

## **BAB III**

### **MATERI DAN METODE**

Penelitian dilakukan pada bulan Maret 2017. Penelitian dilakukan di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian, Universitas Diponegoro, Semarang.

#### **1.1. Materi Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu susu sapi segar yang diperoleh dari Kelompok Studi Ternak dan Perah Fakultas Peternakan dan Pertanian Unniversitas Diponegoro, Semarang. Bibit kefir atau *kefir grains* yang berasal dari Rumah Kefir Ungaran, Semarang. Medium *de Man Ragosa and Shape Agar* (MRSA), medium *Potato Dextrose Agar* (PDA), indikator *phenolphtalein* (PP) 1%, NaCl fisiologis 0,85%, NaOH 0,1 N, dan aquades. Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu oven, *autoclave*, inkubator, tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan petri, erlenmeyer 20 ml, erlenmeyer 1000 ml, buret, *colony counter*, pipet mikro, tip, pipet tetes, aluminium foil, *plastic wrap*, saringan, termometer, pengaduk, *vortex*, gelas plastik, timbangan analitik, panci, kompor, kertas dan cup untuk uji mutu hedonik.

## 1.2. Metode Penelitian

Metode penelitian terdiri dari desain percobaan, hipotesis percobaan, prosedur penelitian, pengujian parameter dan analisis data. Metode tersebut saling berkaitan satu sama lain dan dilakukan secara berurutan.

### 3.2.1. Desain Percobaan

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah secara eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan perlakuan lama fermentasi kefir, yaitu T1 : Lama Fermentasi 12 jam, T2 : Lama Fermentasi 24 jam, T3 : Lama Fermentasi 36 jam dan T4 : Lama Fermentasi 48 jam. Masing-masing perlakuan dilakukan pengulangan sebanyak 5 kali. Kombinasi perlakuan dan ulangan dapat dilihat pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Kombinasi Perlakuan dengan Ulangan Penelitian

Ulangan (U)	Perlakuan lama fermentasi kefir			
	T1	T2	T3	T4
1	T1U1	T2U1	T3U1	T4U1
2	T1U2	T2U2	T3U2	T4U2
3	T1U3	T2U3	T3U3	T4U3
4	T1U4	T2U4	T3U4	T4U4
5	T1U5	T2U5	T3U5	T4U5

Keterangan:

T1	: Lama fermentasi kefir 12 jam	U1	: Ulangan ke-1
T2	: Lama fermentasi kefir 24 jam	U2	: Ulangan ke-2
T3	: Lama fermentasi kefir 36 jam	U3	: Ulangan ke-3
T4	: Lama fermentasi kefir 48 jam	U4	: Ulangan ke-4
		U5	: Ulangan ke-5

Model matematis rancangan percobaan yang diterapkan adalah:

$$Y_{ij} = \mu + i + ij$$

Keterangan:

$Y_{ij}$  = Hasil pengamatan dari perlakuan ke- $i$  (1,2,3,4) dan ulangan ke- $j$  (1, 2, 3,4, 5)

$\mu$  = Nilai tengah perlakuan

$i$  = Pengaruh perlakuan ke- $i$  (1,2,3,4)

$ij$  = Pengaruh galat substitusi perlakuan ke- $i$  (1,2,3,4) dan ulangan ke- $j$  (1, 2, 3, 4, 5)

### 3.2.2. Hipotesis

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

$H_0 : \mu_1 = \mu_2$  = Tidak terdapat pengaruh lama fermentasi terhadap keasaman, total bakteri asam laktat, total khamir, dan mutu hedonik kefir.

$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2$  = Sekurang-kurangnya terdapat satu pengaruh lama fermentasi terhadap keasaman, total bakteri asam laktat, total khamir, dan mutu hedonik kefir.

Kriteria pengujian analisis statistik yang digunakan adalah:

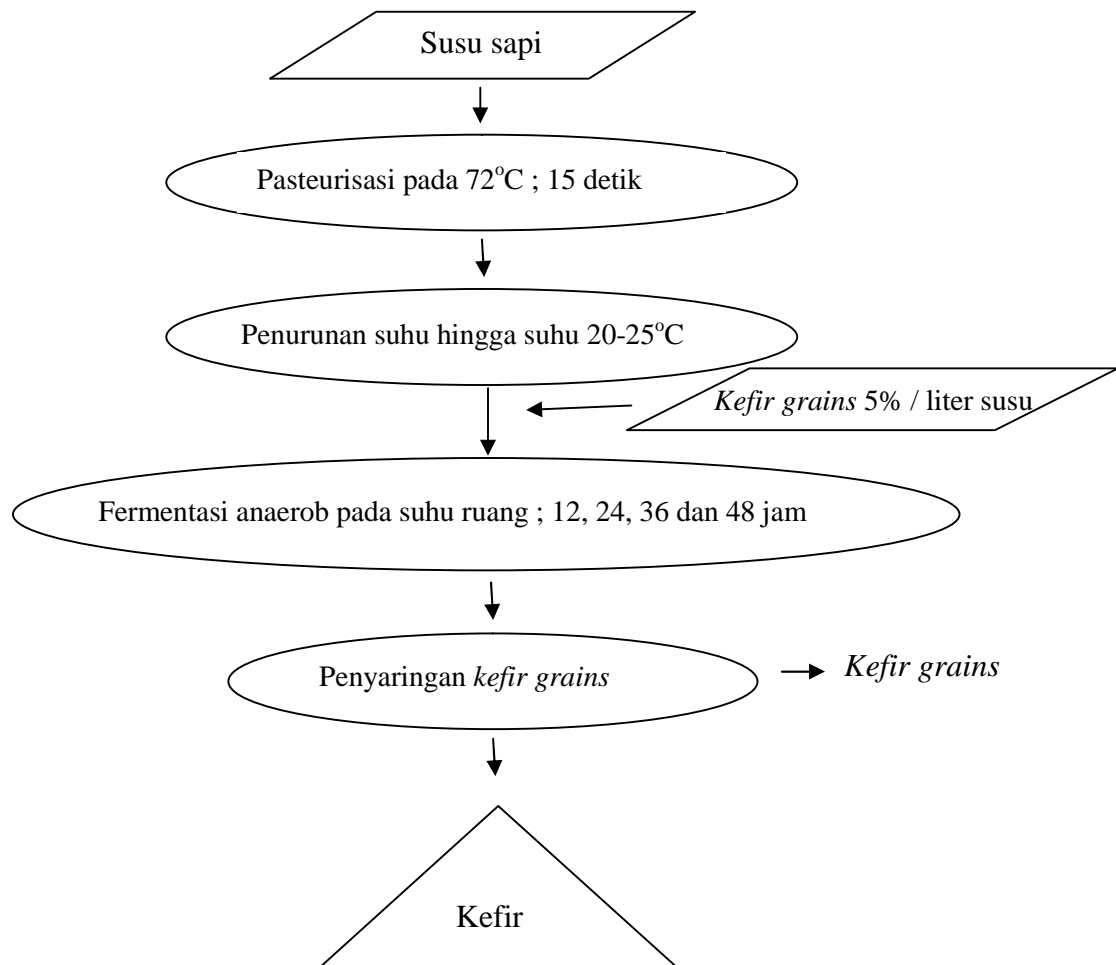
$P_{hitung} < P_{tabel}$ , maka  $H_0$  diterima dan  $H_1$  ditolak

$P_{hitung} > P_{tabel}$ , maka  $H_0$  ditolak dan  $H_1$  diterima

### 3.2.3. Prosedur Penelitian

Pembuatan kefir diawali dengan proses pasteurisasi susu sapi segar pada suhu  $72^\circ\text{C}$  selama 15 detik kemudian dilakukan penurunan suhu hingga mencapai suhu ruang. Tahap selanjutnya yaitu pengukuran jumlah susu yang digunakan setiap percobaan di setiap perlakuan dan dilakukan penambahan biji kefir atau *kefir grains* sebanyak 5% dari total susu yang digunakan dalam liter dan diaduk perlahan hingga rata. Kemudian dilakukan fermentasi menggunakan wadah tertutup pada suhu ruang dan di tempat yang gelap atau kedap cahaya. Lama

fermentasi kefir yaitu sesuai dengan perlakuan yang meliputi 12 jam, 24 jam, 36 jam dan 48 jam serta dilakukan penyaringan *kefir grains* sesuai perlakuan lama fermentasi. Selanjutnya dilakukan pengamatan sesuai parameter yang telah ditentukan. Detail pembuatan kefir dapat dilihat pada Ilustrasi 1.



**Ilustrasi 1.** Diagram Alir Pembuatan Kefir (Otes and Cagindi, 2003)

### 3.2.4. Pengujian Parameter Penelitian

Parameter yang diuji adalah keasaman, total bakteri asam laktat, total khamir dan mutu hedonik kefir.

#### 3.2.4.1. Pengujian Keasaman

Pengukuran keasaman kefir dilakukan dengan menghitung kadar asam laktat dengan menggunakan metode titrasi (Jannah *et al.*, 2014). Kefir yang akan diukur keasamannya diambil sebanyak 20 ml untuk dititrasi. Kemudian sampel kefir ditetesi indikator *phenolphthalein* (PP) 1% sebanyak 2 tetes. Sampel kemudian dititrasi dengan menggunakan NaOH 0,1 N sampai terlihat perubahan warna sampel menjadi warna merah muda konstan. Rumus yang digunakan dalam perhitungan keasaman kefir yaitu:

$$\text{Kadar asam} = \frac{V_1 \times N \times B}{V_2 \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan :

V1 = Volume NaOH (ml)

V2 = Volume sampel (ml)

N = Normalitas NaOH (0,1 N)

B = Berat molekul asam laktat (90)

#### 3.2.4.2. Total Bakteri Asam Laktat (BAL) (Aristya *et al.*, 2013<sup>a</sup>)

Pengujian total bakteri asam laktat dilakukan dengan proses pengenceran hingga  $10^7$  yang kemudian diuji menggunakan metode hitungan cawan. Medium yang digunakan yaitu medium *de Man Rogosaand Shape Agar* (MRSA). Pengujian dilakukan dengan mengambil 10 ml sampel kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 90 ml NaCl fisiologis 0,85% sebagai pengenceran  $10^1$ .

