

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Waktu dan Lokasi

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari 2025 hingga Januari 2026. Untuk pengolahan tempe fortifikasi tepung tulang ikan nila dilakukan di Laboratorium Ilmu Teknologi Pangan Jurusan Gizi Poltekkes Kemenkes Medan. Uji konsumen dilakukan di Puskemas Lubuk Pakam. Uji kimia dilaksanakan di laboratorium PT. Saraswati Indo Genetech (SIG) Bogor. Dengan cara mengirim sampel produk yang telah dibuat melalui jasa pengiriman.

B. Jenis dan Rancangan Penelitian

1. Jenis penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan desain rancangan acak lengkap (RAL). Penelitian ini dilakukan dengan 3 (tiga) kali perlakuan 2 (dua) kali pengulangan.

2. Jumlah unit percobaan

a. Perlakuan

Penelitian ini merupakan pengembangan produk dengan perlakuan yang didasari oleh penelitian (Ratnaningtyas, Soeprijadi and Ambarwati, 2023), berdasarkan penelitian tersebut didapati perlakuan sebanyak 3 perlakuan, yaitu:

- i. Perlakuan P0 kacang kedelai 100%
- ii. Perlakuan P1 kacang kedelai 100 g + tepung tulang ikan 3 g (30% AKG)
- iii. Perlakuan P2 kacang kedelai 100 g + tepung tulang ikan 5 g (50% AKG)

b. Pengulangan

Jumlah unit percobaan (n) dalam penelitian dihitung dengan rumus:

$$\begin{aligned} & \sum \text{unit percobaan} \\ n &= r \times t \\ &= 2 \times 3 \\ &= 6 \text{ unit percobaan} \end{aligned}$$

Ket : n = Jumlah unit percobaan

r = Jumlah pengulangan (replikasi)

t = Jumlah perlakuan (treatment)

C. Penentuan Bilangan Acak

Penentuan bilangan acak dengan menggunakan microsoft excel dengan menekan tombol '=RAND()' pada sel A1, Kemudian untuk memperoleh delapan bilangan acak, Maka dilakukan dengan mengcopy dan menempatkan isi sel lain sebanyak 6 sel. Tiap angka yang terendah diurutkan berdasarkan nilai terendah hingga nilai tertinggi.

Tabel 3. 1 Penentuan Bilangan Acak

NO	Bilangan acak	Rangking	Unit percobaan
1	0.519	4	P0A
2	0.128	1	P0B
3	0.329	2	P1A
4	0.888	6	P1B
5	0.868	5	P2A
6	0.471	3	P2B

Ranking bilangan tersebut dianggap menjadi nomor urut percobaan dan dikelompokkan berdasarkan jenis perlakuan dan selanjutnya disusun dalam layout percobaan berikut :

P0A, P0B, P1A, P1B, P2A, P2B

Tabel 3. 2 Layout percobaan

1 P0B (0.128)	2 P1A (0.329)	3 P2B (0.471)
4 P0A (0.519)	5 P2A (0.868)	6 P1A (0.888)

Keterangan:

P0A = 100 g kacang kedelai

P0B = 100 g kacang kedelai

P1A = 100 g kacang kedelai + 3 g tepung tulang ikan (30%AKG)

P1B = 100 g kacang kedelai + 3 g tepung tulang ikan (30%AKG)

P2A = 100 g kacang kedelai + 5 g tepung tulang ikan (50%AKG)

P2B = 100 g kacang kedelai + 5 g tepung tulang ikan (50%AKG)

D. Bahan dan Alat

1. Tepung tulang ikan nila

a. Bahan

Bahan dalam pembuatan tepung tulang ikan ini ialah tulang ikan nila yang diperoleh dari PT. Aquafarm Nusantara dan sudah dibersihkan dari sirip, ekor, dan tulang belakang sebanyak 29 kg dan cuka.

b. Alat

Alat dalam pembuatan tepung tulang ikan ini ialah pisau, talenan, baskom, presto merk Kirin dengan kapasitas 16 L, *cabiner dryer*, sendok kayu, saringan, blender, ayakan, mesin penggiling merk Yamasuka Model : FFC-15, ice gel pack, dan box styrofoam.

