

BAB III METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Penelitian ini merupakan eksperimental dengan menggunakan desain penelitian Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan 4 taraf perlakuan. Sebagai penetapan proporsi yaitu tepung terigu:tepung tempe:tepung kacang hijau. Formulasi ini didesain untuk memenuhi kebutuhan gizi dari pemberian makanan tambahan pada anak usia 6 – 59 bulan. Sebagai dasar penetapan proporsi menurut Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 51 Tahun 2016 tentang Standar Produk Suplementasi Gizi Makanan Tambahan untuk Balita 6 – 59 bulan dengan jumlah energi 400 Kalori, protein 8 – 12 gram, lemak 10 – 18 gram per 100 gram dan menurut SNI 01-2973-1992 tentang syarat mutu biskuit kadar karbohidrat maksimal 70%. Masing-masing perlakuan dilakukan replikasi sebanyak 3 kali sehingga jumlah unit percobaan adalah 12 unit. Rincian perlakuan secara lengkap disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Rancangan Acak Lengkap

Taraf Perlakuan (Tepung terigu:tepung tempe:tepung kacang hijau) (%)	Replikasi		
	1	2	3
P ₀ (100:0:0)	X ₀₁	X ₀₂	X ₀₃
P ₁ (50:25:25)	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃
P ₂ (50:20:30)	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃
P ₃ (50:15:35)	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃

Keterangan:

X₀₁ : unit penelitian pada taraf perlakuan P₀ replikasi 1

X₁₁ : unit penelitian pada taraf perlakuan P₁ replikasi 1

X₁₂ : unit penelitian pada taraf perlakuan P₂ replikasi 2

....

X₃₃ : unit penelitian pada taraf perlakuan P₃ replikasi 3

Setiap unit penelitian mempunyai peluang yang sama untuk mendapatkan taraf perlakuan, maka dalam penempatan unit penelitian digunakan randomisasi atau pengacakan yang disajikan pada Lampiran 1. Berikut estimasi komposisi zat gizi pada masing masing taraf perlakuan disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Estimasi Komposisi Zat Gizi pada Masing-masing Taraf Perlakuan per 100 gram Biskuit

Taraf Perlakuan (Tepung terigu:tepung tempe:tepung kacang hijau) (%)	Energi (Kkal)	Protein (gram)	Lemak (gram)	Karbohidrat (gram)
Standar	400*	8 – 12*	10 – 18*	Maks. 70%**
P ₀ (100:0:0)	417	7,4	16,3	62,4
P ₁ (50:25:25)	435	13,2	17,8	56,7
P ₂ (50:20:30)	433	12,8	17,5	57,5
P ₃ (50:15:35)	431	12,5	17,2	58,3

Keterangan:

* : Peraturan Menteri Kesehatan Republik Indonesia Nomor: 51 Tahun 2016

** : SNI 01-2973-1992

B. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni - Juli 2022 yang bertempat di:

1. Laboratorium Ilmu Teknologi Pangan Jurusan Gizi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang untuk proses pengolahan biskuit.
2. Laboratorium Organoleptik Jurusan Gizi Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang untuk uji mutu organoleptik biskuit.
3. Laboratorium Gizi, Departemen Gizi Kesehatan, Fakultas Gizi Kesehatan Masyarakat Universitas Airlangga untuk analisis mutu kimia (kadar air dan kadar abu) dan mutu gizi (kadar protein, lemak, dan karbohidrat).

C. Alat dan Bahan

1. Alat

a. Formulasi Biskuit

1) Pengolahan tepung tempe dan tepung kacang hijau

Alat yang digunakan dalam pengolahan tepung tempe dan tepung kacang hijau diantaranya adalah kompor, risopan, panci, loyang, baskom, baskom peniris, sendok, pisau, talenan, nampan, *cabinet dryer*, timbangan digital, blender dan ayakan 80 mesh.

2) Pengolahan biskuit

Alat yang digunakan dalam pengolahan biskuit diantaranya adalah baskom, pisau, *mixer*, spatula, sendok, piring, timbangan digital, loyang dan oven.

b. Analisis mutu kimia

1) Kadar Air

Alat yang digunakan adalah cawan dan penutup, oven, desikator, timbangan analitik, penjepit cawan, dan spatula.

2) Kadar Abu

Alat yang digunakan adalah cawan porselin, desikator, timbangan analitik, pembakar bunsen, tanur, oven, penjepit dan spatula.

b. Analisis mutu gizi

1) Kadar Protein

Alat yang digunakan adalah labu *kjeldhal*, labu destilasi, timbangan analitik, spatula, kondensor, pipet ukur 5 ml, pipet ukur 20 ml, pemanas desikator, tabung biuret, *hotplate*, *beaker glass*, penjepit, erlenmeyer 100 ml, labu ukur 100 ml dan statif.

2) Kadar Lemak

Alat yang digunakan adalah soxhlet apparatus, labu lemak, penjepit cawan, oven, erlenmeyer 100 ml, cawan porselen, timbangan analitik, desikator, dan kertas saring.

3) Kadar Karbohidrat

Analisis kadar karbohidrat menggunakan metode *by difference*. Kadar karbohidrat merupakan selisih 100% dari persen total protein dan lemak.