Pengenceran selanjutnya dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 1 ml dari pengenceran  $10^1$  dan dipindahkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml larutan NaCl fisiologis 0,85% sebagai pengenceran  $10^2$ . Langkah tersebut dilakukan hingga pengenceran  $10^7$ . Pada pengenceran  $10^5 - 10^7$  dilakukan pencawanan dengan mengambil 1 ml sampel dari masing-masing pengenceran kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri dan dilakukan secara duplo. Tutup rapat cawan petri agar tidak terjadi kontaminasi, kemudian sebanyak 15 ml medium MRSA bersuhu  $50^\circ\text{C}$  dimasukkan ke dalam cawan petri dengan cara membuka sedikit tutup cawan untuk mengurangi kontaminasi dari luar. Cawan langsung digerakkan diatas meja secara hati-hati setelah dilakukan penuangan medium untuk menyebarkan sel-sel bakteri asam laktat secara merata dengan cara menggerakkannya membentuk angka delapan. Jika medium sudah memadat, cawan tersebut diinkubasi dengan menggunakan inkubator pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam dalam posisi cawan terbalik. Hasil analisis mikrobiologi dilaporkan dengan menggunakan *Standard Plate Count*.

#### **3.2.4.3. Total Khamir (Aristya *et al.*, 2013<sup>a</sup>)**

Pengujian total khamir dilakukan dengan menggunakan pengenceran hingga  $10^6$  dan menggunakan medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) untuk media pertumbuhan khamir. Pengujian dilakukan dengan mengambil 10 ml sampel kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi 90 ml NaCl fisiologis 0,85% sebagai pengenceran  $10^1$ . Pengenceran selanjutnya dilakukan dengan mengambil sampel sebanyak 1 ml dari pengenceran  $10^1$  dan dipindahkan ke dalam tabung

reaksi berisi 9 ml larutan NaCl fisiologis 0,85% sebagai pengenceran  $10^2$ . Langkah tersebut dilakukan hingga pengenceran  $10^6$ . Pada pengenceran  $10^4 - 10^6$  dilakukan pencawanan dengan mengambil 1 ml sampel dari masing-masing pengenceran kemudian dipindahkan ke dalam cawan petri dan dilakukan secara duplo. Cawan petri kemudian ditutup rapat agar tidak terjadi kontaminasi, kemudian sebanyak 15 ml medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) bersuhu  $50^\circ\text{C}$  dimasukkan ke dalam cawan petri dengan cara membuka sedikit tutup cawan untuk mengurangi kontaminasi dari luar. Cawan langsung digerakkan di atas meja secara hati-hati setelah dilakukan penuangan medium dengan cara menggerakkannya membentuk angka delapan. Jika medium sudah memadat, cawan tersebut diinkubasi dengan menggunakan inkubator pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam dalam posisi cawan terbalik. Perhitungan total khamir dilakukan dengan menggunakan *colony counter* (Fardiaz, 1993).

#### **3.2.4.4. Uji Hedonik (Safitri dan Swarastuti, 2011)**

Pengujian tingkat kesukaan kefir dilakukan dengan menggunakan metode uji hedonik yang meliputi keasaman, kekentalan dan *overall* kesukaan. Metode pengujiannya dilakukan dengan memberi kode tiap perlakuan yang diberikan menggunakan angka 3 digit berdasarkan tabel random untuk memperkecil sifat subyektif. Kemudian membuat instruksi kerja (kuisisioner) yang berisi petunjuk yang mencakup informasi, instruksi dan respon panelis. Pada bagian informasi ditulis keterangan tentang nama panelis, tanggal pengujian, nama/ jenis sampel yang diuji. Pada bagian instruksi dituliskan pemberian tugas dan cara melakukan

penilaian atau cara menyampaikan respon. Pada bagian respon, dituliskan penilaian kesan panelis terhadap sampel yang disajikan yaitu: sangat suka, suka, agak suka, cukup suka, dan tidak suka. Selama penilaian disiapkan peralatan untuk tempat sampel dan gelas berisi air minum untuk berkumur sebelum melakukan pengujian sampel. Setelah penilaian panelis selesai, data pengamatan dari skala hedonik menjadi skala numerik sebagai berikut: 1 = sangat tidak suka, 2 = tidak suka, 3 = cukup suka, 4 = suka, 5 = sangat suka.

### **3.2.5. Analisis Data**

Data hasil pengujian keasaman, total BAL, dan total khamir yang diperoleh, dilakukan analisis data sidik ragam yaitu *Analysis of Variance* (Anova) untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh perlakuan. Apabila terdapat pengaruh yang nyata maka dilakukan uji lanjut Wilayah Ganda Duncan dengan taraf 5% untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan tersebut (Gomez dan Gomez, 1995). Sementara itu hasil uji mutu hedonik kefir dianalisis dengan menggunakan Uji *Kruskal Wallis*. Apabila ada pengaruh yang signifikan maka diuji lanjut dengan menggunakan uji lanjut *Man Whitney* (Kartika, 1988).