

3. METODE

3.1. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada laboratorium mikrobiologi dan sensori pada kampus 2 UNIKA Soegijapranata Semarang, Jl. Rm. Hadisoebeno Sosro Wardoyo, Jatibarang, Kec. Mijen, Kota Semarang, Jawa Tengah. Penelitian dilaksanakan mulai Oktober 2022 hingga February 2023.

3.2. Desain Penelitian

Tabel 2. Alur Desain Penelitian

Literature Review	Dilakukan dengan mengumpulkan jurnal dan buku-buku melalui <i>website</i> terpercaya
Pemerolehan Sampel Susu Pasteurisasi	<ul style="list-style-type: none">• Sampel yang diperoleh dari <i>Green Fresh Farm</i> (GFF) berupa susu segar• Pasteurisasi dilakukan menggunakan metode konvensional dengan 2 suhu dan waktu yang berbeda <i>Low Temperature Long Time</i> (LTLT) (63°C, 30 menit) dan <i>High Temperature Short Time</i> (HTST) (80 °C, 30 menit)• Sampel susu pasteurisasi yang digunakan berupa 2 jenis sampel susu dengan 2 suhu pemrosesan yang dan lama penyimpanan yang berbeda (0 hari, 2 hari, 4 hari, 7 hari)
Uji Mikrobiologi	<ul style="list-style-type: none">• Dilakukan dengan uji TPC untuk menentukan jumlah mikroba (CFU/ml) tiap lama penyimpanan yang berbeda, sehingga dapat dibandingkan dengan standar jumlah mikroba.
Uji Hedonik (5-Point Hedonic Scale)	<ul style="list-style-type: none">• Dilakukan di ruang uji sensori di kampus 2 unika dan 50 panelis semi terlatih (konsumen)• Panelis diseleksi menggunakan uji sensori pendahuluan yaitu uji <i>threshold</i>• Pengujian dilakukan dengan menyajikan tiap sampel dan kontrol secara individu dan berurutan kepada panelis untuk dinilai tingkat kesukaannya berdasarkan 4 skala kesukaan (<i>dislike extremely-like extremely</i>) (Piotrowska <i>et al.</i>, 2015)
Uji Fisik	<ul style="list-style-type: none">• Data uji hedonik juga didukung dengan pengukuran warna menggunakan <i>chromameter</i> dan pengukuran viskositas menggunakan <i>viscometer</i>.
Pengolahan Data dan Penarikan Kesimpulan	Data yang diperoleh diolah menggunakan SPSS dan disimpulkan kualitas mikrobiologi dan sensori dari susu pasteurisasi GFF yang menentukan umur simpan dari susu pasteurisasi GFF.

Variabel penelitian yang digunakan meliputi :

Variabel kontrol : Asal dan waktu pengambilan susu segar, Metode pasteurisasi, Kondisi penyimpanan susu, Suhu dan lokasi inkubasi, Waktu pengukuran viskositas, dan Cara penyajian sampel ke konsumen

Variabel bebas : Suhu dan waktu pasteurisasi, Lama penyimpanan susu.

