

The Effect of Soaking Time and Grinding Temperature Variations on Soy Milk Protein Content

Pengaruh Variasi Lama Perendaman dan Suhu Penggilingan terhadap Kadar Protein Susu Kedelai

Nadiya Syafiah Mufida ^a, Dedi Hanwar ^{a*}

^a Program Studi Farmasi, Fakultas Farmasi, Universitas Muhammadiyah Surakarta, Jawa Tengah, Indonesia.

*Corresponding Authors: dedi.hanwar@ums.ac.id

Abstract

Soy milk, an extract from soybeans, significantly contributes to human nutritional needs, particularly as a source of plant-based protein. The protein quality in soy milk is highly influenced by processing parameters, including soybean soaking duration and grinding temperature. This study aimed to determine the optimum combination of soaking time and grinding temperature to maximize soy milk's protein content. The effects of these two factors were evaluated using Response Surface Methodology (RSM) with a Central Composite Design (CCD). Experiments were conducted for 13 experimental combinations, replicated three times. Protein content was determined by the Lowry method, while pH measurements were also performed to monitor quality. Grinding temperatures ranged from 40°C to 80°C and soaking times varied from 6 to 12 hours, using Grobogan soybean variety as the main raw material. Other parameters such as soybean quantity, water volume, soaking temperature, and boiling and grinding times were set as controlled variables. Optimization results using Design-Expert software indicated that the optimum formulation was achieved at a grinding temperature of 61°C and a soaking time of 9 hours 46 minutes. Under these optimum conditions, the resulting soy milk exhibited a protein content of 3.1% (w/w) and a pH of 7.02, both meeting established soy milk quality standards.

Keywords: Soy milk, grinding temperature, soaking time, protein, Lowry.

Abstrak

Susu kedelai adalah minuman hasil ekstraksi kacang kedelai yang berkontribusi dalam memenuhi kebutuhan gizi manusia, terutama sebagai sumber protein nabati. Kualitas protein dalam susu kedelai sangat dipengaruhi oleh parameter proses pengolahannya, termasuk proses perendaman kacang kedelai dan penggilingan. Penelitian ini bertujuan untuk menentukan kombinasi optimum lama perendaman dan suhu penggilingan guna memaksimalkan kadar protein dalam susu kedelai. Evaluasi pengaruh kedua faktor tersebut dilakukan menggunakan pendekatan Response Surface Methodology (RSM) dengan desain eksperimen Central Composite Design (CCD). Eksperimen dilakukan pada 13 kombinasi percobaan yang direplikasi sebanyak 3 kali. Kadar protein ditetapkan melalui metode Lowry, sedangkan pengukuran pH juga dilakukan untuk memantau kualitas. Pengujian dilakukan dengan variasi suhu penggilingan 40°C hingga 80°C dan lama perendaman 6 hingga 12 jam, menggunakan jenis kedelai grobogan sebagai bahan baku utama. Parameter lain seperti jumlah kedelai, volume air, suhu perendaman serta waktu perebusan dan penggilingan ditetapkan sebagai variabel terkontrol. Hasil optimasi menggunakan software Design-Expert menunjukkan bahwa formulasi optimum dicapai pada suhu penggilingan 61°C dan lama perendaman 9 jam 46 menit. Pada kondisi optimum ini, kadar protein susu kedelai yang dihasilkan adalah 3.1% (w/w) dan pH 7,02, keduanya memenuhi syarat mutu susu kedelai yang ditetapkan.

Kata Kunci: Susu kedelai, suhu penggilingan, lama perendaman, protein, Lowry.



Copyright © 2020 The author(s). You are free to : **Share** (copy and redistribute the material in any medium or format) and **Adapt** (remix, transform, and build upon the material) under the following terms: **Attribution** — You must give appropriate credit, provide a link to the license, and indicate if changes were made. You may do so in any reasonable manner, but not in any way that suggests the licensor endorses you or your use; **NonCommercial** — You may not use the material for commercial purposes; **ShareAlike** — If you remix, transform, or build upon the material, you must distribute your contributions under the same license as the original. Content from this work may be used under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International \(CC BY-NC-SA 4.0\) License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Article History:

Received: 01/06/2025,
Revised: 17/06/2025,
Accepted: 16/07/2025,
Available Online : 20/07/2025.

QR access this Article



<https://doi.org/10.36490/journal-jps.com.v8i3.949>

Pendahuluan

Susu merupakan salah satu komponen penting yang berkontribusi untuk memenuhi kebutuhan gizi manusia. Kandungan nutrisi dalam susu menjadikan susu sebagai sumber gizi baik untuk kesehatan, pertumbuhan, dan kecerdasan terutama bagi anak-anak yang sedang dalam masa pertumbuhan [1]. Produk susu nabati seperti susu kedelai dapat menjadi pilihan untuk memenuhi kebutuhan gizi. Susu kedelai merupakan minuman dari olahan ekstraksi kacang kedelai [2]. Kacang kedelai mengandung protein berkualitas tinggi yaitu berkisar 40-50% [3].

Protein merupakan salah satu sumber energi bagi tubuh serta memiliki fungsi sebagai zat pembangun dan pengatur. Protein terdiri dari asam amino, unit struktural protein, dan peptida sederhana yang terbentuk dari beberapa asam amino yang dihubungkan melalui ikatan peptida [4]. Protein kedelai mempunyai kandungan asam amino esensial yang paling tinggi dibanding dengan kacang-kacangan lainnya. Biji kedelai juga mengandung karbohidrat, vitamin B, vitamin D, dan kalsium yang berguna bagi pertumbuhan tulang serta mengandung lesitin yang membantu perkembangan sel otak [5]. Kandungan protein dalam susu kedelai dapat bervariasi tergantung berbagai faktor seperti jenis kedelai yang digunakan dan cara pengolahannya [6].

Penurunan kadar protein susu kedelai dipengaruhi oleh cara pengolahannya [7]. Pengolahan susu kedelai melibatkan proses perendaman dan penggilingan. Proses perendaman dapat menyebabkan masuknya air ke dalam dinding sel biji kedelai sehingga terjadi pembengkakan sel-sel kotiledon kedelai yang akhirnya akan pecah dan cadangan protein yang disimpan di pusat vakuola pada sel parenkim akan banyak keluar. Penelitian terdahulu membuktikan bahwa semakin lama perendaman biji kedelai maka kadar protein yang dihasilkan semakin menurun [8]. Kadar protein tertinggi diperoleh pada lama perendaman 9 jam. Peneliti lain membuktikan bahwa suhu air pada proses penggilingan juga mempengaruhi kadar protein. Kadar protein tertinggi diperoleh pada perlakuan menggunakan suhu air 60°C [9].

Berdasarkan studi penelitian terdahulu, terlihat bahwa penelitian mengenai pengaruh lama perendaman dan suhu penggilingan terhadap kadar protein susu kedelai masih terbatas pada evaluasi faktor tunggal. Keterbatasan ini menyebabkan optimasi kadar protein melalui kombinasi serta analisis interaksi kedua faktor tersebut secara komprehensif belum banyak dilaporkan. Pendekatan optimasi faktor tunggal sering kali mengabaikan potensi efek interaksi, sehingga titik optimum sebenarnya tidak tercapai. Oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk menentukan kombinasi optimum kedua faktor tersebut guna memaksimalkan kadar protein susu kedelai.

Kombinasi faktor tersebut dievaluasi menggunakan desain eksperimen *Central Composite Design* (CCD) dalam *Response Surface Methodology* (RSM). Pemilihan RSM didasarkan pada kemampuannya menganalisis interaksi antar faktor dengan jumlah percobaan yang minimal, sehingga menghemat waktu dan biaya penelitian [10]. Penetapan kadar protein dalam penelitian ini dilakukan menggunakan metode Lowry. Metode ini dipilih karena kemampuannya dalam meningkatkan sensitivitas deteksi protein [11]. Meskipun demikian, metode Lowry memiliki keterbatasan berupa waktu inkubasi yang relatif lama dan rentan terhadap interferensi dari berbagai senyawa [12,13]. Berbeda dengan Lowry, metode Kjeldahl dianggap sebagai metode standar untuk penetapan protein susu kedelai namun prosesnya memerlukan waktu analisis yang lebih lama, melibatkan penggunaan bahan kimia korosif/toksik serta tidak mampu membedakan jenis nitrogen [12,14]. Oleh karena itu, pemilihan metode Lowry dinilai tepat untuk tujuan penelitian ini.

Metode Penelitian

Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah spektrofotometer UV-Visible (Shimadzu UV-1280®), kuvet (Hellma®), vortex (Barnstead Thermolyne Maxi Mix II), neraca analitik (Ohaus®), mikropipet (ukuran 10-100 µL; 100-1000 µL; 1000-5000 µL; 1-10 mL) (Socorex® dan Dragon Lab®) beserta tipnya, sendok tanduk, timbangan digital, blender, panci, gelas, kompor gas, botol plastik, pengaduk (sendok), termometer, saringan untuk memisahkan sari kedelai, pH meter (Hanna HI98191), dan alat-alat gelas (Iwaki® dan Pyrex®).

Bahan yang digunakan yaitu kacang kedelai lokal dibeli dari *e-commerce*, akuades, NaOH 1 N, CuSO₄.H₂O, K-Na tartrat, Na₂CO₃, reagen Folin-Ciocalteu, Bovine Serum Albumin (HiMedia®) serta larutan buffer pH 4, 7, dan 10. Semua bahan kimia tersebut merupakan *pro analysis* produksi Merck KGaA.

