

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini merupakan jenis penelitian eksperimental yang telah dilaksanakan pada bulan Februari 2016 hingga Juli 2016 di Laboratorium Teknobia-Pangan, Teknobia-Industri, dan Laboratorium Produksi, Fakultas Teknobiologi, Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Pengujian kadar abu dan kadar protein dilakukan di Laboratorium Teknologi Pertanian dan Hasil Pangan, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain blender Miyako, baskom, toples, kain saring, kertas saring, corong kaca, ayakan alumunium, sendok plastik, cup plastik, buret, statif, Erlenmeyer Pyrex, mikrotip, mikro pipet, cawan petri, *hand counter*, corong pemisah, cawan porselen, oven MedCenter Einrichtungen GmbH, *waterbath* Memert, timbangan digital, eksikator, pro pipet, pipet ukur, *stopwatch*, panci, kompor gas Rinnai Grande RI-712A, *color reader* Konica Minolta, alumunium foil, plastik *wrap*, *tissue*, plastik, pH meter Lovibond pH 110, gelas benda, kapas, gelas penutup, jarum ose, jarum enten, kertas payung, karet gelang, vortex RS-VSA10, lampu spiritus, kayu penjepit, pipet tetes, *hair dryer*, mikroskop, tabung reaksi, *Laminar Air Flow* (LAF) ESCO AVC-3A1 dan SV 1200 SG, *microwave* Electrolux, inkubator Memert, gelas pengaduk, beaker Pyrex, *hot plate*, *magnetic stirrer*, termometer batang, kulkas Sharp, Spektrofotometer

UV-1800 Shimadzu, kuvet kaca Uv-Vis, sentrifuge, *autoklaf* Hirayama HIC LIVE/HVE-50, *muffle*, krus porselin, labu ukur, labu Kjedahl, dan labu destilasi.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah beras hitam merk Nutrice sebanyak 3 kg, susu skim bubuk merk Calci Skim sebanyak 3 kg dan susu skim cair merk Greenfield yang diperoleh dari Carefour sebanyak 3 liter, *Lactobacillus acidophilus* dan biakan *Streptococcus thermophilus* yang diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi PAU Pangan dan Gizi UGM Yogyakarta, gula pasir merk Gulaku, karagenan, air mineral merk Aqua, asam sitrat, aquades, label, phenolphthalein, larutan NaOH 0,1 N; methanol 96%, Folin-Ciocalteu, larutan Na₂CO₃ 7%, asam galat, ethanol 96%, medium Nutrien Agar (NA), medium MRS *broth*, larutan H₂O₂ 3%, cat Gram A, cat Gram B (larutan *Mordan*), cat Gram C (larutan peluntur), cat Gram D (*larutan safranin*), cat nigrosin, medium MRS agar, medium *Lactose broth* (LB), *sodium biselenite*, medium *Selenite Cystine Broth* (SCB), *Salmonella Shigella Agar* (SSA), celite, etanol 78%, aseton, bubuk DPPH, CaCO₃, larutan H₂SO₄ 1,25%, larutan NaOH 3,25%, alkohol 70%, alkohol 95%, petroleum eter, dietil eter, larutan NH₃ pekat, air panas, H₂SO₄ (93-98 bebas N), Na₂SO₄-HgO, NaOH-Na₂S₂O₃, zink, asam borat, indikator metilen *red/blue*, dan larutan HCl 0,02 N.

C. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang dilakukan adalah Rancangan Acak Lengkap satu faktor yaitu sari beras hitam dengan variasi susu skim dengan

tiap perlakuan dilakukan tiga kali ulangan. Perlakuan sari beras hitam dengan variasi susu skim dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan percobaan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap

Ulangan	Kontrol		Sari Beras Hitam dengan Variasi Susu Skim (%)		
	Negatif (K1)	Positif (K2)	15% (A)	20% (B)	25% (C)
1	K11	K21	A1	B1	C1
2	K12	K22	A2	B2	C2
3	K13	K23	A3	B3	C3

Keterangan: kode K1 adalah kontrol negatif yaitu fermentasi sari beras hitam; kode K2 adalah kontrol positif yaitu fermentasi susu skim; A, B, C adalah variasi perlakuan; dan angka 1, 2, dan 3 adalah ulangan.

