

## BAB III

### METODA PENELITIAN

#### 3.1 Metoda Percobaan

Rancangan analisis data pada penelitian ini menggunakan faktorial dalam Rancangan Acak Kelompok (RAK), desain faktorialnya 4 x 4 dengan tiga kali ulangan.

##### 3.1.1 Rancangan Percobaan

Desain faktorial 4 x 4 dengan 3 kali ulangan dapat dilihat pada Tabel 3.1.

Tabel 3.1. Desain Faktorial 4 X 4 dengan 3 Kali Ulangan

Konsentrasi DHA (d)	d0 ( 0 % )	d1 ( 1 % )	d2 ( 2 % )	d3 ( 3 % )
Penyimpanan hari ke-(t)				
0				
1				
2				
3				

Variabel atau faktorialnya sebagai berikut:

1. Konsentrasi DHA (d) yang mempunyai 4 taraf yaitu: d0 (konsentrasi DHA 0 %), d1 (konsentrasi DHA 1 %), d2 (konsentrasi DHA 2 %) dan d3 (konsentrasi DHA 3 %).

Lama penyimpanan (t) yang mempunyai 4 taraf yaitu: t0 (hari ke-0), t1 (hari ke-1), t2 (hari ke-2) dan t3 (hari ke-3).

Dengan demikian, banyaknya perlakuan yang dicobakan sebanyak  $4 \times 4 = 16$  perlakuan. Kombinasi perlakuan disusun sebagai berikut :

d0t0	d1t0	d2t0	d3t0
d0t1	d1t1	d2t1	d3t1
d0t2	d1t2	d2t2	d3t2
d0t3	d1t3	d2t3	d3t3

Percobaan diulangi sebanyak 3 kali, dengan demikian terdapat 48 unit percobaan. Bagan percobaan disusun sebagai berikut:

d0t0	d3t1	d2t2	d1t2	d1t1	d0t2	d1t3	d0t1
d3t2	d1t1	d2t3	d0t3	d3t3	d1t1	d2t0	d2t3
d0t1	d0t0	d1t0	d3t0	d0t1	d0t3	d2t1	d1t2
d0t2	d2t0	d3t2	d2t1	d2t2	d1t2	d0t0	d3t2
d1t0	d3t0	d0t3	d3t1	d0t2	d1t3	d2t3	d2t1
d3t3	d2t1	d1t0	d2t2	d1t3	d3t3	d0t1	d3t0

### 3.1.2 Rancangan Analisis Data

Percobaan ini menggunakan rancangan analisis dua faktor dalam rancangan acak lengkap Faktorial RAL, dengan persamaan statistik :

$$Y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + \epsilon_{ij} + \delta_{ijk}$$

Keterangan:

$Y_{ijk}$  = Nilai pengamatan pada ulangan ke-k dalam lama penyimpanan ke-j yang memperoleh konsentrasi DHA ke-i

$\mu$  = Nilai tengah umum (nilai tengah populasi)

$\tau_i$  = Pengaruh konsentrasi DHA ke-i.

$\beta_j$  = Pengaruh lama penyimpanan ke-j.

$\epsilon_{ij}$  = Pengaruh galat pada lama penyimpanan ke-j yang memperoleh konsentrasi DHA ke-i .

$\delta_{ijk}$  = Pengaruh galat pada pengamatan ke-k dalam lama penyimpanan ke-j yang memperoleh konsentrasi DHA ke-i

Untuk mengetahui pengaruh masing-masing faktor, maka dibuat analisis varian pengaruh penambahan asam dokosaheksaenoat (DHA) terhadap ketahanan susu pasteurisasi flavor *strawberry* yang diperlihatkan pada Tabel 3.2.