Penentuan Level Faktor dan Rancangan Formulasi

Formulasi susu kedelai dirancang menggunakan metode *Response Surface Methodology–Central Composite Design* (RSM–CCD) dengan *software Design Expert* versi 13. Faktor penelitian yang diteliti meliputi lama perendaman dan suhu penggilingan, sedangkan respons yang diuji berupa kadar protein dan pH. Faktor pada metode *Central Composite Design* (CCD) terdiri atas lima level, yaitu aksial minimum ($-\alpha$), faktorial minimum (-1), titik tengah (0), faktorial maksimum (1), dan aksial maksimum ($+\alpha$) [15]. Penentuan level minimum dan maksimum bertujuan untuk memastikan kombinasi eksperimen yang dihasilkan *software* berada dalam rentang operasional yang diinginkan [16]. Untuk meningkatkan presisi dalam rentang faktorial, titik tengah diulang sebanyak lima kali. Dalam desain CCD dua faktor, nilai α sebesar 1,414 digunakan dan umumnya berada di luar batas faktorial. Pemilihan nilai α ini bertujuan menjadikan desain bersifat *rotatable* yang mampu memastikan varians prediksi respons konstan di semua titik pada jarak yang sama dari pusat desain. Nilai α diperoleh dari rumus $\alpha = (2^{(k-p)})^{1/4}$ dengan $2^{(k-p)}$ adalah jumlah titik faktorial dalam desain dua tingkat. Bagian faktorial ini dapat berupa desain faktorial penuh (2^k) yang mencakup semua kombinasi level tinggi dan rendah dari k faktor atau desain faktorial fraksional (2^{k-p}) yang hanya menjalankan sebagian dari kombinasi tersebut. Untuk CCD dua faktor ($k=2$), bagian faktorialnya adalah desain faktorial penuh ($2^2 = 4$ titik ($p=0$)). Dengan demikian, nilai α dihitung sebagai $(4)^{1/4} = \sqrt{2} = 1,414$. Nilai spesifik α menunjukkan jarak setiap titik aksial dari pusat CCD. Apabila nilai $\alpha < 1$ maka titik aksial berada di dalam kubus (ruang eksperimen). Jika nilai $\alpha = 1$, titik-titik tersebut berada di permukaan kubus. Apabila nilai $\alpha > 1$ maka titiknya berada di luar kubus [15,17]. Titik aksial berfungsi sebagai titik ekstrim untuk memperluas ruang eksperimen kombinasi faktor [18]. Titik tengah untuk lama perendaman ditetapkan pada 9 jam berdasarkan hasil terbaik penelitian sebelumnya [8], sedangkan titik tengah suhu penggilingan mengacu pada penelitian [9] yang membuktikan bahwa suhu penggilingan optimum adalah 60°C. Penentuan level faktor dan rancangan formula desain RSM-CCD disajikan pada Tabel 1 dan Tabel 2.

Tabel 1. Level faktor penelitian

Faktor	Level				
	$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$
Suhu penggilingan (°C)	31,72	40	60	80	88,28
Lama perendaman (jam)	4,76	6	9	12	13,24

Keterangan: -1 = nilai terendah dari faktor penelitian; 0 = nilai tengah dari faktor penelitian; +1 = nilai tertinggi dari faktor penelitian; $-\alpha$ = titik ekstrim dari faktor penelitian; $+\alpha$ = titik ekstrim tertinggi dari faktor penelitian.

Pembuatan Sampel

Kedelai sebanyak 25 gram dibersihkan secara menyeluruh menggunakan air mengalir sebelum dilakukan perendaman. Proses perendaman kedelai dilakukan dalam gelas pada suhu 25°C dengan durasi sesuai masing-masing perlakuan. Perbandingan kedelai dan air yang digunakan selama proses perendaman yaitu 1:4 atau 100 mL. Selama proses perendaman, air rendaman tidak diganti. Air rendaman dibuang dan kulit ari kedelai dibersihkan/dikupas setelah proses perendaman selesai. Kedelai direbus dalam 100 mL air dengan api kecil atau sedang selama 5 menit [Modifikasi [19]]. Kedelai kemudian dihaluskan/digiling menggunakan blender selama 5 menit dengan penambahan air sebanyak 200 mL. Suhu air yang diberikan saat penggilingan sesuai dengan rancangan formula. Proses diakhiri dengan penyaringan untuk memperoleh produk akhir berupa susu kedelai [Modifikasi [9]]. Beberapa parameter ditetapkan sebagai variabel terkontrol guna memastikan konsistensi proses dan meminimalkan bias dari faktor luar [20]. Parameter tersebut

meliputi jenis kedelai, jumlah kedelai, volume air, metode pengukuran pH, suhu perendaman, metode pengukuran kadar protein serta waktu perebusan dan penggilingan.

Tabel 2. Rancangan formula berdasarkan RSM-CCD

Std	Run	Faktor 1	Faktor 2
		A: Suhu penggilingan (°C)	B: Lama perendaman (jam)
13	1	60	9
10	2	60	9
1	3	40	6
7	4	60	4,75 (4 jam 45 menit*)
5	5	31,70 (32*)	9
8	6	60	13,25 (13 jam 15 menit*)
11	7	60	9
9	8	60	9
6	9	88,30 (88*)	9
2	10	80	6
4	11	80	12
12	12	60	9
3	13	40	12

Keterangan (*) = kondisi uji

Pembuatan Reagen Lowry

Prosedur pembuatan reagen Lowry A, B, dan C dilakukan berdasarkan metode penelitian sebelumnya dengan beberapa modifikasi. Reagen A dibuat dengan melarutkan 0,2 g K-Na tartarat dan 10 g Na₂CO₃ ke dalam 50 mL NaOH 1 N, kemudian ditambahkan akuades hingga 100 mL. Reagen B disiapkan dengan melarutkan 0,2 g K-Na tartarat dan 0,1 g CuSO₄·5H₂O dalam 90 mL akuades, lalu ditambahkan 10 mL NaOH 1 N. Reagen Lowry C dibuat dengan mengencerkan 6 mL reagen *Folin-Ciocalteu* dalam akuades hingga tanda batas volume labu takar 100 mL [21].

Pembuatan Larutan Stok

Pembuatan larutan stok konsentrasi 1000 ppm dilakukan berdasarkan penelitian sebelumnya, sebanyak 10 mg serbuk *Bovine Serum Albumin* (BSA) ditimbang dan dilarutkan dalam akuades hingga tanda batas volume labu takar 10 mL [4].

Pembuatan Larutan Blanko

Larutan blanko disiapkan dengan menambahkan 0,5 mL akuades ke dalam labu takar 5 mL, kemudian secara berurutan ditambahkan 0,9 mL reagen Lowry A dan 0,1 mL reagen Lowry B selanjutnya dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit pada suhu ruang. Sebanyak 3,0 mL reagen Lowry C dan 0,5 mL akuades ditambahkan ke dalam larutan, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex* [Modifikasi [4,22]].

Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

Penetapan panjang gelombang maksimum dilakukan berdasarkan metode penelitian sebelumnya dengan modifikasi larutan stok BSA konsentrasi yang digunakan menjadi 1000 ppm. Diambil 1,0 mL larutan stok BSA ke dalam labu takar 5 mL, kemudian secara berurutan ditambahkan 0,9 mL reagen Lowry A dan 0,1 mL reagen Lowry B selanjutnya dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit pada suhu ruang. Sebanyak 3,0 mL reagen Lowry C ditambahkan ke dalam larutan, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex* dan diukur pada panjang gelombang 400-800 nm dengan spektrofotometer UV-Vis [22].

Pencarian Operating Time (OT)

Pencarian *operating time* dilakukan berdasarkan metode penelitian sebelumnya dengan modifikasi larutan stok BSA konsentrasi yang digunakan menjadi 1000 ppm. Diambil 1,0 mL larutan stok BSA ke dalam labu takar 5 mL, kemudian secara berurutan ditambahkan 0,9 mL reagen Lowry A dan 0,1 mL reagen Lowry B selanjutnya dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit pada suhu ruang. Sebanyak 3,0 mL reagen Lowry C ditambahkan ke dalam larutan, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex* dan absorbansi diukur setiap menit pada panjang gelombang maksimum hingga diperoleh pembacaan yang stabil [22].

Pencarian Kurva Baku

Kurva baku dibuat menggunakan larutan stok BSA 1000 ppm sesuai metode penelitian sebelumnya dengan penyesuaian rentang konsentrasi menjadi 5–60 ppm [4]. Labu takar pertama diisi larutan seri konsentrasi 5 ppm yang dibuat dengan menambahkan 0,025 mL larutan stok BSA ke dalam labu takar 5 mL, kemudian secara berurutan ditambahkan 0,9 mL reagen Lowry A dan 0,1 mL reagen Lowry B selanjutnya dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit pada suhu ruang. Sebanyak 3,0 mL reagen Lowry C dan 0,975 mL akuades ditambahkan ke dalam larutan, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex* [22]. Larutan didiamkan selama 24 menit pada suhu ruang sebagai *operating time*. Absorbansi masing-masing konsentrasi BSA diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Larutan seri konsentrasi lainnya disiapkan dalam labu takar terpisah, dengan komposisi seperti pada Tabel 3.

Tabel 3. Komposisi larutan seri konsentrasi BSA

Volume Larutan Stok BSA (mL)	Reagen Lowry (mL)			Volume Akuades (mL)	Volume Akhir Larutan (mL)	Konsentrasi BSA (ppm)
	A	B	C			
0,025				0,975		5
0,075				0,925		15
0,225	0,9	0,1	3,0	0,775	5	45
0,275				0,725		55
0,325				0,675		65

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ)

Batas deteksi dan kuantifikasi merupakan parameter yang memegang peranan penting dalam validasi prosedur analisis [23]. LOD dan LOQ dihitung secara statistik berdasarkan data kurva baku [24]. Nilai tersebut ditentukan menggunakan rumus $LOD = 3,3\sigma/S$ dan $LOQ = 10\sigma/S$. Simbol σ memperpresentasikan standar deviasi residual dan S adalah kemiringan (*slope*), keduanya merupakan komponen dari persamaan regresi linear [25,26].

Preparasi Sampel

Setiap perlakuan sampel susu kedelai terlebih dahulu diencerkan 10x dengan mengambil 1 mL sampel dan menambahkan akuades hingga tanda batas volume labu takar 10 mL. Selanjutnya, 1 mL larutan hasil pengenceran pertama diambil dan dilakukan pengenceran tahap kedua dengan metode yang sama. Dengan demikian, total faktor pengenceran sampel adalah 100x [27].

