

BAB 3

PELAKSANAAN PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Kimia Hasil Pertanian, Laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian dan Laboratorium Sensoris, Jurusan Teknologi Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Sriwijaya pada bulan November 2019 sampai Agustus 2020.

3.2. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut: 1) *autoclave* (Manitowoc WI 54220, Amerika), 2) alat press, 3) bak fermentor, 4) baskom, 5) cawan aluminium, 6) cawan Petri, 7) desikator (Normax, Eropa), 8) inkubator (Memmert, Jerman), 9) kain saring, 10) kompor (Rinnai 522-C, Jepang), 11) mikro pipet (DragonLAB), 12) neraca analitik (Kenko kk-Lab, Jepang), 13) oven (Memmert S- 400, Jerman), 14) panci, 15) pengaduk, 16) plastik zip lock, 17) termometer (Alla France, France), 18) *Texture Analyzer* (Brookfield, USA), 19) timbangan (Kanita KD-160, Jepang), dan 20) toples.

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini sebagai berikut: 1) air, 2) aquadest, 3) biang protexin, 6) garam, 7) jeruk lemon (lokal), 8) media MRS agar, 9) susu kedelai merk V-soy, 10) susu kerbau rawa dari Pampangan, dan 11) rennet.

3.3. Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Kelompok Faktorial (RAKF) dengan dua faktor perlakuan yaitu, (A) susu kedelai yang terdiri dari tiga taraf perlakuan dan (B) biang protexin yang terdiri dari dua taraf perlakuan. Perlakuan diulang sebanyak 3 kali dengan faktor perlakuan adalah sebagai berikut:

1. Perbandingan susu kerbau : susu kedelai (A) (v/v):

$A_1 = 100\%$ susu kerbau : 0% susu kedelai

$A_2 = 90\%$ susu kerbau : 10% susu kedelai

$A_3 = 80\%$ susu kerbau : 20% susu kedelai

2. Konsentrasi biang protexin (B) (b/v) :

$B_1 =$ protexin $2,5\%$ (b/v)

$B_2 =$ protexin $5,0\%$ (b/v)

3.4. Analisa Data

Data yang diperoleh diolah menggunakan analisis keragaman (ANOVA). Perlakuan yang berpengaruh nyata diuji lanjut menggunakan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) taraf 5%.

Tabel kombinasi perlakuan

Perlakuan	Susu kerbau (g)	Susu kedelai (g)	Protexin (g)	Rennet (g)	Air lemon (g)
A_1B_1	487,5	0	12,5	25	25
A_1B_2	475,0	0	25,0	25	25
A_2B_1	437,5	50	12,5	25	25
A_2B_2	425,0	50	25,0	25	25
A_3B_1	387,5	100	12,5	25	25
A_3B_2	375,0	100	25,0	25	25
Total	2587	300	112,5	150	150

3.5. Cara Kerja

Cara kerja pembuatan keju mozzarella melalui 3 tahap, di antaranya:

1. Persiapan isolat biang protexin
2. Propagasi biang protexin
3. Pembuatan keju mozzarella

3.5.1. Persiapan Isolat Biang Protexin

Cara kerja pembuatan isolat bakteri yang digunakan mengacu pada penelitian Bangun (2009) yang telah dimodifikasi sebagai berikut :

1. Media MRS-*broth* ditimbang sebanyak 6,82 g dan diencerkan ke dalam 100 ml *aquadest*, kemudian diaduk hingga homogen.

2. Media yang telah tercampur kemudian dipanaskan pada *hot plate* dan diaduk hingga mendidih.
3. Media kemudian dimasukkan ke dalam tabung rekasi (18 buah), masing-masing berisi 10 ml.
4. Tabung reaksi ditutup menggunakan *cottonplug* dan disterilisasi.
5. Media disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit di dalam autoklaf.
6. Media didinginkan hingga suhu mencapai 35°C, dan diinokulasi dengan biang protexin yang mengandung bakteri asam laktat.
7. Inkubasi dilakukan pada suhu 37°C selama 24 jam.
8. Pertumbuhan bakteri diketahui ditandai dengan adanya endapan putih pada dasar tabung reaksi tersebut.

