

LAMPIRAN PROSEDUR ANALISIS

A.1. Pengujian Daya Serap Air

(Ganjyal *et al.*, 2006; Shimelis *et al.*, 2006)

Prosedur pengujian daya serap air:

1. Sampel biskuit dihancurkan dengan menggunakan mortar.
2. Sampel biskuit yang sudah dihancurkan ditimbang sebanyak 0,5 gram (BSA) dan disuspensikan dalam 5 ml akuades.
3. Suspensi dicampur menggunakan vorteks selama 30 detik, kemudian didiamkan selama 30 menit.
4. Suspensi disentrifugasi pada kecepatan 3000 rpm selama 10 menit.
5. Cairan supernatan dipisahkan, endapan yang terbentuk ditimbang (BSAk).
6. Daya rehidrasi ditentukan dengan:

$$\text{Daya rehidrasi (\%)} = \frac{(\text{BSAk} - \text{BSA})}{\text{berat sampel (basis kering)}} \times 100\%$$

A.2 Pengujian Nilai Cerna Pati secara *in vitro*

(Kon *et al.*, 1971 yang disitasi oleh Muchtadi dan Palupi, 1992)

Prosedur:

1. Sampel biskuit dihancurkan dengan menggunakan mortar.
2. Suspensi biskuit (1%) dipanaskan dalam penangas air selama 30 menit sampai mencapai suhu 90°C, kemudian didinginkan.
3. 2 ml larutan tepung dalam tabung reaksi ditambah 3 ml air destilat dan 5 ml larutan *buffer* Na-fosfat 0,1 M, pH 7,0, kemudian diinkubasikan pada penangas air pada suhu 37°C selama 15 menit.

4. Ditambahkan 5 ml larutan α -amilase dan diinkubasikan lagi pada suhu 37°C selama 30 menit
5. 1 ml campuran reaksi diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi lain kemudian ditambahkan 2 ml pereaksi dinitrosalisilat. Selanjutnya dipanaskan dalam penangas air 100°C selama 10 menit
6. Setelah didinginkan campuran reaksi diencerkan dengan menambahkan 10 ml air destilat
7. Warna oranye merah dari campuran diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm
8. Kadar maltosa diukur dengan menggunakan kurva standar maltosa murni yang diperoleh dengan cara mereaksikan larutan maltosa standar dengan pereaksi dinitrosalisilat menggunakan cara yang sama seperti sebelumnya
9. Daya cerna pati sampel dihitung sebagai persentase relatif terhadap pati murni sebagai berikut:

$$\text{Daya cerna (\%)} = \frac{\text{kadar maltosa sampel setelah reaksi enzimatik}}{\text{kadar maltosa pati murni setelah reaksi enzimatik}} \times 100\%$$

A.3 Pengujian Tekstur: *Hardness* (*Manual Texture Analyzer - TA-XTPlus*)

Prosedur:

1. Aksesori yang digunakan (*Spherical Probes P/1SP* didukung HDP/90) dipasang pada tempatnya.
2. *Texture Analyzer* diatur sebagai berikut:

Mode : *measure force in compression*

Option : *return to start*

Pre-test speed : 1,0 mm/s

Test speed : 0,5 mm/s

Post-test speed : 10,0 mm/s

Distance : 2 mm
Trigger force : auto – 5 g
Tare mode : auto
Data acquisition rate : 400 pps

3. Sampel biskuit diletakkan pada meja sampel.
4. Alat dijalankan.
5. Grafik yang dihasilkan adalah grafik *time vs force*

A.4 Pengujian Tekstur: Daya Patah *(Manual Texture Analyzer - TA-XTPlus)*

Prosedur:

1. Aksesoris yang digunakan (*Volod Kevich Bite Jaws HDP/VB* didukung HDP/90) dipasang pada tempatnya.

2. *Texture Analyzer* diatur sebagai berikut:

Mode : *measure force in compression*
Option : *return to start*
Pre-test speed : 1,5 mm/s
Test speed : 2,0 mm/s
Post-test speed : 10,0 mm/s
Distance : 5 mm
Trigger force : auto – 25 g
Tare mode : auto
Data acquisition rate : 400 pps

3. Sampel biskuit diletakkan pada meja sampel.
4. Alat dijalankan.
5. Grafik yang dihasilkan adalah grafik *time vs force*

A.5 Pengujian Kadar Protein dengan Metode Kjeldhal yang Dimodifikasi (AOAC, 1970 yang disitasi oleh Sudarmadji dkk., 1997)