Variabel pengganggu : Kontaminasi didalam inkubasi

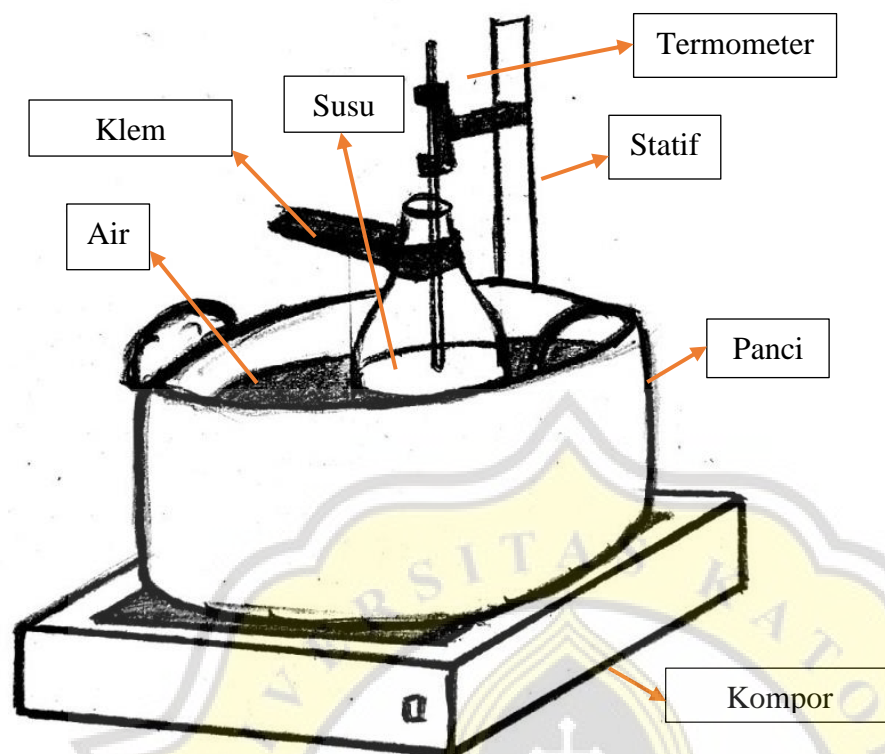
Variabel tergantung/parameter : Nilai Total Plate Count (CFU/ml), Nilai viskositas (cP), Nilai parameter warna (L, a*, b*) dan Nilai kesukaan sensori.

3.2.1. *Literature Review*

Literature review dilakukan dengan tujuan untuk mempelajari dasar-dasar dari uji mikrobiologi, fisik, dan sensori, serta karakteristik dari produk susu pasteurisasi yang digunakan sebagai sampel. Pemerolehan *literature* dapat dilakukan dengan bantuan media internet melalui perangkat pencaharian seperti *google*, *google scholar*, *sciendirect*, *research gate*, dan *scimago*.

3.2.2. Sampel Susu Pasteurisasi

Sampel susu pasteurisasi diperoleh dengan mengolah susu segar yang diproduksi oleh Ternak sapi *Green Fresh Farm* yang berlokasi di desa wisata Jatirejo menggunakan metode *waterbath* konvensional (Kementrian Pertanian Republik Indonesia, 2019; Bakar & Usmiati, 2009) dengan suhu LTLT (63°C, 30 menit) dan modifikasi suhu HTST (80°C, 30 menit, dapat disebut juga pasteurisasi *Ultra High Temperature*) (Bakar & Usmiati, 2009; BSN, 1995). Metode *waterbath* konvensional dilakukan dengan menggunakan kompor induksi (ARTUGO CI 1300 AB), Erlenmeyer, termometer, klem penjepit, statif. Proses pembuatan susu pasteurisasi diawali dengan, meng-*preheat* susu mentah didalam botol kaca menggunakan panci yang berisi air panas ($\pm 60^{\circ}\text{C}$). Kemudian susu dituang kedalam Erlenmeyer dan ditutup dengan *aluminium foil* untuk mengurangi resiko kontaminasi, dan dipasteurisasi dengan cara dipanaskan didalam air panas (perlu dipastikan tinggi air panas melebihi tinggi susu didalam *Erlenmeyer*). *Erlenmeyer* yang berisi susu digoyangkan selama proses pasteurisasi hingga mencapai suhu target dan ditahan selama waktu target sesuai dengan Gambar 2.



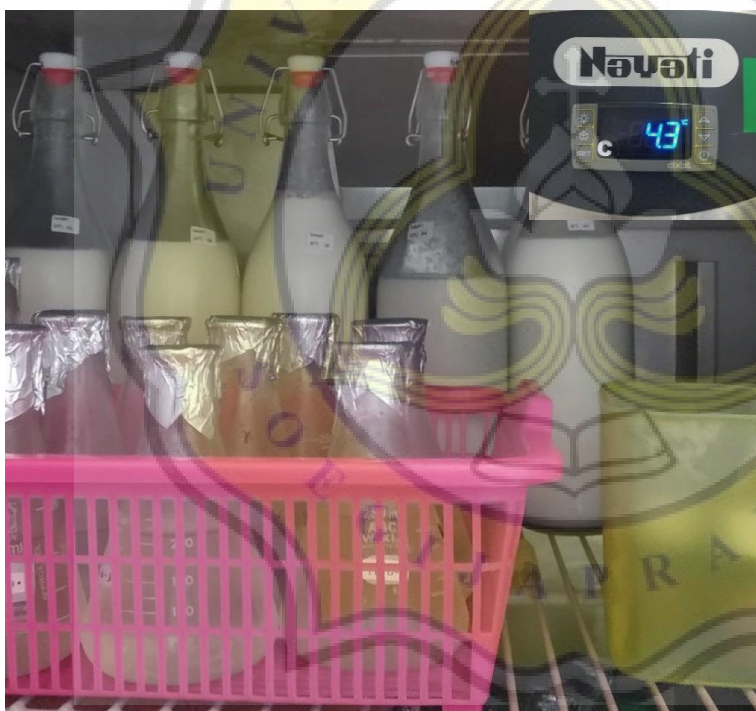
Gambar 2. Desain Metode Pasteurisasi Yang Digunakan Pada Penelitian Ini