2. Tempe

a. Bahan

Tabel 3. 3 Bahan pembuatan tempe

No	Bahan	Perlakuan			Total
		P1	P2	P3	
1.	Kacang kedelai	100 g	100 g	100 g	300 g
2.	Tepung tulang ikan	-	3 g	5 g	8 g
3.	Ragi	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,6 g

b. Alat

Alat yang digunakan dalam pembuatan tempe ini adalah panci, baskom, pisau, tampah, plastik tempe, sendok, tampah, timbangan analitik, masker, corong, press plastik, dan sarung tangan.

3. Uji Kimia

a. Bahan

Bahan yang digunakan dalam uji kimia yaitu H_2SO_4 (93-98% bebas N), NaSO_4 , HgO , larutan asam borat H_3BO_3 , alcohol, $\text{NaOH-Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (natrium tiosulfat), HCl 0,02 N, pelarut lemak (hexan), HNO_3 , H_2O , aquademin, dan lanthanum.

b. Alat

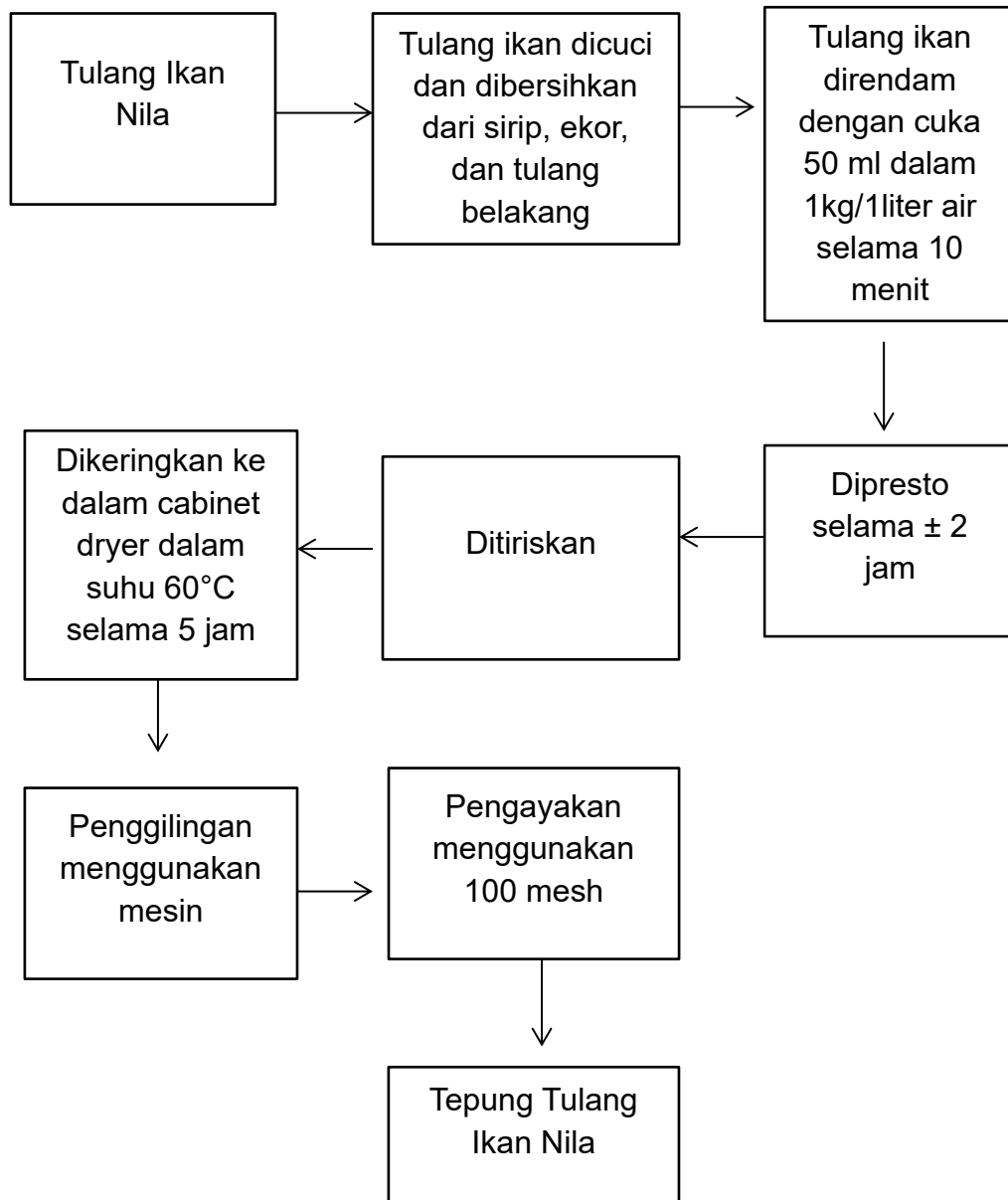
Alat yang digunakan dalam uji kimia yaitu, oven, cawan porselin, desikator, Erlenmeyer, kertas saring, kapas, labu takar, spatula, spectrophotometer.

