# **BAB III**

# **METODE PENELITIAN**

* 1. **Rancangan Penelitian**
		1. **Variabel Penelitian**

Variabel penelitian ini terdiri dari variable bebas dan variable terikat. Variabel bebas yaitu kuning dan putih telur rebus dari ayam kampung, bebek dan puyuh. Variabel terikat adalah kadar protein.

* + 1. **Parameter Penelitian**

Penelitian ini adalah penetapan kadar protein menggunakan metode kjeldahl dan spektrofotometri visible. Metode kjeldahl dengan parameter volume titrasi, sedangkan spektrofotometri visible dengan parameter absorbansi.

* 1. **Jadwal dan Lokasi Penelitian**
		1. **Jadwal Penelitian**

Penelitian ini dilakukan pada bulan januari sampai mei tahun 2024.

* + 1. **Lokasi Penelitian**

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Terpadu Universitas Muslim Nusantara Al-Washliyah.

* 1. **Bahan dan Peralatan**
		1. **Bahan Penelitian**

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah *Bovine Serum Albumin* (BSA), CuSO4, kalium natrium tartrat, KI, NaOH, H2SO4 pekat, natrium karbonat, Larutan asam borat, HCl pekat, indikator *metilen red* dan *bromatimol blue*, kalium biftalat, indikator fenolftalein, katalis campuran (SeO3, K2SO4 dan CuSO4) dan aquadest.

* + 1. **Peralatan Penelitian**

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Spektrofotometer UV-Vis Evolution 201 (*Thermo Scientific*), cuvet, timbangan analitik (*Mettler Toledo*), sentrifuse (*Fischer*), blender (Philips), satu s*et al*at destruksi, satu s*et al*at destilasi, satu s*et al*at titrasi, dan alat-alat gelas seperti: Erlenmeyer (Pyrex), beaker gelas (Pyrex), pipet ukur (Pyrex), labu ukur (Isolab dan Pyrex), gelas ukur (Pyrex) dan corong.

* 1. **Pembuatan Larutan Pereaksi**
		1. **Katalis Campuran (K2SO4, CuSO4 dan SeO3)**

Sebanyak 17,37 g K2SO4, 0,27 g CuSO4 dan 0,36 g SeO3 dicampurkan hingga homogen (Nasution *et al*., 2020).

* + 1. **Larutan HCl 0,01 N**

Pipet 0,8291 ml HCl p encerkan dengan aquadest hingga 1000 ml (Depkes RI, 1979).

* + 1. **Larutan** **H3BO3 2 %**

Timbang 2 g H3BO3 larutkan dalam aquadest secukupnya hingga 100 ml etanol (Depkes RI, 1979).

* + 1. **Larutan Kalium Biftalat 0,1 N**

Timbang 0,102 g Kalium Biftalat larutkan dalam aquadest hingga 50 ml (Depkes RI, 1979).

* + 1. **Larutan NaOH 30 %**

Timbang 30 g NaOH larutkan dalam aquadest bebas CO2 secukupnya hingga 100 ml (Depkes RI, 1979).

* + 1. **Larutan NaOH 0,1 N**

Timbang 4 g NaOH larutkan dalam aquadest bebas CO2 secukupnya hingga 1000 ml (Depkes RI, 1979).

* + 1. **Larutan NaOH 0,2 N**

Timbang 8 g NaOH larutkan dalam aquadest bebas CO2 secukupnya hingga 1000 ml (Depkes RI, 1979).

* + 1. **Larutan Indikator** ***metilen red* 0,05 %**

Larutkan 25 mg *metilen red*dalam etanol hingga 50 ml (Depkes RI, 1979).

* + 1. **Larutan Indikator *bromatimol blue* 0,1 %**

Larutkan 10 mg *bromotimol blue* dalam etanol hingga 10 ml (Depkes RI, 1979).

* + 1. **Larutan Indikator Fenolftalein**

Larutkan 200 mg fenolftaleindalam etanol 90% sebanyak 60 ml cukupkan dengan aquadest 100 ml (Depkes RI, 1979).

* 1. **Persiapan Bahan**
		1. **Pengumpulan Sampel**

Cara pengambilan sampel dilakukan secara purposive sampling, tanpa membandingkan dengan sampel yang sama di daerah lain. Sampel yang digunakan dalam penelitian ini adalah telur ayam kampung, bebek dan puyuh yang diperoleh dari daerah Kecamatan Tanjung Morawa, Kabupaten Deli Serdang, Sumatera Utara.