Modifikasi lama pemasakan HTST dilakukan untuk menjamin kesuksesan proses pasteurisasi karena peralatan pasteurisasi yang konvensional. Sampel dibawa dari *Green Fresh Farm* dengan bantuan botol kaca steril dan *cool box* yang diisi *ice pack* sehingga memiliki suhu $\pm 4,5$ °C sesuai dengan Gambar 3. Terdapat 7 sapi perah di GFF yang diasumsikan sudah melewati masa laktasi lebih dari 2 bulan pada saat waktu pengambilan sampel. Pengambilan sampel susu segar dilakukan pada sapi yang sedang diperah pada saat itu dan dibagi menjadi 2 bagian yaitu untuk uji mikrobiologi dan untuk uji fisik dan sensori. Untuk sampel mikrobiologi ditambah sebanyak 1 botol kaca steril 500 ml yang diperah secara langsung ke dalam botol, sedangkan sampel fisik diambil sebanyak 2 botol kaca steril 500 liter dan sampel sensori diambil sebanyak 8 botol kaca steril 1 liter yang diambil dari ember susu.



Gambar 3. Pengambilan Sampel di GFF Menggunakan *Cool box*

Kemudian sampel susu dipasteurisasi dan disimpan di dalam *chiller* (Nayati) pada suhu $\pm 4,3-5,5^{\circ}\text{C}$ dengan 4 lama waktu penyimpanan berbeda (0 hari, 2 hari, 4 hari, dan 7 hari) di laboratorium Nutrisi dan Teknologi Kuliner sesuai dengan Gambar 4.



Gambar 4. Penyimpanan Sampel di *Chiller* ($4,3-5,5^{\circ}\text{C}$)

Untuk uji TPC, sampel dipisah menjadi 3 botol kaca coklat sejumlah 30 ml untuk tiap waktu penyimpanan dan metode pasteurisasi yang berbeda, sehingga terdapat sebanyak 12 botol untuk satu jenis metode pasteurisasi. Untuk uji fisik, sampel susu disimpan didalam botol *scott (durhan)* 250 ml sebanyak 24 botol (masing-masing hari 3 ulangan metode LTLT dan HTST). Sedangkan untuk uji Sensori, sampel susu disimpan didalam

botol kaca *korken* 1 Liter tiap lama penyimpanan yang berbeda dan metode pasteurisasi yang berbeda, sehingga membutuhkan 8 botol *korken* 1 liter.

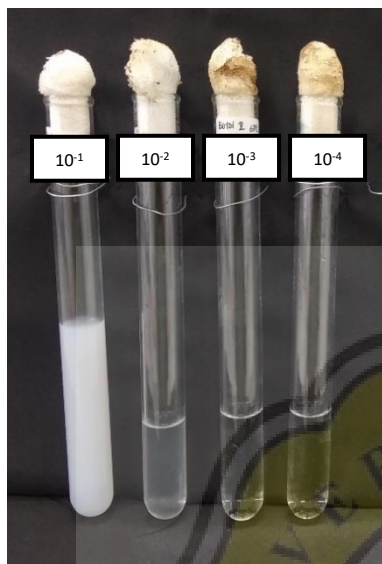
3.2.3. Analisis Mikrobiologi

a. Uji TPC

Uji TPC dilakukan berdasarkan modifikasi dari metode yang dilakukan oleh Badan Standarisasi Nasional (2008). Media agar yang digunakan adalah *Plate Count Agar* (PCA) yang dibuat dengan cara melarutkan PCA (22,5g tiap 1000 ml) menggunakan akuades lalu dipanaskan dengan *hotplate* (*yellow MAG HS7*) sampai suhu 300°C. Sedangkan untuk pengencer digunakan 0,1% *Buffered Peptone Water* (BPW) yang dibuat dengan melarutkan BPW (1g BPW tiap 1000 ml) menggunakan akuades. Kemudian media dan pengencer dituangkan kedalam tabung reaksi sebanyak 13 ml untuk media dan 9 ml untuk pengencer.

