

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian dengan judul pengaruh variasi periode pemanasan pada suhu 70°C terhadap total bakteri, pH dan Intensitas Pencoklatan susu telah dilaksanakan sejak tanggal 11 April sampai 28 Juni 2013 di Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang.

#### **3.1. Materi**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah susu sapi segar dari Kelompok Tani Ternak (KTT) Rejeki Lumintu Gunung Pati, *Nutrient Agar* (NA), aquades pH 7 dan alkohol 70 %. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah gelas ukur, botol 100 ml, *waterbath*, termometer, *stopwatch*, timbangan elektrik, inkubator, kertas hisap/tisu, *aluminium foil*, autoklaf, oven, pH meter, cawan petri, spektrofotometer, *micropipete*, kuvet, dan *microtube*.

#### **3.2. Metode Penelitian**

Metode penelitian yang dilakukan yaitu persiapan sampel, pembuatan media *nutrient agar* (NA), pemanasan susu dengan suhu dan periode yang telah ditentukan, pengujian parameter yang terdiri dari pengujian total bakteri, pengujian nilai pH dan pengujian intensitas pencoklatan pada susu dan analisis data yang dilakukan yaitu menggunakan analisa deskriptif.

### 3.2.1. Penyiapan sampel

Penyiapan sampel dilakukan dengan cara menyiapkan alat dan bahan. Botol 100 ml untuk wadah pemanasan sampel disterilkan dengan merebus botol 100 ml dalam uap air (dikukus) sampai suhu 100°C selama 30 menit. Cawan untuk wadah menumbuhkan bakteri dibersihkan dengan merebus cawan pada suhu 100°C selama 10 menit, kemudian mengeringkan dan membungkus cawan dengan kertas, selanjutnya melakukan sterilisasi cawan dengan oven pada suhu 170°C selama 1 jam. *Microtube* dan *Micropipet* dibersihkan dengan cara direbus didalam air mendidih selama 10 menit kemudian dipanaskan dalam oven dengan suhu 90°C selama 5 jam. Ruangan dan inkubator disiapkan dengan melakukan sterilisasi. Sterilisasi ruangan dan inkubator dilakukan dengan cara fumigasi, yaitu menggunakan bubuk kalium permanganat sebanyak 5 gram kemudian dilarutkan menggunakan cairan formalin sebanyak 10 ml dan didiamkan selama 24 jam sehingga prosedur ini mampu mengurangi resiko terhadap kontaminasi bakteri.

### 3.2.2. Pembuatan media *nutrient agar* (NA)

Media *Nutrient Agar* (NA) untuk pengujian total bakteri memiliki bentuk padat seperti agar yang berupa campuran senyawa kimia pepton serta ekstrak daging. Pepton dan ekstra daging tersebut merupakan nutrisi utama bagi mikroorganisme untuk bertumbuh dan berkembang. Pembuatan media NA digambarkan dengan Ilustrasi 1 yaitu diawali dengan menimbang serbuk NA

sebanyak 11,5 gram menggunakan timbangan elektrik, kemudian melarutkan NA yang sudah ditimbang ke dalam 500 ml aquades. Larutan tersebut diaduk secara cepat dengan suhu 100°C hingga mendidih menggunakan alat *heat stirrer* agar larutan tercampur sempurna, setelah selesai media tersebut disterilisasi pada suhu 120°C selama 15 menit menggunakan *autoklaf*. Media NA merupakan salah satu media yang umum digunakan dalam prosedur bakteriologi seperti uji biasa dari air, produk pangan, untuk membawa stok kultur, untuk pertumbuhan sampel pada uji bakteri dan untuk mengisolasi organisme dalam kultur murni dengan cara disterilisasi dengan autoklaf pada 121°C selama 15 menit (Fathir dan Fuad.,2009)



Ilustrasi 1. Pembuatan Media *Nutrient Agar* (NA)

### 3.2.3. Pemanasan susu

Pemanasan susu yang digambarkan pada ilustrasi 2 dilakukan dengan cara mengisi 100 ml susu ke dalam botol yang sudah disterilkan. Botol tersebut diberi label T1, T2, T3 sebagai ulangan dalam 1 periode eksperimen. Setiap botol dipasang tutup yang diberi sedikit lubang agar tidak terlalu berlebihan tekanan dan panas dalam botol. Dua botol tambahan disediakan untuk tempat sampel susu, botol pertama dipasang termometer dan dimasukkan ke dalam *waterbath* bersama dengan sampel sebagai acuan untuk mengukur suhu susu dalam botol. Botol kedua tidak diberi perlakuan pemanasan sebagai kontrol perlakuan. Botol dipanaskan dalam *waterbath* pada suhu susu 70°C selama periode yang telah ditentukan. Dimasukkan Sampel susu ke dalam *waterbath* kemudian mengamati perubahan waktu pemanasan dalam periode waktu 300, 600, 900, 1.200 ,1.500 ,1.800 dan 2.100 detik.

