

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan September hingga November 2019 di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan dan Laboratorium Rekayasa Pangan dan Hasil Pertanian, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro, Semarang.

3.1. Materi

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu *curd* kefir, buah naga merah, *whipped cream* merk Anchor, madu merk Madurasa Murni, *sweetener* merk Tropicana Slim, dan CMC (*carboxy methyl cellulose*) merk Koepoe-koepoe. *Curd* kefir diperoleh dengan membeli di Oemah Kefir yang berada di Ungaran, Kabupaten Semarang. Buah naga merah diperoleh dari pasar tradisional Banyumanik, Semarang. Alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu *hand mixer*, wadah plastik, blender, sendok, neraca analitik, *ice cream maker*, *cup* kemasan plastik, *freezer*, *form* uji organoleptik, oven, desikator, cawan porselen, labu Kjeldhal, gelas beker, tabung reaksi, alat ekstraksi Soxhlet, dan alat titrasi asam.

3.2. Metode

Metode penelitian meliputi rancangan percobaan, prosedur pelaksanaan penelitian, pengujian parameter dan analisis data yang diperoleh dari hasil percobaan.

3.2.1. Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan dalam penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal dengan perlakuan proporsi *puree* buah naga (PBNM) yang meliputi T_0 = kontrol, T_1 = Proporsi PBNM 10%, T_2 = Proporsi PBNM 20%, T_3 = Proporsi PBNM 30%, dan T_4 = Proporsi PBNM 40%. Level proporsi tersebut ditentukan berdasarkan penelitian pendahuluan tentang level maksimal *puree* buah naga merah yang dapat diterima secara organoleptik.

3.2.2. Hipotesis Penelitian

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut.

H_0 : Tidak terdapat pengaruh dari proporsi *puree* buah naga merah terhadap tingkat kesukaan panelis, nilai *overrun*, total padatan, kadar air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak, kadar karbohidrat, dan total kalori pada es krim kefir.

H_1 : Terdapat pengaruh dari proporsi *puree* buah naga merah terhadap tingkat kesukaan panelis, nilai *overrun*, total padatan, kadar air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak, kadar karbohidrat, dan total kalori pada es krim kefir.

Secara statistik, hipotesis empirik diatas dapat dijabarkan sebagai berikut :

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 = \mu_5$$

$$H_1 : \mu_1 \neq \mu_2 \neq \mu_3 \neq \mu_4 \neq \mu_5 \text{ atau setidaknya ada satu perbedaan nilai tengah } (\mu)$$

Kriteria pengujian analisis statistik yang digunakan adalah sebagai berikut.

$F_{\text{hitung}} < F_{\text{tabel}}$, maka H_0 diterima dan H_1 ditolak

$F_{\text{hitung}} = F_{\text{tabel}}$, maka H_0 ditolak dan H_1 diterima.

3.2.3. Prosedur Penelitian

a. Pembuatan *Puree* Buah Naga Merah

Proses pembuatan es krim kefir buah naga merah diawali dengan pembuatan *puree* buah naga merah. Proses pembuatan *puree* buah naga merah yaitu buah naga merah dibersihkan, dipisahkan antara daging buah dan kulit buah, kemudian daging buah dipotong-potong menjadi ukuan yang lebih kecil untuk mempermudah proses penghancuran daging buah. Buah naga merah yang telah dipotong-potong kemudian dimasukkan ke dalam blender selama 3 menit untuk dihaluskan menjadi *puree*. *Puree* buah naga merah dimasukkan dalam wadah dan siap digunakan.

