skema persiapan kultur kerja dapat dilihat dalam Gambar 3.

3.4.2 Pembuatan Sari Bengkuang

Bengkuang yang digunakan adalah bengkuang yang baik dan layak untuk dikonsumsi. Bengkuang dicuci dengan air bersih hingga kotoran yang menempel pada bagian luar kulitnya hilang, selanjutnya bengkuang dikupas dan dipotong-potong. Tahap selanjutnya agar diperoleh larutan atau sari bengkuang adalah penghancuran bengkuang dengan menggunakan blender pada kecepatan tinggi, setelah itu penyaringan dengan menggunakan kain saring. Kemudian sari bengkuang didiamkan selama 1 jam pada suhu ruang. Selanjutnya endapan sari bengkuang dipisahkan dengan bagian atas sari bengkuang yang berwarna jernih untuk digunakan. Sari bengkuang dipasteurisasi pada suhu 80°C selama 15 menit.

3.4.3 Pembuatan Sari Pisang Kepok

Buah pisang kepok diblansir selama 15 menit dengan cara direndam pada air mendidih, kemudian dikupas. Pisang yang telah dikupas dihaluskan dengan blender dengan penambahan aquades steril hangat dengan perbandingan 1 : 3 (b/v) sampai menjadi bubur pisang. Bubur pisang disaring menggunakan kain saring sehingga diperoleh ekstrak buah pisang kepok. Sari pisang kepok dipasteurisasi pada suhu 80°C selama 15 menit.



Gambar 3. Skema persiapan kultur kerja
Sumber: Fauzi, 2009

3.4.5 Fermentasi Sari Bengkuang dan Pisang Kepok

Minuman sinbiotik dari bengkuang dan pisang kepok ini dibuat sebanyak 200 ml untuk masing-masing perlakuan dan ditempatkan pada wadah botol. Pada proses pembuatannya, ekstrak bengkuang dan ekstrak pisang kepok yang telah jadi

dicampur sesuai perlakuan masing-masing (Tabel 7), kemudian ditambahkan susu skim sebanyak 10% dan glukosa sebanyak 5% (b/v). Selanjutnya ditambahkan starter sebanyak 5% (v/v) yang diambil dari kultur kerja dengan konsentrasi sel sebesar 10^8 koloni/ml. Ekstrak bengkuang dan pisang kepok tersebut difermentasi dengan menggunakan wadah botol. Inkubasi dilakukan pada suhu 40°C dengan lama fermentasi 18 jam. Prosedur pembuatan minuman sinbiotik bengkuang dan pisang kepok disajikan pada Gambar 4.

Tabel 7. Perbandingan antara sari bengkuang dan sari pisang kepok dalam 200ml

Perlakuan	Keterangan
B1P1	Bengkuang 1: Pisang 1 (bengkuang 100 ml pisang 100 ml)
B1P2	Bengkuang 1: Pisang 2 (bengkuang 66,5 ml pisang 133,5 ml)
B1P3	Bengkuang 1: Pisang 3 (bengkuang 50 ml pisang 150 ml)
B2P3	Bengkuang 2: Pisang 3 (bengkuang 80 ml pisang 120 ml)
B3P2	Bengkuang 3: Pisang 2 (bengkuang 120 ml pisang 80 ml)
B2P1	Bengkuang 2: Pisang 1 (bengkuang 133,5 ml pisang 66,5 ml)
B3P1	Bengkuang 3: Pisang 1 (bengkuang 150 ml pisang 50 ml)

3.5 Pengamatan

Pengamatan dan penilaian setelah minuman sinbiotik bengkuang dan pisang kepok terbentuk dalam setiap ulangan meliputi total bakteri asam laktat, pengukuran konsentrasi asam laktat, nilai pH, dan uji organoleptik.