Media dan pengencer yang sudah dibuat, beserta *bluetip* yang sudah disiapkan didalam boxnya disterilkan menggunakan autoklaf (*Hirayama Manufacturing Corporation HL36AE*) (121°C, 15 menit). Sedangkan cawan petri disterilkan menggunakan oven (*Binder*) pada suhu 170°C selama 1 jam.

Kegiatan TPC dilakukan didalam LAF (*Laminar Air Flow*) (*ESCO Airstrem Vertical Laminar Flow Cabinet AVC-4D1*) yang sudah disterilisasi menggunakan cahaya *ultra violet* selama 1 jam dan *air flow* dibiarkan menyala selama 15 menit. Setelah itu, TPC dimulai dengan pengenceran sebanyak 4x terhadap tiap sampel susu dengan perbandingan 1:10. Pengenceran diawali dengan, mencampurkan 1 ml sampel (10^0) kedalam tabung reaksi yang berisi 9 ml 0,1% BPW dengan bantuan mikropipet (*DRAGON ONEMED*) untuk menghasilkan pengenceran 1x (10^{-1}). Setelah itu, pengenceran berlanjut dengan mengambil 1 ml dari tabung pengenceran 1x (10^{-1}) dan dituang kedalam tabung reaksi berikutnya untuk memperoleh pengenceran 2x (10^{-2}). Pengenceran berlanjut hingga diperoleh tabung pengenceran 4 x (10^{-4}) pada masing-masing sampel. Setelah pengenceran selesai sesuai Gambar 5. dilanjutkan dengan pembuatan agar pada cawan petri dengan metode *pour-plate*.

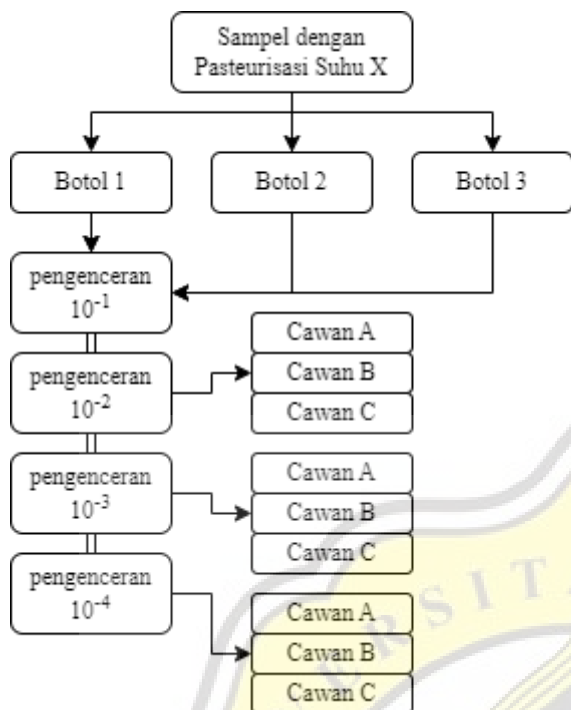


Gambar 5. Pengenceran Sampel Sampai 10^{-4}

keterangan :

- foto diambil setelah melakukan TPC maka untuk pengenceran 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} tidak sebanyak 10^{-1}

Pembuatan media siap pakai dilakukan dengan menuangkan masing-masing hasil pengenceran sampel sebanyak 1 ml kedalam cawan petri (3 ulangan untuk tiap pengenceran atau *triplo*) dan mencampurkannya dengan PCA sebanyak 13 ml (1 tabung). PCA digunakan karena media tersebut merupakan media non-selektif sehingga semua macam mikroba khususnya bakteri dapat tumbuh dan berkembang. Kemudian, media dan sampel dicampur hingga rata dan seragam dengan cara menggoyangkan cawan pada permukaan dasar membentuk angka 8, lalu dibiarkan hingga memadat. Selain itu juga dibuat agar yang tidak berisi sampel untuk menguji kontaminasi dari media agar. Setelah semua agar memadat, dilakukan inkubasi pada suhu $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ selama 2 hari (48 jam) menggunakan oven (*Binder*). Untuk desain pengenceran dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Desain Pengenceran TPC

