

III BAHAN, ALAT DAN METODE PENELITIAN

Pada bab ini akan diuraikan mengenai : (1) Bahan dan Alat yang Digunakan, (2) Metode Penelitian, (3) Prosedur Penelitian.

3.1. Bahan

Bahan-bahan yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah biakan murni *Bacillus subtilis* sebanyak 2 tabung yang dibeli di Laboratorium Mikrobiologi Institut Teknologi Bandung, ubi jalar varietas sukuh yang dibeli dari Pasar Caringin, 45 kg, tepung beras 2,5 kg, tepung terigu segitiga biru 1 kg, alkohol 70%, NA (*Nutrien agar*), air steril, ragi, susu bubuk, (*Bread Improver*), sukrosa, telur, air dingin, *butter*, garam, alkohol 70%, methilen blue, indikator *phenolphthalien*, NaOH 30%, HCl 0,1 N, Na₂SO₄ anhidrat, Selenium Black, HgO, batu didih, H₂SO₄ pekat, granul Zn, dan *aquadest*, NaOH 0,1 N, KIO₃, serbuk KI padat, H₂SO₄, Na₂S₂O₃ 0,1 N, HCL 9,5 N, amilum.

3.2. Alat

Alat-alat yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah timbangan elektrik (Mettler Toledo PL202-S), autoklaf, tabung reaksi, spatula, gelas kimia, *mixer* (Miyako), cetakan, sendok, pisau, *slicer*, wadah penampung adonan, kompor gas (Rinnai), alat pengaduk (*conche*), *tunnel dryer*, nampan bahan ayakan 80 mesh, plastik, inkubator, termometer, lumpang dan alu, pipet tetes, pipet volumetri, pembakaran bunsen, *spray*.

Alat-alat yang digunakan untuk analisis adalah labu Kjeldahl, tang krus, tanur, eksikator, kawat kassa, kaki tiga, timbangan digital, pipa kapiler, kaca

arloji, kertas timbang, pipet ukur, gelas ukur, labu takar 100 ml, penangas air, pipet volume, labu Erlenmeyer 250 ml, alat destilasi, kondensor, kertas PH, buret, statif, klem, pipet tetes, dan botol semprot, oven, *mixer*, spektrofotometer, corong, *Rapid Visco Analyzer*, Spektro Fotometer.

3.3. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan terbagi atas 2 (dua) bagian, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama sebagai berikut.

3.3.1. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan yang akan dikerjakan dibagi ke dalam 2 tahap, tahap Imengembangbiakan *Bacillus subtilis* di dalam substrat (tepung beras dan tepung terigu), kemudian koji yang dihasilkan digunakan untuk pembuatan koji II dengan substrat yang sama namun ditambahkan tepung ubi jalar nonfermentasi dengan konsentrasi yang berbeda.

Tepung ubi jalar yang ditambahkan pada substrat (tepung beras dan tepung terigu) yaitu dengan konsentrasi 0%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1,0%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, dan 1,5%, selanjutnya dipilih media koji yang ditambahkan tepung ubi jalar dengan respon uji jumlah sel hidup.

Perhitungan sel hidup pada koji tahap II dengan metode *Counting Chamber*, koji yang memiliki jumlah sel hidup paling banyak akan digunakan untuk pembuatan tepung ubi jalar fermentasi pada penelitian utama.

3.3.2. Penelitian Utama

Penelitian utama yang akan dilakukan untuk menentukan konsentrasi koji *Bacillus subtilis* dan waktu yang tepat pada proses fermentasi terendam terhadap

karakteristik tepung ubi jalar yang dihasilkan. Penelitian utama terdiri dari rancangan perlakuan, rancangan percobaan, rancangan analisis, dan rancangan respon.

3.3.2.1. Rancangan Perlakuan

Rancangan perlakuan yang akan digunakan pada penelitian utama terdiri dari dua variabel, yaitu variabel bebas atau variabel prediktor dan variabel tidak bebas atau variabel respon. Variabel bebas (X) terdiri dari konsentrasi koji *Bacillus subtilis* dengan tujuh taraf, yaitu (X₁: 0,5%, X₂: 1% X₃ : 1,5%, dan X₄ : 2%, X₅ : 2,5%, X₆ : 3%) dan waktu fermentasi dengan enam taraf, yaitu (Y₁ : 12 jam, Y₂ : 24 jam, Y₃ : 36 jam, Y₄ : 48 jam, Y₅ : 60 jam dan Y₆ : 72jam), variabel tidak bebas (Y) yaitu variabel yang terjadi karena variabel bebas terdiri dari kadar air, kadar protein, kadar pati, kadar amilosa, gel konsistensi, dan pasting properties (Amilografi).

3.3.2.2. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang akan digunakan pada penelitian ini adalah Metode Grafik Regresi Linier Sederhana dengan ulangan sebanyak 2 (dua) kali.