4) Nilai Energi

Analisis nilai energi menggunakan faktor Atwater yakni 1 gram karbohidrat, protein, dan lemak berturut-turut menghasilkan 4,4 dan 9 Kalori (Almatsier, 2010).

c. Analisis Mutu Organoleptik

Alat yang digunakan untuk analisis mutu organoleptik diantaranya adalah alat tulis, form kuisioner penilaian mutu organoleptik (Lampiran 2), stiker label, piring kecil dan nampan kayu ukuran kecil.

d. Analisis Taraf Perlakuan Terbaik

Alat yang digunakan adalah alat tulis dan formulir penilaian taraf perlakuan terbaik. Formulir Penentuan Taraf Perlakuan Terbaik disajikan pada Lampiran 3.

2. Bahan

a. Pengolaha Biskuit

Bahan untuk pengolahan biskuit mengacu pada Mardhiah (2020) disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Bahan yang dibutuhkan untuk Pengolahan Biskuit

Bahan	Berat (g)	Energi (Kkal)	Protein (g)	Lemak (g)	KH (g)
Tepung terigu	500	1665	45	6	386
Tepung maizena	20	68	0,1	0	17
Susu bubuk	85	305	30,3	0,9	44,2
Kuning telur	30	107	4,9	9,6	0,2
Gula halus	250	985	0	0	235
Margarin	200	1440	1,2	162	0,8
Baking powder	5	0	0	0	0
Garam	5	0	0	0	0
Air	100	0	0	0	0
Total	1095	4570	81,4	178,4	683,2
Per 100 g bahan biskuit	100	417	7,4	16,3	62,4

Sumber: Mardhiah, 2020

Tabel 12. Jenis dan Spesifikasi Bahan Makanan yang digunakan

Jenis Bahan Makanan	Spesifikasi
Tepung terigu	Merk Kunci biru, kandungan protein rendah 7-9%
Tempe kedelai	Umur masak 2 hari, asal Sanan Sentra Industri Tempe, bentuk dan warna seragam.
Kacang hijau	Varietas <i>vimil</i> 1, umur panen 57 hari, lokasi Balai Penelitian Tanaman Aneka Kacang dan Umbi Malang, bentuk dan warna seragam.
Susu bubuk	Susu bubuk <i>full cream</i> , merk Dancow
Maizena	Merk Maizenaku, dalam kemasan tertutup
Telur ayam	Telur ayam ras bagian kuning, cangkang utuh, tidak ada kotoran.
Gula bubuk	Gula bubuk putih, merk Rose brand
Margarin	Merk Blue Band, dalam kemasan tertutup
Baking powder	Merk Koepoe-koepoe
Garam	Garam dapur beryodium, merk Cap Kapal

Tabel 13. Komposisi Bahan Penyusun Biskuit Substitusi Tepung Tempe Kedelai dan Tepung Kacang Hijau

Bahan	Taraf Perlakuan (Tepung Terigu:Tepung Tempe:Tepung Kacang Hijau)			
	P ₀	P ₁	P ₂	P ₃
Tepung terigu (g)	250	125	125	125
Tepung tempe (g)	0	62,5	50	37,5
Tepung kacang hijau (g)	0	62,5	75	87,5
Tepung maizena (g)	10	10	10	10
Susu bubuk (g)	42,5	42,5	42,5	42,5
Kuning telur (g)	15	15	15	15
Gula halus(g)	125	125	125	125
Margarin (g)	100	100	100	100
Baking Powder (g)	2,5	2,5	2,5	2,5
Garam (g)	2,5	2,5	2,5	2,5
Air (ml)	50	50	50	50

Estimasi perhitungan energi dan zat gizi pada setiap perlakuan disajikan pada Lampiran 4. Berdasarkan penelitian pendahuluan rendemen tepung tempe kedelai yang dihasilkan sebesar 38,9% dengan BDD sebesar 100%. Untuk mengetahui total bahan baku tepung yang dibutuhkan digunakan rumus berikut:

$$\text{Bahan baku yang dibutuhkan (g)} = \left(\frac{T (g) \times 100}{\text{rendemen} (\%)} \right) \times \frac{100}{\text{BDD} (\%)}$$

Keterangan:

T : tepung yang dibutuhkan (g)
 Rendemen : 38,9 (tempe kedelai) (%)
 BDD : 100 (tempe kedelai) (%)

Setelah dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus diatas, hasil perhitungan bahan baku yang dibutuhkan dalam penepungan tempe kedelai untuk 9 unit penelitian sebesar 1157 gram. Pada unit penelitian X₁₁, X₁₂, dan X₁₃ masing-masing dibutuhkan 161 gram, unit penelitian X₂₁, X₂₂, dan X₂₃ masing-masing dibutuhkan sebesar 129 gram, dan untuk unit penelitian X₃₁, X₃₂, dan X₃₃ masing-masing dibutuhkan sebesar 97 gram tempe kedelai.

Berdasarkan penelitian pendahuluan rendemen tepung kacang hijau yang dihasilkan sebesar 62,8% dengan BDD sebesar 100%. Untuk mengetahui total bahan baku tepung yang dibutuhkan digunakan rumus berikut:

$$\text{Bahan baku yang dibutuhkan (g)} = \left(\frac{T (g) \times 100}{\text{rendemen (\%)}} \right) \times \frac{100}{BDD (\%)}$$

Keterangan:

T : tepung yang dibutuhkan (g)
 Rendemen : 62,8 (kacang hijau) (%)
 BDD : 100 (kacang hijau) (%)

Setelah dilakukan perhitungan dengan menggunakan rumus diatas, hasil perhitungan bahan baku yang dibutuhkan dalam penepungan kacang hijau untuk 9 unit penelitian sebesar 1075 gram. Pada unit penelitian X₁₁, X₁₂, dan X₁₃ masing-masing dibutuhkan 100 gram, unit penelitian X₂₁, X₂₂, dan X₂₃ masing-masing dibutuhkan sebesar 120 gram, dan untuk unit penelitian X₃₁, X₃₂, dan X₃₃ masing-masing dibutuhkan sebesar 140 gram kacang hijau.

