

BAB IV

PROSEDUR

4.1. Pengumpulan dan Determinasi Bahan

Kopi arabika (*Coffea arabica*) yang diperoleh dari perkebunan Legok Nyenang, Desa Mekar Manik, Kecamatan Cimencyan Bukit Palasari Kabupaten Bandung dengan kondisi buah yaang matang ditandai dengan buah berwarna merah. Susu skim, Sukrosa (gulaku), *Lactobacillus acidophilus* diperoleh dari SITH-ITB. Determinasi bahan dilakukan di Laboratorium Taksonomi Tumbuhan Departemen Biologi FMIPA UNPAD dengan tujuan untuk memastikan identitas tanaman yang akan digunakan sebagai bahan uji.

4.2. Penapisan Fitokimia

4.2.1. Alkaloid

Simplisia atau ekstrak ditambahkan 5 mL amoniak dan digerus, kemudian dimasukkan 20 mL kloroform lalu digerus kuat, campuran disaring dan filtratnya digunakan untuk percobaan. Sebagian larutan tersebut diteteskan pada kertas saring dan disemprotkan pereaksi dragendorff. Reaksi positif ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga. Sebagian lain dari larutan tersebut dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asam klorida 10%, dipisahkan lapisan air atau fraksi asamnya, campuran dibagi kedalam dua tabung reaksi. Tabung pertama diberikan pereaksi Dragendorff, hasil positif ditunjukkan

dengan terbentuknya endapan berwarna merah bata bertahan selama kurang lebih 15 menit. Tabung kedua diberikan pereaksi Mayer, hasil positif ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih yang terbentuk kurang lebih 15 menit (Farnsworth, 1996: 253).

4.2.1. Flavonoid

Simplisia sebanyak satu spatel dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air suling 2 mL, kemudian dicampur dengan serbuk magnesium dan asam klorida 2 N, selanjutnya dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Filtrat ditambahkan amil alkohol kemudian dikocok hingga timbul warna merah, kuning, jingga pada lapisan amil alkohol menandakan adanya flavonoid (Farnsworth, 1996: 263-264).

4.2.2. Saponin

Simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan air secukupnya lalu dipanaskan di atas penangas air selama 30 menit, dan disaring. Filtrat kemudian dibiarkan sampai dingin, lalu dikocok kuat-kuat selama 10 detik dengan arah vertikal. Hasil positif sampel, timbulnya busa setinggi kurang lebih 1 cm yang bertahan selama 10 menit menandakan adanya saponin (Farnsworth, 1996: 257).

4.2.3. Tanin

Simplisia sebanyak satu spatel dimasukkan ke dalam tabung reaksi lalu ditambahkan air suling 2 mL, kemudian dipanaskan di atas penangas air dan disaring. Filtrat hasil penyaringan kemudian ditambahkan larutan gelatin 1%

sebanyak 3-4 tetes. Hasil positif sampel apabila ada endapan putih menandakan adanya tanin (Farnsworth, 1996: 264).

4.2.4. Kuinon

Simplisia sebanyak satu spatel ditempatkan pada tabung reaksi dan ditambahkan 2 mL, kemudian dipanaskan diatas penangas air, kemudian disaring. Filtrat ditambahkan larutan NaOH 5%. Hasil positif sampel, dengan terbentuknya warna jingga menandakan positif kuinon (Farnsworth, 1996: 265).

4.2.5. Steroid dan triterpenoid

Simplisia sebanyak satu spatel digerus dengan eter lalu disaring. Filtrat ditempatkan dalam cawan penguap kemudian dibiarkan menguap sampai kering. Kemudian Kedalam cawan penguap ditambahkan 3-4 tetes pereaksi Liebermann-Burchard. Terjadinya warna merah-ungu menandakan positif triterpenoid, sedangkan warna hijau-biru menunjukkan positif steroid (Farnsworth, 1996: 259).