b. Pembuatan Es Krim Kefir *Puree* Buah Naga

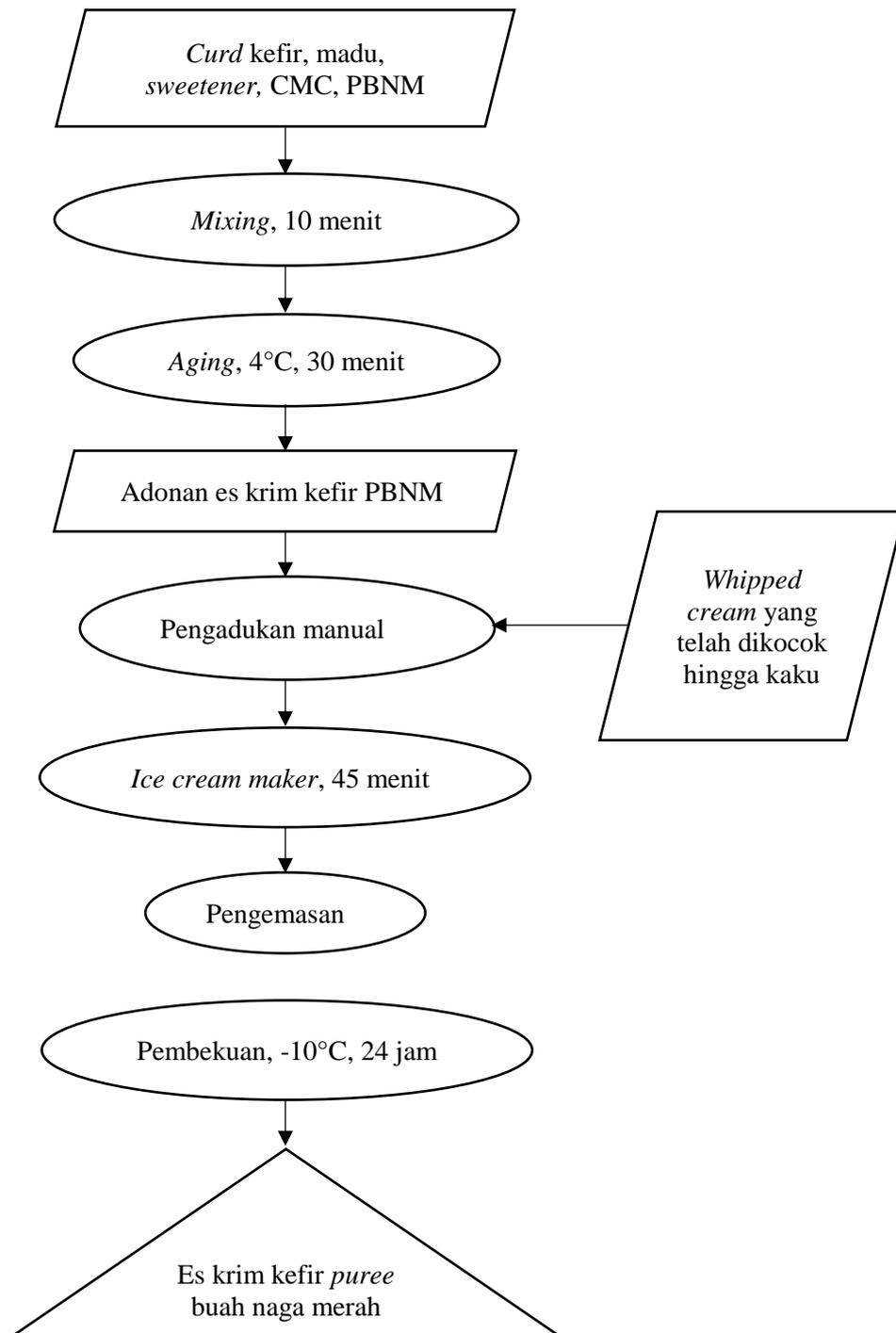
Pembuatan es krim kefir dengan penambahan *puree* buah naga merah (PBNM) dilakukan dengan menggunakan formulasi pada Tabel 2.

Tabel 2. Formulasi Es Krim *Puree* Buah Naga Merah

Bahan	Komposisi (%)				
	T ₀	T ₁	T ₂	T ₃	T ₄
<i>Whipped cream</i>	25	25	25	25	25
<i>Curd</i> kefir	75	75	75	75	75
Madu	15	15	15	15	15
<i>Sweetener</i>	3	3	3	3	3
CMC	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
PBNM	0	10	20	30	40

Keterangan: *Whipped cream* + *curd* kefir = 100% total adonan. Bahan lain (PBNM, madu, *sweetener* dan CMC) didasarkan pada total *whipped cream* dan *curd* kefir yang digunakan. T₀=kontrol, T₁=Proporsi PBNM 10%, T₂=Proporsi PBNM 20%, T₃=Proporsi PBNM 30%, dan T₄=Proporsi PBNM 40%.

Tahap-tahap dalam proses pembuatan es krim kefir *puree* buah naga merah dapat dilihat dalam Ilustrasi 1.