3.5.1 Nilai pH

Salah satu faktor intrinsik dari produk minuman sinbiotik bengkuang pisang kepok adalah pH yang dapat mempengaruhi populasi jasad renik di dalam produk tersebut karena kebanyakan bakteri mempunyai pH optimum. Metode yang dilakukan untuk mengukur nilai pH dapat menggunakan pH meter (Fardiaz dkk, 1996). Sebelum melakukan pengukuran, pH meter harus dikalibrasi dahulu

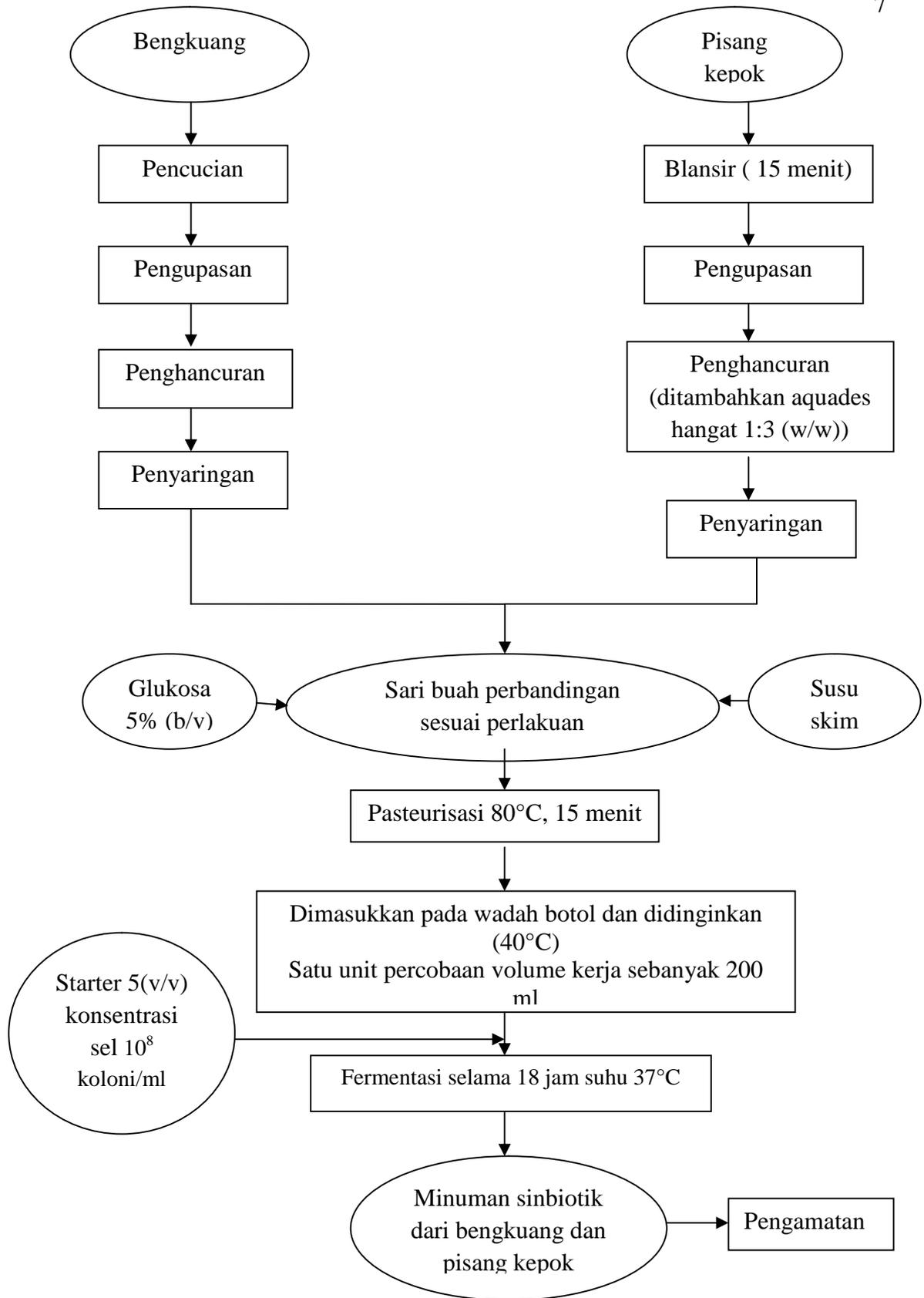
dengan larutan buffer 7,0. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap larutan sampel dengan mencelupkan elektroda ke dalam larutan sampel dan biarkan sesaat sampai diperoleh hasil pembacaan yang stabil.

