

## BAB 4

## METODE PENELITIAN

## 4.1 Rancangan Penelitian

Jenis rancangan adalah penelitian *true experimental* dengan desain penelitian rancangan acak lengkap (RAL). Perlakuan penelitian adalah penggantian tepung terigu dengan Mocaf dan tepung tempe sebagai bahan pembuatan *cookies* GFCF. Penelitian ini dilakukan dengan 5 taraf perlakuan. Setiap taraf perlakuan dilakukan 3 kali replikasi sehingga secara keseluruhan didapatkan 15 sampel. Desain Rancangan Acak Lengkap (RAL) secara lengkap disajikan pada tabel.

Tabel 4.1. Rancangan Acak Lengkap

Taraf Perlakuan (Mocaf : Tepung Tempe)	Replikasi		
	I	II	III
P0 (100% : 0%)	R01	R02	R03
P1 (90% : 10%)	R04	R05	R06
P2 (80% : 20%)	R07	R08	R09
P3 (70% : 30%)	R10	R11	R12
P4 (60% : 40%)	R13	R14	R15

Tabel 4.2. Randomisasi Unit Eksperimen

No. Urut	Bilangan Random	Rangking
1	980	10
2	780	5
3	675	2
4	784	6
5	679	9
6	453	1
7	627	4
8	199	7

9	068	3
10	761	8
11	887	15
12	563	11
13	907	13
14	661	12
15	833	14

## 4.2 Variabel Penelitian

### 4.2.1 Variabel Independen

Variable bebas pada penelitian ini adalah:

1. Perbandingan jumlah substitusi Mocaf dan tepung tempe.

### 4.2.2 Variabel Dependen

Variable terikat yang digunakan dalam penelitian ini adalah zat gizi makro (protein), Skor asam amino, jumlah mikrobiologi *E. coli*.

## 4.3 Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian akan dilaksanakan pada bulan Januari – Februari 2013 di :

1. Laboratorium Lembaga Studi Ilmu Hayati Universitas Brawijaya Malang pengujian kadar protein (analisis Kjeldahl) dari *cookies*.
2. Laboratorium Penyelenggaraan Makanan Jurusan Gizi kesehatan Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk pembuatan *cookies* dan pengujian organoleptik.
3. Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang untuk melakukan uji mikrobiologi terhadap *cookies* Mocaf dan tepung tempe.

#### 4.4 Alat/Instrumen dan Bahan Penelitian

##### 4.4.1 Pembuatan tepung tempe dan cookies

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan, pisau, baskom, ayakan, oven listrik Kirin, Loyang, blender Philips, kompor gas Modena, cetakan kue. Alat-alat tersebut dapat diperoleh dari laboratorium dimana penelitian dilaksanakan.

Bahan yang digunakan untuk membuat tepung tempe adalah tempe segar yang bisa dibeli di Sentra Pembuatan Tempe Sanan, Malang. Sedangkan bahan utama pembuatan cookies adalah Mocaf yang dapat dibeli di Koperasi gemah Ripah Loh Jinawi Desa Kerjo Kecamatan Karang kabupaten Trenggalek. Komposisi bahan-bahan setiap unit eksperimen disajikan pada tabel 4.3.

**Tabel 4.3. Bahan Pengolahan Cookies**

Jenis Bahan	Jumlah bahan pada setiap unit eksperimen pada masing-masing taraf perlakuan				
	P0	P1	P2	P3	P4
Mocaf (g)	150	135	120	105	90
Tepung Tempe (g)	0	15	30	45	60
Kuning telur (butir)	1	1	1	1	1
Gula halus (g)	75	75	75	75	75
Margarine (g)	125	125	125	125	125
Keterangan:					
Total kebutuhan Mocaf pada masing-masing unit eksperimen		= 150 : 135 : 120 : 105 : 90			
Total kebutuhan tepung tempe pada masing-masing unit eksperimen		= 0 : 13 : 30 : 45 : 60			