Ilustrasi 1. Diagram Alir Proses Pembuatan Es Krim *Puree* Buah Naga Merah (Modifikasi Mahdiana *et al.*, 2017)

Tahap pembuatan es krim meliputi pencampuran, *aging* (pemeraman) dan pembekuan. *Mixing curd kefir*, bubuk buah naga, madu, *sweetener*, CMC dan *puree*

buah naga merah sesuai formulasi hingga homogen. *Aging* adonan kefir tersebut pada refrigerator selama 30 menit dengan keadaan ter-*wrap* pada suhu 4°C untuk meningkatkan viskositas adonan. *Whipped cream* dikocok dalam wadah terpisah hingga mengembang dan lembut lalu sisihkan. Campur adonan tersebut dengan adonan *whipped cream* yang telah dikocok kemudian diaduk secara manual. Adonan es krim tersebut dimasukkan ke dalam *ice cream maker* selama ± 45 menit untuk menyeragamkan ukuran kristal es yang terbentuk kemudian dikemas dalam cup dan ditutup rapat. Simpan es krim ke dalam *freezer* pada suhu ± -10°C selama 24 jam.

3.3. Parameter Penelitian

Pengujian pada es krim kefir PBNM terdiri dari 3 tahap. Tahap pertama yaitu pengujian organoleptik dengan uji mutu hedonik. Tahap kedua yaitu pengujian *overrun* dan karakteristik kimia es krim kefir PBNM yang meliputi total padatan, kadar air, kadar lemak, kadar protein, kadar karbohidrat, dan kalori. Pengujian tahap kedua dilakukan dengan membandingkan es krim kefir kontrol dengan es krim kefir PBNM perlakuan terbaik berdasarkan hasil pengujian organoleptik. Tahap ketiga yaitu pengujian preklinis pada mencit sebagai hewan percobaan.

3.3.1. Pengujian Tahap 1

3.3.1.1. Uji Organoleptik

Pengujian organoleptik yang dilakukan adalah menggunakan uji mutu hedonik terhadap atribut rasa, warna, tekstur dan aroma dan *overall*. Penilaian

dilakukan dengan menggunakan 25 panelis semi terlatih. Atribut rasa menggunakan 5 taraf yaitu 1 (sangat asam), 2 (asam), 3 (cukup asam), 4 (sedikit asam), dan 5 (tidak asam). Atribut aroma kefir menggunakan taraf yaitu 1 (tidak terasa), 2 (sedikit terasa), 3 (cukup terasa), 4 (terasa), dan 5 (sangat terasa). Atribut warna menggunakan 5 taraf yaitu 1 (tidak merah), 2 (sedikit merah), 3 (cukup merah), 4 (merah), dan 5 (sangat merah). Atribut tekstur dengan 5 taraf yaitu 1 (tidak lembut), 2 (sedikit lembut), 3 (cukup lembut), 4 (lembut), dan 5 (sangat lembut). Sedangkan overall penerimaan kesukaan menggunakan skala 1 (tidak suka), 2 (sedikit suka), 3 (cukup suka), 4 (suka), dan 5 (sangat suka).

3.3.2. Pengujian Tahap 2

3.3.2.1. Overrun

Pengujian *overrun* (daya kembang) dilakukan sesuai dengan petunjuk Goff dan Hartel (2013) yaitu dengan mengukur pengembangan es krim sebelum dan setelah proses pembekuan. Pengukuran *overrun* dilakukan dengan cara adonan es krim diukur dengan volume yang sama menggunakan gelas ukur sebelum dan sesudah diproses dengan *ice cream maker* kemudian hasil berat volume tersebut dimasukkan dalam rumus berikut :

$$\text{Overrun} = \frac{\text{Berat adonan} - \text{Berat es krim}}{\text{Berat es krim}} \times 100\%$$

3.3.2.2. Total Padatan

Pengujian total padatan dilakukan dengan menggunakan metode oven sesuai dengan pendapat Soedarmadji *et al.* (1984). Analisis total padatan dilakukan

dengan perhitungan kadar air terlebih dahulu kemudian hasil kadar air dari sampel digunakan untuk menghitung total padatan menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Total padatan} = 100\% - \text{kadar air}$$