3.5.2. Propagasi Biang Protexin

Cara kerja propagasi biang protexin mengacu pada penelitian Widowati dan Misgiyarta (2002) yang telah dimodifikasi, sebagai berikut:

1. 0,35 ml biang protexin dari MRS *broth* dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan ditambahkan 34,65 ml *aquadest* divortex, supernatannya dibuang.
2. *Aquadest* steril ditambahkan hingga 35 ml, divortex dan disentrifuse, kemudian supernatan dibuang.
3. Ditambahkan lagi *aquadest* steril hingga 35 ml, divortex dan starter siap digunakan.
4. 35 ml biang protexin yang siap pakai diinokulasikan dalam susu kerbau sebanyak 315 ml.
5. Susu kerbau diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.
6. Biang protexin siap digunakan.

3.5.3. Pembuatan Keju Mozzarella

Cara kerja pembuatan keju mozzarella menurut Purwadi (2007) dan Wardani (2012), dengan sedikit modifikasi adalah sebagai berikut :

1. Susu kerbau dipasteurisasi sebanyak 3500 g pada suhu 65°C selama 5 menit, lalu 487,5 g susu dimasukkan ke dalam toples A₁B₁, 475 g dimasukkan ke dalam toples A₁B₂, lalu 437,5 g dimasukkan ke dalam toples A₂B₁, lalu 225 g

- dimasukkan ke dalam toples A₂B₂, 387,5 g dimasukkan ke dalam toples A₃B₁ dan 375 g dimasukkan ke dalam toples A₃B₂.
2. Susu kedelai dengan total 300 ml dipasteurisasi pada suhu 63°C selama 30 menit, selanjutnya 50 g susu kedelai dimasukkan ke dalam toples A₂B₁ dan A₂B₂, serta 100 g susu kedelai dimasukkan ke dalam toples A₃B₁ dan A₃B₂. Semua susu dalam toples didinginkan hingga suhu 40°C.
 3. Selanjutnya starter biang protexin dimasukkan sebanyak 12,5 g dimasukkan ke dalam toples A₁B₁, A₂B₁, dan A₃B₁. Susu kedelai sebanyak 25 g dimasukkan ke dalam toples A₁B₂, A₂B₂, dan A₃B₂. Semua toples ditutup dan diinkubasi selama 3 jam.
 4. Kemudian, campuran dituangkan ke dalam wadah berukuran 25 x 17 x 4 cm. lalu rennet sebanyak 25 g dan air jeruk lemon sebanyak 25 g ditambahkan ke dalam setiap wadah. Selanjutnya susu didiamkan selama 1 jam agar terbentuk *curd* yang kompak dan dapat dipotong membentuk kubus berukuran 1 cm x 1 cm x 1 cm.
 5. Kemudian, *curd* dan *whey* yang telah terbentuk dituangkan ke dalam cetakan keju berukuran 30 cm x 30 cm yang telah diberi kain saring, lalu *whey* dibuang.
 6. *Curd* dimasukkan ke dalam plastik *zip lock* dan diberi garam sebanyak 1 g pada setiap perlakuan.
 7. *Curd* direndam dalam air es selama 1 jam.
 8. Keju mozarella yang diperoleh disimpan dalam ruang dingin pada suhu ± 17°C selama ± 24 jam, kemudian dilakukan pengujian.

3.6. Parameter

Parameter yang diamati meliputi karakteristik fisik (tekstur/kekerasan), karakteristik kimia (kadar air, kadar abu dan kadar protein (perlakuan terbaik)), karakteristik mikrobiologi (jumlah mikrobia total) dan karakteristik sensoris (penampakan, aroma dan kekerasan/tekstur).