Penentuan Kadar Protein

Diambil 0,5 mL sampel yang diecerkan 100x ke dalam labu takar 5 mL, kemudian secara berurutan ditambahkan 0,9 mL reagen Lowry A dan 0,1 mL reagen Lowry B selanjutnya dihomogenkan dan didiamkan selama 5 menit pada suhu ruang. Sebanyak 3,0 mL reagen Lowry C dan 0,5 mL akuades ditambahkan ke dalam larutan, kemudian dihomogenkan menggunakan *vortex* [22]. Larutan didiamkan selama 24 menit pada suhu ruang sebagai *operating time*. Absorbansi diukur pada panjang gelombang maksimum menggunakan spektrofotometer UV-Vis. Pengukuran kadar protein sampel susu kedelai dilakukan sebanyak tiga kali replikasi.

Uji pH

Uji ini dilakukan menggunakan pH meter yang telah dikalibrasi dengan larutan standar *buffer* pH 4, 7, dan 10. Kalibrasi elektroda sebelum pengukuran sampel dilakukan untuk meningkatkan keakuratan hasil pengukuran [28]. Pembacaan nilai pH dilakukan setelah elektroda dicelupkan ke dalam sampel dan nilai menunjukkan kestabilan [29]. Persyaratan rentang nilai pH susu kedelai yaitu antara 6,5-7 [14].

Analisis Data Respons

Data respons dianalisis untuk memperoleh model yang sesuai berdasarkan saran *software*. Pemilihan model dilakukan berdasarkan jumlah kuadrat urutan model (*sequential model sum of square*), uji ketidaksesuaian model (*lack of fit test*), dan ringkasan model secara statistik (*model summary statistics*). Model tersebut selanjutnya dievaluasi menggunakan fitur *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan

mempertimbangkan nilai *lack of fit*, selisih nilai *adjusted R²* dengan *predicted R²*, dan *adequate precision*. Model yang diperoleh ditampilkan dalam bentuk grafik *contour* permukaan dan tiga dimensi [30,31].

Penentuan Formulasi Optimum dan Konfirmasi

Setelah diperoleh model yang sesuai dari masing-masing respon, dilakukan optimasi untuk menentukan formula yang menghasilkan kondisi optimum [31]. Optimasi dilakukan dengan menentukan target dan skala prioritas untuk setiap faktor dan respons [32]. Target respons ditentukan berdasarkan standar mutu susu kedelai mengacu pada SNI 01-3830-1995. Formula optimum dipilih berdasarkan nilai *desirability* tertinggi (mendekati 1) [33]. Nilai *desirability* menunjukkan tingkat kesesuaian hasil yang mendekati titik optimum. Formula optimum kemudian dikonfirmasi dengan membandingkan hasil pengujian dengan *Confident Interval* (CI) atau *Prediction Interval* (PI) 95% untuk memastikan keakuratan model yang digunakan [32,34,35]. Konfirmasi dilakukan dalam tiga kali replikasi atau lebih untuk memastikan kesesuaian antara hasil prediksi dengan nilai aktual [15].

Hasil dan Diskusi

Metode Lowry merupakan pengujian protein yang didasarkan pada prinsip reaksi Biuret dengan penambahan reagen untuk meningkatkan sensitivitas deteksi. Reaksi ini dimulai dengan reduksi ion tembaga(II) (Cu^{2+}) menjadi tembaga(I) (Cu^+) oleh protein dalam larutan alkali, membentuk kompleks berwarna biru. K-Na tartrat ditambahkan untuk menjaga kelarutan dan stabilitas Cu^{2+} dalam suasana basa, mencegah pengendapan, dan memastikan ketersediaan tembaga untuk bereaksi dengan ikatan peptida protein. Asam fosfomolibdat/fosfotungstat yang dikenal sebagai Folin-Ciocalteu ditambahkan ke dalam larutan dan berinteraksi dengan ion Cu^+ (hasil reduksi tembaga dari kompleks awal) serta rantai samping asam amino tirosin, triptofan, dan sistein. Reaksi tersebut menghasilkan warna biru-hijau (biru molibdenum) yang terdeteksi pada 650–750 nm. Metode ini hampir 100 kali lebih sensitif dibandingkan metode Biuret, sehingga memerlukan jumlah sampel protein yang lebih sedikit dan sampel yang telah bereaksi dengan pereaksi tidak dapat digunakan lagi untuk pengujian lanjutan [36,37].

Pembuatan Susu Kedelai

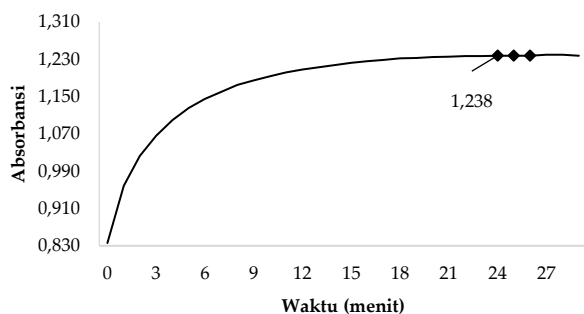
Susu kedelai dalam penelitian dibuat oleh peneliti untuk menjamin kualitas sampel selama proses pengujian. Bahan baku yang digunakan adalah kedelai lokal varietas grobogan yang dibeli melalui *e-commerce*. Untuk menjamin kualitas sampel, kedelai dipilih berdasarkan kondisi fisik yang bersih, tidak berlubang, dan tidak mengalami kerutan pada permukaannya. Kedelai dibersihkan dari kotoran, kemudian direndam untuk melunakkan struktur dan mempermudah proses penggilingan [38]. Proses perebusan dilakukan untuk menginaktivkan anti tripsin, menghilangkan zat-zat yang menimbulkan bau langu yang disebabkan oleh kerja enzim lipoksigenase [9]. Susu kedelai tanpa pengawet memiliki daya tahan (masa simpan) berkisar antara 6-8 jam. Masa simpan dapat bertahan lebih lama (± 24 jam) apabila susu kedelai dimasukkan ke dalam almari es (*freezer* atau rak di bawah *freezer*) [5].

Penetapan Panjang Gelombang Maksimum

Penetapan panjang gelombang maksimum dilakukan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada daerah panjang gelombang 400-800 nm dengan serapan 1,0-3,0 A. Pada penelitian ini menunjukkan absorbansi sebesar 1,372 pada panjang gelombang 732,0 nm. Panjang gelombang ini sedikit berbeda dengan hasil penelitian yang dilakukan oleh penelitian terdahulu yaitu 742,0 nm dengan absorbansi 0,293 [21]. Penentuan panjang gelombang yang menghasilkan serapan tertinggi diharapkan mampu memberi sensitivitas pengukuran yang optimal [38,39].

Pencarian Operating Time (OT)

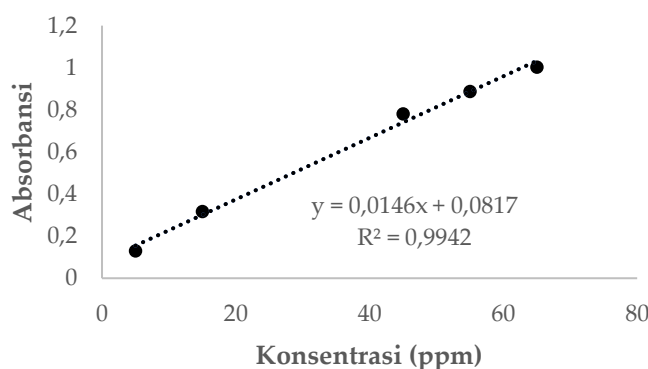
Pencarian *operating time* bertujuan untuk mengetahui kestabilan warna yang diperoleh dengan pembacaan absorbansi larutan [21]. Pengukuran absorbansi larutan menunjukkan kestabilan pada menit ke-24 hingga menit ke-26, dengan nilai sebesar 1,238. Kestabilan ini menandakan bahwa reaksi antara ion Cu^{2+} dan ikatan peptida pada protein telah mencapai kondisi optimal, sehingga menit ke-24 ditetapkan sebagai *operating time* seperti pada Gambar 1.



Gambar 1. Nilai absorbansi yang diamati setiap menit untuk menentukan waktu optimum pada metode Lowry

Penentuan Kurva Baku

Penentuan kurva baku diperoleh dengan menghubungkan antara konsentrasi BSA (sumbu x) dengan absorbansi (sumbu y). Kurva kalibrasi larutan standar menunjukkan terdapat hubungan yang linier antara konsentrasi dan absorbansi dengan nilai koefisien korelasi (r) sebesar 0,9971 [Gambar 2]. Pengujian dari lima titik seri konsentrasi kadar didapatkan persamaan regresi linier $y = 0,0146x + 0,0817$. Perolehan nilai r tersebut memenuhi syarat karena nilainya mendekati 1 [38].



Gambar 2. Konsentrasi BSA dan nilai absorbansi yang diukur sebagai dasar pembentukan kurva baku

Batas deteksi (LOD) dan batas kuantifikasi (LOQ)

Pengujian batas deteksi dilakukan untuk menilai kemampuan metode analisis mendeteksi konsentrasi terendah dari analit suatu sampel dan menghasilkan respons yang signifikan dibandingkan dengan blanko [40]. Batas kuantifikasi memiliki kemampuan untuk mengukur jumlah terendah dalam sampel analit dengan presisi dan akurasi yang dapat diterima secara tepat dan akurat [41,42]. Batas deteksi diperoleh sebesar 7,58 ppm (0.000758%w/w) mengindikasikan konsentrasi analit terkecil yang mampu dideteksi metode analisis dengan memberikan respons. Sinyal alat terhadap analit dapat dipercaya apabila konsentrasi dalam analit melebihi batas deteksi, sedangkan konsentrasi di bawah nilai tersebut maka sinyal yang ditangkap sepenuhnya *noise* [43]. Hasil pengukuran konsentrasi pada batas deteksi memiliki tingkat akurasi yang rendah, sehingga belum sepenuhnya dapat dipercaya. Berdasarkan perhitungan, dihasilkan batas kuantifikasi sebesar 22,97 ppm atau (0.002297%w/w). Nilai tersebut menunjukkan konsentrasi analit terendah yang terkuantifikasi, sekaligus menentukan batas rentang kerja yang diperlukan suatu pengukuran [44]. Hal ini menunjukkan bahwa metode analisis yang digunakan mampu memberikan respons yang baik apabila digunakan untuk menganalisis analit yang terkandung dalam sampel.