Tabel 14. Total Bahan Biskuit pada Seluruh Taraf Perlakuan

Bahan makanan	Unit Penelitian												Total (g)
	X ₀₁	X ₀₂	X ₀₃	X ₁₁	X ₁₂	X ₁₃	X ₂₁	X ₂₂	X ₂₃	X ₃₁	X ₃₂	X ₃₃	
Tepung terigu	250	250	250	125	125	125	125	125	125	125	125	125	1875
Tepung tempe kedelai	0	0	0	62,5	62,5	62,5	50	50	50	37,5	37,5	37,5	450
Tepung kacang hijau	0	0	0	62,5	62,5	62,5	75	75	75	87,5	87,5	87,5	675
Maizena	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	120
Susu bubuk	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5	42,5	510
Kuning telur	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	180
Gula halus	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	1500
Margarin	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1200
Baking powder	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	30
Garam	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	30

Berat total bahan dalam 1 unit penelitian yang digunakan pada pengolahan biskuit setelah ditambahkan 50 ml air yang mengacu pada ½ resep biskuit Mardhiah (2020) ialah 597,5 gram. Sementara itu, rendemen biskuit mengacu pada Marwah (2018) sebesar 84,3%. Sehingga estimasi biskuit yang diperoleh sebesar 504 gram. Dalam penilaian mutu organoleptik yang melibatkan 25 responden, masing-masing responden akan menerima 1 sampel

biskuit 10 gram untuk setiap unit penelitian. Sehingga diperkirakan 1/2 resep dalam setiap unit penelitian akan menghasilkan 50 sampel.

b. Analisis Mutu Kimia dan Mutu Gizi

1) Analisis Kadar Air dan Kadar Abu

Bahan yang digunakan untuk analisis kadar air dan kadar abu adalah formula biskuit pengembangan.

2) Analisis Kadar Protein

Bahan yang digunakan antara lain: biskuit pengembangan, CuSO_4 , asam laktat 10%, KMnO_4 (1:9), H_2SO_4 pekat, selenium mix, HCl standar, asam borat 3, indikator metil merah, dan aquades.

3) Analisis Kadar Lemak

Bahan yang digunakan antara lain: biskuit pengembangan, pelarut lemak, dan kertas saring.

4) Analisis Karbohidrat

Bahan yang digunakan adalah biskuit hasil perhitungan kadar air, abu, protein, dan lemak.

5) Analisis Nilai Energi

Bahan yang digunakan adalah data hasil analisis air, abu, protein, lemak, dan karbohidrat.

c. Analisis Mutu Organoleptik

Bahan yang digunakan adalah biskuit pengembangan dan air mineral bagi setiap peserta.

d. Analisis Taraf Perlakuan Terbaik

Bahan yang digunakan untuk analisis taraf perlakuan terbaik adalah data ranking variabel panelis.

D. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas : Proporsi tepung terigu, tepung tempe dan tepung kacang hijau.
2. Variabel Terikat : Mutu kimia, mutu gizi, mutu organoleptik, dan taraf perlakuan terbaik.

E. Definisi Operasional Variabel

Variabel	Definisi	Metode dan Alat Ukur	Skala Pengukuran
Biskuit dengan substitusi tepung tempe dan tepung kacang hijau	Perbandingan tepung terigu, tepung tempe dan tepung kacang hijau P ₀ (100:0:0) P ₁ (50:25:25) P ₂ (50:20:30) P ₃ (50:15:35)		
Mutu Organoleptik	Tingkat kesukaan panelis yang meliputi warna, rasa, aroma dan tekstur	Metode <i>Hedonic scale Test</i> dengan panelis tidak terlatih berjumlah 25 orang. Skala hedonik: 4 = sangat suka 3 = suka 2 = tidak suka 1 = sangat tidak suka	Ordinal
Nilai Energi	Jumlah energi yang tersedia dalam 100 gram biskuit (Kkal)	Ditetapkan melalui perhitungan secara empiris dengan metode faktor <i>atwatter</i>	Rasio
Formulasi Perlakuan Terbaik			
Kadar Air	Kandungan air dalam produk biskuit (%)	Metode <i>thermogravimetri</i>	Rasio
kadar Abu	Kandungan abu dalam produk biskuit (%)	Metode <i>gravimetric</i>	Rasio
Kadar Protein	Kandungan protein dalam produk biskuit (%)	Metode <i>semi micro kjeldhal</i>	Rasio
Kadar Lemak	Kandungan lemak dalam produk biskuit (%)	Metode <i>Soxhlet extraction</i>	Rasio
Kadar Karbohidrat	Kandungan karbohidrat dalam produk biskuit (%)	Metode <i>by difference</i>	Rasio
Perhitungan <i>Calculated Value</i>			
Kadar Air	Kandungan air dalam produk	<i>Calculated Value</i> (Kemenkes, 2017)	Rasio

Variabel	Definisi	Metode dan Alat Ukur	Skala Pengukuran
	biskuit (%)		
kadar Abu	Kandungan abu dalam produk biskuit (%)	<i>Calculated Value</i> (Kemenkes, 2017)	Rasio
Kadar Protein	Kandungan protein dalam produk biskuit (%)	<i>Calculated Value</i> (Kemenkes, 2017)	Rasio
Kadar Lemak	Kandungan lemak dalam produk biskuit (%)	<i>Calculated Value</i> (Kemenkes, 2017)	Rasio
Kadar Karbohidrat	Kandungan karbohidrat dalam produk biskuit (%)	<i>Calculated Value</i> (Kemenkes, 2017)	Rasio