Model percobaan untuk penelitian ini adalah sebagai berikut :

$$Y = a + bX$$

Koefisien–koefisien regresi a dan b untuk regresi linier akan dihitung dengan rumus, seperti yang dijelaskan oleh Sudjana (2005) :

$$a = \frac{(\sum Yi)(\sum Xi^2) - (\sum Xi)(\sum XiYi)}{n \sum Xi^2 - (\sum Xi)^2}$$

$$b = \frac{n \sum XiYi - (\sum Xi)(\sum Yi)}{n \sum Xi^2 - (\sum Xi)^2}$$

Denah layout penelitian dan data hasil pengamatan dicatat dalam bentuk tabel variabel tak bebas dan variabel bebas seperti pada tabel 12 dan tabel 13.

Tabel 12. Denah Layout Percobaan

Ulangan I					
X ₁ Y ₃	X ₁ Y ₂	X ₁ Y ₁	X ₁ Y ₆	X ₁ Y ₅	X ₁ Y ₄
X ₂ Y ₄	X ₂ Y ₆	X ₂ Y ₃	X ₂ Y ₁	X ₂ Y ₂	X ₂ Y ₅
X ₃ Y ₁	X ₃ Y ₂	X ₃ Y ₅	X ₃ Y ₄	X ₃ Y ₃	X ₃ Y ₆
X ₄ Y ₂	X ₄ Y ₁	X ₄ Y ₃	X ₄ Y ₆	X ₄ Y ₅	X ₄ Y ₄
X ₅ Y ₅	X ₅ Y ₂	X ₅ Y ₄	X ₅ Y ₃	X ₅ Y ₁	X ₅ Y ₆
X ₆ Y ₁	X ₆ Y ₃	X ₆ Y ₂	X ₆ Y ₅	X ₆ Y ₆	X ₆ Y ₄

Tabel 13. Pendataan Nilai Variabel Bebas dan Tidak Bebas

Variabel tidak bebas (Y)	Variabel bebas (X)
Y ₁	X ₁
Y ₂	X ₂
Y _n	X _n

Sumber : Sudjana. (2005)

3.3.2.3. Rancangan Analisis

Untuk mencari atau menentukan hubungan antara variabel bebas terhadap variabel tidak bebas akan dilakukan dengan menghitung korelasi antara kedua variabel tersebut terhadap respon yang diukur. Nilai koefisien korelasi atau r dapat dihitung dengan rumus, seperti yang dijelaskan oleh Sudjana (2005).

$$r = \frac{n \sum XiYi - (\sum Xi)(\sum Yi)}{\sqrt{n\{\sum Xi^2 - (\sum Xi)^2\}n\{\sum Yi^2 - (\sum Yi)^2\}}}$$

3.3.2.4. Rancangan Respon

1. Rancangan respon yang akan dianalisis pada penelitian pendahuluan meliputi :

Perhitungan jumlah sel hidup dengan metode *Counting Chamber*.

2. Rancangan respon yang akan dianalisis pada penelitian utama meliputi :

Kadar air metode gravimetri (AOAC, 2012), kadar protein metode Kjeldhal (AOAC, 2012), kadar pati (AOAC, 1997 dalam Annisa 2013), kadar amilosa metode spektrofotometri (Apriyantono, 1989), respon fisiko-kimia yaitu gel konsistensidan *pasting properties* (amilografi) menggunakan *Rapid Visco Analyzer*, dan Analisis Konsistensi Gel (Cagampang, 1973)

3.4. Prosedur Percobaan

Prosedur pengembangbiakan mikroorganisme meliputi :