Selanjutnya, setelah diinkubasi, cawan petri diletakan pada alat *colony counter* (Stuart® SC6) untuk dihitung jumlah koloni yang terbentuk pada inkubasi 24 dan 48 jam. Perhitungan jumlah bakteri dilakukan dengan metode *Standard Plate Count* (SPC) yaitu menghitung cawan dengan jumlah antara 25-250 koloni (BSN, 2008).

3.2.4. Analisis Sensori

a. Uji Threshold

Seleksi panelis dilakukan sebelum dilakukan uji hedonik dengan melakukan uji *threshold* untuk menilai sensitivitas calon panelis untuk mendeteksi suatu rasa (manis, asin, dan asam) (Lawless & Heymann, 2010). Calon panelis disajikan sampel berupa larutan berasa dengan konsentrasi yang meningkat dan didata pada konsentrasi berapa panelis dapat mendeteksi rasa tersebut (*Scoresheet* untuk uji threshold dapat dilihat pada Gambar 16 di Lampiran 7). Calon panelis yang yang mampu mendeteksi rasa pada batas *threshold*-nya maka lolos menjadi panelis uji hedonik. Sebenarnya, *threshold* untuk berbagai jenis rasa akan bervariasi pada tiap daerah, karena perbedaan pola makan yang dimiliki oleh masyarakat pada masing-masing daerah (Öner *et al.*,

2016). Untuk orang normal memiliki *threshold* terhadap rasa manis pada konsentrasi 0,33 g/ml (330 mg/ml) (Park *et al.*, 2015). Sedangkan untuk rasa asin dan asam, sebagian besar orang akan dapat mendeteksinya pada konsentrasi $2,50 \times 10^2$ mM (14,61 mg/ml) dan 5×10^0 mM (0,96 mg/ml) (Wise & Breslin, 2013).

Untuk prosedur uji *threshold* digunakan modifikasi dari *Harris-Kalmus test* yang dideskripsikan oleh Wise & Breslin (2013). Tiap calon panelis diberikan 4 sampel larutan sejenis dengan konsentrasi berbeda yang disajikan didalam wadah plastik kecil (± 30 ml), kemudian calon panelis berusaha mendeteksi atau mengidentifikasi rasa dari larutan tersebut dengan cara menahan larutan didalam mulut selama 5 detik lalu dibuang (prosedur *whole mouth, sip-and-spit*) dan mengurutkan rasa dari tingkat rasa terendah hingga tertinggi (konsentrasi terendah ke tinggi). Tiap percobaan calon panelis perlu mengukurnya menggunakan air biasa terlebih dahulu. Desain uji *threshold* dapat dilihat pada Tabel 3. Untuk uji *threshold* ini peneliti mampu mengumpulkan calon panelis sebanyak 65 orang yang kemudian diseleksi menjadi 50 orang untuk uji hedonik.

Tabel 3. *Worksheet* Uji Threshold Untuk tiap Panelis

Tahapan	Posisi Penyajian Larutan			
	Posisi 1	Posisi 2	Posisi 3	Posisi 4
Tahap 1	Larutan 1	Larutan 2	Larutan 3	Larutan 4
Tahap 2	Larutan 5	Larutan 6	Larutan 7	Larutan 8
Tahap 3	Larutan 9	Larutan 10	Larutan 11	Larutan 12

Keterangan :

- Larutan 1, 2, 3, dan 4 merupakan larutan air gula dengan konsentrasi 82,5 ; 110 ; 165 ; dan 330 mg gula/ml air.
- Larutan 5, 6, 7, dan 8 merupakan larutan air garam dengan konsentrassi 3,65 ; 4,87 ; 7,31 ; dan 14,61 mg garam/ml air.
- Larutan 9, 10, 11, dan 12 merupakan larutan air asam dengan konsentrasi 0,24 ; 0,32 ; 0,48 dan 0,96 mg asam sitrat/ml air.

b. Uji Hedonik (4-Point Hedonic Scale Test)