F. Metode Penelitian

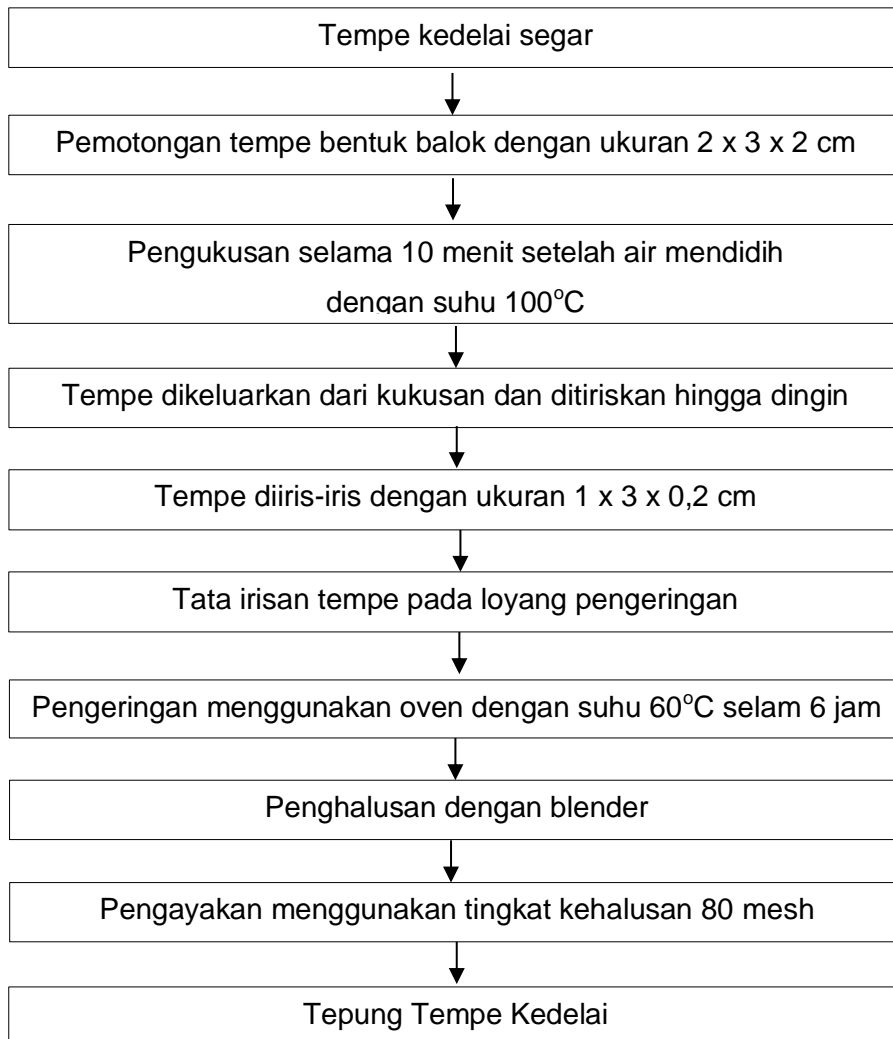
1. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilaksanakan pada bulan Mei 2022 meliputi pembuatan tepung tempe kedelai dengan berat tempe kedelai sebesar 375 gram menghasilkan tepung tempe kedelai 146 gram dan pembuatan tepung kacang hijau dengan berat kacang hijau sebesar 500 gram menghasilkan tepung kacang hijau 314 gram. Pembuatan biskuit menggunakan perlakuan P₃ dan perlakuan P₂ dari seluruh total bahan untuk mendapatkan hasil bahwa formulasi yang didesain telah berhasil dilakukan dan menghasilkan sebuah produk biskuit masing masing sebanyak 52 buah biskuit.

2. Penelitian Utama

Setelah penelitian pendahuluan selanjutnya dilakukan penelitian utama. Penelitian utama dilakukan pengolahan tepung tempe kedelai, pengolahan tepung kacang hijau serta pengolahan biskuit dan selajutnya dilakukan analisis mutu organoleptik (warna, aroma, rasa dan tekstur), mutu kimia (kadar air, kadar abu, protein, lemak dan karbohidrat), dan nilai energi.