Tabel 3.2. Analisa Varian Pengaruh Penambahan Asam Dokosaheksaenoat (DHA) terhadap Ketahanan Susu Pasteurisasi Flavor *Strawberry*

Sumber Keragaman	Derajat Bebas (DB)	Jumlah Kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	$F_{hitung}$	$F_{tabel}$ 5 %
Konsentrasi DHA	$r-1 = 3$	JKP	KTP	KTP/KTG	$(v1, v3)$
Lama penyimpanan	$t-1 = 3$	JKK	KTK		
Galat 1	$(r-1)(t-1) = 9$	JKG1	KTG1	KTG1/KTG2	$(v3, v4)$
Galat 2	$st(r-1) = 32$	JKG2	KTG2		
Total	$srt-1 = 47$				

Berdasarkan data analisa varian, maka dapat ditentukan daerah penolakan hipotesisnya yaitu:

- a.  $H_0$  ditolak jika  $F_{hitung} > F_{tabel}$

Dugaan bahwa konsentrasi DHA berpengaruh terhadap ketahanan susu pasteurisasi flavor *strawberry*.

- b.  $H_0$  diterima jika  $F_{hitung} < F_{tabel}$

Dugaan bahwa konsentrasi DHA tidak berpengaruh terhadap ketahanan susu pasteurisasi flavor *strawberry*.

Berdasarkan kaidah keputusan di atas dapat disimpulkan bahwa jika  $H_0$  diterima, maka perlakuan yang diuji tidak berbeda nyata atau semua perlakuan yang dicobakan memberikan pengaruh yang sama sehingga tidak perlu lagi melakukan pengujian lanjutan. Namun jika  $H_0$  ditolak, berarti perbedaan diantara perlakuan sangat nyata atau paling sedikit ada satu perlakuan yang mempengaruhi ketahanan susu pasteurisasi flavor *strawberry* sehingga nilai rata-ratanya berbeda dengan yang lain.

## 3.2 Alat dan Bahan

### 3.2.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini yaitu peralatan gelas, pemanas listrik, lemari pendingin, pengaduk mekanis, inkubator, neraca analitik, milkana, mixer, oven, pH-meter, termometer dan autoklaf.