##### 4.4.2 Alat Pengujian Mutu Cookies

Analisis	Analisis Mutu Cookies	
	Bahan	Alat
Kadar protein	Asam sulfat pekat, air raksa oksida, kalium sulfat, larutan natrium hidroksida-natrium tiosulfat, larutan asam borat jenuh, larutan asam klorida 0.02 n, sampel	Pemanas kjedahl lengkap, labu kjedahl berukuran 30 ml/50, alat distilasi lengkap dengan erlenmeyer, buret 25 ml/50 ml, erlenmeyer, statif, gelas beker, pipet

Pengukuran mutu protein	Kandungan protein dalam setiap sampel	tetes
Uji TPC <i>E. Coli</i>	Tabung reaksi, timbangan digital (alat timbang analitik dengan ketelitian $\pm 0,0001$ g dan $\pm 0,1$ g), pipet ukur mikro, gelas preparat, <i>inkubator</i> , <i>waterbath</i> , cawan petri, alat penghitung koloni, ose, <i>vortex</i> , <i>autoclave</i> , dan mortar.	Tabel perhitungan mutu protein Media <i>Eosin methylene blue Agar</i> (EMBA), NaCl 0,9%, aquades steril, <i>aluminium foil</i>
Uji organoleptik	Sampel (cookies)	Piring kecil, gelas, air minum, form kuesioner, alat tulis

#### 4.5 Definisi Istilah/Definisi Operasional

Variabel	Definisi Operasional Variabel
<b>Mocaf</b>	MOCAF (Modified Cassava Flour) adalah produk tepung dari ubi kayu yang diproses dengan menggunakan prinsip memodifikasi sel ubi kayu secara fermentasi. Mocaf ini dibeli di Koperasi Gemah Ripah Loh Jinawi, Desa Kerjo, Kecamatan Karang, Kabupaten Trenggalek, Jawa Timur.
<b>Tepung tempe</b>	Tepung tempe yang digunakan adalah tepung yang terbuat dari tempe kacang kedelai yang dibeli dari Sentra Pembuatan Tempe Sanan Malang, yang diproses dengan cara dipotong, kemudian dikeringkan dan ditepungkan dengan ayakan.
<b>Kadar protein</b>	Kadar protein adalah jumlah protein yang terkandung didalam <i>cookies</i> yang terbuat dari Mocaf dan tepung tempe, yang diukur dengan menggunakan metode Kjeldahl. Dan hasilnya dinyatakan dalam bentuk gram protein
<b>Penentuan protein</b>	<b>mutu</b> Penetapan mutu protein dengan beberapa tolok ukur yaitu nilai biologis, <i>net protein utilization</i> dan skor kimia/skor asam amino.
<b>Mutu mikrobiologi</b>	Jumlah bakteri <i>E. coli</i> pada cookies dalam cawan yang menggunakan uji TPC ( <i>Total Plate Count</i> )
<b>Mutu organoleptik</b>	Tingkat kesukaan panelis yang ditentukan dengan menggunakan uji <i>hedonic</i> meliputi warna, rasa, flavor, dan kerenyahan terhadap cookies dengan menggunakan skala penilaian 1 sampai dengan 7

## 4.6 Prosedur Penelitian/Pengumpulan Data

### 4.6.1 Pembuatan Tepung Tempe

1. Tempe segar dipotong tipis-tipis dengan menggunakan pemotong atau *slicer*
2. Kemudian dikeringkan dibawah sinar matahari selama 3-5 jam.
3. Setelah kering, kemudian dilakukan penggilingan.
4. Diayak menggunakan ayakan untuk menjadi tepung tempe.

### 4.6.2 Pembuatan Cookies

1. Aduk rata Mocaf dan tepung tempe. Ayak dan sisihkan.
2. Kocok margarine, kuning telur, gula halus, dan garam menggunakan mixer hingga lembut.
3. Masukkan campuran tepung terigu kedalam adonan margarine, aduk rata. Tekan-tekan menggunakan sendok kayu atau spatula plastic hingga terbentuk adonan yang menyatu.
4. Pipihkan adonan menggunakan *Rolling pin* kemudian cetak menggunakan cetakan. Lakukan hingga adonan habis.
5. Panggang kue di dalam oven bertemperatur 150°C selama 25 menit atau hingga kue matang. Angkat dan dinginkan.