1. Inokulasi

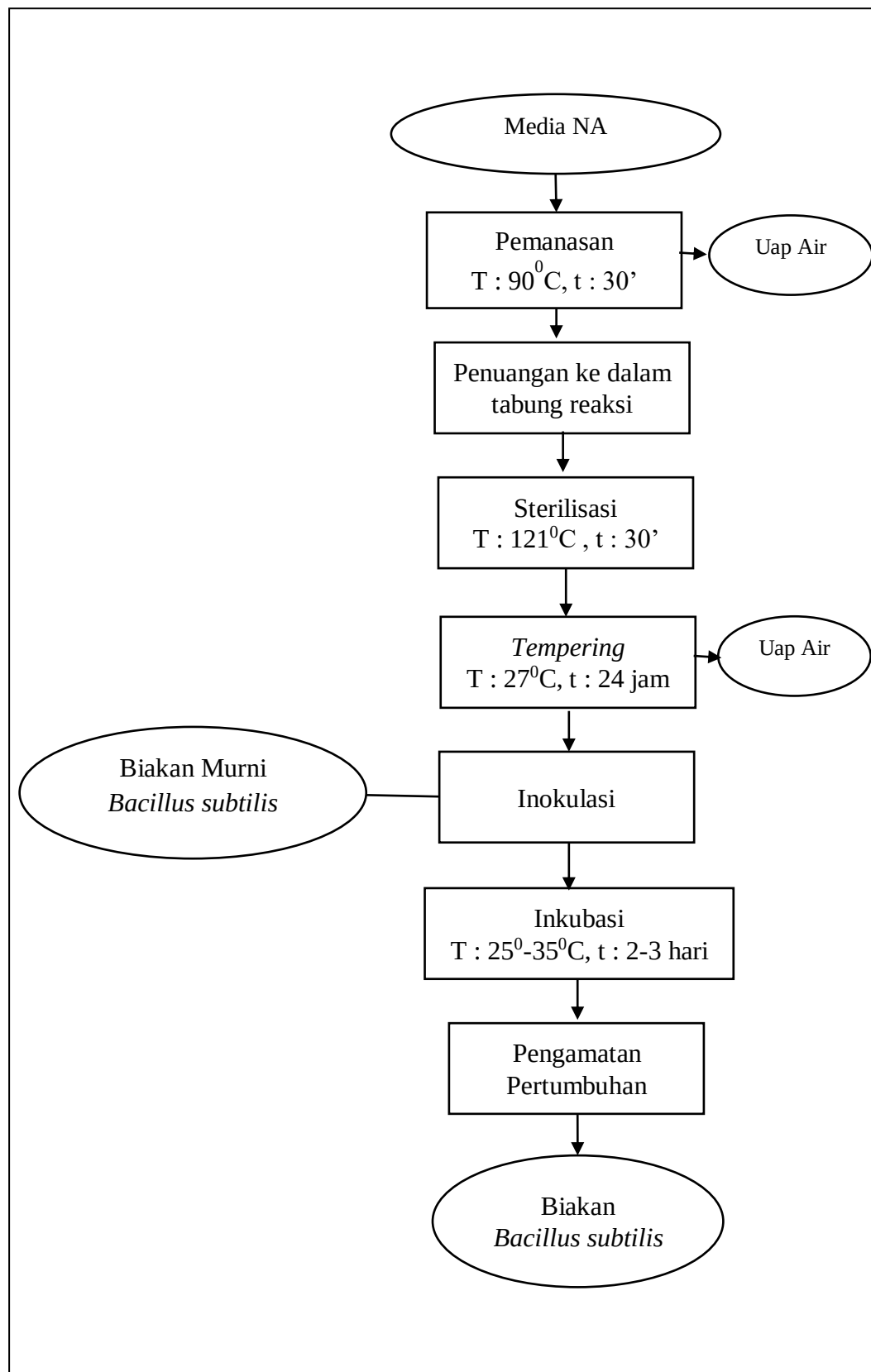
Proses ini dianalisis dengan cara memindahkan biakan murni *Bacillus subtilis* kedalam media agar miring (NA) hal ini dilakukan dalam keadaan aseptis agar pertumbuhannya tidak terhambat akibat kontaminasi.

2. Inkubasi

Proses inkubasi ini dilakukan pada suhu optimum pertumbuhan *Bacillus subtilis* 25-35°C, dalam waktu 2 – 3 hari. Hal ini dilakukan untuk menjaga pertumbuhan mikroorganisme, agar dapat berkembangbiak dengan baik.

3. Pengamatan pertumbuhan

Proses pengamatan mikroba ini dapat dilakukan secara langsung, karna pertumbuhannya masih terlihat oleh pandangan mata, dengan terbentuknya garis bekas goresan berwarna putih.



Gambar 1. Diagram Alir Pengembangbiakan Mikroorganisme

Prosedur penelitian pendahuluan pembuatan koji *Bacillus subtilis* adalah sebagai berikut :

1. Penggilingan

Penggilingan beras bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel dan memudahkan dalam proses selanjutnya.

2. Pencampuran

Tepung beras dan tepung terigu sangrai dicampurkan, agar tepung terigu menyebar secara merata. Pada koji tahap II, pencampuran dilakukan dengan menambahkan tepung ubi jalar sesuai konsentrasi yang telah ditentukan yaitu 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,6%, 0,7%, 0,8%, 0,9%, 1%, 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5%. Hal ini bertujuan untuk menentukan banyaknya mikroba yang tumbuh pada masing-masing koji yang ditambahkan ubi jalar dalam konsentrasi yang berbeda.

3. Pengukusan

Proses pengukusan dilakukan untuk mematangkan campuran tepung dan meningkatkan kandungan air dalam bahan yang akan digunakan sebagai media pertumbuhan mikroorganisme (*Bacillus subtilis*), serta sebagai proses sterilisasi bahan pembuatan koji. Pengukusan dilakukan pada suhu 70°C dalam waktu $\pm 7-10$ menit.

4. *Tempering*

Proses *tempering* pada tepung yang sudah dikukus bertujuan agar pada saat inokulasi mikroba tidak mati akibat panas yang cukup tinggi. Proses ini dilakukan

didalam *laminer flow* agar bahan tetap dalam keadaan *steril*, sehingga terhindar dari kontaminasi. Waktu yang diperlukan $\pm 15-20$ menit.

5. Pembuatan Suspensi

Suspensi dibuat agar mikroba dapat diinokulasikan pada bahan koji. Pembuatan suspensi dilakukan dengan cara *Bacillus subtilis* yang telah dibiakan dalam tabung reaksi diambil dengan kawat oase secara aseptis, kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisi air steril.

6. Inokulasi

Suspensi *Bacillus subtilis* yang sudah dibuat, kemudian diinokulasikan secara merata pada bahan koji yang sudah di *tempering* pada nampan yang telah disterilkan. Proses ini dilakukan didalam *laminer flow* agar tetap dalam keadaan steril. Proses inokulasi ini dilakukan dengan menambahkan 2 tabung suspensi *Bacillus subtilis* pada 250 g bahan koji.

Sedangkan pada proses pembuatan koji tahap II, inokulasi dilakukan dengan menambahkan koji yang dihasilkan dari pembuatan koji tahap I sebanyak 3% dari berat bahan.