Analisis Data Respon

Rancangan CCD menyediakan beberapa model statistik untuk menganalisis hasil respon. Beberapa model yang umumnya dipertimbangkan antara lain *Linear*, *2FI (Factor Interacton)*, *Quadratic*, dan *Cubic*. Kriteria untuk menentukan kesesuaian suatu model didasarkan pada nilai probabilitas (p -value) dari analisis *Sequential Model Sum of Squares*. Model dinyatakan sesuai dan signifikan apabila nilai p -value <5% atau 0,05 artinya peluang terjadinya kesalahan dalam pengambilan keputusan maksimal adalah 5%. Semakin kecil nilai p -value maka semakin signifikan model tersebut [30,45]. Berdasarkan hasil analisis *Sequential Model Sum of Squares*, model 2FI menunjukkan nilai p -value sebesar 0,7792 untuk respons protein dan 0,8206 untuk respons

pH [Tabel 4]. Nilai *p-value* tersebut menunjukkan bahwa peluang kesalahannya lebih dari 0,05. Dengan demikian, model 2FI tidak signifikan dan model kuadratik dipilih sebagai model terbaik untuk kedua respons karena nilai *p-value* <0,05 untuk masing-masing respon.

Tabel 4. Hasil *sequential model sum of squares* untuk permodelan kadar protein dan pH

Response	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F value	p-value	
Protein	Mean vs Total	108,75	1	108,75			
	Linear vs Mean	0,3494	2	0,1747	2,22	0,1590	
	2FI vs Linear	0,0072	1	0,0072	0,0835	0,7792	
	Quadratic vs 2FI	0,7344	2	0,3672	57,87	<0,0001	Suggested
	Cubic vs Quadratic	0,0289	2	0,0144	4,65	0,0723	<i>Aliased</i>
	Residual	0,0155	5	0,0031			
	Total	109,89	13	8,45			
pH	Mean vs Total	635,18	1	635,18			
	Linear	0,1314	2	0,0657	17,58	0,0005	
	2FI vs Linear	0,0002	1	0,0002	0,0545	0,8206	
	Quadratic vs 2FI	0,0343	2	0,0172	42,89	0,0001	Suggested
	Cubic vs Quadratic	0,0017	2	0,0008	3,70	0,1032	<i>Aliased</i>
	Residual	0,0011	5	0,0002			
	Total	635,35	13	48,87			

Evaluasi model kedua dilakukan berdasarkan *summary statistics* [Tabel 5]. Pemilihan model ini berdasarkan nilai standar deviasi terendah, PRESS (*Prediction Error Sum of Square*) terendah, dan nilai R² tertinggi. Dalam metode ini, model kubik tidak disarankan ditandai dengan keterangan *aliased*. Hal ini terjadi karena model kubik tidak mampu meningkatkan kecocokan secara signifikan dibandingkan dengan model kuadratik. Apabila model tersebut secara statistik signifikan, model tersebut diberi keterangan *aliased* karena tidak sesuai dengan tujuan permodelan [46].

Evaluasi akhir dilakukan berdasarkan *lack of fit* (ketidaksesuaian). Model kuadratik lebih disarankan pada kedua respons Tabel 6 dan Tabel 7. Berdasarkan hasil evaluasi ketiga kriteria penilaian, model kuadratik dipilih sebagai model yang paling sesuai untuk menggambarkan hubungan antara variabel penelitian terhadap kadar protein dan pH yang dihasilkan.

Tabel 5. *Summary statistics* untuk penentuan model respons kadar protein dan pH

Response	Source	Std. Dev	R ²	Adj R ²	Pred R ²	PRESS	
Protein	Linear	0,2804	0,3077	0,1693	-0,2964	1,47	
	2FI	0,2942	0,3141	0,0855	-0,4963	1,70	
	Quadratic	0,0797	0,9609	0,9329	0,7858	0,2433	Suggested
	Cubic	0,0557	0,9863	0,9672	0,8439	0,1772	<i>Aliased</i>
pH	Linear	0,0611	0,7786	0,7343	0,5884	0,0695	
	2FI	0,0642	0,7799	0,7066	0,4901	0,0861	
	Quadratic	0,0200	0,9834	0,9715	0,9174	0,0139	Suggested
	Cubic	0,0150	0,9933	0,9839	0,9710	0,0049	<i>Aliased</i>

Tabel 6. Hasil uji ketidaksesuaian terhadap data pada respons kadar protein

Response	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
Protein	Linear	0,7729	6	0,1288	39,40	0,0016	
	2FI	0,7657	5	0,1531	46,83	0,0012	
	Quadratic	0,0313	3	0,0104	3,19	0,1457	Suggested
	Cubic	0,0025	1	0,0025	0,7492	0,4355	<i>Aliased</i>
	Pure Error	0,0131	4	0,0033			

Tabel 7. Hasil uji ketidaksesuaian terhadap data pada respons pH

Response	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value	
pH	Linear	0,0363	6	0,0060	22,40	0,0048	
	2FI	0,0361	5	0,0072	26,72	0,0036	
	<u>Quadratic</u>	<u>0,0017</u>	<u>3</u>	<u>0,0006</u>	<u>2,13</u>	<u>0,2395</u>	<u>Suggested</u>
	Cubic	0,000	1	0,000	0,1852	0,6891	<i>Aliased</i>
	Pure Error	0,0011	4	0,0003			

Tabel 8. Hasil *Analysis of Variance* untuk menguji signifikansi model respons kadar protein dan pH

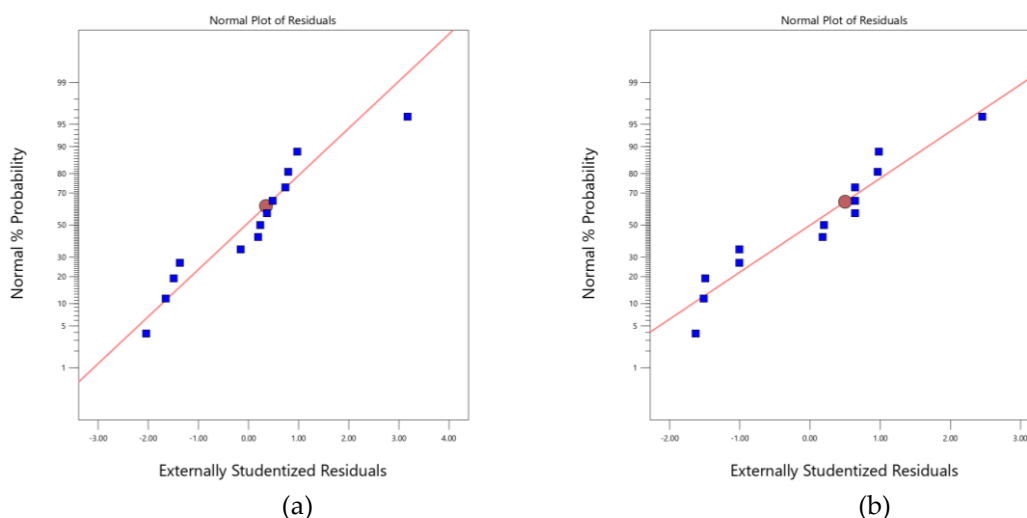
Response	Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Protein	Model*	1,09	5	0,2182	34,39	<0.0001
	A-Temperature	0,0015	1	0,0015	0,2428	0,6373
	B-Time*	0,3479	1	0,3479	54,83	0,0001
	AB	0,0072	1	0,0072	1,14	0,3213
	A2*	0,7337	1	0,7337	115,63	<0,0001
	B2	0,0072	1	0,0072	1,14	0,3210
	Residual	0,0444	7	0,0063		
	Lack of fit**	0,0313	3	0,0104	3,19	0,1457
	Pure Error	0,0131	4	0,0033		
	Cor Total	1,14	12			
Std. Dev.			0,0797	Adjusted R²		0,9329
Mean			2,89	Predicted R²		0,7858
Adeq Precision			16,6226	Adj R²-Pred R²		0,1471
pH	Model*	0,1660	5	0,0332	82,91	<0,0001
	A-Temperature	0,0025	1	0,0025	6,18	0,0418
	B-Time*	0,1290	1	0,1290	322,04	<0,0001
	AB	0,0002	1	0,0002	0,5619	0,4779
	A2*	0,0004	1	0,0004	1,04	0,3410
	B2	0,0343	1	0,0343	85,74	<0,0001
	Residual	0,0028	7	0,0004		
	Lack of fit**	0,0017	3	0,0006	2,13	0,2395
	Pure Error	0,0011	4	0,0003		
	Cor Total	0,1688	12			
Std. Dev.			0,0200	Adjusted R²		0,9715
Mean			6,99	Predicted R²		0,9174
Adeq Precision			27,8862	Adj R²-Pred R²		0,0541

