

III. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Teknobia-pangan dan Laboratorium Teknobia-produksi, Fakultas Teknobiologi Universitas Atma Jaya Yogyakarta. Penelitian dimulai pada bulan Februari hingga bulan Juni 2016.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan adalah *mixer*, baskom, panci, cetakan biskuit, loyang, oven, *roller*, pengayak tepung (80 mesh), toples, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas beker, kompor gas, cawan aluminium, *soxhlet Isopad*, labu destilasi, labu Kjeldahl, lemari asam, *texture analyzer LFRA Texture Analyzer Brookfield*, *probe*, *moisture balance Phoenix Instrument*, erlenmeyer, buret, statif, tanur, cawan porselin, mortar, pro pipet, pipet ukur, pipet tetes, sendok, neraca analitik Explorer Ohaus, autoklaf *My Life MA631*, kertas saring, *Laminar Air Flow SV 1200 SG*, inkubator *Memert*, kapas, cawan petri, mikro pipet, tip, *vortex 37600 Mixer*, kantong plastik, sarung tangan, masker, kertas payung, karet, *aluminium foil*, batu didih, *chromamometer Konica Minolta*, diagram kromatisasi CIE, desikator, pisau, *blender*, penjepit, bunsen, trigalski, microwave *Electrolux*, *colony counter*, corong, buret, dan gelas pengaduk.

Bahan yang digunakan adalah tepung terigu Segitiga Biru yang diperoleh dari toko Mirota (Yogyakarta), tepung sorgum yang diperoleh dari daerah Gombang (Kebumen), tempe kedelai yang dibeli di Pasar Gede (Surakarta).

Bahan yang lain yaitu telur, susu bubuk, garam halus, gula pasir, margarin, dan soda kue yang diperoleh dari toko bahan kue daerah Janti (Yogyakarta). Bahan yang digunakan untuk analisis adalah aquades, petroleum eter, katalisator K_2SO_4 , K_2SO_4 10%, NaOH 0,3N, larutan H_2SO_4 pekat, larutan H_2SO_4 0,3N, larutan NaOH 0,1N, NaOH 40%, larutan HCl 0,1N, indikator *phenolptalein* (PP), indikator *methyl red*, $CaSO_4$, alkohol 95%, medium *Plate Count Agar* (PCA) dan *Potato Dextrose Agar* (PDA).

C. Rancangan Percobaan

Rancangan Percobaan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian dilakukan dengan menggunakan 3 kali ulangan dengan 5 jenis kombinasi tepung sorgum dengan penambahan tepung tempe untuk mendapatkan produk biskuit yang baik (warna, tekstur, aroma, rasa, dan nilai gizinya). Kombinasi tepung sorgum dan tepung tempe dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Kombinasi Tepung Sorgum dan Tepung Tempe

Ulangan	Komposisi tepung sorgum (g): tepung tempe (g)				
	0 : 0 A	50 : 10 B	40 : 20 C	30 : 30 D	20 : 40 E
1	A1	B1	C1	D1	E1
2	A2	B2	C2	D2	E2
3	A3	B3	C3	D3	E3

Keterangan : huruf A, B, C, D, dan E adalah variasi perlakuan dan angka 1, 2, dan 3 adalah ulangan ke-

D. Tahap Penelitian

Tahapan penelitian yang akan dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Pembuatan tepung tempe
2. Uji proksimat tepung sorgum dan tepung tempe meliputi : kadar karbohidrat, kadar serat, kadar air, kadar protein, kadar lemak, dan kadar abu
3. Pembuatan biskuit sesuai dengan perlakuan kombinasi tepung terigu, tepung sorgum dan tepung tempe. Biskuit kontrol dibuat dengan bahan dasar tepung terigu saja.
4. Analisa mutu biskuit meliputi : uji fisik (tekstur dan warna), uji kimia (air, karbohidrat, serat, protein, lemak, dan kadar abu), uji mikrobiologis (Angka Lempeng Total, kapang, dan khamir) dan uji organoleptik (warna, bau/ aroma, tekstur, dan rasa).

E. Cara Kerja

1. Pembuatan Tepung Tempe (Bastian, dkk., 2013) dengan modifikasi

Pembuatan tepung tempe dimulai dengan pengirisan tempe dengan ketebalan 0,5 -1 cm. Tempe yang telah diiris-iris kemudian diblansir menggunakan air panas (90°C) selama 15 menit. Tempe yang telah diblansir kemudian ditiriskan lalu dikeringkan menggunakan oven pada suhu 100°C selama 2 jam. Tempe yang telah kering kemudian digiling menggunakan *blender* dan diayak menggunakan ayakan 80 mesh.

