

III. METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan April 2015 - November 2015, di Laboratorium Teknobiologi Pangan Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta, Laboratorium Kimia Analisis Fakultas Farmasi Universitas Sanata Dharma Yogyakarta, dan LPPT Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini adalah neraca analitik Ohaus, pisau, petridish, cawan porselen, baskom, gelas ukur, labu ukur, corong, gelas beker, pipet tetes, pipet ukur, pro pipet, mikropipet, erlenmeyer, tabung reaksi, penjepit tabung reaksi, rak tabung reaksi, trigalski, buret, *vortex*, eksikator, *Texture Analyzer* Brookfield, Loyang, oven Ecocell, kantong plastik klip, spektrofotometer Geneys, corong, batu didih, tanur, autoklaf, labu kjedahl, *soxhlet*, inkubator, *laminair flow*, almari asam, kertas alumunium, kapas, karet, kertas payung, kompor gas, kertas label, kertas saring, lampu bunsen, labu destilasi pyrex.

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian adalah tepung sukun lokal yang diperoleh dari produsen tepung di UD. Putri 21 Kecamatan Paliyan, Kabupaten Gunungkidul – Yogyakarta. Ikan teri nasi didapatkan dari Pasar Nitiprayan. Tepung terigu, air, mentega, dan susu skim dibeli di Toko Mirota jalan Menteri Supeno. Bahan yang digunakan untuk analisis adalah akuades steril,

petroleum eter, H₂SO₄ pekat, H₂SO₄ 1,25%, HCl 0,1 N, katalis N, NaOH 0,1 N, NaOH 40%, Na₂SO₄ murni, indikator *phenolphthalein* (PP), *methyl red* (MR), aseton, alcohol 70%, medium PDA dan medium PCA.

A. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini dilakukan menggunakan 4 variasi substitusi tepung terigu, tepung sukun, dan tepung ikan teri nasi. Variasi perlakuan tersebut dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Substitusi Tepung Sukun dan Tepung Ikan Teri Nasi

Ulangan	Substitusi Tepung Sukun dan Tepung Ikan Teri Nasi (%)			
	30:0	25:5	20:10	15:15
1	A1	B1	C1	D1
2	A2	B2	C2	D2
3	A3	B3	C3	D3

B. Cara Kerja

Penelitian ini dilakukan dengan beberapa tahapan, antara lain :

1. Pembuatan Tepung Ikan Teri Nasi (Perana, 2003; Ferazuma dkk., 2011) Dengan Modifikasi

Tepung dibuat dengan tahap awal berupa pembersihan dan pencucian ikan teri nasi, lalu ikan dihancurkan dengan blender dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 80°C selama 30 menit. Ikan teri nasi yang telah kering dihancurkan lalu diayak dengan ayakan 60 *mesh* sehingga didapatkan tepung ikan teri nasi yang benar-benar kering dan halus sebagai bahan baku pembuatan *crackers*.

2. Uji Pendahuluan Tepung Sukun dan Tepung Ikan Teri Nasi (*Stolephorus sp.*)

Analisis yang dilakukan terhadap tepung sukun meliputi uji kadar air, kadar protein, kadar karbohidrat, kadar lemak, kadar serat kasar, dan kadar abu. Analisis terhadap tepung ikan teri nasi meliputi kadar air, kadar protein, dan kadar abu.

a. Penentuan Kadar Air (Nurjanah, 2006; Hariyanto dan Sambudi, 2010) dengan Modifikasi

Alat *moisture balancing* dinyalakan dan dibuka. Cawan logam dimasukkan ke dalam alat dan tombol *Zero* ditekan untuk kalibrasi berat cawan. Sampel ditaruh di atas cawan sebanyak 1 gram dan kemudian diratakan. Alat ditutup dan tombol *Start* ditekan. Sampel dipanaskan dengan *moisture balancing* hingga kadar air yang diukur secara otomatis selesai. Angka kadar air yang terukur dicatat.

b. Penentuan Kadar Abu (Sudarmadji dkk., 1997)

Wadah dioven selama ± 24 jam lalu ditimbang dan dicatat beratnya. Sampel ditimbang sebanyak 2 gram dan diarangkan menggunakan kompor listrik lalu dipijarkan menggunakan tanur dengan suhu 550°C sampai diperoleh abu berwarna keputih-putihan. Wadah didinginkan dalam eksikator selama 10 menit dan ditimbang. Kadar abu sampel dihitung menggunakan rumus :

$$\text{kadar abu} = \frac{\{(\text{berat cawan} + \text{abu}) - \text{berat cawan}\}}{\text{berat mula} - \text{mula}} \times 100\%$$

c. Penentuan Kadar Lemak dengan Modifikasi (Sudarmadji, 1997)