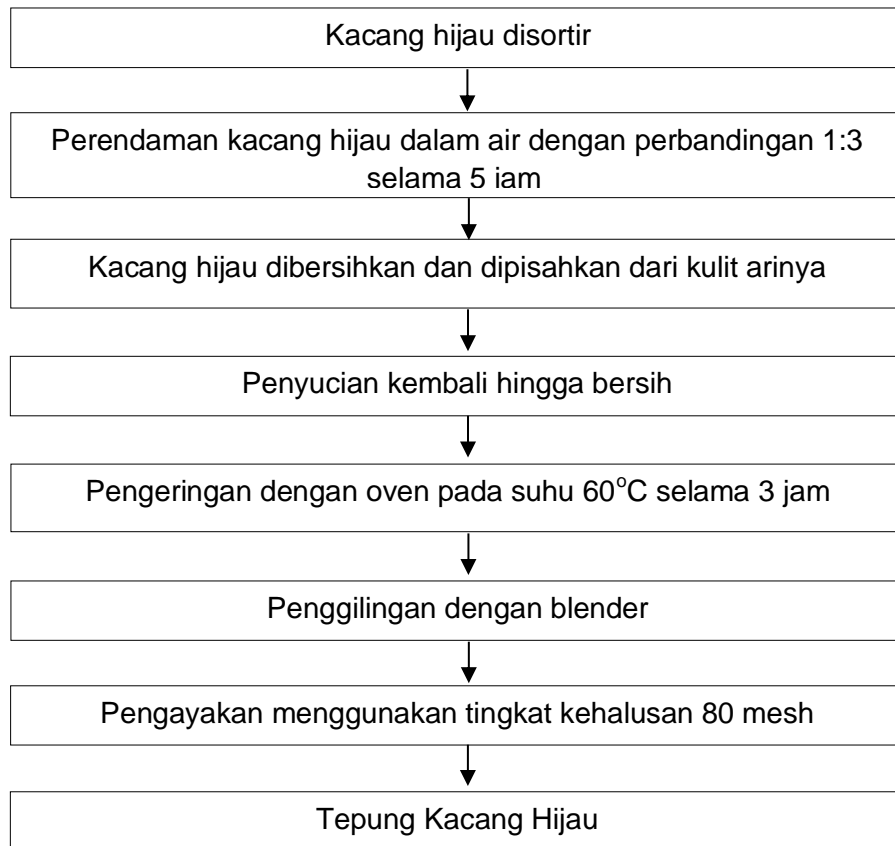
3. Penepungan Tempe Kedelai



Gambar 1. Diagram Alir Penepungan Tempe Kedelai

Sumber: Rahmawati, 2017 dan modifikasi

4. Penepungan Kacang Hijau



Gambar 2. Diagram Alir Penepungan Kacang Hijau

Sumber: Ratnasari dan Yunianta, 2015

5. Pengolahan Biskuit Tepung Tempe dan Tepung Kacang Hijau



Gambar 3. Diagram Alir Pengolahan Biskuit

Sumber: Agustin, 2018 dan modifikasi

G. Metode Analisis

1. Analisis Kadar Air (AOAC, 2005)

Mengeringkan cawan logam dan tutupnya dalam oven pada suhu 100°C selama 30 menit, mendinginkan dalam desikator dan menimbang cawan. Setelah itu menimbang 2 gram sampel dalam cawan dan tutup dengan cepat. Meletakkan cawan tersebut dalam drying oven dan melonggarkan tutupnya. Memanaskan oven sampai suhu 100°C dengan vakum dipertahankan 25 mmHg. Melakukan pengeringan sampai diperoleh berat konstan selama 5 jam. Memasukkan udara kering ke dalam oven sampai dicapai tekanan atmosfer dan

segera menutup cawan, lalu memasukkan ke dalam desikator dan segera menimbang setelah dingin pada suhu kamar. Kadar air dapat dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{B - C}{B - A} \times 100\%$$

Keterangan:

A = Berat cawan kosong (g)

B = Berat cawan yang diisi dengan sampel (g)

C = Berat cawan dengan sampel yang sudah dikeringkan (g)

2. Analisis Kadar Abu (AOAC, 2005)

Analisis kadar abu menggunakan metode gravimetri. Menyiapkan cawan porselin dan mengeringkan dalam oven dengan suhu 105°C selama 1 jam. Mendinginkan cawan dalam desikator selama 15 menit dan menimbang berat awal (x) memasukkan sampel 5 gram, kemudian dimasukkan ke dalam tanur bersuhu 550°C selama 3 jam. Dinginkan di luar tanur sampai suhu 120°C, kemudian dimasukkan dalam desikator. Setelah itu cawan dan abu ditimbang sehingga diperoleh berat konstan. Kadar abu dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Kadar abu (\%)} = \frac{\text{Berat abu (g)}}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100\%$$

3. Analisis Kadar Protein (AOAC, 2005)

Analisis kadar protein menggunakan metode *Kjeldahl*. Masukkan 50 mg sampel ke dalam labu *kjeldahl*. Menambahkan 0,5 g *Tablet kjeldahl* dan 2 ml H₂SO₄ pekat. Melakukan destruksi dengan memanaskan selama 4 jam sampai diperoleh larutan jernih dalam tabung, lalu didinginkan. Menambahkan 5 ml aquades ke dalam labu *kjeldahl* kemudian ditambahkan 2 tetes indicator pp dan reagen NaOH-thio sampai suasana larutan menjadi basa (berwarna merah muda). Siapkan 5 ml asam borat 4% yang telah diberikan 4 tetes indicator MR-MCG dalam Erlenmeyer 125 ml. Pasang pada mulut tabung penyulingan (*distilling tube*) sampai terendam dalam asam borat. Kemudian melakukan destilasi dengan menuang hasil destruksi ke dalam tabung destilasi. Menambahkan 5 ml aquades ke dalam tabung *kjeldahl* untuk mencuci sisa

larutan. Menampung destilasi dalam larutan asam borat 3% dan menghentikan destilasi bila larutan sudah bersifat basa. Melakukan titrasi dengan 0,2 NHCl sampai tercapai larutan berwarna merah muda dan dapat menghitung N total menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Total Nitrogen} = \frac{(ml \text{ HCl} - ml \text{ blanko}) \times N \text{ HCl} \times 14,007 \times 100}{mg \text{ sampel}}$$

$$\& \text{ Protein} = \% \text{ total nitrogen} \times \text{faktor konversi}$$

Keterangan:

14,007 = berat atom nitrogen

Kadar protein diukur dengan mengalikan total nitrogen dengan faktor konversi bahan makanan 6,25.

