

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan suatu penelitian eksperimental yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian kefir dari susu sapi dengan kualitas terbaik terhadap penurunan kadar kolesterol mencit (*Mus musculus*). Penelitian ini dilaksanakan dengan dua tahap, tahap pertama yaitu mengetahui pengaruh konsentrasi starter terhadap kualitas kefir dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 4 perlakuan dan 4 ulangan. Tahap kedua yaitu mengetahui pengaruh variasi waktu pemberian kefir terhadap penurunan kadar kolesterol mencit (*Mus musculus*) dengan variasi pemberian kefir yang berbeda.

Tahap I : Pengaruh konsentrasi starter yang berbeda terhadap kualitas kefir (C), yang terdiri dari 4 perlakuan yaitu:

C1 : Konsentrasi 2% (v/v)

C2 : Konsentrasi 3% (v/v)

C3 : Konsentrasi 4% (v/v)

C4 : Konsentrasi 5% (v/v)

Tahap II : Pengaruh waktu pemberian kefir yang mempunyai kualitas terbaik terhadap penurunan kadar kolesterol mencit (*Mus musculus*), (T) yang terdiri dari 5 perlakuan yaitu:

K1: Kontrol negatif (tanpa diet kolesterol dan kefir)

K2: Kontrol positif (dengan diet kolesterol dan tanpa kefir)

T1 : 5 hari pemberian (dengan diet kolesterol dan kefir)

T2 : 10 hari pemberian (dengan pakan kolesterol dan kefir)

T3 : 15 hari pemberian (dengan pakan kolesterol dan kefir)

3.2. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan Biosistemika Jurusan Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang. Penelitian ini dilaksanakan selama 3 bulan yaitu mulai tanggal 1 September- 30 November 2014.

3.3. Instrumen Penelitian

3.3.1. Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini yaitu Toples kaca, *Bottle jam*, panci, penyaring, sendok, kompor gas, bak mencit, gunting, botol minum, alat pengukur kolesterol portable (Easy Touch®), pipet tetes, tabung Erlenmeyer, buret, gelas ukur, *hot plate*, autoklaf, cawan petri, bunsen, *beaker glass*, *magnetic stirrer*, *laminar air flow*, pH meter, viscometer, sentrifuge, botol Babcock, tabung reaksi, termometer, timbangan analitik, pengaduk kaca, dan sonde.

3.3.2. Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu susu sapi, granula kefir, mencit (*Mus musculus*), lemak sapi, NaOH 0,1 N, larutan Phenoltallein 1%, Alkohol 70%, aquades, asam sulfat pekat (95%), susu skim, media *Plate Count Agar* (PCA), kertas label, aluminium foil, kapas dan tisu.

3.4. Variabel Penelitian

Variabel yang ada dalam penelitian ini ada 3 yaitu variable terikat, variable bebas dan variable kontrol. Variabel terikat dalam penelitian ini yaitu kualitas kefir dan penurunan kadar kolesterol. Variabel bebas dalam penelitian ini yaitu lama pemeraman dan variasi waktu pemberian kefir pada mencit (*Mus musculus*). Sedangkan variabel kontrol dalam penelitian ini ada 2 yaitu kontrol positif dan negatif. Kontrol positif yaitu mencit yang diberikan pakan kolesterol tapi tidak diberikan kefir. Kontrol negatif yaitu mencit yang tidak diberikan pakan hiperkolesterol dan kefir.

3.5. Langkah Kerja

3.5.1. Tahap Persiapan

3.5.1.1. Pembuatan Kefir

Pembuatan kefir pada penelitian ini dilakukan dengan metode tradisional (Otes, 2003 dan Hidayat, 2006). Sebelum dilakukan pembuatan kefir, terlebih dahulu dilakukan sterilisasi alat-alat yang digunakan dalam proses pembuatan kefir. Pembuatan kefir diawali dengan memasukkan susu sebanyak 500 ml pada masing-masing toples steril. Toples susu kemudian dimasukkan ke dalam plastik untuk memudahkan pengambilan setelah proses pasteurisasi. Kemudian susu dipasteurisasi hingga suhu sekitar 80-90°C selama 15 menit. Kemudian susu didinginkan hingga suhu 18-22°C.

Tahap selanjutnya yaitu inokulasi. Starter kefir dimasukkan ke dalam masing-masing toples susu sesuai perlakuan yaitu dengan konsentrasi 2%, 3%, 4% dan 5%.

Kemudian diberi label perlakuan pada masing-masing toples susu. Selanjutnya diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Setelah itu dilakukan penyaringan untuk memisahkan kefir dan biji kefir. Kefir yang didapatkan dari penyaringan diambil untuk dilakukan uji kualitas yaitu uji TPC, kadar asam laktat, nilai pH, viskositas, kadar lemak dan kadar protein (ulangan 1). Langkah tersebut dilakukan kembali untuk ulangan selanjutnya.