Sampel dihaluskan dan disaring dengan ayakan dengan diameter 1 mm lalu ditimbang sebanyak 2 g. Sampel dibungkus menggunakan kertas

saring yang telah diketahui beratnya lalu dimasukkan ke dalam sokhlet. Ekstraksi lemak dilakukan dengan sokhlet selama 6 jam lalu pemanas dimatikan. Setelah sokhlet dingin sampel diambil lalu dikeringkan dalam oven dengan suhu 100°C hingga berat konstan.

$$\text{kadar lemak (\%)} = \frac{\text{Berat residu tanpa kertas saring (g)}}{\text{berat sampel (g)}} \times 100\%$$

d. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Kjeldahl dengan Modifikasi (Standardisasi Nasional Indonesia, 2011)

Sampel sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam labu kjedahl lalu ditambah katalisator sebanyak 2 g dan H₂SO₄ pekat sebanyak 25 ml untuk didestruksi dalam lemari asam sampai cairan berwarna bening. Cairan bening tersebut diangkat dan dibiarkan sampai dingin. Setelah dingin, sampel dimasukkan ke dalam labu destilasi yang telah berisi 75 ml larutan NaOH 60% dan akuades 125 ml. Larutan indikator PP ditambahkan 4 tetes hingga basa (warna biru pada kertas lakmus) dan batu didih.

Larutan H₃BO₃ 4% disiapkan 1000 ml yang kemudian ditetesi indikator MR-BCG 3 ml disiapkan. Larutan sebanyak 50 ml kemudian dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Sampel didestilasi hingga warna asam borat berubah biru. Filtrat tersebut dititrasikan dengan larutan HCl 0,01 N sampai berwarna merah. Perlakuan perhitungan %N dikalikan dengan 6,25 yang merupakan konversi serum albumin yang biasanya mengandung 16% nitrogen. Angka 14,007 merupakan berat atom nitrogen. Kadar protein dihitung menggunakan rumus:

$$\%N = \frac{(\text{ml HCl contoh} - \text{ml NaOH blanko}) \times N \text{ HCl} \times 6,25 \times 14,007}{\text{berat bahan (g)} \times 1000} \times 100\%$$

$$\% \text{ Protein} = \%N \times 6,25$$

e. Penentuan Kadar Karbohidrat (Winarno, 2002)

Kadar karbohidrat ditentukan dengan cara perhitungan yaitu metode *carbohydrate by differences*, yaitu angka 100 dikurangi jumlah hasil perhitungan kadar air, kadar protein, kadar lemak, dan kadar abu.

f. Penentuan Kadar Serat Kasar dengan Modifikasi (Sudarmadji, 1997)

Sampel sebanyak 2 g yang akan dianalisis dihaluskan dan disaring menggunakan ayakan dengan diameter 1mm. Bahan diekstraksi lemaknya menggunakan soklet. Bahan dipindahkan ke dalam erlenmeyer ukuran 600 ml. Larutan 0,255 N H₂SO₄ dimasukkan ke dalam erlenmeyer lalu dididihkan selama 30 menit.

Suspensi lalu disaring dengan kertas saring dan residu yang tertinggal dalam erlenmeyer dicuci menggunakan 100 ml akuades mendidih. Seluruh residu pada kertas saring dimasukkan ke erlenmeyer baru yang berisi 0,313 N NaOH sebanyak 200 ml lalu dididihkan selama 30 menit. Suspensi kemudian disaring menggunakan kertas saring yang telah diketahui beratnya sambil dicuci dengan larutan K₂SO₄ 10% sebanyak 50 ml. Residu dicuci kembali dengan 100 ml akuades mendidih dan 15 ml alkohol 95%. Kertas saring dikeringkan dalam oven dengan suhu 110°C selama 1 jam hingga berat konstan.

$$\text{kadar serat kasar (\%)} = (\text{berat residu} : \text{berat sampel}) \times 100\%$$

3. Pembuatan *Non Flaky Crackers* (Susilawati dan Medikasari, 2008) dengan Modifikasi

Pembuatan *non flaky crackers* dimulai dengan pencampuran bahan dan pembentukan adonan, pemipihan adonan menjadi lembaran, pemotongan dan pencetakan, dan pemanggangan. Proses pembuatan *non flaky crackers* diawali dengan pencampuran bahan yaitu 35 g mentega, 5 g gula halus lalu diaduk hingga homogen (campuran 1), kemudian 70 g tepung terigu, 30 g, 25 g, 20 g, dan 15 g tepung sukun, dan tepung ikan teri nasi sebesar 5%, 10%, 15% dicampur kemudian ditambah air dan dibuat adonan sampai kalis. Adonan kemudian disimpan selama 30 menit, lalu dipipihkan setebal 0,2 mm. Adonan dicetak dan diletakkan dalam loyang kemudian dipanggang pada suhu 150°C selama 30 menit. Percobaan menggunakan substitusi seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Komposisi Bahan *Non Flaky Crackers*