4. Analisis Kadar Lemak (AOAC, 2005)

Analisis kadar lemak menggunakan metode *Soxhlet Extraction*. Mengeringkan labu lemak dalam oven suhu 105°C selama 30 menit, mendinginkan dalam eksikator selama 15 menit. Menimbang erlenmeyer yang akan digunakan untuk menampung minyak hasil ekstraksi dan menimbang 5 gram bahan pada kertas saring. Membungkus kertas saring dengan rapi sehingga bahan yang telah ditimbang tidak bocor keluar kertas saring. Menambahkan pelarut lemak (*chloroform*) secukupnya (1,5 x vol ekstraktor) ke dalam labu lemak dan memasukkan bahan yang dibungkus kertas saring ke dalam soxhlet bagian ekstraktor. Memanaskan labu lemak dan mengekstraksi selama 3 jam (5 x ekstraksi) dan menguapkan chloroform dari minyak ekstraksi. Melanjutkan penguapan chloroform selama 30 menit, kemudain mendinginkan dalam eksikator selama 30 menit. Selanjutnya ditimbang dan dicatat berat kadar lemak dihitung menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Lemak (\%)} = \frac{\text{Berat lemak (g)}}{\text{Berat sampel (g)}} \times 100\%$$

5. Analisis Kadar Karbohidrat

Analisis kadar karbohidrat dilakukan dengan menggunakan metode *by difference* (Tejasari, 2005). Kadar karbohidrat dihitung sebagai pengurangan persentase total kadar air, kadar abu, kadar protein, dan kadar lemak, dengan perhitungan sebagai berikut:

$$\text{Karbohidrat (\%)} = 100 - \% (\text{air} + \text{abu} + \text{protein} + \text{lemak})$$

6. Analisis Nilai Energi

Nilai energi diperoleh menggunakan faktor Atwater, nilai energi makanan ditetapkan melalui perhitungan komposisi karbohidrat, lemak, dan protein, serta nilai energi dari makanan tersebut. Nilai energi ini dihitung menggunakan perhitungan secara empiris dengan faktor atwater rumus sebagai berikut:

$$\text{Nilai Energi} = (4 \times \% \text{karbohidrat (g)}) + (4 \times \% \text{protein (g)}) + (9 \times \% \text{lemak (g)})$$

7. Analisis Nilai Mutu Kimia (*Calculated Value*)

Nilai hasil perhitungan zat gizi dari setiap jenis bahan makanan yang digunakan pada suatu resep, dikoreksi dengan faktor kehilangan atau penambahan berat bahan makanan (*yield factor*) dan perubahan zat gizi (*retention factor*) akibat pengolahan. Nilai tersebut merupakan estimasi kasar, karena kondisi pengolahan setiap resep sangat bervariasi, seperti temperatur dan durasi pemasakan yang bervariasi, mempengaruhi *yield* dan *retention factor* secara signifikan.

% Yield Factor

$$= \frac{\text{Berat makanan matang dalam kondisi masih panas (g)}}{\text{Berat bahan makanan mentah yang akan dimasak (g)}} \times 100$$

% Retention Factor

$$= \frac{\text{Kandungan zat gizi per gram makanan matang} \times \text{berat makanan matang (g)}}{\text{Kandungan zat gizi per gram makanan mentah} \times \text{berat makanan mentah (g)}} \times 100$$

Rumus diatas menunjukkan bahwa perlunya data berat makanan yang akurat dan harus benar-benar melakukan penelitian untuk mengetahui berat makanan tersebut. Sehingga, untuk penelitian ini mengambil data berdasarkan hasil penelitian untuk *yield factor* dan untuk data *retention factor* mengambil data berdasarkan yang telah ada yaitu menggunakan tabel dalam kategori *cereal based flour, bake* (Bognar, 2002).

Tabel 15. Faktor Rata-rata Zat Gizi Makanan dengan Memasak Hidangan Berbasis Tepung Sereal seperti *Pasta (Mie)*, *Pan Cake*, *Roti*, *Pizza*, *Kue*.

Zat Gizi	Faktor Retensi						
	<i>Pasta (Mie)</i>				<i>Pan Cake</i>		Roti, pizza, kue
	Tepung Gandum		Tepung Terigu		Goreng	Goreng (merendam)	
	Rebus	Rebus	Rebus	Rebus			Panggang
A	B	A	B	A	B	A	
Protein	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Lemak	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Penyerapan minyak	-	-	-	-	7,00	7,00	-
Karbohidrat	0,95	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Serat	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Mineral	0,50	0,50	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00

Sumber: Bognar, 2002

8. Perhitungan Mutu Protein

Mutu protein suatu bahan pangan ditentukan oleh kandungan asam amino esensial yang tersusun lengkap dan komposisi sesuai kebutuhan tubuh, serta memiliki nilai cerna protein yang tinggi. Mutu cerna protein merupakan kemampuan protein yang dapat dicerna oleh enzim pencernaan. protein yang mudah dicerna menunjukkan bahwa jumlah protein yang diserap dan digunakan tubuh cukup tinggi. Terdapat dua faktor yang menentukan nilai gizi suatu protein, yaitu: daya cerna atau nilai cernanya dan kandungan asam amino esensialnya. Protein yang mudah dicerna (dihidrolisis) oleh enzim-enzim pencernaan, serta mengandung asam-asam amino esensial yang lengkap serta dalam jumlah yang seimbang, merupakan protein bernilai gizi tinggi (Muchtadi, 2008).