4.2.6. Monoterpen dan seskuioterpen

Sebanyak 1 gram simplisia atau 2 mL ekstrak disari dengan eter, kemudian filtratnya ditempatkan dalam cawan penguap dan dibiarkan menguap hingga kering, lalu ditambahkan vanili 10% dalam asam sulfat pekat. Hasil positif monoterpen dan sesquiterpen ditunjukkan dengan timbulnya warna-warna (Febriyanti, 2014: 21).

4.2.7. Polifenol

Simplisia atau ekstrak sebanyak 2 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan larutan pereaksi besi (III) klorida ke dalam filtrat. Timbulnya warna hijau atau biru-hijau, merah ungu, biru hitam hingga hitam menandakan positif

fenolat atau timbul endapan coklat menandakan adanya polifenolat (Farnsworth, 1966: 264).

4.3. Formulasi

Formulasi minuman kopi probiotik yang akan dibuat pada penelitian kali ini dibuat dua tahap. Tahap pertama, dilakukan pembuatan minuman kopi probiotik dengan tujuan untuk menentukan cita rasa minuman kopi probiotik yang nikmat, sehingga formulasi dibuat dengan membedakan jumlah konsentrasi susu skim yang digunakan.

Tabel IV.1. Orientasi penentuan jumlah konsentrasi susu skim

Formulasi	Waktu Fementasi (Jam)	Bahan			
		Bakteri Asam Laktat (% v/v)	Susu Skim (% b/v)	Sukrosa (% b/v)	Gelatin (% b/v)
F1	18	2	15	15	0,025
F2		2	20	15	0,025
F3		2	25	15	0,025

Tahap kedua, setelah didapatkan formulasi konsentrasi susu skim terbaik yaitu 25%, selanjutnya dilakukan formulasi dengan mengubah konsentrasi bakteri asam laktat dan waktu fermentasi, hal ini dilakukan dengan tujuan agar mendapatkan formulasi minuman kopi probiotik yang memiliki cita rasa yang nikmat dan sesuai dengan standar SNI yang meliputi aspek: kadar asam, protein, lemak, total bakteri asam laktat.

Tabel IV.2. Orientasi penentuan jumlah konsentrasi bakteri asam laktat dan waktu fermentasi

Formulasi	Waktu Fermentasi (Jam)	Bahan			
		Bakteri Asam Laktat (% v/v)	Susu Skim (% b/v)	Sukrosa (% b/v)	Gelatin (% b/v)
F1	18	2	25	15	0,025
F2		4	25	15	0,025
F3		6	25	15	0,025
F4	21	2	25	15	0,025
F5		4	25	15	0,025
F6		6	25	15	0,025
F7	24	2	25	15	0,025
F8		4	25	15	0,025
F9		6	25	15	0,025

4.4. Pembuatan Minuman Kopi Probiotik

4.4.1. Pembuatan starter

Pembuatan starter dilakukan dengan memodifikasi metode Trivalianza (2004). Kultur bakteri yang digunakan (*Lactobacillus acidophilus*) pertama-tama dipindahkan dari kultur stok ke dalam tabung reaksi berisi NaCl fisiologis steril, kemudian diinokulasikan ke dalam media yang mengandung 5% susu skim bubuk (0,5 gram susu skim dalam 10 ml aqua yang telah dipasterurisasi), selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Kultur yang dihasilkan disebut sebagai kultur induk. Selanjutnya sebanyak 2% (v/v) kultur induk diinokulasikan ke media yang mengandung 5% susu skim yaitu sebanyak dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C sehingga dihasilkan kultur antara. Kultur antara diinokulasikan sebanyak 2% (v/v) ke dalam media yang mengandung susu skim steril dengan penambahan glukosa 3% (b/v), kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk mendapatkan kultur kerja.

4.4.2. Pembuatan serbuk kopi

Kopi arabika sebanyak 50 gram lalu diserbukkan dengan penggilingan kemudian ditimbang.

4.4.3. Ekstraksi kopi arabica

Kopi diekstraksi dengan menggunakan alat mokapot yaitu dengan cara menuangkan air sampai tanda batas, lalu mengisi kopi serbuk sampai batas yang ditentukan. Selanjutnya alat dipanaskan, ketika sudah panas, air kopi akan keluar dan tertampung dalam wadah penampungnya.