7. Inkubasi

Suhu Inkubasi disesuaikan dengan suhu optimal *Bacillus subtilis* yaitu 25-33°C. Proses ini berlangsung selama 2-3 hari didalam inkubator, agar *Bacillus subtilis* dapat tumbuh dengan baik pada seluruh bahan koji.

8. Pengeringan

Proses pengeringan dilakukan menggunakan *tunnel dryer* pada suhu 40°C-50°C selama 2 hari, hal ini agar didapatkan koji yang kering. Suhu pengeringan

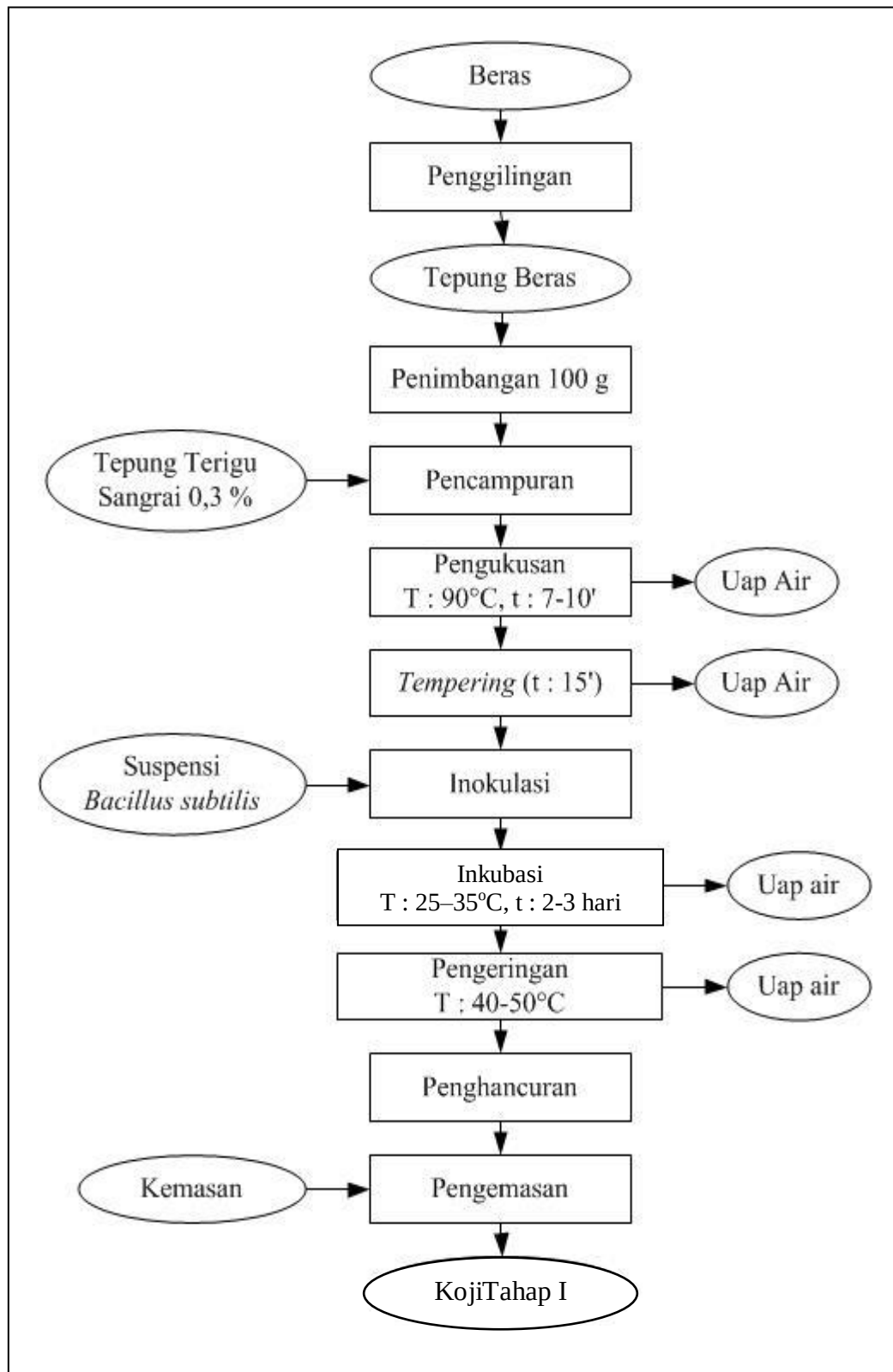
harus dijaga agar *Bacillus subtilis* yang telah tumbuh tidak mati akibat pemanasan pada proses pengeringan.

