

BAB III

MATERI DAN METODE

Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2016 hingga Februari 2017 untuk pengujian TPC di Laboratorium Mikrobiologi PPOMN (Pusat Pengujian Obat dan Makanan Nasional), Badan POM RI, Jakarta Pusat. Untuk pengujian kadar nitrogen total di BBTPPI (Balai Besar Teknologi Pencegahan Pencemaran Industri) Semarang, Jawa Tengah. Sementara itu untuk uji organoleptik di Laboratorium Kimia dan Gizi Pangan, Fakultas Peternakan dan Pertanian Universitas Diponegoro Semarang.

3.1. Materi

Bahan yang digunakan untuk mengetahui kebusukan pada tempe dengan kemasan yang berbeda adalah kacang kedelai kuning, ragi *Rhizopus Oligosporus* raprima, kemasan plastik jenis PP (*Polypropylene*), daun pisang, *Plate Count Agar* (PCA), larutan *Peptone Salt Solution* (PSS), *Triphenyl Tetrazolium Chloride* (TTC), asam sulfat, larutan asam borat 4%, larutan natrium hidroksida-natrium thiosulfat, larutan standar asam klorida 0,2 N, tablet katalis mengandung 3,5 g K_2SO_4 dan 0,175 g HgO, dan batu didih.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah tabung reaksi, *stomacher*, inkubator, vorteks, pipet *filler*, *bio safety cabinet*, cawan petri, timbangan analitik, aluminium *foil*, otoklaf, *colony counter*, pipet ukur, gelas ukur, mikro pipet, erlenmeyer, alat destruksi Kjeldahl ukuran 250 ml, alat destilasi uap, labu

destruksi 250 ml, corong gelas, labu takar, buret 50 ml, pipet volumetrik 25 ml, gelas piala, pipet tetes, dan batang pengaduk.

3.2. Metode

Metode percobaan terdiri dari rancangan percobaan, prosedur penelitian, uji variabel dan analisis data yang diperoleh dari hasil percobaan.

3.2.1. Rancangan Percobaan

Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah menggunakan uji - t atau *T-Student* dengan dua perlakuan, yaitu (T1) tempe kedelai yang dikemas dengan menggunakan plastik dan (T2) tempe kedelai yang dikemas dengan menggunakan daun pisang. Tempe kedelai yang dikemas dengan plastik dan kemasan daun pisang akan diuji aktifitas mikrobiologis, kadar nitrogen total dan organoleptik pada hari ke-1, ke-2 dan ke-3 dan dibandingkan antara hasil kedua perlakuan tersebut. Masing-masing perlakuan dilakukan sebanyak 10 kali ulangan yang tersaji pada Tabel 2.

Tabel 2. Desain Penelitian Perbedaan Jenis Kemasan Terhadap Tingkat Kebusukan Tempe

Ulangan	Perlakuan	
	T1	T2
U1	T1U1	T2U1
U2	T1U2	T2U2
U3	T1U3	T2U3
U4	T1U4	T2U4
U5	T1U5	T2U5
U6	T1U6	T2U6
U7	T1U7	T2U7
U8	T1U8	T2U8
U9	T1U9	T2U9
U10	T1U10	T2U10

Penelitian ini menggunakan pengujian uji- t (*t-test*), yaitu membandingkan daya tahan tempe dengan jenis kemasan apa yang dapat bertahan lebih lama pada suhu ruang dengan mengukur tingkat kebusukan akibat aktifitas mikrobiologis, kadar nitrogen total dan uji organoleptik pada kedua macam jenis kemasan tersebut.

Hipotesis yang digunakan dalam penelitian ini terdapat perbedaan jenis kemasan terhadap tingkat kebusukan pada tempe yang dijabarkan sebagai berikut:

H₀ : Tidak terdapat perbedaan nilai TPC, kadar nitrogen total, dan sifat organoleptik (rasa dan bau) antara tempe dengan kemasan plastik dengan tempe kemasan daun pisang.

H₁ : Terdapat perbedaan nilai TPC, kadar nitrogen total, dan sifat organoleptik (rasa dan bau) antara tempe dengan kemasan plastik dengan tempe kemasan daun pisang.

Kriteria pengujian analisis data yang digunakan adalah sebagai berikut:

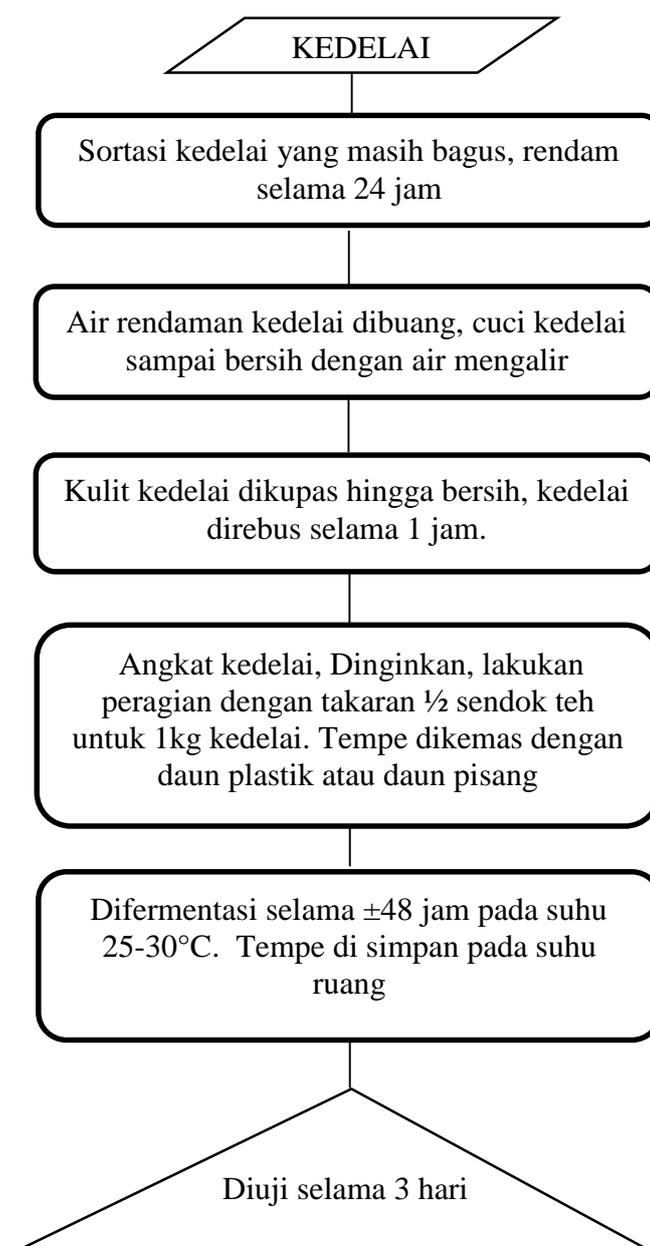
Jika nilai p pada *Significant (2 tailed)* \leq , maka H₀ ditolak dan H₁ diterima
nilai p pada *Significant (2 tailed)* > , maka H₀ diterima dan H₁ ditolak

3.2.2. Prosedur Penelitian

Prosedur percobaan dalam pembuatan tempe kedelai menggunakan ragi *Rhizopus oligosporus* dengan jenis kemasan yang berbeda. Pembuatan tempe kedelai mengacu pada SNI No. 3144 tahun 2009 tentang Standar Mutu Tempe Kedelai. Diagram alir proses pembuatan tempe disajikan pada Ilustrasi 1.

Pembuatan tempe kedelai untuk mengetahui tingkat kebusukan dari berbagai macam kemasan akibat aktifitas mikrobiologis. Dilakukan pengujian selama 3

hari setelah tempe sudah jadi dan diuji TPC, uji kadar nitrogen total dan uji organoleptik meliputi bau dan rasa, untuk mengetahui kemasan mana yang lebih cepat pertumbuhan mikrobiologisnya dan dapat mempengaruhi kebusukan pada tempe kedelai tersebut.



Ilustrasi 1. Diagram Alir Proses Pembuatan Tempe Kedelai

3.2.3. Uji variabel

Pengujian yang dilakukan pada penelitian ini terdiri dari TPC (*Total Plate Count*), kadar nitrogen total, dan uji organoleptik meliputi uji rasa dan bau terhadap tempe kedelai.

a. Uji TPC (*Total Plate Count*)

Prosedur pengujian TPC sesuai dengan metode analisis mikrobiologi (MA PPOM 61/MIK/06) yaitu dengan cara aseptik, pertama kali ditimbang 25 gram sampel ke dalam kantong *stomacher* steril. Setelah itu ditambahkan 225 ml PSS (*Peptone Salt Solution*) dan dihomogenkan dengan *stomacher* selama 30 detik hingga diperoleh suspensi pengenceran 10^{-1} . Tahap berikutnya adalah menyiapkan 5 tabung atau lebih yang masing-masing telah diisi dengan 9 ml PSS.

Hasil dari homogenisasi pada penyiapan sampel yang merupakan pengenceran 10^{-1} , dipipet sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan dalam tabung PSS pertama dikocok atau dihomogenkan dengan menggunakan vorteks hingga diperoleh pengenceran 10^{-2} . Buat pengenceran selanjutnya hingga 10^{-6} atau sesuai dengan pengenceran yang diperlukan. Setiap pengenceran dipipet 1 ml ke dalam cawan petri dan dibuat duplo, ke dalam setiap cawan dituangkan 15-20 ml media PCA yang sudah ditambahkan 1% TTC suhu 45°C . Cawan petri segera digoyang dan diputar sedemikian rupa hingga suspensi tersebar merata.