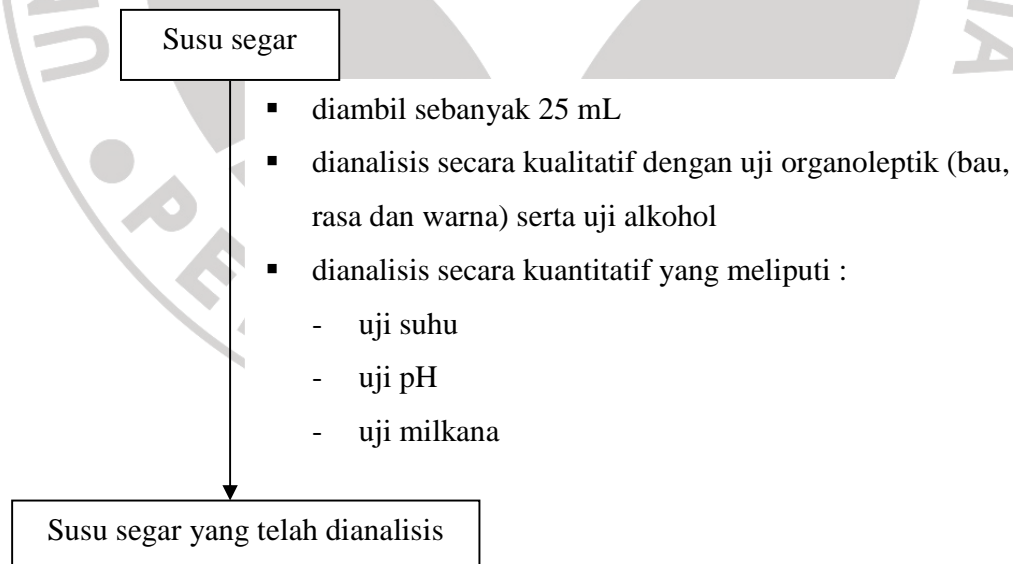
### 3.2.2 Bahan

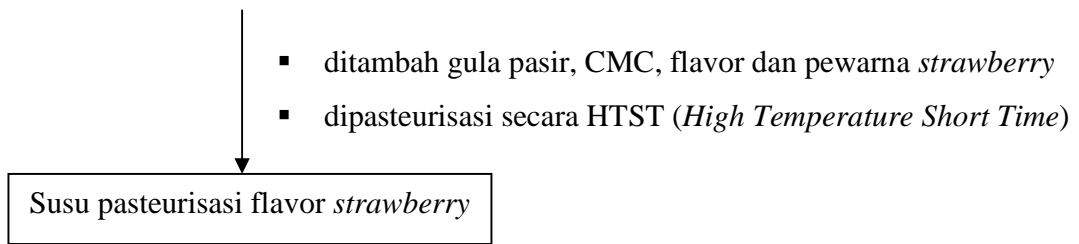
Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi susu segar, gula pasir, CMC (*Carboxy Methyl Cellulose*), flavor *strawberry*, pewarna *strawberry* (ponceau 4 R), Driphorm<sup>®</sup>HiDHA<sup>®</sup>50, larutan ringer, *Plate Count Agar* (PCA) dan alkohol 70 %.

### 3.3 Bagan Alir Penelitian

Bagan alir penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.1-3.2.

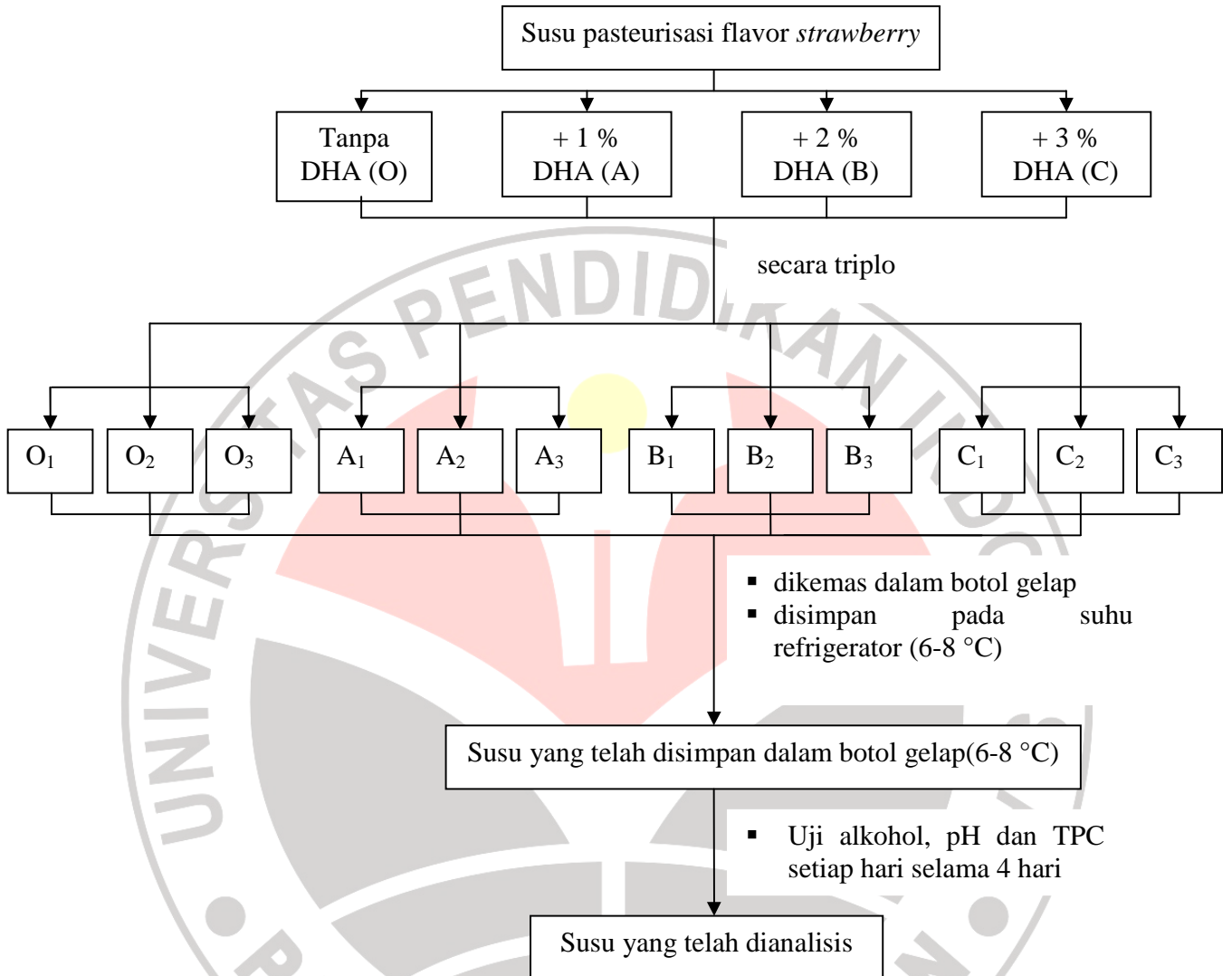
#### 1. Pembuatan Susu Pasteurisasi Flavor *Strawberry*