4.4.4. Pembuatan minuman kopi probiotik

1) Pembuatan minuman kopi

Hasil ekstraksi kopi sebanyak 100 mL selanjutnya ditambah susu skim, sukrosa dan gelatin yang dicampurkan hingga didapatkan sediaan minuman kopi. Pembuatan minuman kopi dilakukan dengan menggunakan formulasi yang berbeda-beda. Pembuatan minuman kopi dilakukan untuk menentukan cita rasa kopi terbaik dengan menggunakan variasi konsentrasi susu skim bubuk yaitu 15%, 20% dan 25%, sukrosa sebanyak 15% dan gelatin sebanyak 0,025%. Selanjutnya setelah didapat formulasi terbaik dilakukan pembuatan kopi dengan jumlah konsentrasi bakteri yang berbeda yaitu 2%, 4% dan 6%.

2) Fermentasi

Proses fermentasi dilakukan dengan cara menambahkan kultur kerja pada minuman kopi yang telah dibuat. Proses fermentasi ini dilakukan dua kali, pertama dilakukan untuk menentukan formulasi cita rasa terbaik yaitu dengan cara mengfermentasi minuman kopi dengan konsentrasi susu skim bubuk yang berbeda

(15, 20, 25 %) dengan menambahkan sebanyak 2% (v/v) kultur kerja pada minuman kopi. Kedua, setelah didapat formulasi terbaik yaitu berdasarkan dari cita rasa yang paling nikmat, selanjutnya dilakukan fermentasi dengan menggunakan konsentrasi bakteri asam laktat yang berbeda-beda (2, 4 dan 6)% dan waktu fermentasi yang berbeda pula (18, 21 dan 24) jam.

4.5. Evaluasi Sediaan Minuman Kopi Probiotik

4.5.1. Organoleptik

Uji ini dilakukan secara visual dengan mengidentifikasi penampilan fisik sediaan yang meliputi warna, bau, bentuk dan rasa.

4.5.2. Uji hedonik

Uji Hedonik dilakukan melalui uji hedonik. Panelis yang digunakan sebanyak 30 orang. Pengujian dilakukan terhadap karakteristik warna, tekstur, rasa dan aroma. Uji hedonik yang digunakan yaitu metode skoring pada kisaran 1-7, yaitu 1= sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = agak tidak suka, 4 = agak suka, 5 = suka, dan 6 = sangat suka 7 = amat sangat suka (Soekarto, 1985).

Uji hedonik dilakukan pada saat panelis tidak dalam kondisi lapar atau kenyang, yaitu sekitar pukul 14.00-16.00. Syarat-syarat panelis adalah sebagai berikut (SNI, 01-2346-2006:3-8):

1. Tertarik terhadap uji hedonik dan mau berpartisipasi;
2. Konsisten dalam mengambil keputusan;
3. Berbadan sehat, bebas dari penyakit THT, tidak buta warna serta gangguan psikologis;

4. Tidak menolak terhadap makanan yang akan diuji (tidak alergi);
5. Tidak melakukan uji 1 jam sesudah makan;
6. Menunggu minimal 20 menit setelah merokok, makan permen karet, makanan dan minuman ringan;
7. Tidak melakukan uji pada sakit influenza dan sakit mata;
8. Tidak memakan makanan yang sangat pedas pada saat makan siang, jika pengujian dilakukan pada waktu siang hari;
9. Tidak menggunakan kosmetik seperti parfum dan lipstik serta mencuci tangan dengan sabun yang tidak berbau pada saat dilakukan uji bau;
10. Disarankan mencuci mulut dengan air putih pada saat melakukan uji rasa.
11. Tidak memiliki masalah pada indra pengecap/perasa.
12. Pernah mencicipi kopi dan yoghurt.