Media dan pengencer dibuat uji control (blangko) untuk mengetahui sterilitas pada media dan pengencer yang digunakan. Satu cawan diisi 1 ml pengencer dan media agar, pada cawan yang lain diisi media. Setelah media memadat, cawan

diinkubasi suhu 35-37°C selama 24-48 jam dengan posisi dibalik. Setelah itu jumlah koloni yang tumbuh diamati dan dihitung dengan rumus :

$$N = \frac{\Sigma C}{(V(n1 + 0,1n2) \times d)}$$

Keterangan :

N = Jumlah mikroba dalam sampel

C = Jumlah Koloni Pada dua cawan pengenceran

V = Volume Inokulum yang dimasukkan ke dalam masing-masing cawan petri
(V = 1ml)

n1 = Jumlah cawan petri yang digunakan pada pengenceran 1

n2 = jumlah cawan petri yang digunakan pada pengenceran 2

d = pengenceran yang berhubungan dengan pengenceran pertama

b. Uji Kadar Nitrogen Total

Prosedur pengujian Nitrogen digunakan dengan metode kjeldahl berdasarkan SNI No. 01-2354.4 tahun 2006 tentang cara uji kimia penentuan kadar protein dengan metode total nitrogen pada produk perikanan. Prinsip dari uji ini yaitu senyawa nitrogen dilepaskan dari jaringan sampel melalui destruksi menggunakan asam sulfat pekat dengan bantuan panas pada suhu 410°C selama ± 2 jam (sampai diperoleh larutan jernih) di mana senyawa nitrogen terikat oleh sulfat membentuk ammonium sulfat. Selanjutnya ammonium sulfat diubah menjadi garam basa NH₄OH dengan penambahan NaOH. NH₄OH didestilasi menggunakan panas uap untuk memisahkan senyawa amoniak. Prosedur pertama yang dilakukan yaitu penimbangan seksama kira-kira 2 gram homogenat dan dimasukkan ke dalam labu destruksi, ditambahkan 2 buah tablet katalis serta beberapa butir batu didih,

ditambahkan 15 ml H₂SO₄ pekat (95%-97%) dan 3 ml H₂O₂ secara perlahan-lahan dan didiamkan 10 menit dalam ruang asam, didestruksi pada suhu 410°C selama ± 2jam atau sampai larutan jernih, didiamkan hingga mencapai suhu kamar dan tambahkan 50-75 ml larutan aquades, siapkan Erlenmeyer berisi 25 ml larutan H₃BO₃ 4% yang mengandung indikator sebagai penampung destilat.

Pasang labu yang berisi hasil destruksi pada rangkaian alat destilasi uap, ditambahkan 50-75 ml larutan natrium hidroksida thisulfat, dilakukan destilasi dan destilat ditampung dalam Erlenmeyer tersebut (6.5) hingga volume mencapai minimal 150 ml, titrasi hasil destilat dengan HCl 0,2 N yang sudah dibakukan sampai warna berubah dari hijau menjadi abu-abu netral, lakukan pengerjaan blanko, dan lakukan pengujian contoh minimal duplo.

Kadar nitrogen dihitung dengan rumus sebagai berikut :

$$\text{Nitrogen} = \frac{(\text{Titran Sampel} - \text{Titran Blanko}) \times 14.007 \times N}{\text{mg. sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

Titran Sampel = Jumlah titran untuk sampel (ml)

Titran Blanko = Jumlah titran untuk blanko / tanpa sampel

N = Normalitas titran

mg.Sampel = Berat sampel (mg)

c. Uji Organoleptik Bau dan rasa

Pengujian organoleptik berdasarkan Setyaningsih *et al.*, (2010). Metode yang digunakan dengan panelis agak terlatih sebanyak 25 orang dengan kisaran usia 19-25 tahun, pria atau wanita berstatus mahasiswa. Pengambilan data dari uji organoleptik terdiri atas : rasa pahit dan bau busuk. Skor untuk pengujian rasa

pahit yaitu skor 1 untuk kategori tidak pahit, skor 2 untuk kategori agak pahit, skor 3 untuk kategori pahit, dan skor 4 untuk kategori sangat pahit. Untuk pengujian bau yaitu skor 1 untuk kategori tidak bau busuk, skor 2 untuk kategori sedikit bau busuk, skor 3 untuk kategori cukup bau busuk, dan skor 4 untuk kategori sangat bau busuk. Form uji organoleptik tempe kedelai yang digunakan dalam pengujian dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.2.4. Analisis Data

Data hasil uji TPC dan kadar nitrogen total dianalisis statistik dengan menggunakan uji t (*independent sample t-test*) dengan taraf signifikansi 5%, yaitu membandingkan sifat TPC dan kadar nitrogen total (Sugiyono, 2000). Data hasil uji organoleptik dianalisis statistik dengan menggunakan uji non parametrik yaitu uji *Mann-Whitney* dengan taraf signifikansi 5% (Kartika, 2008). Semua data diolah dengan bantuan program komputer SPSS versi 16.0.