D. Tahap Penelitian

Penelitian ini terdiri dari beberapa tahapan yang meliputi uji kemurnian *Lactobacillus acidophilus* dan *Streptococcus thermophilus*, pembuatan sari beras hitam, uji proksimat sari beras hitam, perbanyakan *Lactobacillus acidophilus* dan *Streptococcus thermophilus*, pembuatan starter, fermentasi *yoghurt*, uji kualitas fisik, uji mikrobiologis, uji kimia, uji organoleptik, dan analisis data.

E. Cara Kerja

1. Uji kemurnian *Lactobacillus acidophilus* dan *Streptococcus thermophilus*

Uji kemurnian bakteri dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui tingkat kemurnian isolat yang diperoleh dan karakteristik isolat bakteri murni yang meliputi pengamatan terhadap morfologi sel meliputi pengamatan bentuk sel, pewarnaan Gram, uji motilitas; uji biokimia yang meliputi uji katalase.

- a. Pengamatan bentuk sel pada bakteri *L. acidophilus* dan *S. thermophilus* (Harley dan Prescott, 2002 *diacu dalam* Yulita, 2014)

Gelas benda dan gelas penutup dibersihkan menggunakan alkohol 70%, selanjutnya biakan bakteri uji diambil secara aseptis sebanyak 1 ose dan diletakkan di dekat ujung kanan di atas gelas benda. Cat nigrosin sebanyak 1-2 tetes diarahkan pada salah satu ujung gelas benda, kemudian gelas penutup diletakkan dengan sudut 45°C terhadap gelas benda yang mengandung suspensi bakteri, lalu ditarik permukaannya dari ujung satu ke ujung yang lain hingga cat menjadi rata dan ada lapisan tipis. Selanjutnya, gelas benda diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x45 dan dilakukan pengambilan gambar.

- b. Pengamatan sifat Gram mikrobia uji (Harley dan Prescott, 2002 *diacu dalam* Yulita, 2014)

Gelas benda dan gelas penutup dibersihkan dengan alkohol 70% hingga kering, selanjutnya dipanaskan dengan lampu spiritus sampai kering. Biakan *L. acidophilus* dan *S. thermophilus* masing-masing disuspensikan sebanyak 1 ose secara aseptis dan diratakan di atas gelas benda. Selanjutnya, mikrobia uji tersebut ditetesi dengan aquades lalu difiksasi secara aseptis dengan lampu spiritus.

Selanjutnya, cat Gram A (kristal violet) ditetaskan sebanyak 2-3 tetes pada permukaan lapisan bakteri dan didiamkan selama 1 menit. Hasil pengecatan Gram A dicuci menggunakan air mengalir, kemudian dikeringkan dengan *hair dryer*. Setelah kering,

permukaan lapisan bakteri ditetesi dengan cat Gram B (*larutan Mordan*) dan didiamkan selama 1 menit. Sampel kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan. Selanjutnya permukaan lapisan bakteri ditetesi lagi dengan cat Gram C (*larutan peluntur*) dan didiamkan selama 30 detik dan dicuci kembali menggunakan air mengalir dan dikeringkan. Permukaan lapisan bakteri ditetesi kembali dengan cat Gram D (*larutan safranin*) sebanyak 2-3 tetes dan didiamkan selama 2 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dikeringanginkan.