Uji hedonik dilakukan dengan menggunakan bantuan *4-point hedonic scale* (modifikasi *5-point hedonic scale* dari Piotrowska *et al.* (2015)). Uji ini dilakukan dengan menyajikan masing-masing sampel secara individu kepada panelis untuk dinilai tingkat kesukaannya berdasarkan atribut Rasa, Aroma, Warna, Tekstur, Kesegaran, dan Keseluruhan dengan 4 tingkat penilaian dari *dislike very much*/sangat tidak suka (1) hingga *like very much*/sangat suka (4) (*Scoresheet* untuk uji hedonik dapat dilihat pada Gambar 17. di Lampiran 7.). Rasa merupakan rasa khas susu yang dirasakan oleh indrapera saat susu diminum. Aroma merupakan aroma khas susu yang dirasakan oleh hidung saat susu dicium menggunakan hidung. Warna adalah warna yang dimiliki oleh susu saat dipersepsi oleh indra pelihat. Tekstur atau *mouthfeel* merupakan sensasi fisik (encer/kental/konsistensi/ homogenitas/dll) dari susu ketika susu diminum. Kesegaran yang merupakan sensasi rasa/warna/aroma/tekstur dari susu yang dapat dijadikan indikasi bahwa susu tersebut segar/tidak. Serta keseluruhan, yang merupakan penilaian konsumen terhadap seluruh atribut terhadap susu (Apriliyani & Apriliyanti, 2018; BSN, 1995). Uji hedonik dilakukan dalam 4 tahap, tiap tahap menguji 2 sampel susu pasteurisasi dengan suhu pasteurisasi yang berbeda dengan mengevaluasi tingkat kesukaan konsumen terhadap sampel susu dengan lama penyimpanan yang berbeda secara berurutan. Panelis yang digunakan untuk melakukan uji ini bersifat semi terlatih sebanyak 50 orang yang merupakan mahasiswa Unika yang berperan sebagai konsumen yang telah diseleksi di tahap *threshold*, namun panelis yang dapat hadir pada hari uji hanya sebanyak 32 panelis. Desain uji hedonik dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. *Worksheet* Penguji Untuk Uji Hedonik Untuk Tiap Panelis

Tahapan	Posisi 1	Posisi 2
Tahap 1	A	E
Tahap 2	B	F
Tahap 3	C	G
Tahap 4	D	H

Keterangan :

- sampel A adalah sampel LTLT dengan umur penyimpanan 0 hari
- sampel B adalah sampel LTLT dengan umur penyimpanan 2 hari
- sampel C adalah sampel LTLT dengan umur penyimpanan 4 hari
- sampel D adalah sampel LTLT dengan umur penyimpanan 7 hari
- sampel E adalah sampel HTST dengan umur penyimpanan 0 hari
- sampel F adalah sampel HTST dengan umur penyimpanan 2 hari
- sampel G adalah sampel HTST dengan umur penyimpanan 4 hari
- sampel H adalah sampel HTST dengan umur penyimpanan 7 hari

3.2.5. Analisis Fisik

Selain itu juga dilakukan pengukuran menggunakan alat *chromameter/colorimeter* (*Precision Colorimeter NR20XE*) untuk memberikan data terukur terhadap atribut warna dan pengukur menggunakan alat *viscometer* (*Brookfield LVDV-I Prime*) untuk memberikan data terukur terhadap atribut viskositas (cP).

a. Pengukuran Warna

Sampel susu dari masing-masing botol dimasukkan kedalam plastik bening dan dilakukan pengukuran warna menggunakan alat *chromameter* (*Precision Colorimeter NR20XE*) sesuai Gambar 7. Hasil pengukuran berupa parameter warna L, a*, dan b*. L merupakan parameter *Lightness* (semakin (+) maka akan semakin terang, sedangkan semakin (-) akan semakin gelap) yang berkisar dari 0-100. a* merupakan parameter warna merah-hijau (semakin (+) maka akan menunjukkan warna yang semakin merah, sedangkan semakin (-) akan menunjukkan warna yang semakin hijau) yang berkisar dari -128 hingga +127. b* merupakan parameter kuning-biru (semakin (+) maka akan menunjukkan warna yang semakin kuning, sedangkan semakin (-) akan menunjukkan warna yang semakin biru) yang berkisar dari -128 hingga +127 (Becker, 2016; Collins

et al., 2019). Kemudian, data warna yang diperoleh divisualisasikan menggunakan *Colorizer.org*.



