

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penentuan c.m.c. fosfolipid dari emulsi santan kelapa melalui tiga tahap proses yaitu isolasi fosfolipid dari emulsi santan kelapa, identifikasi fosfolipid hasil isolasi dan pengukuran c.m.c. dengan turbidimeter.

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Penelitian ini menggunakan peralatan gelas, sentrifuge, pompa vakum, corong buchner, kertas saring, pengaduk magnet, hot plate, rotary evaporator Buchi R-114, seperangkat alat refluks. Analisis fosfolipid hasil isolasi dilakukan dengan lampu UV, FTIR Excalibur series Bio Rad, GC-MS Shimadzu QP 5000. Pengukuran c.m.c. dilakukan dengan turbidimeter Orbeco-Hellige.

3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah santan kelapa, aseton (teknis), heksana (teknis), isopropanol (teknis), butylated hidroksitoluena (BHT), Na_2SO_4 anhidrat (p.a), kloroform (p.a), metanol (p.a), asam asetat (p.a), aquades, reagen esterifikasi (logam Na, metanol), plat kromatografi.

3.2. Cara Kerja

3.2.1. Isolasi Zat Pengemulsi pada Santan Kelapa

Santan kelapa dari 4 buah kelapa disentrifuge selama 10 menit untuk memisahkan krim dengan skim. Sebanyak 100 g krim yang diperoleh digunakan untuk isolasi zat pengemulsi dengan ditambah 200 mL aseton dingin lalu dihomogenasi dengan pengaduk magnet selama 15 menit. Homogenat yang diperoleh disaring dengan pompa vakum menggunakan corong buchner. Residu yang diperoleh ditambah dengan 100 mL campuran isopropanol-heksana (2 : 3) dan 0,1% BHT, kemudian diaduk di atas hot plate pada suhu ± 40 °C selama 15 menit. Setelah didinginkan kemudian disaring dengan pompa vakum. Residu pada kertas saring disiram dengan 30 mL campuran isopropanol-heksana (2 : 3). Filtrat yang diperoleh dicuci dengan 50 mL Na_2SO_4 jenuh dan dipisahkan dengan ekstraksi kemudian dicuci lagi dengan Na_2SO_4 anhidrat dan disaring. Pelarutnya diuapkan dengan rotary evaporator^[19].

3.2.2. Identifikasi Fosfolipid Hasil Isolasi

Isolat yang diperoleh dianalisa awal dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) silika. Noda yang diperoleh diidentifikasi dengan lampu UV. Kemudian dianalisa lebih lanjut dengan FTIR untuk mengetahui gugus fungsi-gugus fungsinya^[25,2].

Untuk mengidentifikasi asam lemak penyusun fosfolipid dilakukan analisa dengan GC-MS. Sebelumnya dilakukan esterifikasi terlebih dahulu yaitu 100 mL sampel ditambah dengan 0,5 M H_2SO_4 kemudian direfluks sampai mendidih dan ditambah 15 mL reagen esterifikasi (Na dalam metanol) dan dididihkan kembali selama ± 15 menit. Setelah didinginkan hasil yang diperoleh dimasukkan ke dalam corong ekstraksi lalu ditambah dengan 50 mL aquades dan 25 mL heksana dan digojog secara perlahan-lahan setelah itu dibiarkan beberapa saat sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan heksana (atas) dipisahkan kemudian dikeringkan dengan Na_2SO_4 anhidrat. Selanjutnya pelarut diuapkan dengan rotary evaporator. Hasil yang diperoleh kemudian dianalisa dengan GC-MS.

Kondisi operasi alat GC-MS yang digunakan adalah sebagai berikut:

Jenis pengionan	: EI (elektron impact) 70 kv
Suhu detektor	: 280 °C, gain: 1,5 Kva
Injeksi	: Split (40:1). 1 μ l; inlet 270 °c
Jenis kolom	: DB-1 30 m x 0,25 mm, 0,33 μ m
Gas pembawa	: Helium 15 Kpa, constan flow

3.2.3. Pengukuran c.m.c. dengan Turbidimeter

Pengukuran c.m.c. dilakukan dengan mengukur tingkat kekeruhan pada variasi konsentrasi fosfolipid^[14]. Data yang diperoleh diplotkan dalam suatu grafik antara tingkat kekeruhan terhadap konsentrasi fosfolipid. Perubahan

gradien yang drastis antara tingkat kekeruhan dan konsentrasi fosfolipid pada grafik menunjukkan harga c.m.c. yang ditentukan.