Data yang diperoleh dari lembar penilaian ditabulasi dan ditentukan nilai mutunya dengan mencari hasil rerata pada setiap panelis pada tingkat kepercayaan 95%. Untuk menghitung interval nilai mutu rerata dari setiap panelis digunakan rumus sebagai berikut (SNI, 01-2346-2006:6):

$$\{P \bar{x} - (1,96 \times s/\sqrt{n})\} \leq \mu \leq \{\bar{x} + (1,96 \times s/\sqrt{n})\} \cong 95\% \quad (1)$$

4.5.3. Nilai pH

Pengukuran nilai pH dilakukan menggunakan pH meter (Fardiaz, 1989). Sebelum dilakukan pengukuran, pH meter harus dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan penyangga (buffer) 4,0; 7,0 dan 9,0. Selanjutnya dilakukan pengukuran terhadap larutan sampel dengan mencelupkan elektroda pada pH

meter ke dalam larutan sampel dan biarkan beberapa saat sampai diperoleh pembacaan yang stabil.

4.5.4. Viskositas

Pengukuran Viskositas dengan menggunakan alat viskometer Brookfield RV. Cara evaluasi yaitu sampel sediaan dimasukkan ke dalam wadah yang tersedia pada alat, kemudian diletakkan dibawah alat viskometer Brookfield dengan spindel nomor 61 dengan putaran yang diatur mulai dari 5, 10, 20, 50 dan 100 rpm, lalu dilanjutkan dari kecepatan sebaliknya. Masing-masing pengukuran dibaca skalanya (Lachman dkk, 1994).

4.5.5. Stabilitas

Sediaan disimpan pada 2 suhu yang berbeda yaitu pada suhu kulkas (8-10°C) dan suhu kamar (25-28°C) selama 2 minggu, kemudian dilakukan pengamatan organoleptis (warna, homogenitas, aroma, rasa).

4.5.6. Penetapan Kadar Kafein

1) Ekstraksi kandungan kafein

Minuman Kopi Probiotik ditimbang sebanyak 1 gram kemudian dimasukkan ke dalam gelas kimia 150 mL, lalu ditambahkan 150 mL aquades panas sambil diaduk. Larutan kopi kemudian disaring menggunakan kertas saring dan ditampung didalam erlenmeyer, filtratnya dimasukkan kedalam corong pisah lalu diekstraksi sebanyak 3 kali dengan 25 mL kloroform. Lapisan bawahnya diambil kemudian, kemudian ekstrak kloroform diuapkan diatas penangas air hingga kloroform menguap seluruhnya (Fitri, 2008).

2) Pembuatan larutan baku kafein

Kafein standar ditimbang sebanyak 250 mg kemudian dilarutkan dengan air suling panas secukupnya, lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 250 mL dan ditambahkan air suling sampai tanda batas, kemudian diambil sebanyak 10 mL dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL lalu ditambahkan air suling sampai mencapai tanda batas dan dikocok (Arwangga, 2016).

3) Pembuatan kurva standar

Pertama dilakukan pemipetan larutan standar 100 ppm sebanyak 4, 5, 6, 7, 8, 9 mL lalu diencerkan menjadi 10 mL. Larutan standar diukur absorbansinya hingga diperoleh panjang gelombang maksimal.

4) Penentuan kadar kafein

Ekstrak kafein dari sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, lalu diencerkan dengan mengambil 1 mL sampel kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 10 mL ditambahkan air suling hingga tanda batas, lalu diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 273 nm (Fitri, 2008 dan Arwangga, 2016).

4.6. Evaluasi Sediaan sesuai SNI

4.6.1. Kadar protein

Tahap pertama ditimbang 1 g sampel masukkan ke dalam labu Kjeldahl, kemudian ditambahkan 15,00 g K_2SO_4 , 1 ml larutan katalis $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ atau 1 g campuran katalis selen, 8-10 butir batu didih dan 25 ml H_2SO_4 pekat. Kedua, campuran dipanaskan dalam pemanas listrik sampai mendidih, sehingga larutan menjadi jernih agak kehijau-hijauan. Prosedur tersebut dilakukan didalam lemari

asam. Selanjutnya dibiarkan dingin dan encerkan dengan air suling secukupnya. Ketiga, ditambahkan 75 mL larutan NaOH 30% (diperiksa dengan indikator PP sehingga campuran menjadi basa). Keempat disulingkan selama 5 – 10 menit atau saat larutan telah mencapai kira-kira 150 mL, dengan penampung destilat adalah 50 mL larutan H₃BO₃ 4%, dibilas ujung pendingin dengan air suling, titar larutan campuran destilat dengan larutan HCl 0,1 M dan dikerjakan secara blanko (Badan Standar Nasional, 2009).