Bahan	Takaran Substitusi Tepung Sukun dan Tepung Ikan Teri Nasi			
	30:0 (A)	25:5 (B)	20:10 (C)	15:15 (D)
Tepung terigu	70 gram	70 gram	70 gram	70 gram
Tepung sukun	30 gram	25 gram	20 gram	15 gram
Tepung ikan teri nasi	0 gram	5 gram	10 gram	15 gram
Mentega	35 gram	35 gram	35 gram	35 gram
Gula halus	5 gram	5 gram	5 gram	5 gram

4. Uji Kualitas Kimia *Non Flaky Crackers*

- a. Penentuan Kadar Air dengan Metode Moisture Balancing (Nurjanah, 2006; Hariyanto dan Sambudi, 2010) Dengan Modifikasi

Cara pengujian sesuai dengan penentuan kadar air di halaman 19.

b. Penentuan Kadar Abu (Sudarmadji, 1997)

Cara pengujian sesuai dengan penentuan kadar abu di halaman 19.

c. Penentuan Kadar Lemak Dengan Metode Sokhlet (AOAC, 1995)

Cara pengujian sesuai penentuan kadar lemak di halaman 19.

d. Penentuan Kadar Protein dengan Metode Mikro Kjeldahl (Sudarmadji dkk., 1997).

Cara pengujian sesuai dengan penentuan kadar protein di halaman 20.

e. Penentuan Kadar Karbohidrat (Sudarmadji dkk., 1997)

Cara pengujian sesuai dengan penentuan kadar karbohidrat di halaman 21.

f. Penentuan Kadar Serat Kasar (Sudarmadji, 1997)

Cara pengujian sesuai penentuan kadar serat di halaman 21.

5. Uji Kualitas Mineral Biskuit

a. Penentuan Kadar Kalsium (Cahyadi, 2009)

Pengukuran kadar kalsium ditentukan dengan mengidentifikasi ion Ca^{2+} dalam pengamatan spectrum garis emisi atau absorpsinya menggunakan Spektroskopi Serapan Atom. Uji kuantitatif dengan metode kurva kalibrasi pada panjang gelombang garis emisi atau absorpsi dengan intensitas 422,7 nm.

Prosedur pengukuran yaitu kurva kalibrasi dibuat dengan pengenceran dalam larutan baku ion kalsium pada berbagai konsentrasi yang selanjutnya diukur dengan intensitas tiap larutan pada λ 422,7 nm dan dibuat kurva antara intensitas dan konsentrasi. Bahan berupa 25

gram bahan roti kering yang sudah dihaluskan ditimbang lalu sampel dimasukkan ke dalam tanur yang telah diatur suhunya yaitu 250°C lalu suhu dinaikkan perlahan dengan kenaikan 50°C hingga 350°C sampai tidak terbentuk asap lagi. Suhu dinaikkan menjadi 500°C dengan setiap kenaikan sebesar 75°C dimana contoh tidak boleh terbakar dan sampel diabukan selama 10 jam hingga abu berwarna putih dan bebas karbon.

Abu yang telah bebas karbon dilarutkan dalam 5 ml HNO₃ 1 N. Hangatkan di atas penangas air atau plat pemanas selama 2-3 menit. Saring abu menggunakan S&S 589 *black paper* ke dalam labu ukur 50ml. Pencucian residu diulangi 5 ml HNO₃ 1 N, lalu disaring dan jadikan satu dengan saringan sebelumnya dengan diencerkan menggunakan HNO₃ 0,1 N hingga tanda batas. Hal yang sama dilakukan untuk blanko pereaksi untuk baku dan contoh.

Buat kurva baku kalibrasi dengan memplot emisi atau serapan dari masing-masing baku yang telah dikoreksi dengan blanko, terhadap konsentrasi baku dalam µg/ml butyl asetat. Konsentrasi baku dalam butyl asetat ialah empat kali baku dalam air. Konsentrasi unsur mineral ditetapkan dari kurva baku menggunakan emisi atau serapan contoh yang telah dikurangi dengan blanko pereaksi. Perhitungan kadar kalsium dapat diperoleh dengan memasukkan harga intensitas emisi atau absorpsi dari sampel dalam kurva kalibrasi atau persamaan regresi linier kurva kalibrasi ($Y=bX + a$)

$$\text{Kadar kalsium (ppm)} = \frac{\mu\text{g Ca/ml dari kurva}}{\text{contoh (g)} \times 20/50}$$