2. Uji Proksimat Tepung Sorgum

Uji proksimat tepung sorgum meliputi kadar karbohidrat, kadar serat kasar, kadar air, kadar protein, kadar lemak, dan kadar abu (cara kerja dapat dilihat pada uji kimia mutu biskuit).

3. Uji Proksimat Tepung Tempe

Uji proksimat tepung tempe meliputi kadar karbohidrat, kadar serat kasar, kadar air, kadar protein, kadar lemak, dan kadar abu (cara kerja dapat dilihat pada uji kimia mutu biskuit)

4. Tahapan Pembuatan biskuit

a. Biskuit dari tepung terigu (kontrol positif) (Sulistyo, 1999) dengan modifikasi.

Pembuatan biskuit pada percobaan ini menggunakan 100 g tepung terigu (protein sedang), 20 g mentega , 50 g gula pasir , susu bubuk 7 g, 1,7 g garam, dan 1,17 g soda kue. Mentega, susu bubuk, gula, soda kue, garam, kuning telur, dan air diaduk rata menggunakan mixer dengan kecepatan tinggi selama \pm 15 menit, hingga adonan menjadi kalis. Setelah adonan tercampur homogen, ditambahkan tepung terigu, sambil dituangkan air sedikit demi sedikit sambil diaduk.

Adonan yang terbentuk kemudian dicetak di atas loyang. Setelah itu, biskuit dipanggang di dalam oven dengan suhu 100°C selama 40 menit. Biskuit yang sudah masak didinginkan pada suhu kamar ($26 - 27^{\circ}\text{C}$) selama \pm 15 menit. Biskuit yang dibuat dari tepung terigu pada percobaan ini digunakan sebagai kontrol positif dengan konsentrasi tepung terigu 100%.

b. Biskuit dengan variasi tepung sorgum dan tepung tempe

Pembuatan biskuit variasi tepung sorgum dan tepung tempe pada dasarnya sama dengan pembuatan biskuit dari tepung terigu, perbedaannya terletak pada variasi tepung sorgum dan tepung tempe yang digunakan. Kombinasi tepung sorgum dan tepung tempe yang digunakan yaitu 0 : 0 (kontrol positif), 50 : 10, 40 : 20, 30 : 30, dan 20 : 40.

Pembuatan biskuit dilakukan setelah analisis proksimat tepung sorgum dan tepung tempe. Bahan – bahan yang dibutuhkan dalam pembuatan biskuit ditimbang (Komposisi bahan dapat dilihat pada Tabel 7). Bahan – Bahan seperti gula, kuning telur, mentega, susu bubuk, soda kue, dan garam dicampur sampai adonan kalis. Kemudian tepung sorgum, tepung tempe, dan tepung terigu dimasukkan ke dalam adonan tersebut selanjutnya diaduk dan ditambahkan air sedikit demi sedikit sampai adonan tidak terasa lengket di tangan. Adonan yang sudah jadi dicetak dan dipanggang dengan oven pada suhu 100°C selama 40 menit.

Tabel 7. Formulasi Bahan-Bahan Pembuat Biskuit

Bahan	Komposisi biskuit				
	0 : 0 A	50 : 10 B	40 : 20 C	30 : 30 D	20 : 40 E
Tepung sorgum	0 gram	50 gram	40 gram	30 gram	20 gram
Tepung tempe	0 gram	10 gram	20 gram	30 gram	40 gram
Tepung terigu	40 gram	40 gram	40 gram	40 gram	40 gram
Gula	50 gram	50 gram	50 gram	50 gram	50 gram
Margarin	20 gram	20 gram	20 gram	20 gram	20 gram
Susu bubuk	7 gram	7 gram	7 gram	7 gram	7 gram
Garam	1,7 gram	1,7 gram	1,7 gram	1,7 gram	1,7 gram
Telur	2 butir	2 butir	2 butir	2 butir	2 butir
Soda kue	1,17 gram	1,17 gram	1,17 gram	1,17 gram	1,17 gram

5. Analisis mutu biskuit meliputi :

1. Uji kimia meliputi :

a. Penentuan Kadar Air (Sembiring, 2009 dengan modifikasi)

Alat *moisturizer balance* dihidupkan dan dinolkan angkanya. Sampel biskuit sebanyak lima gram ditempatkan dalam cawan aluminium. Alat *moisturizer balance* ditutup dan ditunggu sampai memberikan tanda. Angka yang tercatat pada alat *moisturizer balance* dibaca dan dicatat kadar airnya

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

Wadah dimasukan ke dalam oven pada suhu 100°C selama kurang lebih satu jam lalu ditimbang dan dicatat beratnya. Sampel ditimbang sebanyak dua gram lalu dipijarkan dalam tanur dengan suhu 550°C selama delapan jam hingga diperoleh abu berwarna keputih-putihan. Wadah didinginkan kemudian kadar abu sampel dihitung dengan rumus:

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

c. Penentuan Kadar Protein Metode Kjeldhal (Sudarmadji dkk., 1997)

Sampel biskuit ditimbang sebanyak satu gram. Sampel dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl lalu ditambahkan katalisator K_2SO_4 sebanyak satu gram dan larutan H_2SO_4 pekat sebanyak 10 ml dan didestruksi dalam lemari asam hingga cairan berwarna bening. Sampel kemudian diangkat dan didinginkan hingga benar-benar dingin. Setelah dingin, sampel dimasukkan ke dalam labu destilasi dan ditambahkan aquadest sebanyak 50 ml, tiga tetes indikator PP dan larutan NaOH 40% hingga basa (warna biru pada kertas lakmus) dan ditambahkan batu didih secukupnya. Larutan HCl 0,1N sebanyak 10 ml dan dua tetes indikator

methyl red dimasukkan kedalam gelas beker sebagai penampungan. Sampel didestilasi hingga menghasilkan filtrat sebanyak 50 ml. Filtrat tersebut kemudian dititrasikan dengan larutan NaOH 0,1N hingga berwarna kuning jerami. Kadar protein dihitung dengan rumus:

$$\%N = \frac{\text{ml NaOH (blanko - sampel)}}{\text{berat sampel} \times 1000} \times N \text{ NaOH} \times 14,008 \times 100\%$$

$$\% P = \% N \times 6,25$$

Keterangan :N = nitrogen, P = protein

d. Penentuan Kadar Lemak (Sudarmadji dkk., 1997)

Sampel dihaluskan dan diambil sebanyak dua gram kemudian air pendingin dialirkan melalui kondensor. Tabung ekstraksi dipasang pada alat destilasi *soxhlet* dengan pelarut petroleum eter selama empat jam. Residu dalam tabung ekstraksi diaduk dan ekstraksi dilanjutkan kembali selama dua jam dengan pelarut yang sama. Petroleum eter yang telah mengandung ekstrak lemak dipindahkan ke dalam botol timbang yang bersih dan telah diketahui beratnya lalu diuapkan dengan pemanas air hingga agak pekat. Pengeringan diteruskan di dalam oven dengan suhu 100°C hingga berat konstan. Berat residu dalam botol dinyatakan sebagai berat lemak. Kadar lemak dihitung dengan rumus :

$$\text{Kadar lemak} = \frac{\{(\text{berat labu + lemak}) - \text{berat labu}\}}{\text{berat sampel (g)}}$$

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

Penentuan kadar karbohidrat dengan cara perhitungan yang disebut *carbohydrate by different* yaitu angka 100 dikurangi kadar air, kadar abu, kadar lemak dan kadar protein. Rumus yang digunakan adalah :

$$\text{Kadar karbohidrat (\%b/b)} = 100\% - (\text{KA} + \text{A} + \text{P} + \text{L})$$

Keterangan :

KA = Kadar air (%)

A = Kadar abu (%)

P = Kadar protein (%)

L = Kadar lemak (%)

f. Penentuan Kadar Serat Kasar (Sudarmadji dkk., 1997)

Sampel biskuit dihaluskan dan ditimbang sebanyak dua gram. Lemak sampel diekstraksi dengan *soxhlet*. Sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan H₂SO₄ pekat sebanyak 200 ml dan ditutup dengan pendingin balik. Larutan dipanaskan selama 30 menit sambil digoyang-goyangkan.

Suspensi disaring menggunakan kertas saring dan residu yang tertinggal dalam erlenmeyer dicuci dengan aquades mendidih. Residu dalam kertas saring dicuci hingga tidak bersifat asam lagi (diuji dengan kertas lakmus). Residu dalam kertas saring dipindahkan secara kuantitatif ke dalam erlenmeyer dengan menggunakan spatula, dan sisanya dicuci dengan NaOH 0,3 N mendidih sebanyak 200 ml sampai semua residu masuk ke dalam erlenmeyer. Setelah itu larutan dididihkan dengan pendingin balik selama 30 menit sambil digojog.

Larutan disaring menggunakan kertas saring yang telah diketahui beratnya sambil dicuci dengan K₂SO₄ 10%. Residu dicuci lagi dengan aquades mendidih kemudian dengan alkohol 95% kurang lebih sebanyak 15 ml. Kertas saring beserta isinya dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 110°C sampai berat konstan (1-2 jam) kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang. Kadar serat kasar dapat diketahui dengan cara :

$$\text{Berat residu} = \text{Berat serat kasar}$$

2. Uji fisik meliputi :

a. Analisis tekstur (Winarni, 1995)