Hasil pengecatan Gram diamati di bawah mikroskop dengan perbesaran 10x45. Jika sel berwarna biru berarti bakteri bersifat Gram positif dan berwarna merah berarti Gram negatif. Selanjutnya, hasil yang diperoleh diambil gambarnya.

c. Uji motilitas bakteri (Hadioetomo, 1993 *diacu dalam* Yulita, 2014)

Kultur *L. acidophilus* dan *S. thermophilus* ditusuk pada medium NA padat pada tabung, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24-48 jam. Uji akan bernilai positif ditunjukkan dengan melebarnya bekas tusukan pada medium yang merupakan indikasi bakteri tersebut bersifat motil.

d. Uji katalase bakteri (Harley dan Prescott, 2002 *diacu dalam* Yulita, 2014)

Biakan bakteri *L. acidophilus* dan *S. thermophilus* diambil sebanyak satu ose dan ditetesi dengan H₂O₂ 3% sebanyak 1-2 tetes pada gelas benda. Bila dihasilkan buih atau gelembung, maka

hasilnya positif. Apabila tidak dihasilkan buih atau gelembung, maka uji katalase negatif.

2. Pembuatan Sari Beras Hitam (Amelia dkk., 2013 dan Senja dkk., 2014 dengan modifikasi)

Beras hitam dicuci sampai bersih dari kotoran ataupun debu. Selanjutnya beras hitam direndam selama 24 jam pada suhu ruang dengan aquades:larutan asam sitrat 3% (85:15) dengan perbandingan beras hitam dan larutan perendam 1:10. Setelah itu, beras hitam diblender dengan menggunakan air rendaman selama 10 menit. Bubur beras hitam disaring dengan kain saring sebanyak 1 kali, kemudian sari beras hitam yang dihasilkan disaring kembali dengan kertas saring. Selanjutnya, sari beras hitam dapat digunakan untuk membuat *yoghurt*.

3. Uji Proksimat Sari Beras Hitam

a. Analisis kadar abu (Sudarmadji dkk., 1997)

Cawan porselin dikeringkan dalam oven selama 24 jam, kemudian ditimbang dan dicatat beratnya. Sampel diambil sebanyak 2 g dan dipijarkan dalam tanur dengan suhu 550°C selama 8 jam hingga diperoleh abu berwarna keputih-putihan. Selanjutnya, sampel dipanaskan dengan oven pada suhu 100°C selama 2 jam, kemudian dimasukkan ke dalam eksikator selama 10 menit dan ditimbang beratnya. Perlakuan diulang sampai didapatkan berat yang konstan. Kadar abu sampel dihitung dengan rumus:

$$\text{Kadar abu} = \frac{(\text{berat cawan} + \text{abu}) - \text{berat cawan}}{\text{Berat sampel mula} - \text{mula}} \times 100\%$$

- b. Analisis kadar protein menggunakan metode Semi-Mikro Kjeldahl (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 dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl 500 ml dan ditambahkan dengan 10 ml H_2SO_4 . Selanjutnya larutan ditambahkan dengan 5 gram campuran Na_2SO_4 -HgO (20:1) untuk katalisator.

Larutan kemudian dididihkan sampai jernih, kemudian dilanjutkan pendidihan selama 30 menit. Setelah dingin, dinding dalam pada labu Kjeldahl dicuci dengan aquades dan dididihkan lagi selama 30 menit. Setelah dingin, campuran ditambahkan dengan 140 ml aquades, 35 ml $\text{NaOH-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ dan beberapa butiran zink. Selanjutnya dilakukan distilasi dan distilat 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,

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

f = faktor pengenceran yaitu 10

c. Analisis kadar lemak (AOAC, 1995 *diacu dalam* Stella, 2014)

Metode yang digunakan dalam penentuan kadar lemak adalah metode *Rose-Gottlieb*. Metode ini digunakan untuk menentukan kadar lemak dan minyak khusus untuk bahan yang berbentuk cair atau pasta. Sampel ditimbang sebanyak 10 gram (W_0) dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 ml, kemudian ditambahkan dengan NH_3 pekat 1,25 ml. Erlenmeyer dipanaskan dengan *waterbath* pada suhu $70^{\circ}C$ selama 15 menit, lalu diaduk beberapa kali dan didinginkan. Larutan tersebut dipindahkan ke dalam corong pemisah, kemudian ditambahkan dengan alkohol 95% sebanyak 10 ml dan dietil eter sebanyak 25 ml. Setelah itu, larutan ditutup dan dikocok kencang selama 1 menit untuk mengekstrak kandungan lemak dalam sampel. Petroleum eter ditambahkan sebanyak 25 ml ke dalam larutan, kemudian ditutup dan dikocok kencang kembali selama 1,5 menit.