E. Prosedur

1. Prosedur pembuatan tepung tulang ikan nila

Pada penelitian yang telah dilakukan (Tarigan and Sihotang, 2024), pengolahan tulang ikan nila menjadi tepung tulang ikan nila adalah sebagai berikut:

- 1) Sebanyak 29 kg tulang ikan nila yang telah dibersihkan dari bagian sirip, ekor, dan tulang belakang dicuci menggunakan air mengalir hingga benar-benar bersih.
- 2) Tulang ikan yang telah bersih direndam dalam larutan cuka sebanyak 50 ml per 1 kg atau 1 liter air selama 10 menit.
- 3) Setelah proses perendaman, tulang ikan dipresto selama 2 jam dan menghasilkan tulang sebanyak 19.003 gram.
- 4) Tulang ikan hasil presto kemudian ditiriskan.
- 5) Proses pengeringan dilakukan dengan menggunakan cabinet dryer pada suhu 60°C selama 5 jam, dan menghasilkan tulang kering seberat 10.335 gram.
- 6) Tulang ikan nila yang telah kering kemudian digiling hingga halus dan diayak menggunakan ayakan berukuran 100 mesh.
- 7) Rendemen yang dihasilkan dari proses ini mencapai 35,65%.

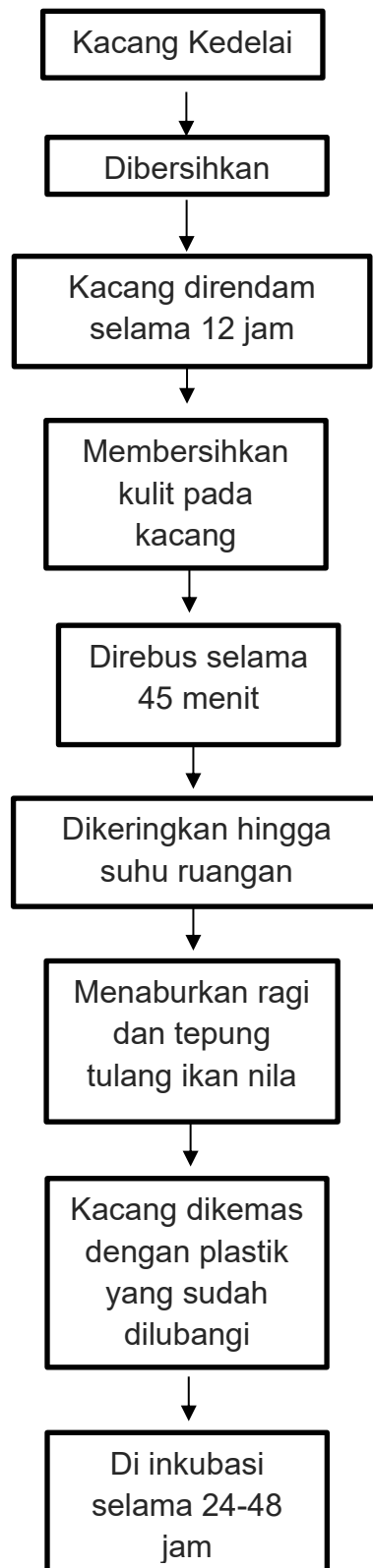


Gambar 3. 1 Diagram alir pengolahan tepung tulang ikan

2. Prosedur pembuatan tempe tepung tulang ikan nila

Prosedur pengolahan tempe yang dilakukan oleh, (Alvina, Hamdani and Jumiono, 2019) lalu dimodifikasi sebagai berikut:

- 1) Kacang kedelai yang memiliki kualitas baik dipilih, kemudian dibersihkan dari kotoran dan benda asing seperti batu.
- 2) Proses pencucian kacang dilakukan menggunakan air yang mengalir.
- 3) Selanjutnya, kacang direndam dalam air hingga seluruh biji terendam selama kurang lebih 12 jam.
- 4) Setelah perendaman, kacang dicuci kembali sambil diaduk-aduk menggunakan tangan hingga kulitnya terkelupas dan bijinya terbelah.
- 5) Kulit yang telah terkelupas dipisahkan dari biji kacang.
- 6) Kacang kedelai direbus selama 45 menit hingga lunak.
- 7) Setelah perebusan, kacang dituangkan ke atas tampah dan dibiarkan hingga kering serta mencapai suhu ruang.
- 8) Tepung tulang ikan ditaburkan secara merata hingga tercampur homogen, lalu dilanjutkan dengan penaburan ragi yang telah disiapkan.
- 9) Plastik yang akan digunakan berukuran 10×20 cm untuk 100 gram kedelai, dengan lubang aerasi berjarak ± 1 cm antar lubang dan diameter sekitar 1mm yang dibuat merata dengan menggunakan jarum steril pada kedua sisi plastik (± 50 lubang).
- 10) Kacang kedelai yang telah diberi ragi dikemas ke dalam plastik.
- 11) Proses inkubasi dilakukan pada suhu ruang selama 24 hingga 48 jam.



Gambar 3. 2 Diagram alir pengolahan tempe tepung tulang ikan nila

F. Jenis Data dan Cara Pengumpulan Data

1. Daya terima tempe

Prosedur pengumpulan data dilakukan melalui uji konsumen yang melibatkan 32 orang ibu hamil. Panelis dipilih secara purposive dengan kriteria: ibu hamil, usia kehamilan trimester 1-3, berusia 18–45 tahun, tidak sedang sakit, tidak merokok, dan bersedia mengikuti uji. Rekrutmen dilakukan dengan menyebarkan formulir berisi biodata dan pertanyaan penyaring kepada warga sekitar lokasi penelitian. Panelis yang memenuhi kriteria akan diundang untuk mengikuti uji di hari yang telah ditentukan.

Sebelum uji organoleptik dilaksanakan, ibu hamil yang berpartisipasi sebagai panelis diberikan lembar persetujuan (informed consent). Uji konsumen dilakukan di ruangan yang telah disiapkan dengan kondisi bersih, terang, dan bebas dari bau. Ibu hamil duduk secara terpisah untuk menghindari saling memengaruhi dalam penilaian. Setiap ibu hamil menerima enam sampel tempe dalam wadah plastik klip sekali pakai yang diberi kode acak. Ibu hamil kemudian diberikan penjelasan mengenai cara penilaian menggunakan lembar uji hedonik skala 1–5 meliputi aspek rasa, tekstur, warna, dan aroma. Setelah mencicipi setiap sampel, panelis diberikan air mineral untuk menetralkan rasa sebelum mencoba sampel berikutnya. Langkah – langkah pengumpulan data kepada panelis adalah sebagai berikut :

- a. Sebelum uji, peneliti mengumpulkan panelis untuk memberikan penjelasan tentang produk yang tersedia (tempe) dan metode untuk menilai yang paling disukai.
- b. Peneliti juga telah menyiapkan persyaratan untuk panelis yang akan menguji organoleptik, yang diberikan handsanitizer dan air mineral.
- c. Tempe tepung tulang ikan nila yang telah dibuat diletakkan di atas enam piring dan masing-masing diberi label dengan kode.
- d. Setelah itu, air minum diberikan untuk menghilangkan rasa yang tidak enak saat mengonsumsi fortifikasi tempe tulang ikan nila.
- e. Panelis menggunakan skala hedonik untuk menilai warna, aroma, tekstur, dan rasa. Skala hedonik yang digunakan adalah: Amat sangat suka (5), Sangat suka (4), Suka (3), Kurang suka (2), Tidak suka (1).

2. Mutu Kimia

Uji mutu kimia yang meliputi analisis kadar air, kadar abu, lemak, protein, karbohidrat, kalsium, dan warna dilakukan di laboratorium PT. Saraswati Indo Genetech (SIG), Bogor.