* + 1. **Pengolahan Sampel**

Telur direbus selama 10 menit untuk ayam kampung, 13 menit untuk bebek dan 4 menit untuk puyuh dimulai dari air mendidih. Setelah dingin dipisahkan antara daging dan cangkang telur, kemudian haluskan secara terpisah kuning dan putih telur ayam kampung, bebek dan puyuh.

* 1. **Prosedur Penetapan Kadar Protein Menggunakan Metode Kjeldahl**
		1. **Tahap Destruksi**

Sampel diambil kemudian dihaluskan secara seksama, lalu ditimbang sebanyak 1 gram dimasukkan ke dalam labu Kjeldahl, untuk mempermudah destruksi sampel ditambahkan 2 gram katalis campuran dan 25 ml H2SO4 pekat sambil diaduk perlahan hingga larutan homogen. Kemudian larutan tersebut dipanaskan hingga mendidih dan terjadi perubahan warna menjadi hijau jernih (Nasution *et al*., 2020).

* + 1. **Tahap Destilasi**

Larutan hasil destruksi yang telah dingin diencerkan dengan 100 ml aquades di dalam labu ukur 100 ml dan dipipet 5 ml ke labu destilasi. Untuk mempermudah pemisahan amoniak dari larutan sampel maka ditambahkan NaOH 30% hingga larutan basa. Ditambahkan beberapa batu didih. Larutan didestilasi dan destilat ditampung dengan erlenmeyer yang berisi 10 ml larutan asam borat 2% dan 3:2 tetes indikator *metilen red* dan *bromotimol blue*. Destilasi selama kurang lebih 5-10 menit (Nasution *et al*., 2020).

* + 1. **Tahap Titrasi**
1. Pembakuan
* Pembakuan NaOH dengan Kalium Biftalat

Larutan kalium biftalat 0,01 N sebanyak 10 ml dalam erlenmeyer ditambah 4 tetes indikator fenolftalein kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,01 N sampai berwarna merah muda (Depkes RI, 1979).

* Pembakuan HCl dengan NaOH

Larutan HCl 0,01 N sebanyak 10 ml dalam erlenmeyer ditambah 4 tetes indikator fenolftalein kemudian dititrasi dengan larutan NaOH 0,01 N sampai berwarna merah muda (Depkes RI, 1979).

1. Titrasi Destilat Dengan HCl 0,01 N standar

Hasil destilat dititrasi dengan larutan baku asam klorida 0,01 N, titik titrasi tercapai jika terjadinya perubahan warna menjadi jingga (Nasution *et al*., 2020).

1. Penetapan Blanko

Blanko dibuat seperti perlakuan pada sampel (Nasution *et al*., 2020).

* + 1. **Perhitungan Kadar Protein Metode Kjeldahl**

Dilakukan untuk penetapan kadar protein pada sampel telur rebus yaitu kuning ayam kampung, kuning bebek, kuning puyuh, putih ayam kampung, putih bebek dan putih puyuh yang kemudian diberi kode KAk, KBk, KPy, PAk, PBk dan PPy. Hasil titrasi dilanjutkan perhitungan kadar protein dengan rumus berikut:

$$\% Protein= \frac{\left(Vol Sampel-Vol Blanko\right) x N HCl x 14,007 x FP x FK }{Berat Sampel mg} x 100\%$$

Keterangan:

FP : Faktor Pengenceran (100 ml/ 5ml = 20)

FK : Faktor Konversi

Gunakan faktor konversi pada Tabel 3.1 untuk menentukan kadar protein dari sampel. Bila sampel yang dianalisis tidak tercakup dalam tabel, gunakan faktor konversi 6.25.

**Tabel 3.1 Faktor konversi persen nitrogen menjadi protein** (Yenrina, 2015)

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Jenis Pangan** | **X****(%N dalam protein)** | **Faktor Konversi F (100/X)** |
| Campuran | 16.00 | 6.25 |
| Daging | 16.00 | 6.25 |
| Maizena | 16.00 | 6.25 |
| Roti, gandum, macaroni, bakmi | 16.00 | 6.25 |
| Susu dan produk susu | 15.66 | 6.38 |
| Tepung | 17.54 | 5.70 |
| Telur | 14.97 | 6.68 |
| Gelatin | 18.02 | 5.55 |
| Kedelai | 17.51 | 5.71 |
| Beras | 16.81 | 5.95 |
| Kacang tanah | 18.32 | 5.46 |

* 1. **Prosedur Penetapan Kadar Protein Menggunakan Metode Spektrofotometri Visible**
		1. **Pembuatan Larutan Pereaksi Biuret**

Larutkan 3 gram CuSO4.5H2O dan 9 gram Na K Tartarat dalam 500 ml larutan NaOH 0.2 N. Tambahkan 5 gram KI kemudian encerkan sampai 1000 ml dengan menggunakan larutan NaOH 0.2 N (Yenrina, 2015).