A. Skor Asam Amino (SAA)

Asam amino esensial yang sering defisit pada atau kekurangan dalam konsumsi pangan adalah salah satu dari lisin, treonin, triptofan, metionin, dan sistein yang dalam banyak hal mempunyai fungsi sama dalam tubuh, sehingga penilaian SAA didasarkan pada asam amino tersebut.

Cara menghitung Skor Asam Amino (SAA) adalah sebagai berikut:

1. Buatlah tabel penentuan SAA setiap bahan.

2. Hitung protein bahan berdasarkan jumlah yang digunakan, kemudian jumlahkan ke bawah sehingga diperoleh.
3. Hitung Asam Amino (AA) *Lysin, Treonin, Triptofan, Metionin + Sistin* berdasarkan jumlah protein.
4. Hitung masing-masing AA tersebut dalam satuan Asam Amino per gram protein, sehingga diperoleh LxP, TxP, RxP, MxP.
5. Hitung rasio (perbandingan masing-masing konsumsi Asam Amino terhadap Pola Kecukupan Asam Amino)

Rumus:

$$TKAE = \frac{\text{mg AA per gram protein yang dikonsumsi}}{\text{mg AA per gram protein dalam PKAE}} \times 100$$

Keterangan:

TKAE : Tingkat Konsumsi Asam Amino Esensial

PKAE : Pola Kecukupan Asam Amino Esensial

6. Urutkan hasil perhitungan TKAE dari masing-masing asam amino
7. Nilai TKAE yang terkecil merupakan nilai SAA konsumsi pangan tersebut.

B. Mutu Cerna

Mutu Cerna Teoritis (MC) merupakan cara teoritis untuk menghampiri atau menaksir mutu cerna (*digestibility*) yang dilakukan melalui penelitian *bio-assay*. Mutu cerna ini menunjukkan bagian dari protein atau asam amino yang dapat diserap tubuh dibandingkan dengan yang dikonsumsi (Muchtadi, 2008).

Cara menghitung Mutu Cerna Teoritis disajikan sebagai berikut:

Cara menghitung Mutu Cerna Teoritis disajikan sebagai berikut:

1. Siapkan tabel seperti tabel perhitungan Mutu Cerna.
2. Tabelkan bahan pangan dan hitung protein menurut kelompok pangan yang ada hasil penelitian Mutu Cerna (MC) secara *Bio-assay*.
3. Hitung secara tertimbang Mutu Cerna (MC) campuran pangan yang dikonsumsi ini, caranya kalikan mutu cerna tiap bahan dengan protein dan dijumlah.
4. Hasil penjumlahan no. 3 dibagi dengan jumlah protein.
5. Hasil penelitian ini yang dinyatakan sebagai Mutu Cerna Teoritis

Tabel 16. Skor Asam Amino, Mutu Cerna Teoritis dan NPU

Taraf Perlakuan (Tepung terigu:tepung tempe:tepung kacang hijau) (%)	Skor Asam Amino *	Asam Amino Pembatas	Mutu Cerna Teoritis (%)	NPU (%)
P ₀ (100:0:0)	91	Lisin	91,25	89
P ₁ (50:25:25)	100	Met +Sis	93,33	93
P ₂ (50:20:30)	100	Met +Sis	93,45	93
P ₃ (50:15:35)	100	Met +Sis	93,58	93

*Apabila angka perhitungan >100, maka ditulis sebagai 100

Tabel 16 menunjukkan bahwa biskuit dengan substitusi tepung tempe kedelai dan tepung kacang hijau memiliki nilai mutu cerna lebih tinggi dari biskuit kontrol tanpa penambahan apapun. Biskuit dengan substitusi tepung tempe kedelai dan tepung kacang hijau mampu menutupi kekurangan lisin dari tepung terigu. Hal tersebut sejalan dengan penelitian Annisaa dan Afifah (2015), tepung terigu berasal dari gandum mengandung asam amino lisin yang rendah namun tinggi metionin. Sementara pada kacang-kacangan mengandung tinggi asam amino lisin namun mempunyai kekurangan asam amino metionin. Apabila ketiganya digabungkan, maka kekurangan lisin pada gandum serta metionin pada tempe dan kacang hijau akan saling melengkapi sehingga dapat meningkatkan mutu protein.

Net Protein Utilization (NPU) merupakan metode yang hampir mirip dengan nilai biologis. Metode ini menggambarkan bagaimana protein yang dikonsumsi dapat dimanfaatkan oleh tubuh (BPOM, 2019). Tabel 16 menunjukkan bahwa hasil perhitungan NPU biskuit dengan substitusi tepung tempe kedelai dan tepung kacang hijau lebih tinggi dari biskuit kontrol tanpa penambahan apapun.