*Significant

** Not significant

Model kuadratik yang terpilih selanjutnya dianalisis menggunakan *Analysis of Variant* (ANOVA) untuk mengevaluasi signifikansi pengaruh masing-masing variabel serta interaksi antarvariabel terhadap respons yang diukur. Hasil ANOVA kedua respons tertera pada Tabel 8. Model kuadratik terbukti berpengaruh secara signifikan terhadap respons karena kedua respons memiliki *p-value* <0,05 yaitu <0,0001. *Lack of fit* respons protein (*p* = 0,1457) dan pH (*p* = 0,2395) menunjukkan tidak signifikan (*p-value*>0,05). Nilai *lack of fit* yang tidak signifikan merupakan model yang baik karena menunjukkan adanya kesesuaian data respons dengan model dari faktor [18]. Selisih antara nilai *Predicted R²* dan *Adjusted R²* respons protein dan pH menunjukkan nilai yang sesuai karena kurang dari 0,2. Selain itu, nilai *Adeq. Precision* lebih besar dari 4 yang menunjukkan bahwa model tersebut memiliki rasio sinyal terhadap *noise* yang kuat sehingga model yang diperoleh dari hasil analisis data dapat diterima [47]. Pengujian asumsi kenormalan residual untuk respons kadar protein dan pH dievaluasi melalui pendekatan visual dan statistik [Gambar 3 dan Tabel 9]. Grafik *normal probability plot of residuals* menunjukkan bahwa titik-titik residual terdistribusi di sepanjang garis lurus, sehingga residual

dinyatakan telah mengikuti distribusi normal [47,48]. Untuk memperkuat asumsi visual tersebut, dilakukan uji normalitas Shapiro-Wilk. Pemilihan uji Shapiro-Wilk didasarkan pada jumlah sampel penelitian yang kurang dari 50. Hasil uji menunjukkan nilai signifikansi (*p-value*) sebesar 0,224 untuk residual kadar protein dan 0,191 untuk residual pH. Kedua nilai *p-value* lebih besar dari 0,05, sehingga dapat disimpulkan bahwa residual kedua model terdistribusi secara normal [49].



Gambar 3. Grafik normal plot vs residual protein (a); dan pH (b) menunjukkan kesesuaian model

Tabel 9. Hasil uji shapiro-wilk untuk normalitas residual

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Externally Studentized Residual Protein	0,916	13	0,224
Externally Studentized Residual pH	0,911	13	0,191
$Y_1 = 0,0139(A) - 0,2085(B) - 0,0425(AB) - 0,3247(A^2) - 0,0322(B^2)$			
$Y_2 = -0,0176(A) - 0,1270(B) - 0,0075(AB) - 0,0077(A^2) - 0,0702(B^2)$			

Keterangan:

Y1 = respons protein;

Y2 = respons pH;

A = suhu penggilingan;

B = lama perendaman

Persamaan regresi menggambarkan kontribusi masing-masing variabel terhadap respon. Berdasarkan persamaan 1 dapat diketahui bahwa suhu penggilingan (A) memberikan respons positif terhadap protein (Y) yang dihasilkan, artinya kadar protein meningkat seiring dengan kenaikan suhu (dalam batas rentang tertentu). Hasil penelitian menunjukkan bahwa variasi lama perendaman dan suhu penggilingan secara signifikan mempengaruhi kadar protein dan pH susu kedelai, seperti yang terlihat pada Tabel 10.

Tabel 10 Kadar protein susu kedelai yang diperoleh berkisar antara 2,41-3,39%w/w, sedangkan nilai pH berada dalam rentang 6,70-7,10. Kadar protein tertinggi diperoleh pada lama perendaman 4,75 jam dan suhu penggilingan 60°C (3,39%w/w), sedangkan kadar protein terendah diperoleh pada lama perendaman 9 jam dan suhu penggilingan 88,30°C (2,41%w/w).

Hasil ini sesuai dengan penelitian terdahulu bahwa seiring bertambahnya suhu penggilingan maka kadar protein semakin meningkat kemudian menurun apabila sudah mencapai titik optimum [9]. Kadar protein cenderung naik pada suhu awal karena gerakan molekul air dan protein yang lebih cepat sehingga membantu pelarutan protein globular (legumelin) ke dalam air. Pada suhu di atas 60°C, kadar protein mengalami penurunan karena denaturasi protein. Hal tersebut dibuktikan pada lama perendaman 9 jam, kadar protein menurun dari 3,14%w/w (suhu 60°C) menjadi 2,41%w/w (suhu 88,3°C). Proses denaturasi ini merusak struktur protein, mengurangi kelarutannya, dan memicu penggumpalan (koagulasi), sehingga menghambat ekstraksi protein secara optimal. Penggunaan suhu tinggi juga dapat menyebabkan adanya reaksi Maillard dan penurunan protein terlarut [50].

Reaksi kimia ini melibatkan interaksi antara gugus amino (terutama gugus ε-amino lisin) dan gugus karbonil dari gula pereduksi [51]. Lisin sangat rentan terhadap reaksi Maillard karena ketidakstabilan

kimianya pada pemanasan dan memiliki dua gugus fungsional amin. Laju reaksi Maillard meningkat seiring kenaikan suhu [52,53]. Penurunan kualitas protein karena berkurangnya jumlah lisin setelah bereaksi dengan gula pereduksi merupakan efek utama dari reaksi Maillard. Perubahan struktur protein akibat denaturasi menyebabkan terbukanya lipatan molekul protein. Kondisi ini membuat lisin lebih mudah bereaksi dengan gula dan mempercepat terjadinya reaksi Maillard. Reaksi ini membentuk rantai samping glikosil lisin yang tidak dapat dicerna dan menghambat penyerapan. Lisin yang terlibat dalam reaksi Maillard juga dapat membentuk zat yang menghambat atau bersifat anti-nutrisi [52,54]. Pembentukan senyawa tidak larut ini mengurangi jumlah protein terukur. Oleh karena itu, suhu penggilingan yang tepat sangat penting untuk mendapatkan kadar protein maksimal.

Tabel 10. Nilai respons kadar protein dan pH yang diukur pada masing-masing *run* dalam rancangan RSM-CCD

Std	Run	Faktor 1	Faktor 2	Kadar Protein	pH
		A: Suhu penggilingan (°C)	B: Lama perendaman (jam)	(%w/w)	
1	3	40	6	2,84	7,08
2	10	80	6	3,03	7,06
3	13	40	12	2,60	6,87
4	11	80	12	2,62	6,82
5	5	31,70 (32*)	9	2,48	7,05
6	9	88,30 (88*)	9	2,41	7,00
7	4	60	4,75 (4 jam 45 menit*)	3,39	7,10
8	6	60	13,25 (13 jam 15 menit*)	2,67	6,70
9	8	60	9	3,14	7,05
10	2	60	9	3,10	7,05
11	7	60	9	3,17	7,05
12	12	60	9	3,13	7,01
13	1	60	9	3,02	7,02

Keterangan (*) = kondisi uji

Pada persamaan regresi meningkatnya lama perendaman akan menurunkan kadar protein. Temuan ini konsisten dengan data percobaan, pada perendaman yang lebih lama menunjukkan penurunan kadar protein. Pada suhu penggilingan 60°C kadar protein menurun dari 3.39%w/w (perendaman 4,75 jam) menjadi 3.14%w/w (perendaman 9 jam) dan 2.57%w/w (perendaman 13,25 jam). Hasil ini didukung oleh penelitian sebelumnya yang membuktikan bahwa semakin lama waktu perendaman maka kadar protein cenderung menurun karena adanya protein terlarut ke air perendaman [8,55].

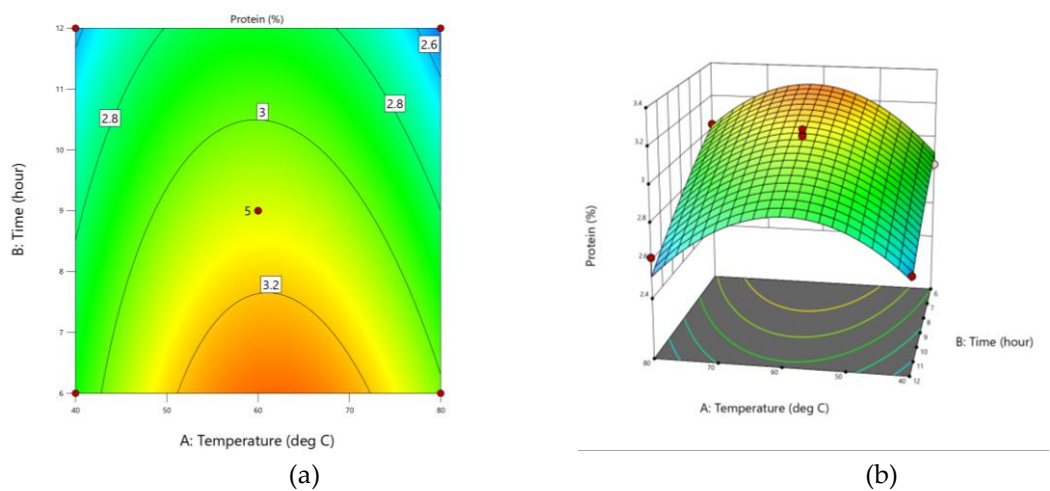
Perendaman yang lebih lama akan membuat struktur biji kedelai lunak dan lebih banyak air masuk ke dalam sel. Sel-sel kotiledon akan membengkak dan akhirnya pecah, sehingga cadangan protein yang tersimpan dalam vakuola sel parenkim lebih banyak keluar. Hal tersebut menyebabkan protein yang keluar ke air perendaman semakin banyak dan kandungan protein yang dapat diekstrak ke dalam sari kedelai pun berkurang. Proses ini menunjukkan bahwa durasi perendaman yang terlalu panjang dapat mengurangi perolehan protein dari kedelai. Interaksi AB bernilai negatif, menunjukkan bahwa peningkatan satu variabel harus diimbangi dengan penurunan variabel lain untuk mempertahankan respons [33,56].

Hasil uji kadar protein dari 13 formula susu kedelai menunjukkan seluruhnya memenuhi persyaratan dengan kadar minimal 2.0%w/w [14]. Hubungan antara lama perendaman dan suhu penggilingan terhadap kadar protein ditunjukkan dalam bentuk *contour* dan bentuk tiga dimensi pada Gambar 4. Area berwarna biru merupakan daerah dengan nilai respons tertinggi, sedangkan area berwarna merah merepresentasikan nilai respons terendah dalam rentang kondisi percobaan yang dievaluasi. Kontribusi variabel terhadap respons pH menunjukkan penurunan seiring dengan peningkatan suhu penggilingan (A) dan lama perendaman (B) seperti yang terlihat pada Persamaan 2. Perubahan lama perendaman memiliki pengaruh lebih dominan terhadap pH dibandingkan suhu penggilingan. Perbandingan tersebut dapat dilihat dari nilai koefisien lama perendaman yang lebih besar daripada suhu penggilingan.