9. Penghancuran

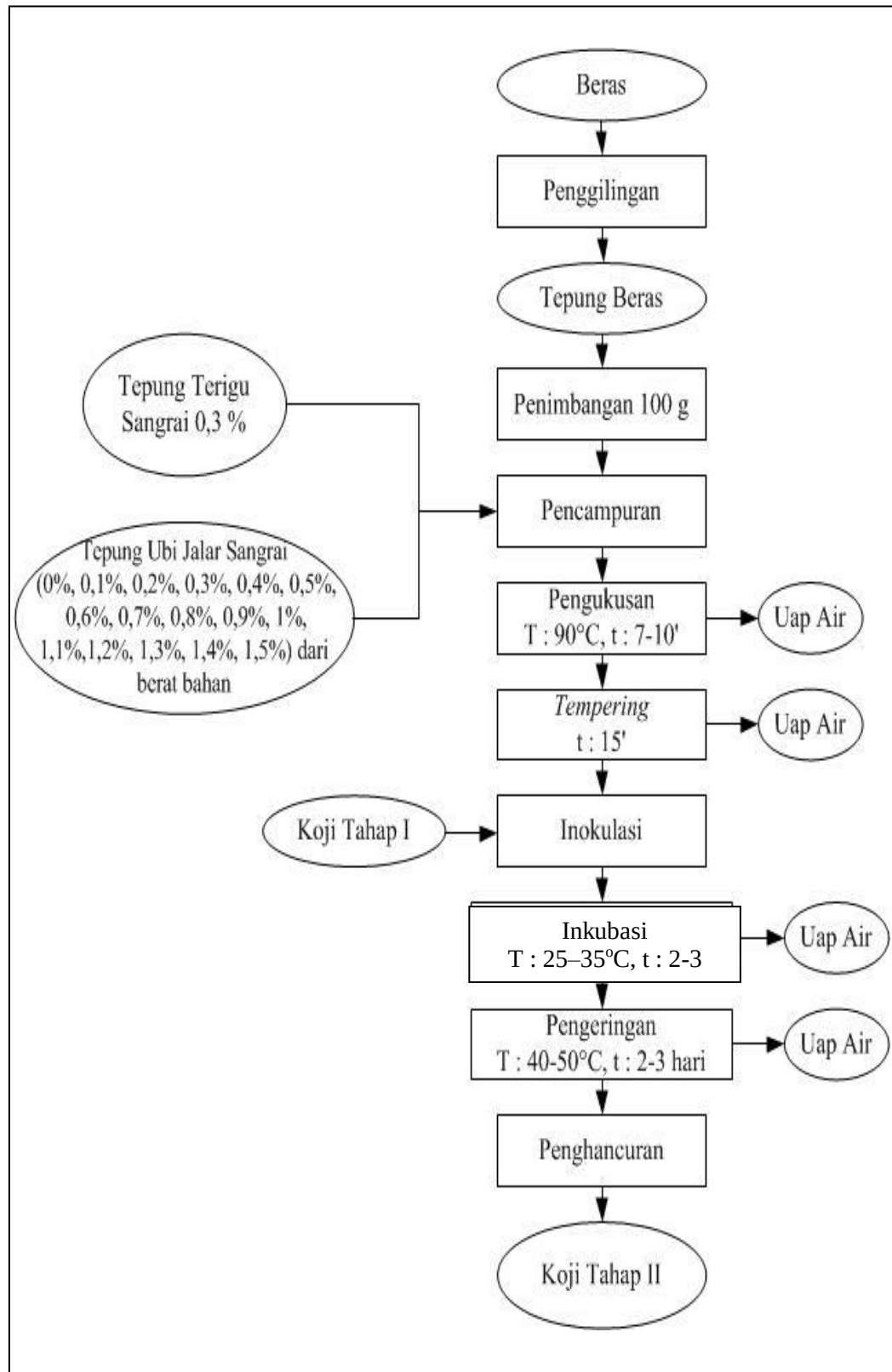
Proses penghancuran koji bertujuan untuk memperkecil ukuran partikel koji sehingga diperoleh koji yang halus. Proses penghancuran ini dilakukan dengan cara ditumbuk, hal ini dilakukan untuk mencegah terjadinya kerusakan jaringan pada mikroba yang sudah terbentuk, serta mencegah kerusakan akibat panas yang timbul dari alat penggilingan.

10. Perhitungan Sel Hidup pada Koji

Koji halus yang telah didapatkan dihitung jumlah selnya dengan mengambil 1 gram koji lalu dibuat suspensi dengan menggunakan air steril. Suspensi ditambahkan dengan 1-2 tetes *methylen blue*. Lalu suspensi ditetaskan pada *counting chamber* dengan menggunakan pipet tetes. Pengambilan suspensi dilakukan setelah bahan koji mengendap pada tabung reaksi. Perhitungan jumlah sel dilakukan menggunakan mikroskop dengan ketentuan sel mati akan berwarna biru *methylen blue* sedangkan sel hidup akan terlihat transparan.



Gambar 2. Diagram Alir Penelitian Pendahuluan Tahap I Pembuatan Koji



Gambar 3. Diagram Alir Penelitian Pendahuluan Tahap II Pembuatan Koji

Deskripsi percobaan proses pembuatan tepung ubi jalar fermentasi meliputi tahap-tahap sebagai berikut :

1. Pencucian

Sebelum dilakukan pengolahan tahap ubi jalar yang akan digunakan sebagai bahan untuk pembuatan tepung, terlebih dahulu ubi jalar tersebut dicuci dengan tujuan untuk menghilangkan atau memisahkan kotoran atau tanah yang menempel pada permukaan kulit ubi jalar.