3.5.1.2 Pembuatan Pakan Hiperkolesterolemia

Pakan hiperkolesterolemia pada penelitian ini dibuat dari lemak sapi. Ditimbang lemak sapi sebanyak 250 gr, kemudian dicairkan dengan cara dipanaskan di atas *hotplate* dengan suhu 250-300°C hingga mencair seluruhnya (Vanessa dkk. 2013). Kemudian lemak yang telah cair dimasukkan ke dalam *bottle jam* kemudian ditutup.

3.5.1.3 Uji Kualitas Kefir

Uji kualitas kefir ini meliputi beberapa pengujian meliputi (Usmiati, 2004):

a. Pengukuran kadar asam laktat

Prinsip dalam pengukuran asam laktat yaitu jumlah asam dihitung sebagai asam laktat. Pengujian yang dilakukan berdasarkan uji keasaman menurut SNI 2981_2009 dengan metode Soxhlet Henkel yaitu ditimbang sebanyak 10 g contoh (pipet 10 ml contoh) (W) dimasukkan ke dalam *erlenmeyer*; dilarutkan dalam air bebas CO₂ sebanyak 2 kali volume dan ditambahkan 2 ml indikator p.p dan titrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sampai terbentuk warna merah muda.

Cara perhitungannya yaitu:

$$\% \text{ asam laktat} = \frac{V \times N \times 90}{W} \times 100\%$$

W= bobot contoh (mg)

V= volume larutan NaOH (ml)

N= normalitan larutan NaOH

90= bobot setara asam laktat

b. Pengukuran nilai pH

Pengukuran pH kefir susu berpedoman pada standar nasional Indonesia (SNI 2981:2009). pH meter dicelupkan ke dalam kefir susu sapi. pH meter akan bekerja secara otomatis. Pada saat pertama dicelupkan angka yang ditunjukkan oleh *display* masih berubah-ubah dan ditunggu 2-3 menit sampai angka digital stabil.

c. Pengukuran kekentalan kefir (viskositas)

Pengukuran viskositas kefir dilakukan dengan menggunakan alat viscometer Brookfield (Saputra, 2011). Pengukuran fluida dengan kekentalan yang belum diketahui dianjurkan dengan mencoba menggunakan *spindle* bernomor besar hingga kecil dengan kecepatan putar dari rendah ke tinggi. Batas atas viskositas tiap *spindle* pada berbagai kecepatan dapat dilihat pada Tabel 3.1. Hal ini karena terdapat batas atas viskositas (cP) yang dapat terukur oleh tiap *spindle* pada bagian kecepatan putar, yaitu :

Tabel 3.1 Batas atas viskositas (cP) tiap *spindle* pada berbagai kecepatan

Spindle	Rpm			
	60	30	12	6
No. 1	100	200	500	1000
No. 2	500	1000	2500	5000
No. 3	2000	4000	10000	20000
No. 4	10000	20000	50000	100000

Sampel sebanyak 200 ml dimasukkan ke dalam gelas piala 250 ml. Spindle dicelupkan ke dalam contoh dan diatur ketinggian viscometer hingga tanda garis tercelup. Pengukuran dilakukan dengan menekan tombol ON dan dibiarkan *spindle* berputar selama 20-30 detik, dan angka yang ditunjukkan oleh jarum dibaca secara tepat. Viskositas dihitung dengan persamaan (1):

$$\text{Viskositas (cP)} = \text{skala yang terbaca} \times \text{faktor konversi} \quad (1)$$

Tabel 3.2 Faktor konversi penetapan viskositas

Spindle	Rpm			
	60	30	12	6
No. 1	1	2	5	10
No. 2	5	10	25	50
No. 3	20	40	100	200
No. 4	100	200	500	1000

d. Pengukuran kadar protein

Contoh ditimbang sejumlah 0,2 gram dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, lalu ditambahkan $1,9 \pm 0,1$ gram K_2SO_4 , 40 ± 10 mg HgO , dan $2,0 \pm 0,1$ ml H_2SO_4 . Kemudian contoh didestruksi sampai cairan menjadi jernih (sekitar 1jam). Larutan jernih ini kemudian dipindahkan ke dalam alat destilasi. Labu Kjeldahl dicuci dengan akuades (1-2 ml) kemudian air cucian dimasukkan ke dalam alat destilasi ditambahkan 8-10ml larutan $NaOH-Na_2S_2O_3$.