Sampel susu yang telah dipanaskan kemudian didinginkan dengan menggunakan air es hingga suhu turun menjadi 10°C agar sampel dapat segera diuji. Pengujian sampel setelah dipanaskan meliputi uji total bakteri, pH dan Intensitas Pencoklatan susu. Menurut SNI 3141.1:2011 susu pasteurisasi adalah susu segar, susu rekonstitusi, susu rekombinasi yang telah mengalami proses pemanasan pada temperatur 6°C –66°C selama minimum 30 menit atau pada pemanasan 72°C selama minimum 15 detik, kemudian segera didinginkan sampai 10°C, selanjutnya diperlakukan secara aseptis dan disimpan pada suhu maksimum 4,4°C. Hasil yang diperoleh dari pengamatan pemanasan susu yang dilakukan dicatat pada buku dan diketik menggunakan laptop.



Ilustrasi 2. Proses Pemanasan dan Pendinginan Cepat

### 3.3. Pengujian Parameter

Pengujian Parameter pada penelitian yang dilakukan meliputi pengujian Total Bakteri, pengujian Nilai pH dan pengujian Intensitas Pencoklatan.

#### 3.3.1. Pengujian total bakteri

Pengujian total bakteri sesuai dengan ilustrasi 3 dilakukan dengan cara menanamkan sampel susu yang sudah diencerkan pada pengenceran  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  dan  $10^6$  ke dalam media *Nutrient Agar* (NA). Pengenceran tersebut menggunakan aquades dengan perbandingan 1 ml sampel susu atau 1 ml dari pengenceran sebelumnya dimasukkan ke dalam 9 ml aquades, Sehingga untuk mendapatkan pengenceran  $10^2$  memerlukan 1 ml sampel dari pengenceran sebelumnya yaitu  $10^3$  yang dimasukkan ke dalam aquades 9 ml. Prosedur ini dilakukan hingga mendapatkan pengenceran  $10^6$ . Metode pencawanan dilakukan dengan cara mengkulturkan ke dalam media NA 1 ml sampel dan dilakukan secara duplo yaitu 2 cawan petri untuk setiap ulangan T1, T2, T3 dan T0 atau

sampel susu segar. Setelah selesai pencawanan kemudian sampel diinkubasi pada suhu  $35^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam (Rofi'i, 2009). Koloni yang tumbuh kemudian dihitung sesuai dengan SNI 3141.1:2011 yaitu antara 25-250 cfu/ml



Ilustrasi 3. Pengujian Total Bakteri

### 3.3.2. Pengujian nilai pH

Pengujian nilai pH susu diuji menggunakan pH meter. Langkah pertama sebelum menguji pH susu yaitu mempersiapkan pH meter kemudian dibersihkan dengan aquades. Setelah dibersihkan kemudian pH meter dikalibrasi dengan cairan buffer pada pH 7 dan pH 4. Setelah kalibrasi menunjukkan angka yang tepat pada alat sesuai dengan buffer pH 7 dan pH 4 kemudian pH meter dibilas menggunakan aquades. Sampel susu yang akan diuji diukur sebanyak 10 ml, sampel susu diambil dari susu yang tidak diberi perlakuan serta sampel susu yang

diberi perlakuan untuk membandingkan nilai pH sebelum dan sesudah dipanaskan. Sampel diberi pH meter sedikit diaduk kemudian dibaca angka yang ditunjukkan angka digital pada pH meter (Wahyudi, 2006). Air susu yang segar dan baik kualitasnya mempunyai pH sekitar 6,5-6,8 (Adnan, 1984).



Ilustrasi 4. Pengujian Nilai pH

### 3.3.3. Intensitas pencoklatan

Pengujian Intensitas Pencoklatan atau intensitas pencoklatan pada susu menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 420 nm. Sebelumnya, larutan fosfat buffer 7,4 dibuat dengan menimbang sodium dihidrogen fosfat (pH 4) sebanyak 7,8 g yang dilarutkan ke dalam aquades sebanyak 500 ml. Kemudian menimbang 17,907 gram sodium hidrogen fosfat (pH  $\pm$  9) yang dilarutkan ke dalam aquades sebanyak 500 ml, mengambil larutan sodium dihidrogen fosfat sebanyak 100 ml, menambahkan dan mengaduk larutan sodium hidrogen fosfat sedikit demi sedikit hingga menunjukkan nilai pH 7,4. Selanjutnya mengambil sampel susu sebelum dan sesudah pemanasan masing-masing sebanyak 30  $\mu$ l dan menambahkan larutan fosfat buffer sebanyak 2970  $\mu$ l ke



dalam tabung. Kemudian memasukkan sampel ke dalam spektrofotometer dan hasilnya akan terlihat (Sun *et al.*, 2006<sup>b</sup>).



Ilustrasi 5 . Pengujian Intensitas Pencoklatan

### 3.4. Analisis Data

Hasil dari penelitian dianalisis dengan analisa deskriptif. Analisa deskriptif bertujuan untuk menggambarkan masalah keadaan atau peristiwa yang terjadi menggunakan tabel, gambar atau grafik dan dijelaskan menggunakan kalimat atau paragraf.

Statistik deskriptif adalah bagian dari statistika yang mempelajari cara pengumpulan data dan penyajian data sehingga mudah dipahami. Statistika deskriptif hanya berhubungan dengan hal menguraikan atau memberikan keterangan-keterangan mengenai suatu data atau keadaan dengan kata statistika



deskriptif berfungsi menerangkan keadaan, gejala, atau persoalan. Penarikan kesimpulan pada statistika deskriptif (jika ada) hanya ditujukan pada kumpulan data yang ada (Hasan, 2001).