### 4.6.3 Uji Mikrobiologi TPC *Escherichia coli*

#### Cara Kerja

Analisa jumlah *Escherichia Coli* menggunakan metode cawan hitung (*Plate Count*) dengan media *Eosin Methylene Blue Agar* yaitu meliputi:

- a. Preparasi contoh

Siapkan *cookies* yang akan dianalisa mikrobiologi.

b. Prosedur

Masing-masing sampel ditimbang secara aseptik sebanyak  $\pm 1$  g untuk contoh dengan berat kurang dari 1 kg, kemudian diletakkan dalam *aluminium foil*. Sampel kemudian dihaluskan dalam mortar kemudian tambahkan 9 ml NaCl lalu dihomogenkan selama 2 menit. Homogenat ini merupakan larutan pengenceran  $10^{-1}$ . 1 ml homogenat diambil dan dimasukkan ke dalam 9 ml larutan NaCl dengan menggunakan pipet ukur steril untuk mendapatkan pengenceran  $10^{-2}$ . Pengenceran berikutnya ( $10^{-3}$ ) dilakukan dengan mengambil 1 ml contoh dari pengenceran  $10^{-2}$  ke dalam 9 ml NaCl. Setiap pengenceran dilakukan *vortex* agar sampel menyampur seluruhnya dalam larutan NaCl. Selanjutnya lakukan hal yang sama untuk pengenceran  $10^{-4}$ , dan  $10^{-5}$  sesuai kondisi contoh.

c. Isolasi *Escherichia Coli*

- 1) Pengenceran  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ , dan seterusnya dipindahkan secara aseptik dan diambil 1 ml untuk dimasukkan dalam 3 cawan masing-masing (0,3 ml; 0,3 ml) yang sudah berisi media EMBA.
- 2) Inokulum diratakan pada permukaan agar (*striking*) dengan menggunakan ose pada media EMBA.
- 3) Koloni *Escherichia coli* pada EMBA mempunyai ciri-ciri: koloni bundar, sekeliling tepi koloni dikelilingi oleh zona warna logam perak atau *methalic sheen*.

d. Perhitungan Koloni

- 1) Cawan petri dipilih yang mempunyai jumlah koloni 30-300 lalu dihitung dan dicatat jumlah koloninya.

- 2) Bila terdapat beberapa jenis koloni yang terlihat seperti *Escherichia coli* pada cawan petri, masing-masing jenis tersebut dihitung dan dicatat hasil perhitungannya secara terpisah.
- 3) Jika cawan petri pada pengenceran terendah berisi kurang dari 30 koloni, data koloni dapat digunakan.
- 4) Bila terdapat cawan yang berisi lebih dari 300 koloni dengan ciri-ciri *Escherichia coli* dan pada pengenceran yang lebih tinggi tidak ditemukan koloni, maka cawan tersebut digunakan untuk menghitung *Escherichia coli*.

#### 4.6.4 Uji Analisis Zat Gizi Protein

##### 4.6.4.1 Analisis Kadar Protein

1. Timbang 1 g bahan yang telah dihaluskan dan masukkan ke dalam labu kjeldahl. Kalau kandungan protein bahan tinggi, gunakan bahan kurang dari 1 g. kemudian tambahkan 7.5 g  $K_2S_2O_4$  dan 0.35 g HgO dan akhirnya tambahkan 15 ml  $H_2SO_4$  pekat.
2. Panaskan semua bahan dalam labu kjeldahl dalam almari asam sampai berhenti berasap. Teruskan pemanasan dengan api besar sampai mendidih dan cairan menjadi jernih. Teruskan tambahkan lebih kurang 1 jam. Matikan api pemanas dan biarkan bahan menjadi dingin.
3. Kemudian tambahkan 100 ml aquades dalam labu kjeldahl yang didinginkan dalam air es dan beberapa lempeng Zn, juga tambahkan 15 ml larutan  $K_2SO_4$  (dalam air) dan akhirnya tambahkan perlahan-lahan larutan NaOH 50% sebanyak 50 % sebanyak 50 ml yang sudah didinginkan dalam lemari es. Pasanglah labu kjeldahl dengan segera pada alat destilasi.