6. Uji Fisik *Non Flaky Crackers*

a. Analisis Warna dengan *Colour Reader* (deMan, 1997)

Sampel *non flaky crackers* disiapkan dan dimasukkan ke dalam plastik. Setelah itu *colour reader* dinyalakan sehingga muncul pilihan sistem pengukuran pada layar. Sistem pengukuran L, a, b dipilih, lalu *Colour Reader* dikalibrasi dengan warna standar CaSO₄, dipilih warna putih yang menunjukkan warna netral dengan nilai L = 100,13; a = 3,73; dan b = 174,37 dan hasil kalibrasi disimpan dalam memori. Pengukuran terus dilakukan hingga alat memberi cahaya terhadap sampel sebanyak 2 kali sehingga didapat hasil pengukuran berupa nilai L, a, b. Nilai dimasukkan ke dalam rumus untuk mencari nilai x dan y. Setelah nilai x dan y diketahui maka dilakukan visualisasi dari angka ke warna menggunakan kalkulator warna.

b. Analisis Tekstur Menggunakan *Lyod Instrument* (Winarni, 1995)

Pengukuran tekstur *non flaky crackers* ditentukan secara objektif menggunakan *Lyod Instrument* dengan kecepatan 3 mm/menit. Sampel *non flaky crackers* disusun dengan ketebalan 1,5 cm diletakkan di atas meja objek kemudian tombol *enter* ditekan sehingga jarum penetrometer akan menekan *non flaky crackers* sampai tidak dapat ditekan lagi. Jarum penetrometer kemudian ditarik keatas secara otomatis. Tahap dilanjutkan dengan analisis grafik tekstur *non flaky crackers* yang ditampilkan oleh alat *Universal Testing Instrument*.

7. Uji Mikrobiologi *Non Flaky Crackers*

a. Perhitungan Angka Lempeng Total (Standardisasi Nasional Indonesia, 2011)

Sampel *non flaky crackers* diambil sebanyak 1 gram dan dilarutkan dalam 9 ml akuades steril kemudian divorteks selama 2 menit sampai tercampur homogen untuk pengenceran 10^{-1} . Larutan kemudian diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml akuades steril menjadi konsentrasi 10^{-2} dan seri pengenceran dilanjutkan sehingga didapatkan larutan dengan konsentrasi 10^{-3} , 10^{-4} . Larutan dengan pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , kemudian diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasi ke dalam medium *Plate Count Agar* (PCA) dalam cawan petri secara *pour plate* dan diratakan dengan menggoyang cawan membentuk jalur berbentuk angka delapan. Cawan petri ditunggu hingga dingin dan agar medium memadat.

Tahap selanjutnya cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator untuk proses inkubasi pada suhu 37°C selama 2 x 24 jam. Koloni yang tumbuh dapat langsung dihitung secara kasat mata. Jumlah total mikroorganisme dihitung menggunakan perkalian jumlah koloni yang tumbuh dengan faktor pengenceran.

b. Perhitungan Angka Kapang dan Khamir (Standardisasi Nasional Indonesia, 2011)

Jumlah kapang dan khamir dihitung pada sampel *non flaky crackers*. Larutan hasil pengenceran 10^{-1} dan 10^{-2} masing-masing diambil sebanyak 1 ml dan diinokulasikan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam petri secara *pour plate* dan digoyangkan dengan membentuk jalur berupa

huruf delapan hingga homogen. Cawan petri dimasukkan ke dalam inkubator untuk diinkubasi pada suhu 37°C selama 3 x 24 jam. Koloni yang tumbuh dihitung secara kasat mata. Jumlah total mikroorganisme dihitung menggunakan perkalian jumlah koloni tumbuh dengan faktor pengenceran.

8. Uji Organoleptik (Lawless dan Heymann, 1999)

Uji organoleptik untuk *non flaky crackers* ikan teri nasi bertujuan mengetahui tingkat kesukaan panelis. Jumlah panelis yaitu 60 orang yang terdiri dari 30 orang laki-laki dan 30 orang perempuan. Uji organoleptik meliputi warna, tekstur, aroma, dan rasa. Hasil pengujian akan diurutkan dengan tingkatan yang paling disukai dengan yang paling tidak disukai. Terdapat angka yang menunjukkan nilai dalam parameter yang diujikan yaitu : 4 = sangat suka, 3 = suka, 2 = agak suka, dan 1 = tidak suka.

9. Analisis Data (Gasperz, 1991)

Data yang diperoleh kemudian dianalisis menggunakan ANAVA satu arah dan untuk mengetahui letak beda nyata antar perlakuan digunakan tes *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan tingkat kepercayaan 95% dan tingkat signifikansi 0,05.