Gambar 3.1. Tahapan Pembuatan Susu Pasteurisasi Flavor *Strawberry*

2. Penambahan DHA dan Uji Ketahanan Susu Pasteurisasi Flavor *Strawberry* yang Terfortifikasi DHA



(Tahapan pengujian ketahanan susu dilakukan setiap hari setelah proses produksi selama 4 hari dengan pengulangan sebanyak 3 kali)

Gambar 3.2. Tahapan Penambahan DHA dan Uji Ketahanan Susu Pasteurisasi Flavor *Strawberry*

### 3.4 Cara Kerja

#### 3.4.1 Penyiapan Bahan Baku

Pada awal penelitian dilakukan analisis secara kualitatif dan kuantitatif terhadap susu segar yang digunakan sebagai bahan baku dalam proses pembuatan susu pasteurisasi flavor *strawberry*. Kedua analisis dilakukan untuk menjaga kualitas bahan baku yang akan sangat mempengaruhi kualitas akhir dari produk susu pasteurisasi flavor *strawberry* yang dihasilkan. Bahan baku diperoleh dari TPK (Tempat Pelayanan Koperasi) para anggota KPBS.

Pengujian secara kualitatif dilakukan dengan uji organoleptik yang dilakukan tester KPBS dengan menggunakan panca indera sebagai sarana pengujian untuk rasa, bau dan warna. Pengujian secara kualitatif juga dilakukan dengan menambahkan 2 mL alkohol 70 % pada 2 mL susu segar yang terdapat dalam tabung reaksi. Pengujian tersebut bertujuan untuk mengetahui keberadaan bakteri secara kasar. Pengujian secara kuantitatif meliputi uji suhu dengan termometer, uji pH dengan pH-meter dan uji milkana. Pengujian dengan alat milkana bertujuan untuk menentukan kadar zat-zat yang terkandung di dalam bahan baku. Pengujian alat tersebut meliputi *fat* (lemak), SNF (*Solid Non Fat*/bahan kering tanpa lemak), *density* (berat jenis/BJ) dan protein. Tahapan pengujian secara kuantitatif dengan menggunakan milkana yaitu:

- a. Susu segar dimasukkan ke dalam wadah plastik berukuran 5 mL dan diaduk hingga homogen. Susu yang akan dianalisis tidak boleh dalam keadaan dingin. Bila susu dalam keadaan dingin maka susu dihangatkan.