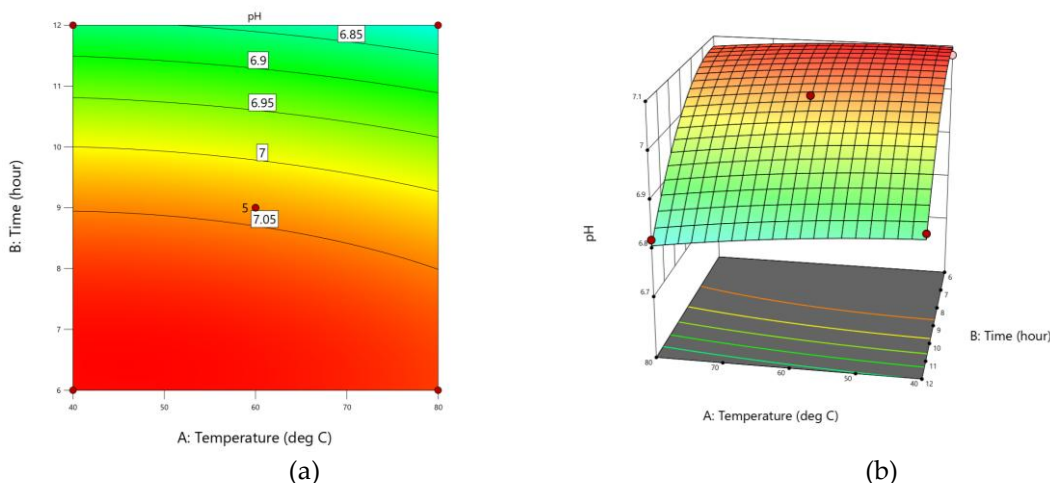
Berdasarkan hasil percobaan, peningkatan suhu penggilingan tidak menunjukkan pengaruh signifikan terhadap pH. Pada perendaman 9 jam, pH sedikit bergeser dari 7,05 (suhu penggilingan 31,7°C) menjadi 7,05 (suhu penggilingan 60°C) dan 7,0 (suhu penggilingan 88,3°C). Suhu penggilingan tidak menunjukkan

pengaruh signifikan terhadap pH karena durasi proses penggilingan yang singkat (5 menit) tidak memadai untuk memicu perubahan pH berarti melalui fermentasi. Selama perendaman terjadi penurunan pH yang semakin signifikan seiring dengan bertambahnya waktu. Penurunan pH ini secara langsung disebabkan oleh aktivitas fermentasi alami bakteri selama proses perendaman, yang dapat ditandai dengan munculnya bau asam dan buih pada air rendaman [8]. Berdasarkan hasil percobaan, pH susu kedelai akan menurun seiring dengan perpanjangan durasi perendaman. Pada suhu penggilingan 60°C, pH menurun dari 7,1 (perendaman 4,75 jam) menjadi 7,05 (perendaman 9 jam) dan 6,7 (perendaman 13,25 jam). Hasil percobaan tersebut selaras dengan prinsip penelitian terdahulu yang menyatakan bahwa penurunan nilai pH pada perendaman yang lebih lama disebabkan oleh aktivitas fermentasi [8].

Dalam penelitian ini, interaksi antara penambahan suhu penggilingan dan lama perendaman (AB) terhadap pH menunjukkan respons negatif artinya jika salah satu nilai variabel ditingkatkan maka variabel lain harus diturunkan untuk mendapatkan respons yang sama [33,56]. Hasil uji pH dari 13 *run* menunjukkan bahwa *run* 2, 3, 4, 5, 7, 8, dan 10 dengan pH berturut-turut sebesar 7,05; 7,08; 7,10; 7,05; 7,05; 7,05 dan 7,06 tidak memenuhi persyaratan pH yaitu 6,5-7,0. Hubungan antara lama perendaman dan suhu penggilingan terhadap pH divisualisasikan dalam bentuk *contour* dan bentuk tiga dimensi pada Gambar 5.



Gambar 4. Grafik *contour plot* (a); dan tiga dimensi (b) hubungan variasi lama perendaman dan suhu penggilingan respons protein.

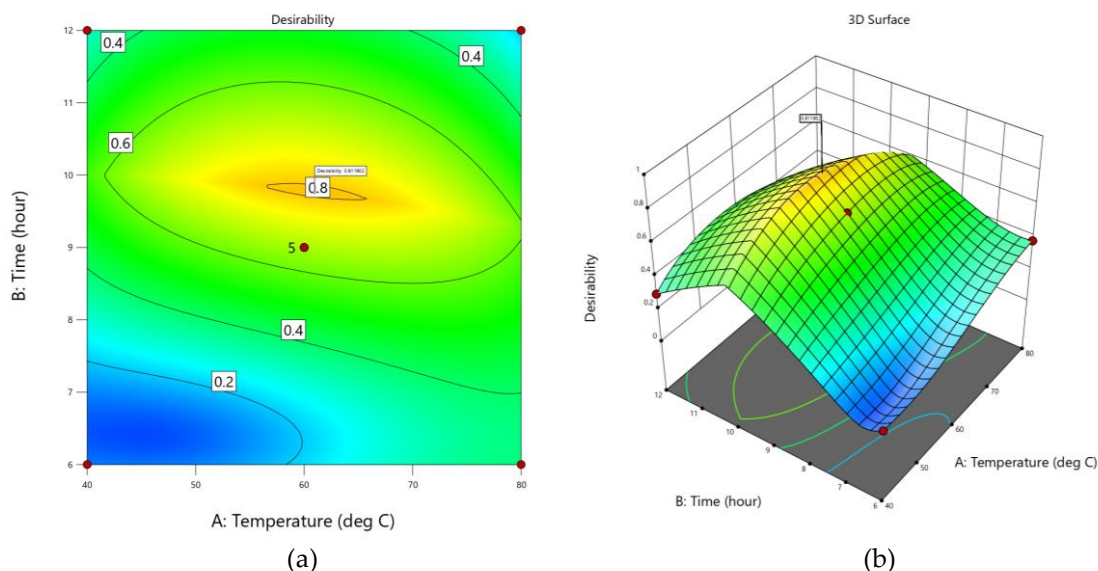


Gambar 5. Grafik *contour plot* (a); dan tiga dimensi (b) hubungan variasi lama perendaman dan suhu penggilingan respons pH

Penentuan Formulasi Optimum dan Konfirmasi

Optimasi hasil percobaan dilakukan dengan menetapkan parameter, target (*goal*), batas maksimum dan minimum serta tingkat kepentingan (*importance*) masing-masing variabel sesuai dengan tujuan penelitian [Tabel 11]. Tingkat kepentingan parameter suhu penggilingan dan lama perendaman ditetapkan menggunakan target *in range* mengacu pada rentang nilai hasil pengukuran sebenarnya. Respons protein

ditetapkan *maximize* karena semakin tinggi kadar protein maka semakin baik. Pada respons pH dipilih *in target* = 7 mengacu pada rentang pH yang disyaratkan untuk susu kedelai yaitu 6,5-7,0. Penetapan target tersebut dilakukan untuk memastikan bahwa formulasi yang dihasilkan tidak hanya memiliki kadar protein yang tinggi, tetapi juga mempertahankan pH dalam rentang batas syarat mutu pH susu kedelai. Penetapan target *in range* menunjukkan bahwa nilai dalam batas tersebut dapat diterima, sedangkan *maximize* menandakan bahwa batas bawah merupakan nilai minimum yang dapat diterima dan batas atas merupakan hasil terbaik yang diinginkan. Berdasarkan kriteria optimasi tersebut, didapatkan empat solusi dengan nilai *desirability* masing-masing sebesar 0,812; 0,613; 0,379 dan 0,122 [Tabel 12]. Nilai *desirability* yang mendekati 1 dapat menentukan derajat ketepatan hasil solusi optimal [57]. Formula dengan nilai *desirability* tertinggi dipilih untuk tahap konfirmasi dan visualisasi formulasi optimum disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Grafik *contour plot* (a); dan tiga dimensi (b) hubungan variasi lama perendaman dan suhu penggilingan *desirability* formulasi optimum

Tabel 11. Kriteria respons untuk formulasi optimum

Parameter	Goal	Limit	Importance
Temperature/suhu penggilingan	<i>in range</i>	40-80	+++
Time/lama perendaman	<i>in range</i>	6-12	+++
Protein (%w/w)	<i>maximize</i>	2,41-3,39	+++
pH	<i>target</i> = 7	6,7-7,1	+++

Tabel 12. Solusi formulasi optimum

No	Temperature	Time	Protein	pH	Desirability	Selected
1	60,960	9,767	3,056	7,000	0,812	Selected
2	80,000	9,270	2,778	7,000	0,613	
3	79,999	6,000	3,020	7,077	0,379	
4	40,000	6,000	2,907	7,097	0,122	

Konfirmasi hasil optimasi dilakukan pada formula optimum yang direkomendasikan *software Design Expert* versi 13, yaitu lama perendaman 9,767 jam dan suhu penggilingan (60,960°C). Pengujian konfirmasi ini menghasilkan kadar protein 3.1%w/w dan pH 7,02. Nilai respons uji dibandingkan dengan rentang prediksi 95% Confidence Interval (95% CI) dan 95% Prediction Interval (95% PI), hasil menunjukkan bahwa kadar protein 3.1%w/w berada dalam rentang 95% CI (2,9727–3,1393) dan 95% PI (2,91902–3,19299). Demikian pula, nilai pH 7,02 berada dalam rentang 95% CI (6,97909–7,0209) dan 95% PI (6,9656–7,03443).