4. Panaskan labu kjeldahl perlahan-lahan sampai dua lapisan cairan tercampur kemudian panaskan dengan cepat sampai mendidih.
5. Distilat ini ditampung dalam Erlenmeyer yang telah diisi dengan 50 ml larutan standar HCl (0.1 N) dan 5 tetes indikator metal merah. Lakukan distilasi sampai distilat yang tertampung sebanyak 75 ml.
6. Titrasi distilat yang diperoleh dengan standar NaOH (0.1 N) sampai warna kuning. Buatlah juga larutan blanko dengan mengganti bahan dengan aquades, lakukan destruksi, destilasi dan titrasi seperti pada bahan contoh.

Perhitungan:

$$\% \text{ Nitrogen} = \frac{(ml \text{ NaOH blanko} - ml \text{ NaOH sampel}) \times N \text{ HCl} \times 100 \times 14.008}{g \text{ sampel} \times 1000}$$

$$\% \text{ Kadar protein} = \% \text{ nitrogen} \times \text{factor konversi (6,25)}$$

#### 4.6.5 Penilaian Mutu Protein

##### 4.6.5.1 Skor Kimia/Skor Asam Amino

1. Membuat tabel SAA
2. Memasukkan makanan yang ditentukan SAA
3. Menghitung konsumsi protein (menggunakan DKBM) kemudian dijumlahkan ke bawah (diperoleh nilai P)
4. Menghitung AAE lisin, treonin, triptofan, metionin+sistin berdasarkan jumlah protein yang dikonsumsi (menggunakan DKAE)
5. Hitung konsumsi masing-masing AA tersebut dalam satuan mg AA / g protein, sehingga diperoleh nilai L/P, T/P, R/P, M/P
6. Tentukan Skor Asam Amino dengan menghitung rasio perbandingan dibagi kebutuhan AA anak pra sekolah (WHO/FAO/UNU, 2007) kemudian dikali 100.

**Tabel 4.4 . Contoh Pembuatan Tabel Perhitungan Skor Asam Amino**

No.	Jenis makanan yang dikonsumsi	Berat (g)	Prot (g)	Konsumsi Asam Amino (AA)				Metionin+sistin (mg)
				Lysin (mg)	Triptofan (mg)	Trionin (mg)		
	Jumlah		P	L	T	R	M	
	Rasio perbandingan			L/P	T/P	R/P	M/P	
	Kebutuhan AA pra sekolah			B	B	B	B	
	SAA			(L/P)/B x 100	(T/P)/B x 100	(R/P)/B x 100	(M/P)/B x 100	

Keterangan:

- L = Lysin
- T = Triptofan
- R = Trionin
- M = Metionin+sistin
- B = kebutuhan AA pra sekolah

#### 4.6.5.2 Penentuan Net Protein Value

**Tabel 4.5 Contoh Kerja Untuk Menghitung Skor Asam Amino Den Net Protein Value Suatu Formula Makanan.**

No.	Komponen	Berat(g)	N (g)	Prot. (g)	Lys (mg)	Thr (mg)	Try (mg)	Met&sys (mg)
	Mg/g N dalam Protein							
	Pola FAO/WHO/UNU (1983), mg/g N							
	Skor asam amino (%)							
	% Protein							

$$\text{Net Protein Value (NPV)} = \frac{\text{skor asam amino terkecil} \times \% \text{ protein}}{100}$$

#### Prosedur

1. pada kertas kerja catat komponen serta berat masing-masing komponen (dalam gram)
2. catat kadar nitrogen (N), kadar protein (Nx6,25), serta kadar lisin, treonin, triptofan, dan asam amino belerang (met+cys), dengan cara mengalikan

nilai-nilai yang tertera pada komponen dengan berat komponen dibagi dengan 100.