2. Pengupasan

Ubi jalar yang telah dicuci selanjutnya dikupas pada bagian kulit ubi, tujuannya adalah untuk memisahkan kulit ubi yang kotor dengan bagian daging ubi yang akan diproses. Dalam melakukan proses pengupasan sebaiknya mengupas bagian kulitnya saja jangan sampai terlalu banyak mengenai daging ubi karena akan banyak mengurangi berat ubi tersebut.

3. Pengirisan

Setelah dikupas dengan bersih, ubi jalar selanjutnya di iris tipis-tipis dengan menggunakan alat (*slicer*) bila tidak tersedia alat pemotong bisa juga menggunakan pisau yang tajam, hal ini dilakukan untuk mempercepat proses pengeringan.

4. Pencampuran

Ubi jalar yang sudah di iris tipis-tipis kemudian dicampurkan dengan air kedalam sebuah tanki sampai seluruh permukaannya terendam.

5. Inokulasi

Irisan ubi jalar yang sudah terendam air kemudian ditambahkan koji *Bacillus subtilis* dengan konsentrasi yang terpilih. Konsentrasi koji *Bacillus subtilis* yang ditambahkan pada masing-masing tanki ubi jalar yaitu 0,5%, 1,0%, 1,5%, 2,0%, 2,5%, dan 3%. Koji yang terpilih yaitu koji didapatkan dari hasil analisis jumlah sel hidup yang paling terbanyak.

6. Fermentasi

Setelah selesai inokulasi, ubi jalar kemudian fermentasi pada suhu kamar 27°C, lama waktu fermentasi yang digunakan yaitu 12 jam, 24 jam, 36 jam, 48 jam, 60 jam, dan 72 jam.

7. Pencucian

Ubi jalar yang difermentasi akan menghasilkan aroma yang khas, oleh sebab itu proses pencucian ini dilakukan kembali supaya ubi jalar tetap dalam keadaan bersih dan aroma khas yang menempel akan hilang.

8. Penirisan

Ubi yang sudah bersih dilakukan proses selanjutnya yaitu penirisan, penirisan ini dilakukan dengan tujuan untuk memisahkan ubi jalar dengan air/ Apabila ubi tidak ditiriskan terlebih dahulu maka pada saat proses pengeringan akan memakan waktu yang lebih lama.

9. Penyusunan di atas nampan bahan

Ubi jalar yang sudah ditiriskan kemudian disusun di atas nampan bahan, hal ini untuk memudahkan proses pengeringan.

10. Pengeringan

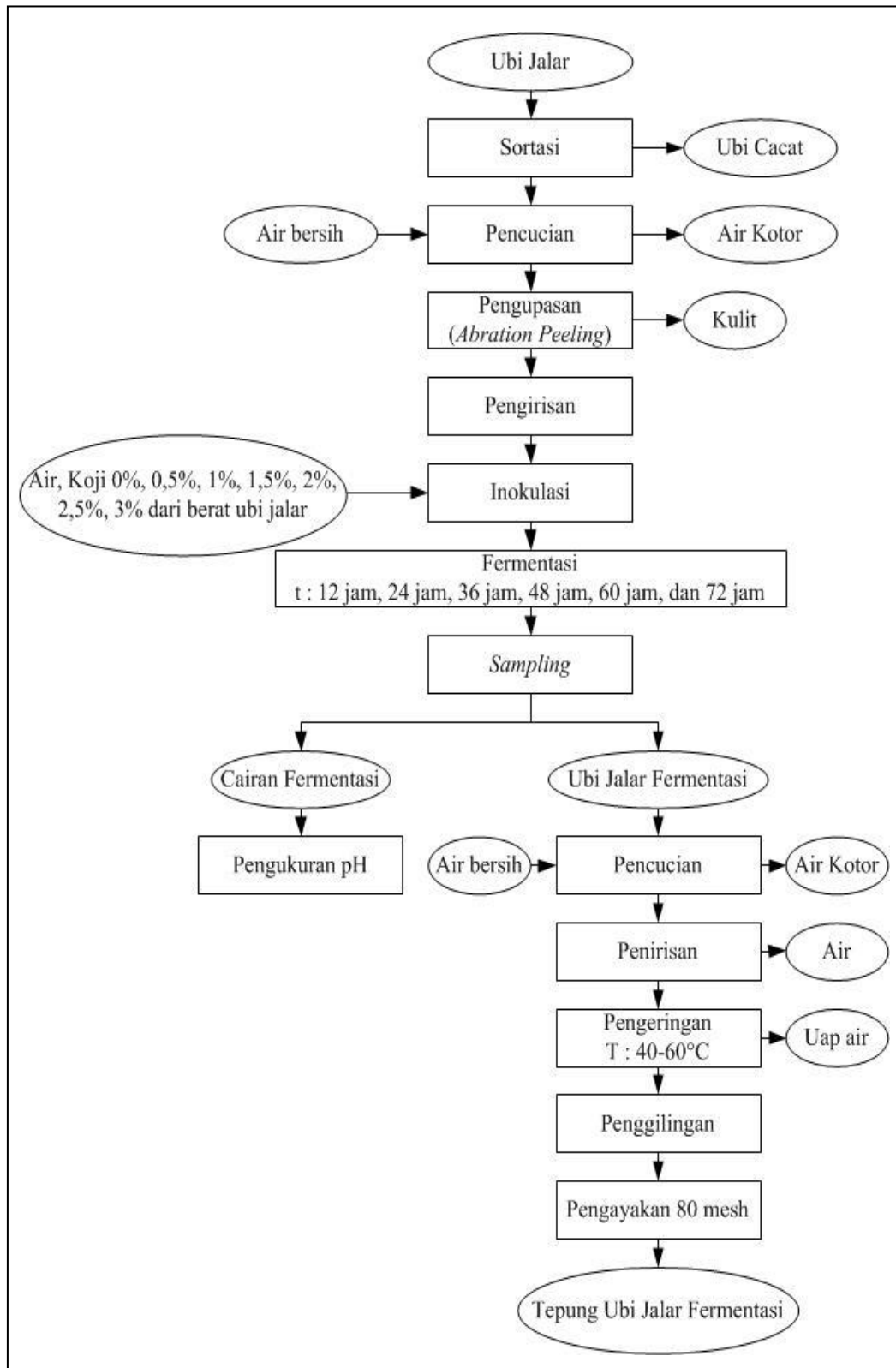
Ubi jalar yang telah disusun diatas nampan bahan, kemudian dimasukan kedalam *tunnel dryer* dengan suhu pengeringan 40-50°C selama 6-7 jam. Umumnya pengeringan dengan alat pengering akan lebih cepat dibandingkan dengan penjemuran dan dapat lebih mempertahankan warna bahan yang dikeringkan.