Cara pengumpulan data:

- a) Mengisi formulir pendaftaran uji kimia dan mengirimkannya ke admin laboratorium PT. Saraswati Indo Genetech (SIG), Bogor.
- b) Mempersiapkan sampel tempe sebanyak 100 gram untuk masing-masing perlakuan.
- c) Tempe dimasukkan ke dalam toples bersih yang telah diberi label, tanggal pembuatan, dan tanggal pengemasan, kemudian ditutup rapat dan disegel dengan selotip agar tidak terbuka saat pengiriman.
- d) Toples yang telah berisi tempe disusun ke dalam kotak styrofoam berisi ice gel guna menjaga suhu dingin selama perjalanan dan memperlambat proses fermentasi agar tempe tetap segar dan tidak mengalami pembusukan.
- e) Setelah semua sampel tertata rapi, kotak styrofoam dipacking, dituliskan alamat lengkap tujuan dan pengirim, serta dicantumkan kontak yang dapat dihubungi. Pengiriman dilakukan menggunakan jasa ekspedisi J&T.
- f) Hasil uji kimia diproses oleh laboratorium dan akan dikirimkan kembali ke peneliti melalui kontak yang telah dicantumkan dalam formulir pendaftaran uji, dengan estimasi penyelesaian ± 1 bulan.

1) Analisis kadar air metode Gravimetri (AOAC, 2005)

Untuk menganalisis kadar air ini, gravimetri digunakan. Kadar air dihitung dengan melihat perbedaan sebelum dan sesudah pengering. Analisis kadar air bergantung pada kandungan air suatu bahan. Pada tahap pertama analisis kadar air, cawan porselin dikeringkan selama satu jam dalam oven pada suhu 105°C. Setelah itu, cangkir dimasukkan ke dalam desikator selama sekitar lima belas menit. Setelah itu, dibiarkan sampai dingin sebelum ditimbang. Sampel seberat 1 gram pertama-tama ditimbang dan kemudian

dimasukkan ke dalam oven dengan suhu 102-105 °C selama lima hingga enam jam. Setelah itu, cangkir dimasukkan kembali ke dalam desikator dan dibiarkan dingin selama tiga puluh menit. Cara menghitung kadar air dengan perhitungan sebagai berikut:

$$Kadar\ Air\ (\%) = \frac{B1 - B2}{Berat\ Sampel} \times 100$$

2) Kadar abu dengan metode Gravimetri (AOAC, 2005)

Kadar abu diukur dengan menggunakan gravimetri. Cawan porselen yang telah dibuang dimasukkan ke dalam oven selama setengah jam dan kemudian didinginkan di desikator selama sepuluh menit. Setelah itu, sampel seberat 2 gram ditimbang dan disimpan dalam tanur selama empat jam pada suhu 550°C setelah pengabuan. Catat hasil dan hitung menggunakan rumus:

- Kadar Abu (db) = bobot abu (wb) x (100- % air)
- Kadar Abu (wb) = $\frac{B-A}{Bobot\ Sampel} \times 100\%$

3) Analisis kadar protein metode Kjeldahl (AOAC, 2025)

Kadar protein diukur dengan teknik Kjeldahl. Tahap destruksi, destilasi, dan titrasi adalah prinsipnya. Pada tahap destruksi, sampel ditimbang 0,03 gram, kemudian dimasukkan ke labu Kjeldahl dan ditambahkan 10 mililiter H₂SO₄ (93–98% bebas N). Kemudian, tambahkan 5 gram campuran Na₂SO₄ dan HgO 40 gram. Di dalam ruang asam, labu dan campuran dipanaskan pada suhu 430°C selama proses destruksi sehingga larutan menjadi bening atau jernih. Setelah itu, labu dididihkan selama 30 menit. Kemudian didinginkan dan dicampur dengan 140 mililiter aquades. Sampel dipindahkan ke alat destilasi setelah proses destruksi selesai. Siapkan erlenmeyer berisi 25 mililiter larutan asam borat H₃BO₃ dan 2-4 tetes indikator (2 bagian metil merah 0,2% dan 1 bagian biru metilen 0,2% dalam alkohol). Tambahkan sampel hasil destruksi yang telah dipindahkan dengan 35 ml larutan NaOH-Na₂S₂O₃ (natrium tiosulfat). Kira-kira 100 mililiter

destilat ditampung dalam erlenmeyer selama proses destilasi. Setelah sampel didestilasi, HCl 0,02 N ditetaskan untuk melakukan titrasi.