Pengukuran ketepatan akurasi model dilakukan dengan menghitung *persentase error* antara nilai prediksi model dan nilai aktual hasil konfirmasi. Hasil perhitungan menunjukkan *persentase error* yang

rendah, yaitu 1,42% untuk respons kadar protein dan 0,28% untuk respons pH. *Persentase error* yang rendah mengindikasikan model regresi memiliki akurasi prediksi yang baik dan menunjukkan bahwa *software Design Expert* versi 13 mampu memprediksi respons sediaan dengan baik [Tabel 13].

Tabel 13. Hasil prediksi berdasarkan RSM-CCD

<i>Response</i>	<i>Predicted</i>	<i>Std Dev</i>	<i>95% CI low</i>	<i>95% CI high</i>	<i>95% PI low</i>	<i>Actual</i>	<i>95% PI high</i>
Protein	3,056	0,0796548	2,9727	3,1393	2,91902	3,1	3,19299
pH	7,00001	0,0200105	6,97909	7,0209	6,9656	7,02	7,03443

Kesimpulan

Penelitian ini menunjukkan bahwa kombinasi suhu penggilingan dan lama perendaman memengaruhi kadar protein dan pH susu kedelai. Kombinasi suhu penggilingan 61°C dan lama perendaman 9 jam 46 menit merupakan formulasi optimal yang dihasilkan dari *Design Expert* metode RSM-CCD. Kadar protein dan pH yang dihasilkan memenuhi syarat mutu susu kedelai pada SNI 01-3830-1995, yaitu sebesar 3.1%w/w dan 7,02. Hasil ini dapat memberikan panduan bagi industri, khususnya dalam menentukan formulasi yang efisien untuk memproduksi susu kedelai dengan kualitas gizi optimal. Perlu diingat bahwa temuan ini didasarkan pada varietas kedelai tertentu dan dilakukan dalam skala laboratorium, sehingga penerapannya pada varietas lain atau skala produksi komersial membutuhkan penelitian lebih lanjut.

Acknowledgment

Peneliti menyampaikan apresiasi dan terima kasih kepada seluruh pihak yang telah memberikan kontribusi, baik melalui bimbingan dan arahan maupun dukungan lainnya selama proses penelitian.

Supplementary Materials

Referensi

1. Atmaja, F.N. Analysis Of Protein Levels With Giving Kelor Leaf Extract (*Moringa Oleifera*) On Soy Milk. *J. Qual. Public Heal.* **2020**, *3*, 604–610, doi:10.30994/jqph.v3i2.110.
2. Laila, K.N.; Mashitoh, S.; Puspytasari, H.H. Pengolahan Kedelai Menjadi Susu Kedelai Herbal Sebagai Upaya Peningkatan Ekonomi Keluarga Di Desa Kedungbetik. *BERNAS J. Pengabd. Kpd. Masy.* **2024**, *5*, 1389–1395.
3. Basharat, S.; Ijaz, A.; Tufail, T.; Ul Ain, H.B.; Abid, F.; Azhar, S.; Sharif, M.K.; Iftikhar, F.; Nisar, T.; Noreen, S.; et al. Nutritional and Physicochemical Characterization of Soymilk. *Int. J. Biosci.* **2020**, *16*, 256–264, doi:10.12692/ijb/16.5.256-264.
4. Rejeki, D.S.; Cahyanta, A.N.; Musiyam, S.A. Pengaruh Metode Pengemasan Terhadap Kadar Protein Pada Tempe. *KUNIR J. Farm. Indones.* **2023**, *1*, 10–17, doi:https://doi.org/10.36308/kjfi.v1i2.555.
5. Purwanti, A. Pengenalan Pembuatan Susu Sehat Bernutrisi Dari Kedelai Untuk Berwirausaha Di Dusun Blawong II Trimulyo Jetis Kabupaten Bantul. *J. Inov. Proses* **2018**, *3*, 83–89.
6. Komalasari, H.; Manurung, N.E.P.; Yoga, W.K. Karakteristik Mutu Produk Susu Kedelai Tanpa Merek Yang Beredar Di Kota Mataram. *Food Sci. J. Food Sci. Technol.* **2024**, *4*, 14–31, doi:10.33830/fsj.v4i1.6492.2024.
7. Nurbaya, S.; Supartiningsih Penentuan Kadar Protein Pada Susu Kedelai (*Glycinemax L. Merrill*) Dengan Menggunakan Metode Kjeldahl. *J. Farmanesia* **2020**, *7*, 109–113, doi:10.51544/jf.v7i2.2777.
8. Nazarena, Y.; Malahayati, N.; Priyanto, G. Pengaruh Perendaman Kedelai Terhadap Mutu Sari Kedelai. *J. Sains dan Teknol. Pangan* **2021**, *6*, 3866–3877.
9. Fatisa, Y.; Maslinda Pengaruh Suhu Air Pada Proses Penggilingan Kedelai (*Glycin Max (L) Merrill*) Terhadap Kadar Protein Susu Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Phot. J. Sain dan Kesehat.* **2011**, *2*, 23–26, doi:10.37859/jp.v2i1.122.
10. Gumilar, A.; Dewi, M.A.; Salsabila, N.H. Optimasi Konsentrasi Temulawak Dan Waktu Perendaman Sebagai Pereduksi Formalin Pada Tahu Menggunakan Response Surface Methodology. **2024**, *7*, 19–31,

doi:doi.org/10.36387/jifi.v7i1.1746.

11. Lesly Latumanuw; Damayanti S. Sohilauw Analisis Kadar Protein Dengan Metode Lowry Pada Berbagai Jenis Produk Susu Yang Beredar Di Lingkungan Universitas Muhammadiyah Surakarta. *Antigen J. Kesehat. Masy. dan Ilmu Gizi* **2024**, 2, 21–28, doi:10.57213/antigen.v2i3.291.
12. Pavel, C.-I.; Marghitas, La.; Bonta, V.; Mihai, C.M.; Tomos, L.I. Determination of Total Protein Content in Royal Jelly: A Comparison of the Kjeldahl, the Bradford and the Lowry Methods. *Sci. Pap. - Anim. Husb. Ser.* **2013**, 59, 209–211.
13. Martina, V.; Vojtech, K. A Comparison Of Biuret, Lowry and Bradford Methods for Measuring The Egg's Proteins. *Mendel Net* **2015**, 394–398.
14. Badan Standarisasi Nasional *Standar Nasional Indonesia 01-3830-1995 Tentang Susu Kedelai*; Jakarta, 1995;
15. Anderson, M.J.; Whitcomb, P.J. *RSM Simplified: Optimizing Processes Using Response Surface Methods for Design of Experiments*; CRC Press: USA, 2017; ISBN 9781498745987.
16. Setiawan, O.; Pradipta, A.T. Penggunaan Metode Response Surface Methodology Box Behnken Untuk Pemodelan Dan Optimasi Proses Fenton Pada Pengolahan Limbah Cair Home Industri Sarung Tenun Tradisional Medangan Gresik. *METANA* **2024**, 20, 97–107, doi:10.14710/metana.v20i2.66413.
17. Szpisják-Gulyás, N.; Al-Tayawi, A.N.; Horváth, Z.H.; László, Z.; Kertész, S.; Hodúr, C. Methods for Experimental Design, Central Composite Design and the Box–Behnken Design, to Optimise Operational Parameters: A Review. *Acta Aliment.* **2023**, 52, 521–537, doi:10.1556/066.2023.00235.
18. Lutfiani, P.E.; Hidayat, N.; Sunyoto, N.M.S.; Anggarini, S.; Nurika, I. Optimasi Konsentrasi Glukosa, Urea, Dan Waktu Inkubasi Terhadap Degradasi Lignoselulosa Tandan Kosong Kelapa Sawit Oleh Jamur Serpula Lacrymans. *J. Teknol. Pertan.* **2025**, 26, 47–62.
19. Niyibituronsa, M.; Onyango, A.N.; Gaidashova, S.; Imathiu, S.; Uwizerwa, M.; Ochieng, E.P.; Ng'ang'a, F.; Birungi, J.; Ghimire, S.; Harvey, J. The Effect of Different Processing Methods on Nutrient and Isoflavone Content of Soymilk Obtained from Six Varieties of Soybean Grown in Rwanda. *Food Sci. Nutr.* **2019**, 7, 457–464, doi:10.1002/fsn3.812.
20. Identifikasi Variabel Penelitian, Jenis Sumber Data Dalam Penelitian Pendidikan. **2025**, 3, 586–596, doi:10.61104/jq.v3i2.1025.
21. Sarita, R.N.; Fitriana, A.S.; Prabandari, R. Perbandingan Kadar Protein Pada Kacang Hijau Dan Sari Kacang Hijau Yang Diperjualbelikan Dengan Metode Spektrofotometri UV-Vis. *Semin. Nas. Penelit. dan Pengabd. Kpd. Masy.* **2021**, 238–245.
22. Fauzi, A.; Utami, W.; Vitasari, D.; Wahyuni, A.S. Measurement of Protein Content in Extract of Earthworm. *Urecol Journal. Part C Heal. Sci.* **2022**, 2, 30–34, doi:10.53017/ujs.136.
23. Konieczka, P. *Validation and Regulatory Issues for Sample Preparation*; Elsevier, 2012; Vol. 2; ISBN 9780123813749.
24. Ngibad, K.; Herawati, D. Perbandingan Pengukuran Kadar Vitamin C Menggunakan Spektrofotometri UV-Vis Pada Panjang Gelombang UV Dan Visible. *Borneo J. Med. Lab. Technol.* **2019**, 1, 77–81, doi:10.33084/bjmlt.v1i2.715.
25. Wijayanti, I.R.; Kuncahyo, I.; Herdwiani, W. Skrining Dan Karakterisasi Komponen Self Nano Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) Atorvastatin Menggunakan Fractional Factorial Design (FFD). *J. Mandala Pharmacon Indones.* **2024**, 10, 346–355, doi:10.35311/jmpi.v10i2.546.
26. Yasin, D.S.; Bingül, A.A.; Karaküçük, A.; Teksin, Z.Ş. Development and Validation of an HPLC Method Using an Experimental Design for Analysis of Amlodipine Besylate and Enalapril Maleate in a Fixed-Dose Combination. *Turkish J. Pharm. Sci.* **2021**, 18, 306–318, doi:10.4274/tjps.galenos.2020.89725.
27. Susanti, R.; Hidayat, E. Profil Protein Susu Dan Produk Olahannya. *J. MIPA Unnes* **2016**, 39, 98–106, doi:https://doi.org/10.15294/ijmns.v39i2.9282.
28. Hindayani, A.; Permatasari, F.I.; Putri, A.S. *Pengukuran PH Dengan Teknik Kalibrasi Dua Titik*; Badan Standarisasi Nasional: Jakarta, 2022;
29. Widyawati, P.S.; Ristiarini, S.; Werdani, Y.D.; Kuswardani, I.; Herwina, I.N. Perubahan Sifat Fisikokimia Dan Organoleptik Sari Kedelai Dengan Penambahan Air Seduhan Beluntas. *J. Teknol. Pangan dan Gizi* **2019**, 18, 98–111.
30. Widhiantari, I.A.; Sandra, S.; Djoyowasito, G. Perubahan Sifat Fisik Buah Tomat Setelah Proses Transportasi. *J. Ilm. Rekayasa Pertan. dan Biosist.* **2019**, 7, 139–147, doi:10.29303/jrpb.v7i2.69.
31. Khairina, Z.; Djali, M.; Andoyo, R. Optimasi Proses Produksi Biskuit Tinggi Protein Berbasis Soy Protein Concentrate (SPC). *J. Mutu Pangan Indones. J. Food Qual.* **2025**, 12, 37–46, doi:10.29244/jmpi.2025.12.1.37.