3. Jumlahkan berat campuran komponen, nitrogen, protein serta lisin, treonin, triptofan, dan asam amino belerang dalam kolom total.
4. Untuk mendapatkan nilai mg/g N bagi asam-asam amino, bagi jumlah (mg) lisin, treonin, triptofan, dan asam amino belerang dengan jumlah (g) N dalam campuran.
5. Untuk memperoleh nilai skor asam amino, bagi mg/g N masing-masing asam amino dengan nilai yang tertera pada pola referensi FAO/WHO/UNU, kemudian kalikan dengan 100.
6. Untuk menghitung % protein, jumlah gram protein dalam campuran dibagi dengan berat campuran (gram) dan dikalikan 100
7. Untuk memperoleh nilai NPV, kalikan nilai skor asam amino terkecil dengan % protein, kemudian dibagi dengan 100.

#### 4.6.6 Uji Mutu Hedonik Organoleptik

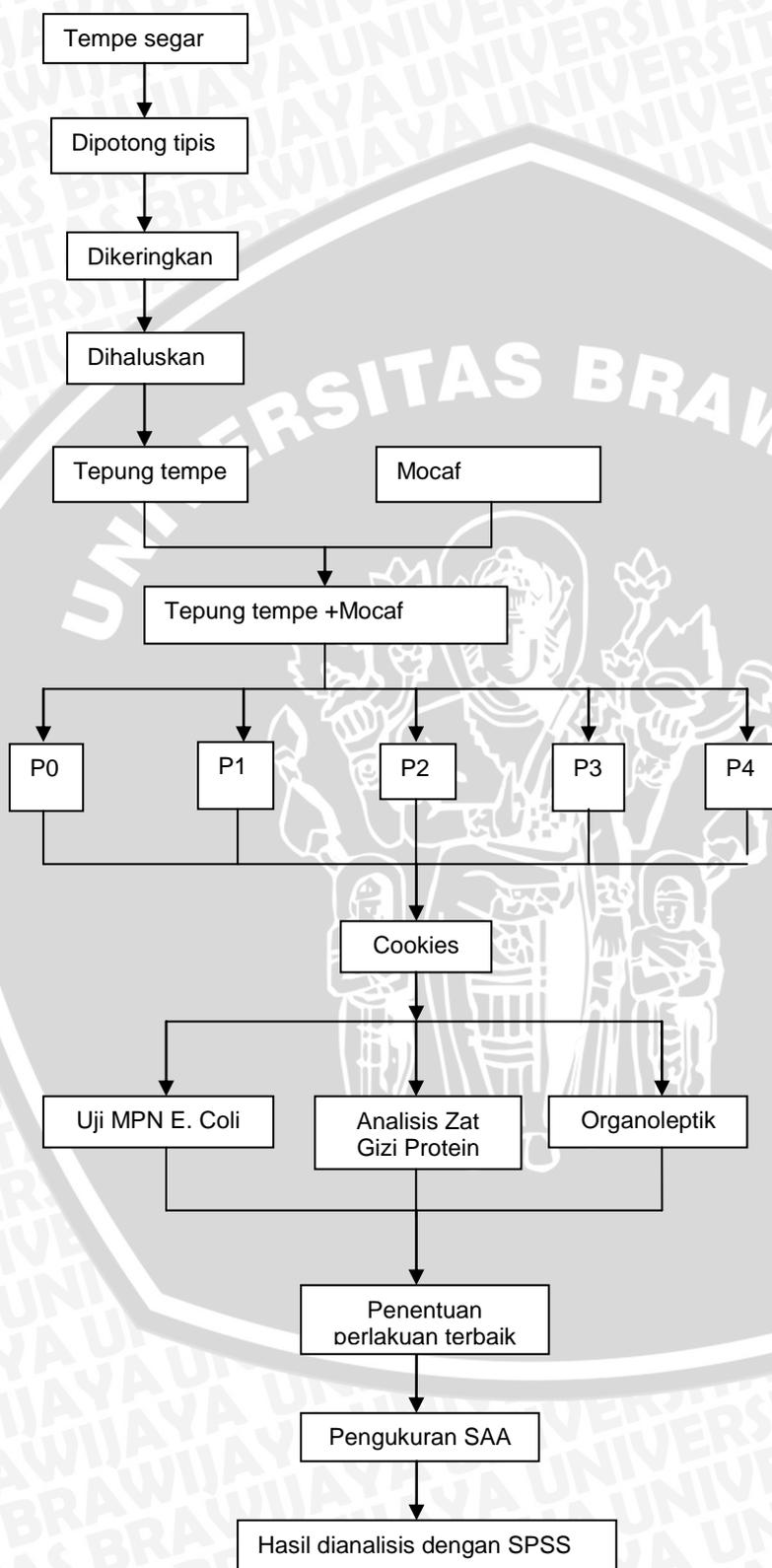
Analisis mutu organoleptik dilakukan di Laboratorium Penyelenggaraan Makanan Jurusan Gizi Kesehatan Universitas Brawijaya. Ada 5 jenis sampel *cookies* yang akan diuji. Dengan jumlah panelis 25 orang mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya yang merupakan panelis kurang terlatih, dengan ketentuantidak sakit (flu dan batuk), tidak dalam keadaan kenyang atau lapar, dan tidak alergi atau pantang terhadap bahan makanan yang diuji. Uji organoleptik dilakukan antar dua waktu makan, yaitu antara pukul 08.00 – 10.00 atau pukul 14.00 – 16.00 WIB