Larutan didiamkan sejenak hingga terbentuk dua lapisan terpisah. Lapisan atas dipindahkan ke dalam cawan yang telah ditimbang (W_1), sedangkan lapisan bawah diekstraksi kembali. Ekstraksi kembali dilakukan dengan menambahkan alkohol 95% sebanyak 5 ml, dietil eter sebanyak 15 ml, dan petroleum eter sebanyak 15 ml. Larutan dikocok dan didiamkan kembali. Lapisan atas dipindahkan kembali ke cawan yang sudah terdapat hasil ekstraksi pertama, kemudian larutan dipanaskan dengan menggunakan *waterbath* pada suhu $100^{\circ}C$ hingga pelarut menguap sempurna. Setelah

itu, cawan dipanaskan kembali pada oven suhu 100°C selama 30 menit untuk dikeringkan, lalu disimpan di eksikator selama 10 menit agar kandungan air yang tersisa diserap oleh *silica gel*. Berat akhir cawan dengan minyak ditimbang (W_2). Kadar lemak dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Kadar lemak} = \frac{(W_1 - W_2)}{W_0} \times 100\%$$

Keterangan:

W_0 : berat sampel (g)

W_1 : berat cawan dan lemak hasil ekstraksi (g)

W_2 : berat cawan kosong (g)

- d. Analisis serat pangan larut (Badan Standardisasi Nasional, 1992; Asp dkk., 1983 *diacu dalam* Aprilia 2015)

Kertas saring yang akan digunakan dikeringkan terlebih dahulu dalam oven pada suhu 105-110°C selama kurang lebih 1 jam dan dimasukkan ke eksikator selama kurang lebih 10 menit. Sampel ditimbang sebanyak 2 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml, ditambahkan dengan H_2SO_4 1,25% sebanyak 200 ml, dipanaskan sampai mendidih, dan dididihkan selama 30 menit. Sampel selanjutnya disaring dengan kertas saring dan residu yang tersaring dibilas dengan air panas sebanyak 200 ml. Residu kemudian dicuci dengan NaOH 3,25% sebanyak 200 ml. Hasil pencucian tersebut ditampung dalam Erlenmeyer.

Hasil pencucian dalam Erlenmeyer dipanaskan sampai mendidih dan dididihkan selama 30 menit. Selanjutnya, hasil pencucian disaring lagi dengan kertas saring. Residu yang tersaring

dibilas dengan air panas sebanyak 200 ml. Hasil pencucian selama pengujian ditampung sebagai filtrat hasil serat kasar.

Filtrat serat kasar ditambahkan 400 ml etanol 95% hangat (60°C) dan dibiarkan presipitasi selama 1 jam (waktu dapat diperpendek), kemudian disaring dengan kertas saring yang telah dipanaskan dengan oven dan ditimbang beratnya (A). Sebanyak 0,5 gram *celite* dimasukkan ke dalam kertas saring. Selanjutnya dicuci berturut-turut dengan 2x1 ml etanol 78%, 2x10 ml etanol 95%, dan 2x10 ml aseton, kemudian dikeringkan dalam oven sampai berat konstan dan dimasukkan ke dalam eksikator kurang lebih 10 menit, berat ditimbang (B). Kadar serat larut dihitung menggunakan rumus,

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

Keterangan:

A : berat kertas saring (g)

B : berat kertas saring+serat (g)

e. Analisis aktivitas penangkap radikal bebas DPPH (Sasaki dkk., 2007)

1. Pembuatan larutan DPPH 0,2 mM

Serbuk DPPH sebanyak 7,88 mg dilarutkan dalam 100 ml larutan methanol teknis kemudian disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit.