32. Prabudi, M.; Nurtama, B.; Purnomo, E.H. Aplikasi Response Surface Methodology (RSM) Dengan Historical Data Pada Optimasi Proses Produksi Burger. *J. Mutu Pangan* **2018**, *5*, 109–115.
33. Fatmawati, A.H.; Adawiyah, D.R.; Wulandari, N. Optimasi Formula Produk Gel Oles Berbahan Dasar Biji Selasih Menggunakan Teknik Response Surface Methodology. *agriTECH* **2021**, *41*, 294, doi:10.22146/agritech.55833.
34. Hidayat, I.R.; Zuhrotun, A.; Sopyan, I. Design-Expert Software Sebagai Alat Optimasi Formulasi Sediaan Farmasi. *Maj. Farmasetika* **2020**, *6*, 99–120, doi:10.24198/mfarmasetika.v6i1.27842.
35. Renaldi, M.I.; Dwiyanto, H.A.; Siswati, N.D.; Susilowati; Triana, N.W. Ekstraksi Saponin Dari Daun Sengon (*Paraserianthes Falcataria* (L.) Nielsen) Menggunakan Pelarut Etanol Dengan Metode Soxhletasi. **2025**, *14*, 23–30.
36. Noble, J.E.; Bailey, M.J.A. *Chapter 8 Quantitation of Protein*; 1st ed.; Academic Press, 2009; Vol. 463;.
37. Shen, C.-H. Quantification and Analysis of Proteins. *Diagnostic Mol. Biol.* **2023**, 231–257, doi:10.1016/B978-0-323-91788-9.00002-8.
38. Puspitasari, A.D.; Sumantri, S.; Murwati, D.B.; Irawan, I. Pengaruh Suhu Dan Lama Penyimpanan Terhadap Kadar Lesitin Dalam Susu Kedelai Dan Soygurt Secara Spektrofotometri UV-Vis. *J. Ilm. Teknosains* **2018**, *4*, 62–68, doi:10.26877/jitek.v4i2.3172.
39. Optimasi Metode Ekstraksi Albumin Dari Ikan Gabus (*Channa Striata*). *JPSCR J. Pharm. Sci. Clin. Res.* **2023**, *8*, 385–393, doi:10.20961/jpscr.v8i3.66952.
40. Pradana, A.; Aisiyah, S.; Purwaningsih, D. Optimasi Gelling Agent Pada Sediaan Gummy Candy Parasetamol Dengan Metode Simplex Lattice Design. *J. Farm. (Journal Pharm.* **2024**, *13*, 1–12.
41. Hashmi, S.A.; Alegete, P. QbD Green Analytical Procedure for the Quantification of Tolvaptan by Utilizing Stability Indicating UHPLC Method. *BMC Chem.* **2024**, *18*, 1–19, doi:10.1186/s13065-024-01214-2.
42. Fatimah, S.F.; Edityaningrum, C.A.; Istyqomah, W.N.; Gandjar, I.G.; Nurani, L.H. Validasi Metode Kromatografi Lapis Tipis (KLT)-Desintometri Untuk Penetapan Kadar β -Karoten Dalam Tablet Kunyah Ekstrak Spirulina Platensis. *J. Imiah Ibnu Sina* **2020**, *5*, 137–148.
43. Trisnawati, N.N.; Dewi, I.G.A.K.S.P.; Suari, P.P. V; Krimayanti, N.P.A. Validasi Metode Uji Merkuri Menggunakan Inductively Coupled Plasma Emission Spectrometry (ICPE) 9000. *Cakra Kim. (Indonesian E-Journal Appl. Chem.* **2022**, *10*, 86–90.
44. Ratnawati, N.A.; Prasetya, A.; Rahayu, E.F. Validasi Metode Pengujian Logam Berat Timbal (Pb) Dengan Destruksi Basah Menggunakan FAAS Dalam Sedimen Sungai Banjir Kanal Barat Semarang. *Indones. J. Chem. Sci.* **2019**, *8*, 60–68.
45. Faridah, A. Optimasi Produksi Tepung Porang Dari Chip Porang Secara Mekanis Dengan Metode Permukaan Respons. *J. Tek. Ind.* **2012**, *13*, 158–166.
46. Stat-Ease Stat-Ease » V25.0 » Tutorials » Response Surface Part 1/3 – The Basics Response Surface Design and Analysis Available online: <https://statease.com/docs/latest/tutorials/multifactor-rsm/> (accessed on 28 June 2025).
47. Jannah, S.; Hajrin, W.; Hanifa, N.I. Optimasi Formula Sampo Ekstrak Etanol Daun Delima (*Punica Granatum* L.) Dengan Metode Simplex Lattice Design. *Sasambo J. Pharm.* **2024**, *5*, 71–82, doi:10.29303/sjp.v5i2.347.
48. Fajrin, J.; Hariyadi, H.; Marchelina, N. Aplikasi Metode Eksperimen Response Surface Untuk Mengoptimalkan Kuat Tekan Bata Non Bakar. *J. Rekayasa Sipil* **2017**, *13*, 79, doi:10.25077/jrs.13.2.79-90.2017.
49. Ningsih, D.A.; Nurhasanah; Fadillah, L. Efektivitas Pembelajaran Di Luar Kelas Dalam Pembentukan Sikap Percaya Diri Peserta Didik Pada Mata Pelajaran Ipa Di Kelas V Sdn 190 Cerning. *Pendidik. Dasar dan Kegur.* **2019**, *4*, 1–12.
50. Mirratunnisya; Ujianti, R.M.D.; Muflihati, I.; Nurdyansyah, F. Studi Pembuatan Flakes Dari Ubi Jalar Putih (*Ipomea Batatas*) Dan Kacang Hijau (*Vigna Radiata* L.). *TEKNOBUGA J. Teknol. Busana dan Boga* **2022**, *10*, 124–130, doi:10.15294/teknobuga.v10i2.33331.
51. Estiasih, T.; Harijono; Waziirroh, E.; Fibrianto, K. Kimia Dan Fisik Pangan - Google Books Available online: https://www.google.co.id/books/edition/Kimia_dan_Fisik_Pangan/V9IYEAAQBAJ?hl=id&gbpv=0 (accessed on 9 July 2025).
52. Chatterjee, S.; Sarkar, A.; Boland, M.J. The World Supply of Food and the Role of Dairy Protein. In *Milk Proteins: From Expression to Food*; Elsevier Inc., 2014; pp. 1–18 ISBN 9780128152515.

53. Kusnandar, F. Kimia Pangan Komponen Makro - Google Books Available online: https://www.google.co.id/books/edition/Kimia_Pangan_Komponen_Makro/JIX5DwAAQBAJ?hl=id&gbpv=0 (accessed on 9 July 2025).
54. Susilo, A.; Rosyidi, D.; Jaya, F.; Apriliyani, A.W. Dasar Teknologi Hasil Ternak - Google Books Available online: https://www.google.co.id/books/edition/Dasar_Teknologi_Hasil_Ternak/vg6QDwAAQBAJ?hl=id&gbpv=0 (accessed on 9 July 2025).
55. Lumowa, S.V.T.; Nurani, I. Pengaruh Perendaman Biji Kedelai (*Glycine Max*, L. Merr) Dalam Media Perasan Kulit Nanas (*Ananas Comosus* (Linn.) Merrill) Terhadap Kadar Protein Pada Pembuatan Tempe. *J. EduBio Trop.* **2014**, 2, 187–350.
56. Hapsari, R.B.; Pranoto, Y.; Murdiati, A.; Supriyanto, S. Optimasi Proses Nanopresipitasi Pada Nanoenkapsulasi Ekstrak Kasar Daun Kakao (*Theobroma Cacao* L.) Menggunakan Response Surface Methodology (RSM). *agriTECH* **2022**, 42, 75–85, doi:10.22146/agritech.49872.
57. Hendrikayanti, R. Optimasi Waktu Pengukusan Dan Suhu Penggorengan Kerupuk Ikan Patin Menggunakan Response Surface Methodology. *JFMR-Journal Fish. Mar. Res.* **2022**, 6, 78–90, doi:10.21776/ub.jfmr.2022.006.01.10.