- b. Wadah plastik dimasukkan ke dalam selang penyedot milkana kemudian tombol enter dipijit. Selang akan menyedot sampel sebanyak 5 mL.
- c. Mesin milkana akan bekerja untuk mendeteksi kandungan zat yang telah ditetapkan alat tersebut dalam susu segar.
- d. Setelah dideteksi, mesin mengembalikan sampel pada wadah plastik (tidak ada susu yang dibuang).
- e. Perintah “*print*” dipilih pada layar milkana. Keluaran yang dihasilkan berupa struk yang berisi kadar zat-zat yang terdapat dalam susu murni.

#### **3.4.2 Proses Pembuatan Susu Pasteurisasi Flavor *Strawberry* yang Terfortifikasi**

##### **DHA**

Setelah melewati pengujian awal secara kualitatif dan kuantitatif di laboratorium, susu murni ditimbang dan disimpan dalam bak penampung untuk dialirkan ke *Plat Cooler* (PC) hingga suhu mencapai 4°C. Kemudian susu ditampung di *storage tank* dan dialirkan ke dalam *mixing tank* untuk mengukur jumlah susu yang akan diproduksi menjadi susu pasteurisasi. Selain digunakan untuk mengukur jumlah susu yang akan diproduksi, *mixing tank* juga digunakan sebagai tempat menambahkan gula pasir, stabilizer (CMC), pewarna ponceau 4R, dan perasa *strawberry* sambil diaduk. Kemudian campuran dialirkan ke *Plat Heat Exchanger* (PHE) Regeneratif I untuk dipanaskan pada suhu 60-65°C. Kemudian susu dialirkan ke dalam *homogenizer* untuk dihomogenisasi. Setelah itu susu dipasteurisasi melalui PHE pasteurisasi. Metode pasteurisasi yang digunakan adalah HTST (*High*

*Temperature Short Time*) oleh karena itu pada *holding tube* ditahan selama 15 detik. Suhu kemudian diturunkan hingga 30-40°C melalui PHE Regeneratif II. Kemudian susu pasteurisasi flavor *strawberry* didinginkan pada suhu 4°C melalui PC lalu dipisahkan dan dicampurkan dengan serbuk DHA dengan konsentrasi yang berbeda yaitu 1 %, 2 % dan 3 % dengan cara diaduk hingga homogen. Produk DHA yang digunakan mengandung EPA dan vitamin C. Setelah homogen, susu pasteurisasi flavor *strawberry* yang terfortifikasi DHA dikemas dalam botol gelap. Setelah dikemas, susu pasteurisasi flavor *strawberry* disimpan pada suhu refrigerator (6-8 °C).

### 3.4.3 Uji Ketahanan Susu

Susu pasteurisasi flavor *strawberry* dalam botol gelap diuji daya simpannya selama 4 hari setelah tanggal produksi. Setiap pengujian dilakukan sebanyak 3 kali. Pengujian ketahanan susu pasteurisasi flavor *strawberry* yang terfortifikasi DHA yaitu:

#### 1. Uji Jumlah Bakteri

Pengujian untuk menentukan jumlah bakteri terdiri dari dua yaitu:

##### a. Uji Alkohol

Sampel dipipet sebanyak 2 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 2 mL alkohol 70 % kemudian dikocok. Bintik-bintik putih (gumpalan) di sekitar dinding tabung diamati.

##### b. Uji TPC (Total Plate Count)

Uji TPC ditujukan untuk menentukan jumlah mikroorganisme yang terdapat dalam susu dengan metoda hitungan cawan. Pekerjaan yang dilakukan harus selalu dekat dengan api untuk menghindari kontaminan mikroorganisme dari luar yang tidak dikehendaki. Sel mikroba yang masih hidup ditumbuhkan pada medium agar, maka sel mikroba tersebut akan berkembang biak dan membentuk koloni yang dapat dilihat langsung dengan indera mata tanpa menggunakan mikroskop.