2. Pembuatan blanko

DPPH 0,2 mM diambil sebanyak 1 ml ditambahkan dengan 4 ml larutan methanol teknis, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm.

3. Pengukuran serapan sampel dengan Spektrofotometer Uv-Vis

Sampel diambil sebanyak 1 ml ditambahkan dengan 5 ml methanol teknis, kemudian di vortex. Selanjutnya, campuran diambil 4 ml dan ditambahkan dengan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 ml, kemudian di homogenisasi dengan vortex. Campuran diinkubasi dalam keadaan gelap selama 2 jam. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm. Persen inhibisi dapat dihitung dengan rumus,

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{Abs\ 0 - Abs\ B}{Abs\ B} \times 100$$

Keterangan:

Abs 0 : absorbansi DPPH kontrol

Abst 1 : absorbansi DPPH sampel

f. Analisis senyawa total fenolik

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

Asam galat sebanyak 0,005 g ditimbang secara analitis dalam kertas timbang lalu dimasukkan ke dalam labu ukur. Etanol teknis ditambahkan sebanyak 0,2 ml. Aquades ditambahkan ke dalam labu ukur sampai tanda batas 100 ml (didapatkan larutan asam galat 50 ppm). Larutan dihomogenisasi dengan vortex. Larutan

asam galat 2, 4, 6, 8, 10, 12 ppm dibuat dengan mengambil Larutan Induk Asam Galat sebanyak 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 1,8; 2,4 ml ke dalam tabung reaksi. Aquades ditambahkan ke tabung reaksi hingga volume mencapai 10 ml, kemudian dihomogenisasi dengan vortex.

Larutan asam galat masing-masing konsentrasi diambil sebanyak 0,4 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Reagen Folin Ciocalteu sebanyak 0,4 ml ditambahkan ke larutan, kemudian dihomogenisasi dengan vortex selama 3 menit. Selanjutnya larutan ditambahkan dengan larutan Na_2CO_3 7% (b/v) sebanyak 4 ml, kemudian dihomogenisasi dengan vortex. Aquades ditambahkan hingga volume mencapai 10 ml. Larutan diinkubasi dalam ruangan gelap pada suhu ruang selama 60 menit. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 750 nm untuk menentukan kurva standar asam galat.

2. Pengukuran kandungan total fenolik (Dungir dkk., 2012; Lee dkk., 2013 *diacu dalam* Alfonsius, 2015)

Sampel sari beras hitam sebanyak 0,4 gram dilarutkan dengan metanol teknis sebanyak 10 ml. Larutan tersebut diambil 0,4 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, selanjutnya ditambahkan dengan reagen Folin Ciocalteu sebanyak 0,4 ml. Larutan kemudian dihomogenkan dengan vortex selama 3 menit.

Selanjutnya larutan ditambahkan dengan larutan Na_2CO_3 7% (b/v) sebanyak 4 ml, kemudian dihomogenisasi dengan vortex. Aquades ditambahkan hingga volume mencapai 10 ml. Larutan

diinkubasi dalam ruangan gelap pada suhu ruang selama 60 menit. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 750 nm untuk menentukan kurva standar asam galat. Larutan blanko yang digunakan adalah etanol teknis.

Hasil absorbansi diplotkan terhadap kurva standar asam galat yang dipersiapkan menggunakan asam galat. Kandungan total fenolik dihitung menggunakan rumus sebagai berikut,

$$Y = a + bx$$

Keterangan:

Y : variabel terikat
X : variabel bebas
a : intersep
b : koefisien regresi

4. Perbanyak *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus thermophilus* dan Pembuatan Starter (Ouwehand dkk., 2001 diacu dalam Stella, 2014 dengan modifikasi)

Biakan murni *L. acidophilus* diinokulasikan ke dalam medium *deMan Rogosa Sharpe* (MRS) *broth* yang sudah disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 15 Psi selama 15 menit. Biakan murni *L. acidophilus* sebanyak 1 ose dimasukkan ke dalam MRS *broth*, lalu diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Kultur yang telah diperbanyak kemudian digunakan untuk persiapan *starter*. Tahapan ini dilakukan pula pada biakan murni *Streptococcus thermophilus*.