* + 1. **Penentuan Panjang Gelombang Maksimum**

Dilakukan mengunakan larutan BSA dengan konsentrasi 2000 ppm (Yenrina, 2015).

* + 1. **Pembuatan Kurva Baku Standar**

Dibuat larutan Bovine Serum Albumin dalam aquadest dengan konsentrasi 20.000 ppm. Masukkan ke dalam labu tentukur 0 (blanko), 0.5, 0.75, 1, 1.25, dan 1.5 ml larutan standar. Larutkan dengan aquadest kurang dari 4 ml. Tambahkan 6 ml pereaksi Biuret ke dalam masing-masing ke labu tentukur. Tambahkan aquadest sampai 10 ml. Kemudian pindahkan ke tabung reaksi. Vortek (pengaduk khusus) masing-masing tabung reaksi. Simpan tabung reaksi pada suhu 37°C selama 10 menit atau pada suhu kamar (30°C) selama 30 menit sampai terbentuk warna ungu sempurna. Ukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Yenrina, 2015).

* + 1. **Penentuan Kadar Protein Dalam Sampel**

Sampel ditimbang 10 g kemudian dihancurkan dengan menggunakan waring blender dengan penambahan aquadest secukupnya. Hancuran yang diperoleh kemudian disentrifuse. Hasil didekantansi, kemudian diambil supernatan masukkan ke labu tentukur. Tambahkan aquadest sampai 50 ml. Untuk kuning telur hasil di saring menggunakan kertas saring. Pipet dengan tepat 1.0 ml supernatan dimasukkan ke dalam labu tentukur. Larutkan dengan aquadest kurang dari 4 ml. Tambahkan 6 ml pereaksi Biuret ke dalam masing-masing labu tentukur. Tambahkan aquadest sampai 10 ml. Kemudian pindahkan ke tabung reaksi. Vortek (pengaduk khusus) masing-masing tabung reaksi. Simpan tabung reaksi pada suhu 37°C selama 10 menit atau pada suhu kamar (30°C) selama 30 menit sampai terbentuk warna ungu sempurna. Ukur absorbansinya pada panjang gelombang maksimum (Yenrina, 2015).

* + 1. **Perhitungan Kadar Protein Metode Spektrofotometri Visible**

Dilakukan untuk penetapan kadar protein pada sampel telur rebus yaitu kuning ayam kampung, kuning bebek, kuning puyuh, putih ayam kampung, putih bebek dan putih puyuh yang kemudian diberi kode KAk, KBk, KPy, PAk, PBk dan PPy. Serapan sampel disubstitusikan pada persamaan regresi yang diperoleh dari kurva kalibrasi sehingga diperoleh konsentrasi protein. Kemudian dilanjutkan perhitungan kadar yang menggunakan rumus:

$$\% Protein= \frac{Konsentrasi ({mg}/{ml}) x Vol labu x FP}{Berat Sampel (mg)} x 100\%$$

Keterangan:

FP : Faktor Pengenceran (10 ml/ 1 ml = 10)

* 1. **Analisa Data Secara Statistik**

Untuk menghitung Standar Deviasi (SD) digunakan rumus sebagai berikut:

$$SD=\sqrt{\frac{\sum\_{}^{}(xi-\leftharpoonaccent{x})^{2}}{n-1}}$$

Keterangan:

SD = Standar Deviasi

$\overbar{x}$ = Kandungan rata-rata sampel

X = Kandungan sampel

n = Jumlah perlakuan

Kandungan dapat dihitung dengan persamaan garis regresi dan untuk menentukan data diterima atau ditolak digunakan rumus:

$$t\_{hitung}(n)= \left|\frac{x- \overbar{x}}{SD/\sqrt{n}}\right|$$

Dengan dasar penolakan apabila thitung ≥ ttabel dan untuk mencari kandungan sebenarnya dengan taraf kepercayaan 99% (α = 0,01) dengan derajat kebebasan dk = n-1 digunakan rumus:

$$μ=\overbar{X}\pm \left(t\_{tabel} x \frac{SD}{\sqrt{n}}\right)$$

* 1. **Metode Pengolahan Data**

Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk deskriptif serta data hasilnya disajikan dalam bentuk tabel, kemudian data di uji menggunakan ANOVA.