1. Ditimbang 1 gram bahan yang telah dihaluskan dan dimasukkan ke dalam labu Kjeldhal.
2. Ditambahkan 7,5 gram $K_2S_2O_4$ dan 0,35 gram HgO dan H_2SO_4 pekat.
3. Semua bahan dipanaskan dalam labu kjeldhal dalam lemari asam sampai berhenti berasap. Pemanasan diteruskan dengan api besar sampai mendidih dan cairan menjadi jernih. Pemanasan tambahan diteruskan lebih kurang satu jam.
4. Api pemanas dimatikan dan bahan dibiarkan menjadi dingin.
5. Ditambahkan 100 ml aquades dalam labu Kjeldhal dan beberapa lempeng Zn, juga ditambahkan larutan K_2S 4% (dalam air) dan akhirnya ditambahkan perlahan-lahan larutan NaOH 50% sebanyak 50 ml yang sudah didinginkan.
6. Labu Kjeldhal dipasang dengan segera pada alat destilasi.
7. Labu Kjeldhal dipanaskan perlahan-lahan sampai dua lapisan cairan tercampur, kemudian dipanaskan dengan cepat sampai mendidih.
8. Destilat ini ditampung dalam erlenmeyer yang telah diisi dengan 50 ml larutan standar HCl (0,1N) dan 5 tetes indikator metil merah.
9. Destilasi dilakukan sampai destilat yang tertampung sebanyak 75 ml.
10. Destilat yang diperoleh dititrasikan dengan standar NaOH (0,1N) hingga berwarna kuning.
11. Dibuat juga blanko dengan cara mengganti bahan dengan akuades, dilakukan dekstruksi, destilasi, dan titrasi seperti pada sampel.
12. Perhitungan % protein adalah sebagai berikut:

$$\% \text{ protein} = \frac{(\text{ml NaOH blanko} - \text{ml NaOH sampel}) \times \text{Faktor konversi}}{\text{gram blanko} \times 1000} \times 100 \times 14,008$$

A.6 Pengujian Kadar Air dengan Metode Thermogravimetri (AOAC, 1970 dan Rangana, 1979 yang disitasi oleh Sudarmadji dkk., 1997)

Prosedur:

1. Ditimbang sampel yang telah berupa serbuk atau bahan yang telah dihaluskan sebanyak 1-2 g dalam botol timbang yang telah diketahui beratnya.
2. Dikeringkan dalam oven pada suhu 100-105°C selama 3-5 jam.
3. Didinginkan dalam eksikator dan ditimbang.
4. Dipanaskan lagi dalam oven 30 menit, didinginkan dalam eksikator dan ditimbang. NB: Perlakuan ini diulangi sampai tercapai berat konstan (selisih penimbangan berturut-turut kurang dari 0,2 mg)
5. Pengurangan berat merupakan banyaknya air dalam bahan.

A.7 Pengujian Nilai Cerna Protein secara *in vitro* (Saunders *et al.*, 1973 yang disitasi oleh Muchtadi dan Palupi, 1992)

Prosedur:

1. Sampel biskuit dihancurkan dengan menggunakan mortar.
2. Dalam tabung *sentrifuge*, 1 gram sampel yang sudah dihancurkan disuspensikan dalam 20 ml HCl 0,1 N dan dicampurkan dengan 50 mg pepsin dalam 1 ml HCl 0,01 N.
3. Campuran diaduk-aduk dalam *shaker* pada suhu 37°C selama 48 jam, kemudian dilakukan *sentrifuge* pada 20.000 x g selama 5 menit, suhu 5°C.
4. Setelah supernatannya dipisahkan, residu disuspensikan kembali dalam 10 ml akuades dan 10 ml buffer Na-fosfat 0,1 M, pH 8,0 dan ditambahkan 5 mg tripsin.

5. Campuran residu dengan akuades, Na-fosfat dan tripsin diaduk-aduk dalam *shaker* pada suhu 23°C selama 16 jam.
6. Residu padatan dipisahkan dengan cara *sentrifuge* seperti di atas dan kemudian dicuci sebanyak 5 kali dengan 30 ml akuades (untuk setiap kali pencucian, supernatan dipisahkan dengan cara *sentrifuge* seperti di atas).
7. Residu disaring melalui *Milipore filter* (1,2 mikron), dikeringkan dalam oven, dan kadar nitrogennya ditentukan dengan metode Kjeldahl.
8. Daya cerna protein *in vitro* dihitung menggunakan rumus:

$$DC \text{ protein } (\%) = \frac{N \text{ total dalam sampel} - N \text{ dalam residu}}{N \text{ total dalam sampel}} \times 100\%$$