3.3.2.3. Kadar Air

Pengukuran kadar air dilakukan dengan metode AOAC yang disitasi oleh Winarno (2004). Timbang sampel yang telah dihaluskan sebanyak 2 gram dalam cawan porselin yang telah diketahui beratnya. Keringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 3 jam. Kemudian dinginkan dalam desikator dan ditimbang. Panaskan lagi dalam oven selama 30 menit, dinginkan dalam desikator dan ditimbang, perlakuan diulang hingga berat konstan (selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,2 mg). Perhitungan kadar air menggunakan rumus sebagai berikut.

$$\text{Kadar Air} = \frac{B - C}{A} \times 100\%$$

Keterangan : A = Berat sampel (g)

B = Cawan + sampel basah (g)

C = Cawan + sampel kering (g)

3.3.2.4. Kadar Lemak

Pengukuran kadar lemak dilakukan dengan metode Soxhlet sesuai dengan Soedarmadji *et al.* (1984). Labu lemak dikeringkan di dalam oven lalu ditimbang. Sampel seberat 2 gram dibungkus kertas saring dan dimasukkan ke dalam alat ekstraksi sokhlet. Kemudian alat dipasang. Petroleum eter dituangkan ke dalam labu lemak dan di ekstraksi selama 6 jam. Cairan yang ada di dalam labu lemak

didistilasi dan pelarutnya ditampung. Labu lemak yang berisi lemak tersebut diuapkan dalam oven 105°C (15-20 menit). Kemudian ditimbang sampai beratnya konstan.

$$\text{Lemak terhitung} = \frac{\text{Berat sampel} - \text{Berat sampel setelah Soxhlet}}{\text{Berat sampel kadar air}} \times 100$$

$$\text{Kadar Lemak} = \frac{(100\% - \% \text{Kadar air})}{100\%} \times \text{Lemak terhitung}$$

3.3.2.5. Kadar Protein

Analisis ini menggunakan metode Kjeldahl sesuai dengan Soedarmadji *et al.* (1984). Sampel sebanyak 0,5 gram dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, ditambahkan 10 g K₂SO₄ dan 10 ml H₂SO₄ pekat. Setelah itu dilakukan distruksi di atas pemanas dalam lemari asam dengan api kecil, setelah asap hilang api dibesarkan. Pemanasan diakhiri setelah cairan menjadi jernih tak berwarna lagi. Blanko dibuat seperti perlakuan diatas tanpa sampel. Setelah labu Kjeldahl beserta cairannya menjadi dingin kemudian ditambah 100 ml aquades serta larutan NaOH 45% sampai cair. Labu Kjeldahl dipasang segera pada alat destilasi. Labu tersebut dipanaskan sampai amonia menguap semua, destilat ditampung dalam erlenmeyer yang berisi 25 ml HCl 0,1N yang telah diberi indikator pp 1% beberapa tetes. Distilasi di akhiri setelah volume distilat 40 ml. Distilat dititrasi dengan larutan NaOH 0,1N.

Kadar protein sampel dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ N} = \frac{(\text{ml NaOH blanko} - \text{ml NaOH sampel})}{\text{g sampel} \times 10} \times \text{NaOH} \times 14.008$$

$$\text{Kadar Protein} = \% \text{ N} \times \text{Faktor koreksi (6,38)}$$

3.3.2.6. Kadar Abu

Pengukuran kadar abu dilakukan dengan metode AOAC yang disitasi oleh Winarno (2004). Timbang sampel yang telah dihaluskan sebanyak 3 gram. Dalam cawan porselin yang telah diketahui beratnya. Bakar cawan berisi contoh di atas kompor hingga tidak berasap. Kemudian pijarkan dalam tanur pada suhu 600°C selama 4 jam (hingga diperoleh abu berwarna keputih-putihan). Dinginkan cawan dan abu dalam desikator kemudian ditimbang. Perhitungan kadar abu dilakukan dengan menggunakan rumus berikut.

$$\text{Kadar Abu} = \frac{B - C}{A} \times 100\%$$

Keterangan : A = Berat sampel (g)

B = Berat cawan + abu (g)

C = Berat cawan kosong (g)

3.3.2.7. Karbohidrat

Kadar karbohidrat pada sampel diukur dengan menggunakan metode *by different* (Winarno, 2004). Perhitungan untuk analisis kadar karbohidrat ini adalah:

$$\text{Karbohidrat} = 100\% - \%(\text{protein} + \text{lemak} + \text{abu} + \text{air})$$

3.3.2.8. Uji Kalori

Pengujian kalori dilakukan dengan menggunakan faktor *Atwater* yaitu dengan mengakumulasikan jumlah karbohidrat, lemak dan protein. Kalori yang dihasilkan untuk 1 gram lemak sebesar 9 kkal dan 4 kkal untuk 1 gram protein dan 1 gram karbohidrat (Hermanto *et al.*, 2010). Perhitungan kalori dapat dilakukan dengan rumus berikut.