3.6.1. Tekstur

Analisa tekstur dengan alat *texture analyzer* merek *Brookfield*. Cara kerjanya menurut Faridah *et al.* (2006), adalah sebagai berikut:

1. *Probe* tipe plastik dipasangkan pada alat *texture analyzer*.
2. Jarum dikaitkan pada ujung sampel yang akan diukur teksturnya.
3. *Speed texture analyzer* diatur (*trigger* 3,0 g, *distance* 3,0 mm dan *speed* 0,3 mm/s).
4. *Brook* tipe plastik akan menekan tepat di tengah sampel.
5. Kemudian pada *display* akan tertera angka *peak load* dan *final load* dalam satuan gram *force*.

3.6.2. Kadar Air

Kadar air diukur dengan metode oven berdasarkan AOAC (2005). Cara kerjanya adalah :

1. Cawan aluminium dimasukkan dalam oven selama 30 menit dan didinginkan dalam desikator selama 15 menit kemudian ditimbang berat cawannya.
2. Sampel sebanyak ± 2 g dan dimasukkan ke dalam cawan yang telah diketahui beratnya. Sampel dikeringkan dengan oven pada suhu 105°C sampai dengan berat konstan.
3. Sampel beserta cawan dipindahkan ke dalam desikator selama 15 menit, kemudian sampel beserta cawan ditimbang hingga beratnya konstan yaitu (0,002 mg), apabila tidak ada penurunan berat sampel pada beberapa kali penimbangan setelah pemanasan.
4. Kadar air sampel ditentukan dari berat air yang menguap. Persen kadar air dapat dihitung menggunakan rumus :

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{\text{berat awal (g)} - \text{berat akhir sampel (g)}}{\text{berat awal sampel (g)}} \times 100\%$$

3.6.3. Kadar Abu

Pengukuran kadar abu berdasarkan AOAC (2005), menggunakan *muffle furnace* dengan cara kerja sebagai berikut :

1. Cawan ditimbang beratnya sampai konstan, sampel ditimbang ± 2 g.

2. Sampel tersebut dimasukan ke dalam cawan porselen yang telah diketahui beratnya, kemudian dipijarkan dalam *muffle furnace* pada suhu 550°C hingga berwarna abu keputihan.
3. Setelah sampel berwarna putih, cawan porselen diambil dengan penjepit lalu dimasukkan ke dalam desikator untuk didinginkan.
4. Perhitungan % kadar abu dihitung dengan menggunakan rumus di bawah ini.

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{\text{berat akhir (g)} - \text{berat cawan (g)}}{\text{berat bahan (g)}} \times 100\%$$

3.6.4. Kadar Protein

Analisa kadar protein dengan metode Kjeldahl menurut AOAC (2005), adalah sebagai berikut:

1. Sampel ditimbang sebanyak 0,5 g dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, ditambahkan satu butir selenium dan 3 ml H₂SO₄ ke dalam tabung tersebut.
2. Kemudian tabung yang berisi larutan tersebut dimasukkan ke dalam alat pemanas dengan suhu 410°C dan ditambahkan 10 ml air, ditunggu selama kurang lebih 2 jam atau sampai cairan berwarna hijau bening atau jernih.
3. Larutan yang telah jernih didinginkan dan kemudian ditambahkan 50 ml *akuadest* dan 20 ml NaOH 40% lalu didestilasi.
4. Larutan H₃BO₃ 2% sebanyak 5 ml dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 125 ml, lalu ditambahkan 2 hingga 4 tetes indikator *bromcresol green* 0,1% dan *methyl red* 0,1%, kemudian diletakkan di bawah kondensor pada perangkat alat destilasi.
5. Larutan Na₂S₂O₃ ditambahkan sebanyak 50 ml, kemudian didestilasi hingga tertampung 100-150 ml destilat di dalam Erlenmeyer dengan hasil destilat berwarna hijau kebiruan
6. Tabung kondensor dibilas dengan air yang ditampung dalam Erlenmeyer yang sama.
7. Sampel di dalam Erlenmeyer diencerkan sampai 50 ml, kemudian dititrasi dengan HCl 0,2 N sampai terjadi perubahan warna merah muda yang pertama kalinya.
8. Volume titran dibaca dan dicatat.