$$\text{Protein} = \frac{(V_1 - V_2) \times N \times 14,007 \times 6,38 \times 100\%}{W} \quad (2)$$

Keterangan:

V₁ = Volume HCl 0,1 N untuk titrasi sampel (mL)

V₂ = Volume HCl 0,1 N untuk titrasi blanko (mL)

N = Normalitas larutan HCl

W = bobot sampel (mg)

14,007 = bobot atom nitrogen

6,38 = faktor protein untuk susu.

4.6.2. Kadar Lemak

Penentuan kadar lemak dilakukan dengan metode soxhlet. Sampel yang telah dikeringkan ditimbang secara seksama sebanyak 1 gram, kemudian dibungkus dengan kertas saring bebas lemak. Kertas saring tersebut dimasukkan ke dalam siphon. Sokhletasi dilakukan dengan pemanasan langsung secara elektrik. Pemanasan dilakukan hingga 3 (tiga) jam. Heksana yang berada didalam labu alas bulat dituangkan kedalam cawan porselen kering yang telah dikonstankan, kemudian diuapkan hingga fraksi lemak bebas dari heksana. Cawan yang telah berisi lemak kemudian ditimbang seksama dan ditetapkan kadar lemaknya (AOAC, 1990).

4.6.3. Kadar total gula

Penentuan kadar total gula dilakukan dengan metode *Luff Schoorl*. Prinsip metode ini adalah gula-gula pereduksi (glukosa, maltosa) dapat mereduksi Cu^{2+} menjadi Cu^+ . Kemudian Cu^{2+} yang tidak tereduksi (sisa) dapat dititer secara iodometri. Jumlah Cu^{2+} asli ditentukan dalam suatu percobaan blanko dan dari perbedaannya dapat ditentukan jumlah gula dalam larutan yang dianalisis (Yenrina, 2015:23).

1) Pengambilan sampel

Sampel ditimbang sebanyak 10 gram dan dimasukkan ke dalam labu takar 250 ml kemudian tambahkan aquades sampai batas dan kocok. Larutan disaring dan dipipet 50 ml, filtratnya dimasukkan ke dalam labu takar 250 ml. Kemudian ditambahkan 10 mL larutan Pb asetat setengah basa sambil dikocok. Kemudian ditambahkan Na_2HPO_4 10% 15 mL, selanjutnya tambahkan aquades sampai dengan tanda batas, kocok dan dibiarkan sekitar 30 menit, kemudian saring.

2) Penentuan kadar gula sebelum inversi

Sample dipipet sebanyak 10 mL kedalam erlenmayer 500 mL berpenutup kemudian ditambahkan 15 mL air, batu didih dan 25 mL larutan Luff Schoorl kemudian larutan dipanaskan sampai mendidih dan dididihkan terus pada *waterbath*. Selanjutnya dinginkan dengan menggunakan es, setelah dingin ditambahkan 10 – 15 ml larutan KI 30% dan 25 ml larutan H_2SO_4 25% dengan perlahan-lahan, larutan tersebut segera di titrasi dengan $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 0.1 N dan larutan kanji 0.5%, kanji baru ditambahkan pada saat warna telah berubah menjadi

kuning. Lakukan prosedur pengerjaan terhadap blanko dengan mengganti larutan sampel/filtrat dengan air.