Perhitungan kadar protein dapat diperoleh dengan cara:

$$\text{Kadar Protein} = \frac{(\text{Volume HCL (sampel - blanko)}) \times N \text{ HCL} \times 14,007 \times 100}{\text{mg sampel}}$$

4) Analisis lemak metode Soxhlet (AOAC, 2005)

Analisis lemak dilakukan dengan teknik Soxhlet. Satu gram sampel tempe dibungkus dengan kertas saring, dimasukkan ke dalam selongsong lemak, ditutup dengan kapas bebas lemak, dan kemudian dimasukkan ke dalam tabung Soxhlet, disiram dengan pelarut lemak (hexan), dan kemudian diletakkan pada alat destilasi Soxhlet. Setelah itu, labu lemak diletakkan di atas pemanasan listrik di alat destilasi dan direfluks selama lima jam hingga pelarut menjadi jernih. Dalam oven, labu yang mengandung hasil ekstraksi dipanaskan selama 60 menit pada suhu 105°C. Setelah itu, labu lemak didinginkan selama 20–30 menit dalam desikator dan kemudian ditimbang. Catat hasil dan hitung menggunakan rumus :

$$\text{Kadar Lemak} = \frac{\text{Berat Lemak (g)}}{\text{Berat Sampel (g)}} \times 100\%$$

5) Analisis karbohidrat metode by difference (AOAC, 2005)

Untuk menganalisis kadar karbohidrat, metode perbedaan mengurangi semua hasil dari empat komponen: air, abu, lemak, dan protein dan lemak. Akibatnya, kadar karbohidrat tergantung pada faktor pengurangan. Ini disebabkan fakta bahwa karbohidrat sangat memengaruhi zat gizi lainnya.. Kadar karbohidrat dapat dihitung dengan menggunakan rumus :

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

6) Kadar kalsium dengan metode AAS (*Atomic Absorbtion Spectrophotometer*) (AOAC,2005)

Analisis kadar kalsium ini dilakukan dengan menggunakan Spectrophotometer Atom Absorbtion (AAC). Sampel ditimbang dengan margin 5 g lebih atau kurang, lalu dibuka untuk mengetahui kadar kalsiumnya. Pada 10:30, HNO₃:H₂O ditambahkan dan campuran abu didestruksi selama ± 10 menit. Setelah dingin, campuran yang terluca disaring dan diletakkan di labu takar 50 mililiter. Setelah labu takar 50 mililiter ditambahkan aquademin, larutan indukan disebut. Kemudian dilakukan pengenceran dengan mengambil 0,5 mililiter larutan indukan yang telah diencerkan dan dimasukkan ke dalam labu takar sepuluh mililiter dan menambahkan aquademin hingga tanda tera muncul. Mengambil 0,5 mililiter larutan yang telah diencerkan, masukkan ke dalam labu takar sepuluh mililiter dan tambahkan 2 mililiter aquademin dan lantanum hingga tanda tera muncul. Pembacaan sampel dilakukan pada Atomic Absorbtion Spectrophotometer (AAS) dengan panjang gelombang 422,7 nm.

Catat hasil dan hitung menggunakan rumus :

$$\% \text{ Kadar Kalsium} = \frac{\text{Konsentrasi} \times \text{Volume Indukan} \times \text{Pengenceran}}{\text{Berat Sampel} \times 100}$$

G. Pengolahan Data

Data yang telah terkumpul diperiksa kelengkapannya, kemudian dientri menggunakan perangkat lunak komputer. Analisis data dilakukan secara univariat, yang mencakup uji organoleptik dan uji kimia. Pada uji indrawi, penelitian terdiri dari satu kontrol dan dua perlakuan, masing-masing dengan dua kali pengulangan. Nilai pada masing-masing pengulangan perlakuan, seperti T1A dan T1B, dijumlahkan lalu dibagi dua untuk memperoleh rerata T1. Prosedur yang sama dilakukan untuk T2A dan T2B guna memperoleh rerata T2. Selanjutnya, dihitung nilai rerata dan standar deviasi dari masing-masing sampel. Pengolahan data uji kimia dilakukan dengan cara yang serupa, yaitu menghitung rerata dari setiap parameter yang diukur. Seluruh data hasil pengukuran kemudian dianalisis menggunakan perangkat lunak SPSS untuk memperoleh hasil statistik yang lebih lanjut.

H. Analisis Data

Analisis data dilakukan secara univariat meliputi uji daya terima dan uji kimia. Data yang telah terkumpul diperiksa dan dientri menggunakan perangkat lunak SPSS. Uji daya terima dianalisis berdasarkan parameter warna, aroma, tekstur, dan rasa dari satu kontrol dan dua perlakuan, masing-masing dengan dua kali pengulangan. Pada proses pengolahan data, terlebih dahulu dilakukan uji homogenitas yaitu menggunakan uji Kolmogorov-Smirnov. Hasil yang diperoleh adalah bahwa data tidak homogen maka dianalisis menggunakan uji Kruskal-Wallis.