9. Selanjutnya dilakukan penetapan blanko.
10. Kadar protein dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\% N = \frac{(\text{mL HCl sampel} - \text{mL HCl Blanko} \times N \text{ HCl} \times \text{volume})}{14,007} \times 100\%$$

Keterangan :

% Protein = % N x faktor konversi

FK = 6,25

3.6.5. Kadar Lemak

Kadar lemak diukur dengan metode Mojonnier (SNI 01 – 2891 – 1992), dengan cara kerja sebagai berikut:

1. Sampel sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam labu Mojonnier dan dilarutkan dengan 10 ml *aquadest* hingga homogen.
2. Sampel yang telah homogen ditambahkan 1,5 ml NH₄OH dan digojok.
3. Sampel ditambahkan dengan 10 ml etanol dan digojok.
4. Sampel ditambahkan 25 ml dietil eter dan digojok.
5. Sampel ditambahkan 25 ml petroleum eter dan digojok selama 1 menit.
6. Sampel yang telah homogen didiamkan hingga terbentuk 2 fase yang berbeda.
7. Sampel dipisahkan dan dituangkan ke dalam labu lemak yang telah diketahui bobotnya.
8. Ekstraksi kembali dilakukan dengan penambahan 5 ml etanol, dietil eter dan petroleum eter masing-masing 15 ml.
9. Sampel dan labu lemak diupkan dalam oven dengan suhu 105°C hingga bobot constant.
10. Sampel beserta labu lemak dipindahkan ke dalam desikator selama 15 menit. Kemudian sampel beserta labu lemak ditimbang hingga beratnya konstan (tidak ada penurunan berat sampel pada beberapa kali penimbangan setelah pemanasan).
11. Kadar lemak dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar lemak (\%)} = \frac{W1 - W2}{W} \times 100\%$$

Keterangan :

W_1 = Bobot labu lemak setelah dioven – bobot labu lemak awal (g)

W_2 = Bobot sampel awal (g)

3.6.6. Populasi Bakteri Asam Laktat

Menurut Fardiaz (1992), pengukuran total bakteri asam laktat (BAL) dilakukan dengan menggunakan metode hitungan cawan (*Total Plate Count*) dengan cara kerja sebagai berikut :

1. Metode yang digunakan yaitu dari pengenceran 10^{-1} (sampel 5 g + 45 ml aquadest steril), 1 ml hasil pengenceran diambil dengan menggunakan pipet 1 ml kemudian ditambah *aquadest* 9 ml.
2. Kemudian medium MRS agar steril yang telah didinginkan sampai suhu 50°C dimasukkan ke dalam cawan tersebut. Medium sebanyak ± 12 ml dituangkan ke dalam cawan. Selama penuangan medium, cawan ditutup dan tidak boleh dibuka terlalu lebar untuk mengurangi kontaminasi dari luar.
3. Segera setelah dituangkan, cawan Petri digerakkan di atas meja secara hati-hati untuk menyebarkan sel-sel BAL secara merata, yaitu digerakkan melingkar atau gerakan seperti angka 8.
4. Setelah agar memadat, cawan-cawan tersebut diinkubasi di dalam inkubator dengan posisi terbalik pada suhu 37°C selama 24 jam. Kemudian dilakukan penghitungan jumlah mikroba (CFU/ml) dengan *colony counter*.

3.6.6. Uji Hedonik

Menurut Pratama (2011), uji hedonik digunakan untuk mengetahui tingkat kesukaan pada sampel uji. Uji ini menggunakan panelis semi terlatih dengan jumlah 25 orang panelis. Panelis diminta untuk memberikan penilaian kesukaan dengan memberikan skor dalam skala berikut : 1) sangat tidak suka, 2) tidak suka, 3) suka, dan 4) sangat suka.