Biakan murni *L. acidophilus* dan *S. thermophilus* dalam medium cair (*broth*) masing-masing diambil 4 ml, kemudian diinokulasikan ke dalam 20 gram susu skim bubuk dan 92 ml susu skim steril (*starter* 8%).

Selanjutnya starter diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sehingga terbentuk *curd* yang digunakan sebagai starter yang akan diinokulasikan pada susu yang akan difermentasi (*yoghurt* susu). Hal yang sama dilakukan pada starter *yoghurt* sinbiotik sari beras hitam dengan komposisi 20 gram susu skim bubuk dan 92 ml sari beras hitam.

5. Pembuatan dan Fermentasi *Yoghurt* Sinbiotik Sari Beras Hitam dengan Variasi Susu Skim (Legowo, 2005 yang telah dimodifikasi)

Susu skim bubuk sesuai dengan perlakuan yaitu 15, 20, 25% (b/v) ditambahkan dengan gula pasir 7% (b/v) dan karagenan 0,5% (b/v). Selanjutnya campuran tersebut ditambahkan dengan sari beras hitam sesuai dengan perlakuan yaitu 92 ml untuk masing-masing perlakuan, kemudian diaduk sampai homogen dengan gelas pengaduk. Selanjutnya, setiap perlakuan dipasteurisasi atau dipanaskan dengan *hot plate* (panel temperatur 4 dan panel kecepatan 5) serta diaduk dengan *magnetic stirrer* sampai suhu 72°C, ditunggu selama 15 detik.

Suhu campuran sari beras hitam dengan susu skim tersebut kemudian dibiarkan turun hingga 43°C. Campuran dituangkan ke dalam wadah-wadah steril (sudah di sterilisasi) yang sudah disiapkan dan ditambahkan dengan starter *L. acidophilus* dan *S. thermophilus* (starter *yoghurt* sinbiotik sari beras hitam yang sudah dibuat sebelumnya) secara steril dengan perbandingan 1:1 yaitu 8% (v/v). Selanjutnya campuran diaduk hingga homogen dan ditutup dengan rapat. Tahapan selanjutnya yaitu inkubasi setiap perlakuan pada suhu 37°C selama 9 jam di dalam

inkubator. Setelah inkubasi selesai, *yoghurt* yang dihasilkan segera didinginkan dalam lemari es pada suhu 5°C.

6. Pembuatan dan Fermentasi *Yoghurt* Kontrol (Legowo, 2005 yang telah dimodifikasi)

Yoghurt kontrol positif dibuat dengan susu skim bubuk 20 gram dan susu skim cair 92 ml, kemudian campuran ditambahkan dengan gula pasir 7%. Campuran diaduk dengan gelas pengaduk dan selanjutnya dipasteurisasi dengan *hotplate* (panel temperatur 4 dan panel kecepatan 5) dan *magnetic stirrer* sampai pada suhu 72°C, ditunggu selama 15 detik. Selanjutnya, susu ditempatkan dalam wadah yang steril (sudah disterilisasi). Suhu susu ditunggu hingga mencapai 43°C, kemudian ditambahkan dengan starter *L. acidophilus* dan *S. thermophilus* (starter *yoghurt* susu yang sudah dibuat sebelumnya) dengan perbandingan 1:1 yaitu 8% (v/v). Selanjutnya campuran diaduk hingga homogen dan ditutup dengan rapat.

Tahapan selanjutnya yaitu inkubasi setiap perlakuan pada suhu 37°C selama 9 jam di dalam inkubator. Setelah inkubasi selesai, *yoghurt* yang dihasilkan segera didinginkan dalam lemari es pada suhu 5°C. Langkah tersebut juga digunakan untuk pembuatan *yoghurt* kontrol negatif dengan menggunakan sari beras hitam dengan starter yang digunakan adalah starter induk *L. acidophilus* dan *S. thermophilus* masing-masing 4 ml (8%).