Tekstur biskuit ditentukan secara objektif dengan menggunakan LI (*Lloyd Instrument*) dengan kecepatan 3 mm/menit. Sampel biskuit dipotong bentuk kubus dengan ukuran 1,5 x 1,5x 1,5 cm² kemudian diletakkan di atas meja obyek kemudian tombol enter pada komputer ditekan sehingga jarum penetrometer (probe) akan menekan biskuit sampai tidak dapat ditekan lagi. Jarum penetrometer kemudian ditarik lagi ke atas secara otomatis, setelah itu alat *Texture Analyzer* akan menampilkan grafik tekstur biskuit pada layar komputer. Hasil analisa tekstur biskuit dapat dibaca dari hasil *print out* komputer.

b. Analisis warna menggunakan *chromamometer* (deMan, 1997)

Dalam analisis warna dengan *chromamometer*, sampel biskuit disiapkan kemudian alat dinyalakan sehingga muncul salah satu sistem pengukuran pada layar. Pengukurannya menggunakan sistem L.a.b. Alat tersebut dikalibrasi menggunakan warna standar CaSO₄ dipilih warna putih. Warna putih menunjukkan warna netral. Dengan nilai L=100,13; a=-3,73; b=174,37 dan hasil kalibrasi disimpan dalam memori. Pengukuran terus dilakukan hingga alat memberi cahaya terhadap sampel sebanyak 2 kali. Hasil pengukuran berupa nilai L, a, b. Kemudian nilai L, a, b dimasukkan dalam rumus x dan y, lalu dibandingkan dengan diagram kromatisasi CIE, dan diperoleh warna dari produk yang dihasilkan

$$x = \frac{a + 1,75 \times L}{5,645 \times L + a - 3,012 \times b} \quad y = \frac{1,786 \times L}{5,645 \times L + a - 3,012 \times b}$$

3. Uji mikrobiologi

a. Perhitungan angka lempeng total (Fardiaz dan Margino, 1993)

Dalam perhitungan angka lempeng total, sampel biskuit diambil sebanyak 10 gram dan dilarutkan ke dalam 90 ml aquadest steril kemudian divortex selama 2 menit sampai tercampur homogen untuk pengenceran 10^{-1} . Larutan diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml aquadest steril (konsentrasi 10^{-2}) dan dibuat seri pengenceran dengan konsentrasi 10^{-3} , dan 10^{-4} . Larutan dengan pengenceran 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , dan 10^{-4} masing-masing diambil sebanyak 0,1 ml dan diinokulasi pada medium *Plate Count Agar* (PCA) dalam petri secara *spread plate* kemudian diratakan dengan trigalski. Petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh dihitung dengan *colony counter*. Jumlah total mikroorganisme dihitung dengan mengalikan jumlah koloni yang tumbuh dengan faktor pengenceran.

b. Angka kapang khamir (Pit dan Hocking, 1985)

Perhitungan jumlah kapang dan khamir dilakukan pada sampel biskuit. Larutan dengan pengenceran 10^{-1} dan 10^{-2} , masing-masing diambil sebanyak 0,1 ml dan diinokulasikan pada medium *Potato Dextrose Agar* (PDA) dalam petri secara *spread plate* dengan menggunakan trigalski. Petri kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Koloni yang tumbuh dihitung dengan *colony counter*. Perhitungan jumlah koloni dipilih pada tingkat pengenceran yang mengandung koloni antara 30 – 300 atau sesuai dengan *Standard Plate Count* sebagai berikut :

Bila jumlah koloni kurang dari 30 (< 30) :

$$N = < 30 \times \frac{1}{d}$$

Bila jumlah koloni antara 30 – 300 :

$$N = \frac{\sum c}{\{(1 \times n1) + (0.1 \times n2)\} \times d}$$

Keterangan :

N = jumlah koloni setiap gram contoh uji pada medium PCA (CFU/mg)

$\sum C$ = total koloni dari seluruh cawan yang dihitung

n1 = jumlah cawan pada pengenceran pertama yang dihitung

n2 = jumlah cawan pada pengenceran kedua yang dihitung

d = pengenceran pertama yang dihitung

6. Uji Organoleptik (Larmond, 1997)

Uji organoleptik dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui tingkat kesukaan konsumen terhadap produk biskuit yang terbuat dari tepung sorgum dan tepung tempe. Uji ini dilakukan dengan cara menyebar kuisisioner kepada 30 orang. Uji ini meliputi warna, rasa, tekstur dan aroma. Hasil uji kemudian diurutkan sesuai tingkatan yang paling disukai hingga yang paling tidak disukai. Skor yang digunakan adalah: 4 = sangat suka; 3 = suka; 2 = agak suka; dan 1 = tidak suka.

7. Analisis data (Gasperz, 1991)

Data yang diperoleh akan dianalisis dengan menggunakan ANAVA, dan untuk mengetahui letak beda nyata antar perlakuan digunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan tingkat kepercayaan 95 %. Data diproses dengan menggunakan program SPSS versi 15.