9. Analisis Mutu Organoleptik

Uji mutu organoleptik dilakukan dengan menggunakan uji deskriptif, jenis panelis tidak terlatih yang berjumlah 25 orang dengan metode *Hedonic Scale Test* yang bertujuan untuk mengetahui daya terima terhadap biskuit yang dijadikan sebagai PMT untuk balita dengan masalah *Stunting*. Jenis parameter yang diuji yaitu warna, aroma, rasa, dan tekstur dengan skala kesukaan

dinyatakan dalam 4 tingkat kesukaan. Tingkat kesukaan pada metode hedonik yang digunakan adalah:

4 = sangat suka

3 = suka

2 = tidak suka

1 = sangat tidak suka

Panelis dalam pengisian form adalah mahasiswa Politeknik Kesehatan Kemenkes Malang Jurusan Gizi berjumlah 25 orang dengan kriteria:

- a. Bersedia menjadi panelis
- b. Tidak boleh dalam keadaan lapar atau kenyang
- c. Dalam keadaan sehat
- d. Tidak mempunyai pantangan terhadap pengembangan tepung tempe dan tepung kacang hijau

Langkah-langkah yang dilakukan dalam pengujian ini yaitu:

- a. Panelis ditempatkan pada suatu ruang khusus (ruang penelitian) mutu organoleptik
- b. Masing-masing produk diletakkan dalam piring berwarna putih sebagai wadah yang sudah diberikan kode
- c. Setiap kali selesai menilai suatu unit perlakuan maka untuk menghilangkan rasa dari unit yang sebelumnya, panelis diberikan air putih.
- d. Panelis diharapkan untuk menilai sampel dan diminta untuk mengisi kuisioner uji mutu organoleptik yang terlampir pada Lampiran 2.

10. Penentuan Taraf Perlakuan Terbaik

Penentuan taraf perlakuan terbaik menggunakan metode indeks efektivitas. Metode tersebut dilakukan dengan cara mengukur beberapa variabel yang mempengaruhi mutu biskuit yang dihasilkan seperti nilai energi, mutu kimia (kadar air dan kadar abu), mutu gizi (kadar protein, kadar lemak, dan kadar karbohidrat), mutu organoleptik (aroma, rasa, warna, dan tekstur).

Panelis kemudian diminta untuk memberikan pendapat yaitu variabel mana yang menurutnya mempengaruhi mutu dan memberikan nilai pada variabel tersebut. Panelis dapat memberikan nilai yang sama pada variabel yang dianggap memberikan pengaruh yang sama pentingnya terhadap

pengembangan biskuit substitusi tepung tempe dan tepung kacang hijau. Adapun kriteria panelis sebagai berikut:

- a. Panelis tidak terlatih
- b. Mengerti tentang variabel penting yang terdapat dalam pengembangan biskuit substitusi tepung tempe dan tepung kacang hijau.
- c. Panelis diharapkan untuk mengisi form penilaian perlakuan terbaik yang disajikan pada Lampiran 3.

H. Pegolahan dan Analisis Data

1. Nilai Energi dan Mutu Kimia

Pengolahan data mutu kimia dan nilai gizi bertujuan untuk mengetahui ada atau tidak adanya pengaruh penambahan tepung tempe kedelai dan tepung kacang hijau sebagai formulasi pengolahan biskuit dari masing-masing taraf perlakuan. Pengolahan data mutu kimia dan mutu gizi menggunakan perhitungan empiris dan analisis deskriptif.

2. Mutu Organoleptik

Parameter mutu organoleptik yang diuji yaitu warna, rasa, aroma dan tekstur. Pengolahan data uji organoleptik menggunakan analisis *Kruskall Wallis* pada tingkat kepercayaan 95%.

Penarikan kesimpulan sebagai berikut:

- a. H_0 ditolak bila $sig < 0,05$ menunjukkan bahwa ada pengaruh substitusi tepung tempe dan tepung kacang hijau terhadap mutu organoleptik (warna, aroma, rasa dan tekstur) pada Biskuit sebagai PMT pencegahan *Stunting* Anak Usia 6 – 59 Bulan.
- b. H_0 diterima apabila $sig > 0,05$ menunjukkan bahwa tidak ada pengaruh substitusi tepung tempe dan tepung kacang hijau terhadap mutu organoleptik (warna, aroma, rasa dan tekstur) pada Biskuit sebagai PMT pencegahan *Stunting* Anak Usia 6 – 59 Bulan.
- c. Jika H_0 ditolak artinya ada pengaruh. Untuk mengetahui pasangan-pasangan taraf perlakuan yang berbeda nyata, dilakukan uji lanjutan menggunakan analisis *Mann-Whitney* pada tingkat kepercayaan 95% untuk menentukan pasangan perlakuan yang berbeda signifikan.

3. Uji Taraf Perlakuan Terbaik

Prosedur untuk menentukan perlakuan terbaik adalah sebagai berikut:

- a. Hasil penentuan taraf perlakuan terbaik dari masing-masing panelis di tabulasi sehingga diperoleh jumlah nilai masing-masing variabel dan rata-ratanya.
- b. Ranking variabel ditentukan berdasarkan nilai rata-rata masing-masing variabel dimana variabel yang memiliki rata-rata terbesar diberi ranking ke-1 dan variabel rata-rata terendah ranking ke-10.
- c. Bobot variabel ditentukan dengan membagi nilai rata-rata tiap variabel dengan rata-rata tertinggi. Variabel dengan nilai rata-rata semakin besar, maka rata-rata terendah sebagai nilai terjelek dan rata-rata tertinggi sebagai nilai terbaik.

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

- d. Bobot normal masing-masing variabel didapat variabel dibagi bobot total variabel.

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

- e. Setiap variabel kemudian dihitung nilai efektifitasnya dengan rumus:

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

- f. Nilai yang digunakan untuk taraf perlakuan terbaik adalah jumlah nilai hasil (Nh) dimana nilai ini dapat dihitung dengan cara mengalikan bobot normal masing-masing variabel dengan Ne dan selanjutnya dijumlahkan.

$$Nh = \text{bobot normal} \times Ne$$

- g. Taraf perlakuan terbaik adalah taraf perlakuan yang memiliki hasil tertinggi.