7. Parameter Kualitas Fisik *Yoghurt*

Analisis warna dengan Chromamometer (Weaver, 1950 *diacu dalam* Stella, 2014)

Sampel *yoghurt* disiapkan dalam sebuah plastik bening, kemudian *color reader* dinyalakan. Pengukuran yang digunakan yaitu sistem pengukuran L, a, b. Sebelum digunakan untuk mengukur sampel, alat dikalibrasi dengan warna standar CaSO_4 , dipilih warna putih dengan nilai $L = 100,13$; $a = 37,3$; $b = 174,37$ dan hasil kalibrasi disimpan dalam memori. Pengukuran sampel dilakukan dengan menyalakan *color reader* dan dipilih sistem analisis L,a,b. Ujung reseptor *color reader* ditempelkan pada sampel yang akan diuji dan tombol pengujian ditekan. Pengukuran terus dilakukan sebanyak tiga kali untuk masing-masing sampel pada tiga titik yang berbeda. hasil pengukuran berupa nilai L,a,b dicatat kemudian dihitung nilai X dan Y dengan rumus:

$$x = \frac{\bar{a} + 1,75 \bar{L}}{5,645 \bar{L} + \bar{a} - 3,012 \bar{b}}$$

$$y = \frac{1,786 \bar{L}}{5,645 \bar{L} + \bar{a} - 3,012 \bar{b}}$$

8. Uji Kimia *Yoghurt* Sinbiotik

a. Analisis kadar abu, kadar protein, kadar lemak, serat pangan larut air, dan total fenolik

Pengujian kadar abu, kadar protein, kadar lemak, serat pangan larut air, dan total fenolik sesuai dengan pengujian pada uji proksimat pada halaman 28-35.

b. Analisis aktivitas penangkap radikal bebas DPPH Sasaki dkk., 2007 dengan modifikasi)

1. Pembuatan larutan DPPH 0,2 mM

Serbuk DPPH sebanyak 7,88 mg dilarutkan dalam 100 ml larutan methanol teknis kemudian disimpan dalam ruang gelap selama 30 menit.

2. Pembuatan blanko

DPPH 0,2 mM diambil sebanyak 1 ml ditambahkan dengan 3 ml larutan methanol teknis, kemudian diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 517 nm.

3. Pengukuran serapan sampel dengan Spektrofotometer Uv-Vis

Sampel diambil sebanyak 2,5 gram dilarutkan dalam 5 ml larutan methanol teknis. Selanjutnya campuran tersebut disentrifugasi selama 10 menit dengan kecepatan 4000 rpm. Supernatan diambil sebanyak 1 ml dan ditambahkan dengan 6 ml larutan methanol teknis, kemudian dihomogenisasi vortex. Selanjutnya campuran diambil sebanyak 3 ml dan ditambahkan dengan DPPH 0,2 mM sebanyak 1 ml, kemudian dihomogenisasi dengan vortex.

Campuran diinkubasi dalam keadaan gelap selama 2 jam. Absorbansi diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada

panjang gelombang 517 nm. Persen inhibisi dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Konversi absorbansi (A)} = \frac{7}{3} \times \text{Abs 1}$$

$$\text{Konversi absorbansi (B)} = \frac{1}{3} \times A$$

$$\% \text{ inhibisi} = \frac{\text{Abs 0} - \text{Abs B}}{\text{Abs B}} \times 100$$

Keterangan:

Abs 0 : absorbansi DPPH kontrol

Abst 1 : absorbansi DPPH sampel

c. Penentuan nilai pH dengan menggunakan pH meter (AOAC, 1975 diacu dalam Stella, 2014)

pH meter yang akan digunakan untuk pengukuran pH dilakukan standardisasi dengan menggunakan larutan buffer dengan pH 7, kemudian sampel *yoghurt* diuji pHnya dengan menggunakan pH meter. pH meter dicelupkan pada wadah yang sudah berisi masing-masing sampel, kemudian dibaca angka yang tertera pada pH meter. Pengulangan dilakukan sebanyak tiga kali untuk masing-masing sampel.