Perhitungan

$$\text{Larutan Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \text{ yang digunakan} = \text{ml blanko} - \text{ml sampel} = z \quad (3)$$

(Z lihat pada tabel Luff school untuk melihat kandungan gulanya)

$$\text{Kadar Gula sebelum inversi (\%)} = \text{mg gula} \times \text{FP} \times 100\% \quad (4)$$

3) Penentuan kadar gula sesudah Inversi

Filtrat dipipet 50 ml dan dimasukkan ke dalam labu takar 100 mL, kemudian ditambahkan 5 ml HCl 25%. Labu dimasukkan ke dalam penangas air 60 – 70⁰ C dan dibiarkan selama 10 menit dalam penangas air (untuk menginversi gula-gula). Angkat dan dinginkan labu kemudian tambahkan NaOH 30% hingga merah jambu atau pH = 7,4. Selanjutnya, dipipet 10 ml filtrate dari persiapan sampel ke dalam erlenmeyer 500 ml bertutup, ditambahkan 15 ml air, batu didih dan 25 ml larutan luff school. 7. Panaskan sekitar 2 menit sampai mendidih dan didihkan terus selama 10 menit dalam water bath. Larutan dipanaskan sampai mendidih dan didihkan terus pada *waterbath*. Selanjutnya dinginkan dengan menggunakan es, setelah dingin. Setelah dingin tambahkan 15 ml KI 30% dan 25 ml larutan H₂SO₄ 25% dengan perlahan-lahan, larutan tersebut segera di titrasi dengan Na₂S₂O₃ 0.1 N dan larutan kanji 0.5%, kanji baru ditambahkan pada saat warna telah berubah menjadi kuning. Lakukan prosedur pengerjaan terhadap blanko dengan mengganti larutan sampel/filtrat dengan air.

Perhitungan:

$$\text{Kadar Sukrosa} = (\% \text{ gula sesudah inverse} - \% \text{ gula sebelum inverse}) \times 0.95 \quad (5)$$

Kadar gula dihitung sebagai sukrosa = % gula sesudah inversi x 0,95 (6)

4.6.4. Total asam laktat

Sampel dipipet sebanyak 1 mL, kemudian dilarutkan dengan aquadest sebanyak 50 mL dan ditambahkan 3 tetes indikator p.p dan dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda (Badan Standar Nasional, 2009).

$$\text{Jumlah asam} = \frac{V \times N \times FP \times 90}{\text{mL sampel}} \quad (7)$$

Keterangan:

FP = Faktor Pengenceran

V = Volume larutan NaOH (mL)

N = Normalitas larutan NaOH

1mL 0,1 N NaOH = 0,0090 gram (90 mg) asam laktat

4.6.5. Total bakteri asam Laktat

Dilakukan persiapan dan homogenisasi, kemudian dibuat tingkat pengenceran sesuai kebutuhan dengan menggunakan larutan NaCl fisiologis, selanjutnya pipet masing-masing 1ml dari pengenceran 10^{-8} sampai 10^{-9} ke dalam cawan petri steril secara duplo, lalu di tuangkan 12 ml sampai 15 ml media panthotenat yang masih cair dengan suhu $(45 \pm 1) ^\circ\text{C}$ ke dalam masing-masing cawan petri, digoyangkan cawan petri dengan hati-hati (putar dan goyang ke depan, ke belakang, ke kanan dan ke kiri) sehingga sampel dan pembenihan tercampur merata dan memadat, dikerjakan pemeriksaan blanko dengan mencampur air pengencer untuk setiap sampel yang diperiksa, biarkan sampai dibiarkan sampai campuran dalam cawan petri memadat, dimasukkan semua

cawan petri dengan posisi terbalik ke dalam lemari pendingin pada suhu (37 ± 1) °C selama 24 jam, dicatat pertumbuhan koloni pada setiap cawan petri yang petri yang mengandung 25 koloni sampai 250 koloni setelah 48 jam (Badan Standar Nasional, 2009).

$$\text{Jumlah bakteri asam laktat} = n \times F \quad (8)$$

Keterangan:

n = Rata-rata koloni dari dua cawan petri dari satu pengenceran (koloni/mL).

F = Faktor pengenceran dari rata-rata koloni yang dipakai.