11. Penggilingan

Setelah dilakukan pengeringan langkah selanjutnya yaitu penggilingan. Ubi jalar yang sudah kering digiling dengan menggunakan blender untuk mendapatkan ukuran yang halus menyerupai tepung.

12. Pengayakan

Ubi jalar yang telah dihaluskan kemudian dilakukan proses pengayakan dengan saringan 80 mesh, dengan tujuan ukuran ubi lebih seragam dan halus. Selain dari itu dapat memisahkan kotoran-kotoran yang ikut terbawa dalam proses ini, sehingga tepung yang dihasilkan bersih dan ukurannya seragam.



Gambar 4. Diagram Alir Penelitian Utama Pembuatan Tepung Ubi Jalar Fermentasi

Deskripsi pembuatan roti tawar menggunakan tepung ubi jalar fermentasi meliputi tahap-tahap sebagai berikut :

1. Pengadukan

Pengadukan atau sering disebut dengan dengan tahap mixing. Mixing merupakan tahapan penting dalam pembuatan roti. Tujuan pengadukan adalah menciptakan daya rekat atau membentuk gluten dalam protein tepung menjadi kalis dengan cara mencampurnya bersama air. Kalis adalah pencapaian pengadukan secara sempurna sehingga terbentuk permukaan tipis pada adonan. Tanda adonan kalis apabila adonan sudah tidak lagi menempel pada wadah pengadukan dan tangan. Selain itu, ketika adonan dilebarkan akan terbentuk selaput tipis yang elastis.

2. Fermentasi awal

Ini adalah tahap mengistirahatkan atau memfermentasikan adonan untuk membentuk rasa dan volume yang dipengaruhi oleh kelembaban udara sekitar. Biasanya suhu yang bagus untuk fermentasi adalah pada suhu 35 – 44°C, karena suhu tersebut adalah suhu optimum pertumbuhan *Sacharomyces cereviceae*. Pada saat fermentasi akan terjadi reaksi antara gula dan ragi sehingga terbentuk gas CO₂, alkohol dan asam- asam organik.

Adonan diistirahatkan selama ±10 menit yang mengakibatkan pemecahan gula oleh ragi menjadi :

- Gas CO₂→membuat adonan mengembang
- Alkohol→memberi aroma pada roti

- Asam→memberi rasa dan memperlunak gluten
- Panas→ suhu meningkat selama fermentasi

3. Penyeragaman Bentuk (Pemotongan dan Penimbangan)

Tahap ini adalah membagi adonan menjadi beberapa bagian sesuai dengan kebutuhan yang bertujuan untuk mendapatkan berat dan ukuran yang seragam pada produk akhir. Tahap ini harus dilakukan dengan cepat karena selama proses berlangsung fermentasi tetap berlangsung.

4. Membulatkan atau rounding

Rounding yaitu membuat adonan menjadi padat dan bulat dengan tujuan membentuk selaput tipis di permukaan adonan yang dapat menahan gas dalam proses peragian. Selain itu tujuan dari rounding adalah memberi bentuk awal supaya mudah dibentuk ke bentuk yang lebih kompleks.

5. *Intermediate proofing* dan Pembuangan Gas

Tahap ini merupakan peragian yang kedua, yaitu mengistirahatkan adonan yang sudah ditimbang agar terjadi proses fermentasi dan adonan mudah dibentuk. Waktu yang diberikan pada fermentasi kedua ini ± 10 menit, waktu *intermediate proofing* juga tergantung dari kondisi adonan supaya adonan tidak pecah-pecah atau rusak pada waktu pengerolan. *Intermediate proofing* bertujuan untuk membuat adonan menjadi rileks dan mudah untuk diproses selanjutnya.

Pembuangan gas dilakukan dengan cara pengerolan yang bertujuan untuk membuang gas yang ada di dalam adonan dan membentuk adonan dengan tebal yang dikehendaki.