d. Analisis kadar asam laktat (Badan Standardisasi Nasional, 2009)

Sampel *yoghurt* sebanyak 20 ml ditambahkan dengan 40 ml akuades bebas CO₂, kemudian diaduk merata dan diberikan 2 ml indikator PP, dititrasi dengan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda yang tetap. Total asam dihitung sebagai persen asam laktat dengan rumus:

$$\text{Kadar asam laktat (\%)} = \frac{\text{volume NaOH} \times N \text{ NaOH} \times 90}{\text{Berat sampel (mg)}} \times 100\%$$

e. Analisis Total Padatan (Askar dan Sugiarto, 2005 dengan modifikasi)

Sampel sebanyak 1 gram diletakan secara merata pada cawan, kemudian dianalisis kadar airnya dengan *Moisture Balancing*. Total padatan dihitung dengan rumus sebagai berikut,

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

9. Parameter Kualitas Mikrobiologis Yoghurt

a. Uji viabilitas BAL (Jutono dkk., 1980 diacu dalam Stella, 2014)

Yoghurt yang sudah jadi kemudian diencerkan dengan tingkat pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , dan 10^{-10} . Tahapan dari pengenceran yang dilakukan adalah sebagai berikut, *yoghurt* sebanyak 10 ml diambil dan dimasukkan ke dalam aquadest steril sebanyak 90 ml (pengenceran 10^{-1}). Dalam membuat pengenceran 10^{-2} , larutan dari pengenceran 10^{-1} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam akuades steril 9 ml. Pengenceran 10^{-3} , larutan dari pengenceran 10^{-2} diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam akuades steril 9 ml, begitu seterusnya hingga tingkat pengenceran 10^{-10} dengan cara yang sama.

Sampel *yoghurt* tingkat pengenceran 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , dan 10^{-10} masing-masing diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan ke dalam medium MRS agar yang ditambahkan CaCO_3 dengan metode *pour plate*. Selanjutnya, cawan diputar membentuk angka 8 dan

diteruskan dengan inkubasi 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 adalah yang mempunyai jumlah antara 30-300 koloni per cawan.

b. Perhitungan *Salmonella* (Hocking dkk., 1997 di dalam Dewi, 2014)

Sampel *yoghurt* diambil sebanyak 25 ml dan dimasukkan ke dalam medium laktosa cair sebanyak 225 ml dalam Erlenmeyer yang telah disiapkan, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sampel yang telah diinkubasi selama 24 jam diambil sebanyak 1 ml dan ditumbuhkan dalam medium SCB (*Selenite Cystine Broth*) sebanyak 9 ml, kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Setelah itu, sampel diinokulasikan pada medium SSA (*Salmonella Shigella Agar*) sebanyak 1 ose dengan metode *streak plate*. Sampel dalam medium SSA diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Koloni *Salmonella* pada medium SSA ditunjukkan bagian transparan dengan bagian tengah berwarna hitam.

10. Uji Organoleptik (Kartika dkk., 1987)

Pengujian organoleptik dilakukan dengan uji kesukaan hedonik terhadap sampel yang paling disukai berdasarkan warna, tekstur, aroma, dan rasa. Pengujian dilakukan oleh 30 panelis yang memiliki latar belakang suka terhadap *yoghurt* dan hasil uji diurutkan dari yang paling disukai sampai yang tidak disukai. Skor yang digunakan sebagai berikut:

- 4 = sangat suka
- 3 = suka
- 2 = agak suka
- 1 = tidak suka

11. Analisis Data Hasil Penelitian (Gazperz, 1989)

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisis dengan ANAVA untuk mengetahui apakah terdapat beda nyata antarperlakuan. Apabila terdapat beda nyata antarperlakuan, uji dilanjutkan dengan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT) untuk diketahui letak beda nyata pada setiap perlakuan. Uji DMRT dilakukan pada tingkat kepercayaan 95%. Data diproses dengan SPSS versi 15.