Alur kerja:

Persiapan dan pengarahan panelis → persiapan sampel → uji organoleptik → uji organoleptik pada sampel (dalam bilik laboratorium organoleptik) sekaligus pengisian kuesioner oleh panelis → pengumpulan kuesioner → analisis data



### 4.7 Alur Penelitian



## 4.8 Analisis Data

### 4.8.1 Mutu kadar protein dan mikrobiologi

Pengolahan data hasil analisa mutu protein dan mikrobiologi cookies GFCF dianalisis secara statistic. Analisis yang digunakan yaitu *one way ANOVA (analysis of variants)* untuk variable terikat (*dependen variable*) yang berskala data interval dan rasio. Statistic *one way anova* pada tingkat kepercayaan 99% dengan model sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \sum_{ij}$$

Dimana:

I : 0,1,2,3

J : 1,2,3

Y<sub>ij</sub> : nilai pengamatan pada perlakuan ke – i ulangan ke – j  
(kadar protein dan mikrobiologi)

μ : nilai tengah umum

α<sub>i</sub> : pengaruh perlakuan ke – i

∑<sub>ij</sub> : kesalahan (galat) percobaan pada perlakuan ke – I  
ulangan ke – j

F : banyaknya perlakuan

N : banyaknya ulangan pada perlakuan

Hipotesis statistic :

H<sub>0</sub> : tidak ada pengaruh formulasi Mocaf dan tepung tempe terhadap kadar protein dan mikrobiologi pada cookies.

H<sub>1</sub> : ada pengaruh formulasi Mocaf dan tepung tempe terhadap kadar protein dan mikrobiologi pada cookies.

Penarikan kesimpulan :

- a)  $H_0$  ditolak apabila  $p \leq \alpha$ , berarti ada pengaruh formulasi Mocaf dan tepung tempe terhadap kadar protein dan mikrobiologi pada cookies
- b)  $H_0$  diterima apabila  $p > \alpha$ , berarti tidak ada pengaruh formulasi Mocaf dan tepung tempe terhadap kadar protein dan mikrobiologi pada cookies

Jika  $H_0$  ditolak, maka dilanjutkan dengan uji statistic nilai tengah ganda *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) untuk menentukan pasangan perlakuan mana yang berbeda signifikan. Statistic DMRT pada tingkat kepercayaan 99 % dengan model sebagai berikut :

$$JNT(\alpha, \rho, v) = JND(\alpha, \rho, v) \times \sqrt{KTG/u}$$

Dimana:

JNT : Jarak Signifikan Terkecil

JND : Jarak Signifikan Duncan

KTG : Kuadran Tengan Galat

u :Ulangan

$\alpha$  : taraf signifikan yang dipilih

$\rho$  : banyaknya nilai tengah dalam wilayah yang diuji

v :db galat percobaan

kesimpulan :

taraf perlakuan satu dengan taraf perlakuan yang lain yang menghasilkan perbedaan signifikan dan ditunjukan oleh mean pada kolom yang berbeda.