6. Moulding

Meletakkan adonan di tengah-tengah cetakan dengan sambungan diletakkan di bagian bawah supaya tidak terbuka pada saat dilakukan final proofing atau waktu pemanggangan.

7. Fermentasi II

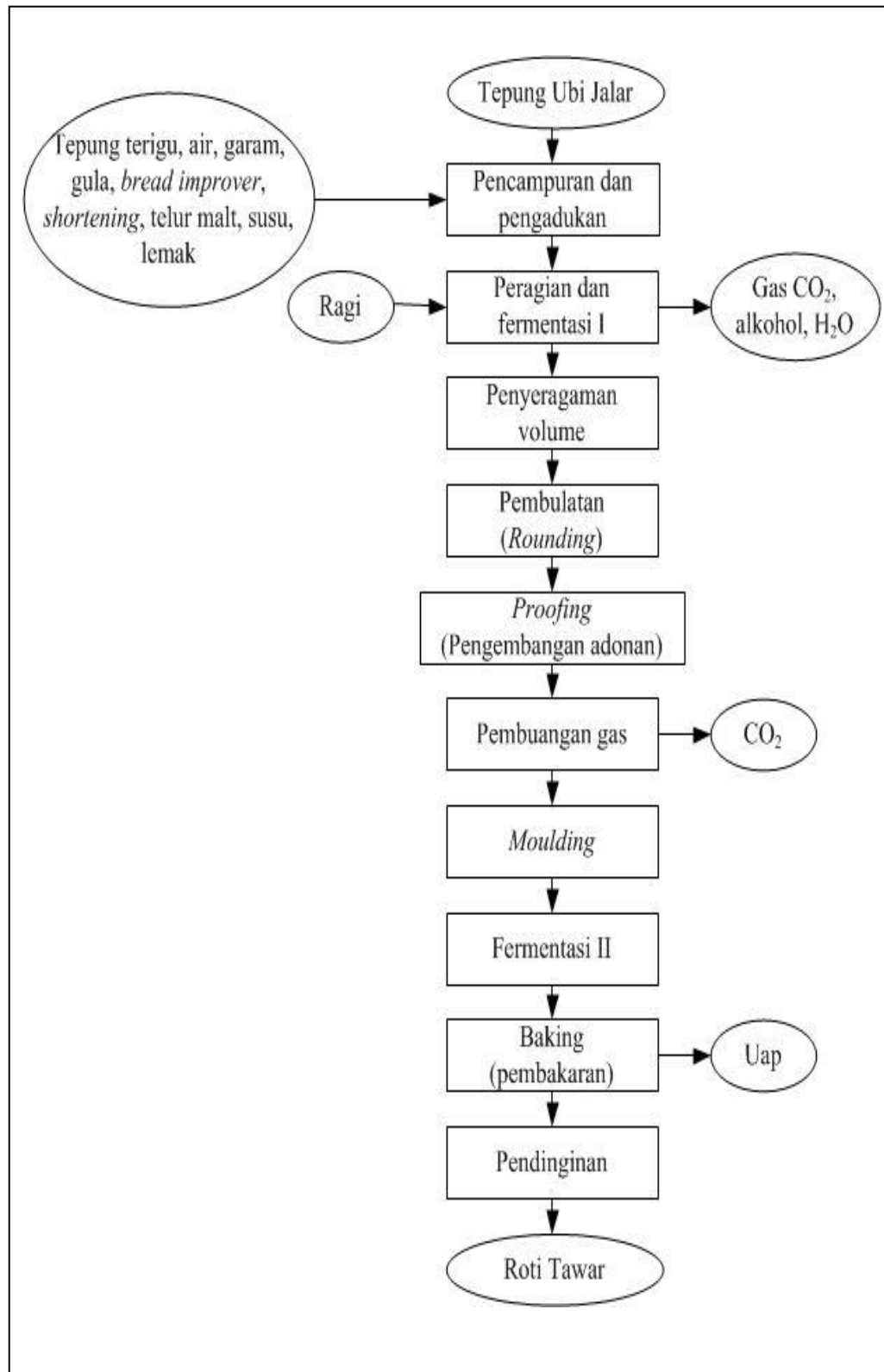
Pada fermentasi akhir ini bertujuan mengembangkan adonan untuk mencapai bentuk dan mutu yang baik. Suhu yang digunakan pada fermentasi akhir ini adalah 35 – 44°C, dengan kelembaban relatif 80 – 85% dan dengan waktu 55 – 65 menit.

8. Pembakaran

Suhu yang digunakan dalam pemanggangan adalah 170°C untuk suhu atas oven dan 190°C untuk suhu bawah. Perbedaan suhu tersebut digunakan untuk menghindari gosong permukaan pada roti. Sedangkan waktu yang dibutuhkan sampai diperoleh roti yang matang bekisar antara 25–35 menit.

9. Pendinginan

Setelah roti dikeluarkan dari cetakan dan dilanjutkan dengan proses pendinginan yang bertujuan untuk memungkinkan pemotongan tanpa mengalami kerusakan. Biasanya didinginkan pada udara terbuka selama $\pm 45 - 70$ menit.



Gambar 5. Diagram Alir Pembuatan Roti Tawar