Gambar 7. Pengukuran Warna Menggunakan *Chromameter*

b. Pengukuran Viskositas

Susu merupakan cairan yang bersifat *non-Newtonian*, yaitu cairan yang viskositasnya dipengaruhi oleh *shear rate* atau gradien kecepatan (perbedaan kecepatan antara dua bidang cair yang dipisahkan oleh jarak yang sangat kecil). Maka untuk melakukan pengukuran viskositas pada suatu larutan *non-Newtonian* perlu digunakan kecepatan alat pengukur yang sama. Selain itu, viskositas cairan *Newtonian* dan *non-Newtonian* dipengaruhi oleh suhu. Semakin tinggi suhu maka viskositas akan semakin berkurang (Vaclavik *et al.*, 2021). Maka pengukuran viskositas perlu dilakukan pada suhu yang konstan. Pada penelitian ini, pengukuran viskositas diawali dengan menstabilkan suhu sampel menjadi suhu ruang menggunakan *waterbath* selama 30 menit (Memmert WNB14 ~ 230 V 50/60 Hz) ($\pm 0.25^\circ\text{C}$) sesuai Gambar 8. Lalu setelah mencapai suhu ruang, viskositasnya diukur menggunakan alat *viscometer* (*Brookfield LVDV-I Prime*) dengan *spindle* LV-1 (S61) dan rotasi sebesar 30 rpm, kemudian hasil pengukuran viskositas diperoleh dalam satuan cP setelah dibiarkan berjalan selama 1 menit sesuai Gambar 9. *Brookfield LVDV-I Prime* memiliki kisaran pengukuran viskositas dari 5-2.000.000 cP (Brookfield Engineering Laboratories, 2022).



Gambar 8. Mengkondisikan Suhu Sampel Susu Menggunakan *Waterbath*



Gambar 9. Pengukuran Viskositas Menggunakan Viskometer

3.2.6. Pengolahan Data

Pengolahan data dilakukan menggunakan perangkat MS Excel dan SPSS versi 13. Data yang diperoleh dari hasil analisis sensori dikompilasi dan ditabulasi terlebih dahulu sehingga sesuai dengan format SPSS. Untuk data parametrik uji fisik diuji dengan menggunakan uji beda parametrik uji *Independent-T* test (untuk membandingkan hasil antara suhu pengolahan sebesar 2 tingkatan) dan uji *one-way* ANOVA (untuk membandingkan hasil antara hari penyimpanan sebesar 4 tingkatan). Untuk uji *one-way* ANOVA apabila terdapat perbedaan yang signifikan (tingkat kepercayaan 95%) maka diuji lebih lanjut dengan uji *Duncan* untuk mengetahui letak perbedaannya (Kristanti, 2017). Khusus pada nilai a^* pada pengukuran warna, perlu disajikan dalam bentuk $-a^*$ agar nilai tidak negative. Untuk data parametrik uji TPC diuji dengan menggunakan uji *Mann-Whitney U* (untuk membandingkan hasil antara suhu pengolahan sebesar 2 tingkatan) dan uji *Kruskal Wallis* (untuk membandingkan hasil antara hari penyimpanan sebesar 4 tingkatan) dan dilanjutkan dengan uji *Mann-Whitney U* apabila ditemukan perbedaan

secara signifikan (tingkat kepercayaan 95%) (Nawangsih *et al.*, 2021). Sedangkan untuk data non-parametrik perbedaan data dihitung secara statistik menggunakan uji beda non-parametrik untuk data uji sensori yaitu uji *Mann-Whitney U* (untuk membandingkan hasil antara suhu pengolahan untuk 2 tingkatan) dan uji *Friedman* (untuk membandingkan hasil antara hari penyimpanan untuk 4 tingkatan). Apabila terdapat perbedaan yang signifikan (tingkat kepercayaan 95%) pada uji *Friedman* maka diuji lebih lanjut dengan uji *Wilcoxon* untuk mengetahui letak perbedaan. Uji *Friedman* digunakan karena, uji *Friedman* merupakan uji non-parametrik yang cocok digunakan untuk menghitung data yang terjadi pengulangan perhitungan (*repeated measures*) dan datanya *equal* pengulangannya (Scheff, 2016).