Dibawah kondensor diletakkan erlenmeyer yang berisi 5 ml larutan H_3BO_3 dan 2-4 tetes indikator (campuran 2 bagian metil merah 0,2% dalamalkohol dan 1 bagian metil biru 0,2% dalam alkohol). Ujung tabung kondensor harus terendam di dalam larutan H_3BO_3 . Kemudian isi erlenmeyer diencerkan sampai 50 ml

lalu titrasi dengan HCl 0,02 N sampai terjadi perubahan warna menjadi abu-abu. Prosedur yang sama dilakukan juga terhadap blanko. Hitung %N dan kadar protein contoh dengan persamaan (2) dan (3) (Saputra, 2011):

$$\%N = \frac{(\text{ml HCl} - \text{ml HCl blanko}) \times N \text{ HCl} \times 14.007}{\text{mg sampel}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{Kadar protein (\%bb)} = \%N \times \text{faktor konversi (6.38)} \quad (3)$$

Keterangan: %bb = kadar protein per bahan basah (%)

%N = kandungan nitrogen pada contoh (%)

e. Uji TPC (*Total Plate Count*)

Uji TPC (*Total Plate Count*) dilakukan untuk mengetahui jumlah bakteri asam laktat yang hidup dalam kefir. Diambil 1 ml larutan sampel dimasukkan dalam tabung reaksi yang berisi aquades sebanyak 9 ml kemudian disentrifugasi (pengenceran 10^{-1}). Pengenceran dilakukan hingga factor pengenceran 10^{-10} . Dari pengenceran tersebut masing-masing diambil 1 ml dan dimasukkan dalam cawan petri steril. Kemudian media PCA steril dituang dalam cawan petri yang berisi sampel. Diinkubasi pada suhu 37°C selama 2x24 jam. Kemudian jumlah koloni yang tumbuh dihitung dengan menggunakan metode SPC dan dinyatakan dalam satuan CFU/ml atau log CFU/ml. Batas minimal jumlah koloni yang ditentukan SNI 2981:2009 untuk susu dan produk fermentasinya yaitu 1×10^7 CFU/ml.

f. Uji Analisis Lemak (Babcock)

Penentuan lemak dengan botol Babcock sangatlah sederhana. Sampel yang telah ditimbang dengan teliti dimasukkan ke dalam botol Babcock. Pada leher botol

Babcock ini telah dilengkapi dengan skala ukuran volume. Sampel yang dianalisa ditambah asam sulfat pekat (95%) untuk merusak emulsi lemak sehingga lemak akan terkumpul menjadi satu pada bagian atas cairan. Pemisahan lemak dari cairannya dapat lebih sempurna jika dilakukan sentrifugasi. Setelah disentrifugasi lemak akan jelas terpisah dengan cairannya dan agar dapat dibaca banyaknya lemak maka ke dalam botol ditambahkan aquades panas sampai lemak/ minyak tepat pada tanda skala bagian atas, dengan demikian banyaknya lemak/ minyak dapat secara langsung dibaca/ diketahui (Sudarmadji, dkk. 1996).

3.5.2. Tahap Pelaksanaan

Mencit diadaptasi di lingkungan barunya selama 14 hari dengan pakan standar dan minum secara *ad libitum*. Sebelum diberi perlakuan dengan pemberian kefir, semua hewan coba dipuaskan terlebih dahulu kemudian diambil darah dari ekor dan diukur kadar kolesterol awal (hari ke-0). Selanjutnya seluruh mencit diberikan diet tinggi kolesterol yang berupa lemak sapi yang sudah dicairkan selama 7-12 hari hingga mencapai 200 mg/dL secara per oral dengan menggunakan sonde. Selanjutnya seluruh mencit selain control diberikan kefir susu sapi yang telah dibuat pada tahap persiapan dengan kualitas yang terbaik dengan variasi waktu pemberian yang berbeda yaitu 5, 10 dan 15 hari. Kefir diambil sebanyak 0,5 ml dan diberikan pada mencit secara per oral dengan dengan sonde (Idris, dkk., 2011).

3.5.3. Tahap Pengamatan

Pengamatan kadar kolesterol dilakukan dengan cara memotong ujung ekor mencit (*Mus musculus*) (Smith and Mangkoewidjojo, 1998 dalam Purnama, 2011).

Darah yang keluar dari ekor mencit (*Mus musculus*) dimasukkan ke dalam strip pengukuran kadar kolesterol yaitu dengan menggunakan alat pengukur kolesterol portable (Easy Touch®).

3.6. Analisis Data

Data yang didapatkan pada penelitian ini mengenai konsentrasi starter yang berbeda terhadap kualitas kefir dianalisis dengan analisis statistik *One Way ANOVA*. Kemudian jika terjadi perbedaan yang nyata akan dilakukan uji lanjut dengan uji Beda Nyata Jujur (BNJ 5%). Sedangkan data yang didapatkan pada pengukuran kadar kolesterol darah mencit (*Mus musculus*) dianalisis secara deskriptif.