Energi (kkal) = (4 kalori/g x kandungan karbohidrat) + (9 kalori/g kandungan lemak) + (4 kalori/g x kandungan protein)

3.3.3. Pengujian Tahap 3

3.3.3.1. Preklinis

Pengujian preklinis (*in vivo*) menggunakan mencit sebagai hewan percobaan dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian es krim kefir dengan perlakuan terbaik terhadap penambahan bobot mencit. Penelitian ini telah mendapat persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro dengan No.127/EC/H/KEPK/FK-UNDIP/X//2019 (Lampiran 17).

Uji preklinis menggunakan mencit dengan spesies *Mus musculus* berjenis kelamin jantan dan betina sebanyak 8 ekor. Mencit yang digunakan berumur 2-3 bulan dengan bobot 20-35 gram yang diperoleh dari peternak mencit Banyumanik. Uji preklinis dilakukan selama 35 hari yang terdiri dari masa adaptasi (hari ke-1 sampai hari ke-7), masa penggemukan (hari ke-8 sampai hari ke-21) dan masa perlakuan (hari ke-22 sampai hari ke-35). Masa perlakuan pemberian es krim kefir *puree* buah naga merah dilakukan dengan metode *force feeding*. Perlakuan pada uji preklinis terdiri dari 4 kelompok. Jumlah mencit untuk masing-masing kelompok perlakuan yaitu 2 ekor.

Variasi pakan yang diberikan yaitu pakan *Normal Diet* (ND) dan pakan *High Fat Diet* (HFD). Kelompok *Normal Diet* (ND) diberikan pakan komersial sedangkan pakan *High Fat Diet* (HFD) diberikan campuran pakan komersial dan komponen tinggi lemak. Pembuatan pakan HFD dilakukan dengan cara mencampurkan pakan komersial (80%), kuning telur (10%) dan minyak kelapa

(10%) kemudian diaduk hingga rata. Pembuatan pakan HFD dilakukan 3 hari sekali. Jumlah pakan yang diberikan setiap hari yaitu 3 gram. Pemberian es krim kefir *puree* buah naga merah disesuaikan dengan dosis yang dapat diterima atau *Acceptable Daily Intake* (ADI) yang telah dikonversikan sesuai dengan bobot mencit yaitu sebanyak 0,728g/bobot mencit.

Pengamatan yang dilakukan yaitu perubahan bobot dan jumlah konsumsi pakan. Sisa pakan ditimbang setiap hari sebelum diberi pakan yang baru. Penimbangan bobot badan mencit dilakukan pada awal dan akhir masa perlakuan. Kelompok perlakuan untuk uji antiobesitas dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Kelompok Perlakuan Pada Mencit

Kelompok	Perlakuan
Kelompok 1	Pakan <i>Normal Diet</i> (ND)
Kelompok 2	Pakan <i>Normal Diet</i> (ND) + Es Krim Kefir <i>Puree</i> Buah Naga Merah
Kelompok 3	Pakan <i>High Fat Diet</i> (HFD)
Kelompok 4	Pakan <i>High Fat Diet</i> (HFD) + Es Krim Kefir <i>Puree</i> Buah Naga Merah

3.4. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan aplikasi SPSS 22.0 pada taraf signifikansi $\leq 0,05$. Analisis data pengujian organoleptik menggunakan uji non parametrik Kruskal Wallis dan uji Mann Whitney. Analisis data pengujian hasil *overrun*, total padatan, kadar air, kadar abu, kadar protein, kadar lemak, kadar karbohidrat, dan kalori menggunakan uji *Independent Sampel T-Test*. Analisis data untuk uji pre klinis dilakukan secara deskriptif untuk masing-masing perlakuan yang diberikan pada mencit.