

## BAB III

### METODE PENELITIAN

Untuk menelaah fosfolipid yang terkandung dalam santan kelapa, maka fosfolipid yang terkandung dalam santan kelapa tersebut perlu diisolasi melalui beberapa tahap. Tahap pertama yaitu ekstraksi fosfolipid yang terkandung dalam santan kelapa. Tahap ekstraksi ini diawali dengan *degumming* santan dengan cara santan ditambah dengan air dan asam sitrat. Proses selanjutnya setelah *degumming* adalah ekstraksi dengan menggunakan pelarut kloroform. Tahap kedua adalah pemisahan ekstrak fosfolipid santan kelapa. Pada tahap ini, digunakan kromatografi kolom vakum dengan kepolaran eluen yang meningkat. Uji terhadap fraksi – fraksi hasil pemisahan dilakukan dengan menggunakan KLT.

Identifikasi gugus – gugus fungsi yang terdapat dalam ekstrak maupun dari hasil pemisahan dilakukan dengan menggunakan FTIR. Asam – asam lemak yang terkandung dalam fosfolipid hasil isolasi diidentifikasi dengan menggunakan GC – MS.

#### 3. 1 Bahan dan Alat

##### 3. 1. 1. Bahan

Sampel yang digunakan adalah santan kelapa yang diperoleh dari pemerasan terhadap daging buah kelapa segar, asam sitrat 3%, kloroform dan etil asetat teknis, n-heksana, metanol, kloroform serta etil asetat p.a., akuades.

Sedangkan untuk identifikasi pada plat KLT sebagai penampak noda digunakan larutan ninhidrin.

### 3. 1. 2. Alat

Peralatan yang digunakan adalah peralatan gelas standar seperti gelas beaker, gelas ukur, labu takar, corong gelas, corong pisah dan pipet selain itu juga dilengkapi peralatan lainnya antara lain mixer Miyako, penguap putar Buchy R-114, sentrifuse, pompa vakum, pemanas listrik, oven dan pendingin.

Gugus-gugus fungsi yang terkandung dalam fosfolipid dianalisa dengan menggunakan FTIR Hawlett Packard, sedangkan asam-asam lemaknya dianalisa dengan GC – MS Shimadzu QP 5000 di laboratorium Kimia Organik UGM.

## 3. 2 Cara Kerja

### 3. 2. 1. Ekstraksi Zat Pengemulsi Fosfolipid dari Santan Kelapa

Ekstraksi zat pengemulsi yang terkandung dalam santan kelapa dilakukan dengan cara menambahkan air dan asam (*degumming*) terhadap santan kelapa kemudian dilanjutkan dengan ekstraksi menggunakan pelarut kloroform. Sebanyak 850 mL santan kelapa ditambah dengan asam sitrat 3 % dengan perbandingan 85 : 15 (dalam mL). Campuran ini dipanaskan sampai suhu 60 °C, kemudian diaduk dengan kecepatan putar tinggi menggunakan mixer selama 30 detik. Campuran didinginkan sampai suhu 25 °C dan diberi akuades sebanyak 2 % berat dan didiamkan selama 1 jam. Selanjutnya campuran dipanaskan sampai suhu 60 °C dan diaduk dengan kecepatan putar rendah selama 10 menit. Campuran dipisahkan dengan sentrifuse dan diambil fasa tengahnya berupa

konsentrat fosfolipid terhidrat. Konsentrat kemudian diekstraksi dengan kloroform, kemudian fasa kloroformnya diuapkan dengan menggunakan penguap vakum putar. Ekstrak diidentifikasi gugus-gugus fungsinya dengan menggunakan FTIR (Copeland, 2001; Nollet, 1996).

### **3. 2. 2. Pemisahan**

Pada prosedur ini, dilakukan fraksinasi terhadap hasil ekstraksi dengan menggunakan kromatografi kolom vakum dengan kepolaran eluen yang meningkat. Terhadap fraksi ini dilakukan KLT dengan berbagai macam pelarut yaitu n – heksana, kloroform, etil asetat serta metanol. Pelarut atau eluen yang digunakan dalam kromatografi kolom didasarkan pada kemampuan pelarut untuk memisahkan noda yang optimal berdasarkan pengujian menggunakan KLT. Identifikasi noda dilakukan dengan menggunakan larutan ninhidrin diikuti dengan pemanasan pada suhu 100 °C.

### **3. 2. 3. Penentuan gugus fungsi dan asam lemak fosfolipid hasil pemisahan**

Fosfolipid yang diperoleh diidentifikasi gugus fungsinya dengan menggunakan spektrometer FTIR sedangkan untuk penentuan asam-asam lemaknya digunakan GC – MS kolom CP Cil – 5 CB, panjang 30 meter pada suhu 80 °C – 280 °C dengan kenaikan suhu 5 °C per menit, dengan tekanan gas pembawa helium 10 kPa dan detektor pada suhu 300 °C serta injektor split 1 : 40 pada 300 °C.