

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Kimia Fisik FMIPA Universitas Diponegoro, Semarang. Garis besar dari penelitian ini adalah penentuan titik isoelektrik tahu tanpa fosfolipid dengan variasi pH dilanjutkan dengan penentuan pengaruh fosfolipid pada kadar protein tahu dengan keberadaan fosfolipid di dalam sari kedelai dengan cara variasi konsentrasi fosfolipid, dan penentuan pengaruh fosfolipid terhadap titik isoelektrik tahu dengan cara variasi pH.

#### 3.1 Alat dan Bahan

##### 3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- Peralatan gelas standar
- Pemanas listrik
- Termometer
- Pengaduk magnet
- Corong *buchner*
- Kertas saring
- Kain saring
- Evaporator putar
- FTIR-Hewlett Packard

- pH meter
- Pompa vakum
- Oven listrik
- Neraca analitis elektrik (Mettler AT200)
- Spektrofotometer UV-vis.

### 3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain:

- Santan kelapa
- Aseton (teknis)
- Normal-heksana (teknis)
- Isopropanol (teknis)
- Butil hidroksi toluena (BHT) (teknis)
- Natrium sulfat ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) anhidrat (pa)
- Kedelai
- Akuades
- Asam asetat glasial 98%
- Tembaga sulfat ( $\text{CuSO}_4$ ) (pa)
- Natrium kalium tartrat (pa)
- Natrium hidroksida ( $\text{NaOH}$ ) (pa)
- Natrium karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) (pa)
- Serum albumin sapi (BSA) (pa)
- Reagen *folin ciocalteay* (pa).

## **3.2 Variabel Penelitian**

### **3.2.1 Variabel yang diukur**

- Berat kering tahu
- Kadar protein supernatan tahu

### **3.2.2 Variabel Bebas**

- pH penggumpalan tahu
- Konsentrasi fosfolipid dalam tahu
- pH penggumpalan tahu-fosfolipid

### **3.2.3 Variabel yang dikonstantakan**

- Jenis kedelai
- Suhu ekstraksi kedelai
- Konsentrasi sari kedelai
- Suhu dan waktu pemanasan sari kedelai
- Jenis bahan penggumpal
- Waktu dan suhu penggumpalan

## **3.3 Cara Kerja**

### **3.3.1 Isolasi Fosfolipid dari Santan Kelapa dan Identifikasi Fosfolipid Hasil**

#### **Isolasi**

Isolasi fosfolipid dari krim santan kelapa menggunakan metode ekstraksi pelarut.

Mula-mula sampel ditambah aseton dingin untuk mengendapkan fosfolipid,

kemudian ditambahkan 0,1 % BHT dan dilanjutkan ekstraksi fosfolipid menggunakan campuran hexana : isopropanol dengan perbandingan 3 : 2. Isolat yang diperoleh dicuci dengan  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  10. % dan dievaporasi untuk menghilangkan pelarutnya. Kemudian hasil isolasi diuji dengan spektrofotometri FTIR di UGM Yogyakarta untuk mengetahui gugus-gugus fungsi yang ada. Dari diagram FTIR dapat diketahui puncak-puncak yang bersesuaian dengan gugus-gugus fungsi pembentuk fosfolipid yang membuktikan keberadaan fosfolipid.

### **3.3.2 Pembuatan Tahu**

#### **3.3.2.1 Pembuatan Sari Kedelai**

Sebanyak 300 gram kedelai kering dan bersih direndam dalam air selama 12 jam. Kedelai rendaman dicuci dengan air sampai bersih dan ditambah 3,00 L aquades panas kemudian diblender selama 3 menit. Bubur kedelai yang diperoleh ditambah aquades panas sebanyak 3,00 L dan dididihkan selama 10 menit pada temperatur  $100^\circ\text{C}$  sambil terus diaduk, kemudian diangkat dan disaring dengan kain saring dalam keadaan panas.

#### **3.3.2.2 Penentuan Titik Isoelektrik Tahu Tanpa Fosfolipid**

Penentuan titik isoelektrik tahu dilakukan pada variasi pH sari kedelai mulai 4,1; 4,4; 4,7; 5,0; 5,3 dan 5,6 dengan menambahkan bahan penggumpal asam asetat 4,9 % secara perlahan-lahan. Asam asetat 4,9 % dibuat dari asam asetat glasial 98 % dengan faktor pengenceran 20 kali. Setelah itu diambil supernatan dari masing-masing larutan untuk dianalisa kadar proteinnya dengan metode Lowry. Gumpalan

tahu hasil penyaringan dioven sampai berat keringnya tetap. Dari data absorbansi ditentukan kadar protein tahu tanpa fosfolipid. Titik isoelektrik diperoleh saat kadar protein tahu paling besar.

### **3.3.2.3 Pengaruh Fosfolipid terhadap Kadar Protein Tahu**

Penentuan pengaruh konsentrasi fosfolipid terhadap berat dan kadar protein tahu dilakukan dengan mengvariasi volume fosfolipid yang ditambahkan dalam 50 mL sari kedelai, yaitu 0,0; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0 dan 2,5 mL kemudian ditambahkan asam asetat 4,9 % sampai pH isoelektrik tahu. Setelah itu diambil supernatan untuk analisa protein, larutan disaring kemudian dioven sampai berat keringnya tetap. Dari data absorbansi yang diperoleh ditentukan kadar proteinnya dan diamati pengaruh peningkatan konsentrasi fosfolipid terhadap kadar protein tahu.

### **3.3.2.4 Pengaruh Fosfolipid terhadap Titik Isoelektrik Tahu**

Pada perbandingan sari kedelai–fosfolipid yang tetap yaitu 25:1(v/v) ditambahkan asam asetat 4,9% sampai variasi pH 4,0; 4,1; 4,2; 4,3; 4,4 dan 4,5. Setelah didiamkan selama satu jam, diambil supernatannya untuk analisa protein, dilakukan penyaringan kemudian dioven sampai berat keringnya tetap. Dari data absorbansi yang diperoleh ditentukan kadar proteinnya dan diamati pengaruh fosfolipid terhadap titik isoelektrik tahu.

### 3.3.3 Penentuan Kadar Protein dengan Metode Lowry

#### 3.3.3.1 Penyiapan Kurva Standar Larutan Protein

Mula-mula dibuat larutan standar BSA induk 1000  $\mu\text{g/mL}$  dengan cara menimbang BSA sebanyak 0,1 g dan melarutkannya dalam 100 mL akuades. Selanjutnya dibuat larutan standart dengan mengencerkan larutan induk sehingga diperoleh larutan standar BSA berkadar 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 dan 80  $\mu\text{g/mL}$ .

Seri larutan standar BSA 2 mL ditambah 5 mL larutan Lowry C, digojog, dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambah reagen *folin ciocalteay* sebanyak 1 mL, dibiarkan selama 0,5 jam, setelah itu diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-vis. Dari data absorbansi yang diperoleh dibuat kurva standar BSA (konsentrasi BSA versus absorbansi).

#### 3.3.3.2 Analisa Kadar Protein Sampel

Pengambilan supernatan dilakukan setelah gumpalan tahu dibiarkan mengendap selama satu jam. Setelah pengenceran sampel dengan akuades, diambil 2 mL sampel ditambah 5 mL larutan Lowry C, digojog, dan dibiarkan selama 10 menit, kemudian ditambah reagen *folin ciocalteay* sebanyak 1 mL, dibiarkan selama 0,5 jam, setelah itu diukur absorbansinya dan data absorbansi diplotkan pada kurva standar BSA untuk menentukan kadar protein sampel.