3.5.2 Konsentrasi Asam Laktat

Ekstrak bengkuang dan pisang kepok yang difermentasi oleh bakteri *Lactobacillus bulgarius* dan *Streptococcus thermophilus* akan menghasilkan sejumlah besar asam laktat. Besarnya asam laktat dapat dihitung dengan menggunakan metode titrasi (Fardiaz, 1989), yaitu untuk setiap sampel diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 10 ml air destilat, lalu ditambahkan indikator Fenolftalein 1-2 tetes dan dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N. Perubahan warna sampel menjadi merah muda menandakan sebagai titik akhir titrasi. Total asam laktat dihitung sebagai % asam laktat dengan rumus :

$$\% \text{ Asam laktat} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times 0,1 \times 90}{\text{ml sampel}}$$

N = Normalitas larutan NaOH
(Fardiaz, 1986)



Gambar 4. Prosedur pembuatan minuman sinbiotik bengkung dan pisang kepok.

3.5.3 Total Bakteri Asam Laktat

Total bakteri asam laktat pada sampel minuman sinbiotik bengkuang pisang kepok dihitung menggunakan metode hitungan cawan yang prinsipnya yaitu bakteri yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, kemudian bakteri tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dan dihitung dengan mata bias (Fardiaz, 1986). Standar yang digunakan untuk melaporkan hasil analisis mikrobiologi dengan cara hitungan cawan disebut metode *plate count*, yaitu dengan cara mengambil sebanyak 1 ml sampel dan dimasukkan ke dalam 9 ml larutan pengenceran yang dijadikan 10^{-1} , kemudian diambil 1 ml dari 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam 9 ml larutan pengencer yang dijadikan pengenceran 10^{-2} , dan seterusnya sampai pengenceran 10^{-9} . 1 ml sampel diambil dari pengenceran yang diinginkan (tiga atau empat pengenceran terakhir) dengan menggunakan pipet lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril, kemudian ditambahkan ±15 ml media MRS agar steril. Kemudian cawan diinkubasi pada suhu 30°C selama dua hari dan dihitung koloni yang tumbuh. Total koloni yang terhitung harus memenuhi *Standar Internasional Commition of Food* (ICMF), yaitu antara 30 sampai 300 koloni per cawan petri. Total bakteri asam laktat dihitung dengan rumus :

$$\text{Kolono per gram} = \text{Jumlah Kolonin} \times \frac{1}{\text{Faktor Pengenceran}}$$

3.5.4 Uji Organoleptik

Minuman sinbiotik bengkuang pisang kepok ini akan diuji organoleptik dengan menggunakan uji hedonik. Uji hedonik bertujuan untuk menentukan minuman

sinbiotik yang paling disukai (Meilguard, 1999). Uji hedonik untuk warna, aroma, rasa dan penerimaan keseluruhan. Sampel diberi kode 3 angka dan disajikan secara acak kepada panelis. Sebelum dilakukan uji organoleptik minuman laktat ditambahkan sukrosa 25% dengan perbandingan 1:1. Hal ini dilakukan untuk mengurangi rasa asam yang timbul dari minuman sinbiotik. Skor penilaian organoleptik minuman sinbiotik dari bengkuang pisang kepok dengan lima skala dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Kriteria uji organoleptik metode hedonik

Warna	Aroma	Rasa	Penerimaan Keseluruhan	Skor
Sangat suka	Sangat suka	Sangat suka	Sangat suka	5
Suka	Suka	Suka	Suka	4
Agak suka	Agak suka	Agak suka	Agak suka	3
Tidak suka	Tidak suka	Tidak suka	Tidak suka	2
Sangat tidak suka	Sangat tidak suka	Sangat tidak suka	Sangat tidak suka	1