#### 4.8.2 Mutu organoleptik

Pengolahan data cookies GFCF dengan bahan dasar Mocaf dan tepung tempe untuk variable terikat yang berskala ordinal yaitu mutu organoleptik dilakukan dengan uji statistic *Kruskal Wallis*. Statistic *Kruskal Wallis* pada tingkat kepercayaan 99 % dengan model sebagai berikut :

$$H: \left[ \frac{12}{N(N+1)} \right] \sum \left( \frac{R_i^2}{n_i} \right) - 3(N+1)$$

Dimana :

- $n_i$  : ukuran sampel ke – i
- $i$  : 0,1,2,3
- $N$  : banyaknya seluruh sampel  $n_1, n_2, n_3$ , dan seterusnya
- $R_i$  : jumlah ranking dalam sampel ke – i

Hipotesis statistic :

- a)  $H_0$  : tidak ada pengaruh formulasi Mocaf dan tepung tempe terhadap mutu organoleptik pada cookies
- b)  $H_1$  : ada pengaruh formulasi Mocaf dan tepung tempe terhadap mutu organoleptik pada cookies

Penarikan kesimpulan :

- a)  $H_0$  ditolak apabila  $p \leq \alpha$ , berarti ada pengaruh formulasi Mocaf dan tepung tempe terhadap mutu organoleptik pada cookies
- b)  $H_0$  diterima apabila  $p > \alpha$ , berarti tidak ada pengaruh formulasi Mocaf dan tepung tempe terhadap mutu organoleptik pada cookies

Jika  $H_0$  ditolak  $p \leq \alpha$ , maka dilanjutkan dengan uji statistik perbandingan ganda Mann Whitney untuk menentukan pasangan

perlakuan yang berbeda signifikan. Statistik Mann Whitney pada tingkat kepercayaan 99 % dengan model sebagai berikut :

$$T:S - \frac{n1(n1 + 1)}{2}$$

Dimana:

S : jumlah peningkatan hasil-hasil pengamatan

n1 : banyaknya sampel dari populasi 1

Penarikan kesimpulan:

Taraf perlakuan satu dengan taraf perlakuan lain yang menghasilkan perbedaan signifikan ditunjukkan oleh angka signifikan yang kurang dari  $\alpha$ .

#### 4.8.3 Penentuan Taraf Perlakuan Terbaik

- variabel mutu organoleptik *cookies* diurutkan (dirangking) berdasarkan peranannya terhadap mutu produk dari yang tertinggi ke terendah dengan menggunakan pendapat panelis.
- Hasil rangking ditabulasi, sehingga diperoleh jumlah dan rata-rata, serta rangking variabel dapat ditentukan.
- Masing-masing bobot variabel dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Bobot variabel} = \frac{\text{rata} - \text{rata variabel}}{\text{rata} - \text{rata tertinggi}}$$

- Bobot normal masing-masing variabel dihitung menggunakan rumus:

$$\text{Bobot Normal} = \frac{\text{bobot variabel}}{\text{bobot total variabel}}$$

- Setiap variabel dihitung nilai efektifitasnya (ne) menggunakan rumus:

$$Ne = \frac{\text{nilai perlakuan} - \text{nilai terjelek}}{\text{nilai terbaik} - \text{nilai terjelek}}$$

Variabel dengan nilai rata-rata perlakuan semakin besar, maka semakin baik sehingga rata-rata terendah sebagai nilai terjelek dan rata-rata tertinggi sebagai nilai terbaik dan sebaliknya.

- f) Dihitung nilai hasil ( $N_h$ ) tiap variabel dengan cara mengalikan bobot normal masing-masing variabel dengan  $N_e$ .

$$N_h = \text{bobot normal} \times N_e$$

- g) Menjumlahkan  $N_h$  semua variabel untuk masing-masing perlakuan. Selanjutnya dipilih perlakuan terbaik (perlakuan dengan  $N_h$  tertinggi).