Sebelum melakukan pengujian, semua alat dan bahan yang digunakan harus disterilisasi terlebih dahulu di dalam autoklaf pada tekanan 1,5 bar dan suhu 121 °C selama  $\pm 2$  jam. Pada hari ke-0 hingga hari ke-1 sampel diencerkan menjadi pengenceran 1:1000 dan 1:10000 sedangkan hari ke-2 menjadi pengenceran 1:10000 dan 1:100000. Pada hari ke-3 sampel diencerkan menjadi pengenceran 1:100000 hingga 1:1000000.

Sebanyak 3 buah tabung reaksi yang berisi larutan ringer diletakkan secara berderet sesuai dengan urutan pengenceran untuk  $10^{-3}$  dan  $10^{-4}$ . Sampel dikocok lalu 0,1 mL dipindahkan dengan menggunakan pipet yang steril ke dalam tabung reaksi 1 dan dikocok dengan menggunakan pengocok mekanis. Setelah itu 0,1 mL pada tabung reaksi 1 dipindahkan dengan menggunakan pipet yang steril ke dalam tabung reaksi 2 dan dikocok dengan menggunakan pengocok mekanis. Selanjutnya 0,1 mL pada tabung reaksi 2 dipindahkan dengan menggunakan pipet yang steril ke dalam tabung reaksi 3 dan dikocok dengan menggunakan pengocok mekanis. Kemudian dengan menggunakan pipet steril 0,1 mL sampel pada tabung reaksi 3 dipindahkan ke dalam cawan petri bertanda  $10^{-4}$ , dan 1 ml ke dalam cawan petri yang bertanda  $10^{-3}$ .

Sebagai kontrol, larutan ringer dalam tabung reaksi yang tidak ditambah sampel diambil sebanyak 1 mL dengan menggunakan pipet yang steril dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang steril. Untuk pengenceran  $10^{-4}$  dan  $10^{-5}$  menggunakan 4 deretan tabung reaksi sedangkan  $10^{-5}$  dan  $10^{-6}$  menggunakan 5 deretan tabung reaksi. Prosedur yang sama dilakukan untuk setiap sampel.

Tiap 25 mL *Plate Count Agar* (PCA) dituangkan ke dalam masing-masing cawan petri yang sudah berisi larutan sampel. Campuran di dalam cawan petri diratakan dengan digerakkan searah gerakan jarum jam yang dilanjutkan dengan gerakan berlawanan dengan arah jarum jam, atau dengan gerakan seperti angka delapan. Masing-masing perlakuan tersebut dilakukan sebanyak 5 kali agar larutan sampel dan media PCA bercampur dengan baik. Selama pencampuran, tutup cawan dijaga agar tidak terkena campuran larutan sampel dan media tersebut. Cawan-cawan tersebut dibiarkan pada posisi horizontal sampai mengeras. Setelah media mengeras, cawan-cawan petri tersebut dibalik hingga posisi tutupnya berada di bawah dan dimasukkan ke dalam inkubator  $37^{\circ}\text{C}$  selama 48 jam. Setiap koloni yang terlihat dihitung.

## 2. Uji pH (Derajat Keasaman)

Uji pH dilakukan dengan menggunakan pH-meter yang harus distandarisasi terlebih dahulu.

### a. Standarisasi pH-meter

Tombol on pada pH-meter ditekan dan dibiarkan stabil beberapa menit (elektroda dicelupkan dalam larutan buffer dengan pH 4). Setelah itu dibiarkan beberapa saat hingga angka pada pH-meter stabil.

b. Pengukuran pH sampel

Elektroda dicelupkan pada sampel dan dibiarkan beberapa saat hingga pH-meter menunjukkan angka yang stabil. Angka yang stabil pada pH-meter menunjukkan pH sampel.

