

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan

3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan adalah :

- Gelas beker
- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Pengaduk
- Pipet tetes
- Pipet ukur
- Kapiler halus
- Corong gelas
- Corong buchner
- Botol-botol kaca
- Kolom kromatografi
- Rotavapor ("Rotary evaporator")
- Perangkat soklet
- Blender
- Oven
- Penangas
- Neraca
- Statif dan klem

- Pemanas listrik
- Lampu ultra violet
- Alat penentu titik leleh "Fisher John"
- Spektrofotometer ultra violet "Secomam S 1000 PC"
- Spektrofotometer infra merah "Buck Scientific" dan "JASCO FT/IR-5300"
- Spektrometer massa "JEOL-JMS DX 303"

3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah :

- Biji kakao lindak
- Petroleum benzin 40-60°C (p.a)
- Kloroform (teknis)
- n-heksana (p.a)
- Toluena (p.a)
- Etil asetat (p.a dan teknis)
- Metanol (p.a dan teknis)
- Akuades
- Theobromin standar
- Plat silika gel 60 F₂₅₄
- Silika gel 60 untuk kromatografi kolom (70-230 mesh)
- Kapur tohor
- Kertas saring

3.2 Percobaan

3.2.1 Penyiapan sampel

Buah kakao jenis lindak dibelah dan bijinya yang dilapisi pulp diambil. Pulp dihilangkan dengan meremas biji-biji tersebut dalam serbuk gergaji dan kemudian dicuci dengan air. Lendir yang tersisa setelah pencucian dikurangi dengan mengaduknya dalam air kapur dan lalu dibilas lagi dengan air. Pengeringan dilakukan dengan meletakkan biji-biji yang sudah bersih ke dalam beberapa wadah lalu dikeringkan dalam oven pada 55°C. Biji-biji yang telah kering dihaluskan dengan blender.

3.2.2 Ekstraksi lemak

Sebanyak 1,245 kg serbuk kering biji kakao dibagi menjadi beberapa bagian dan masing-masing bagian dibungkus dengan kertas saring hingga menyerupai silinder. Kemudian secara bergantian dimasukkan ke dalam alat soklet untuk diekstraksi lemaknya dengan pelarut petroleum benzin 40-60°C selama ± 18 jam. Setelah selesai, serbuk dikeringkan kembali untuk menghilangkan sisa pelarut.

3.2.3 Ekstraksi theobromin

Serbuk biji kakao kering yang telah diekstraksi lemaknya, diekstraksi theobrominnya dengan cara yang sama

seperti pada ekstraksi lemak. Ekstraksi menggunakan pelarut kloroform dalam alat soklet selama \pm 20 jam. Endapan yang terjadi disaring, sedangkan filtrat kloroform yang berwarna kuning diuapkan dengan "rotavapor" sehingga didapatkan ekstrak kental. Endapan yang diperoleh tadi dicuci dengan petroleum benzin. Dalam penjelasan selanjutnya endapan yang telah dicuci itu diberi kode E₁.

3.2.4 Pemeriksaan hasil ekstraksi

Pemeriksaan dilakukan dengan kromatografi lapis tipis (KLT). Endapan berkode E₁ dan ekstrak kental diperiksa dengan KLT pada plat silika gel 60 F₂₅₄ yang telah diaktifkan pada 110°C selama \pm 1 jam. Larutan theobromin standar disertakan sebagai pembanding. Pengembangan menggunakan beberapa pelarut tunggal seperti n-heksana, toluena, etil asetat dan metanol. Setelah dilakukan dengan beberapa pelarut tunggal, maka dicoba dengan campuran etil asetat-metanol. Lampu ultra violet digunakan sebagai penampak noda, sehingga noda kelihatan gelap pada latar belakang berfluoresensi hijau.

3.2.5 Pemisahan dengan kromatografi kolom

Ekstrak kental mengandung beberapa komponen, sehingga perlu dipisahkan untuk mengetahui komponen-komponen tersebut. Dalam hal ini digunakan kromatografi kolom.

Kolom kromatografi yang digunakan berdiameter 2 cm dan panjang 50 cm. Sebelum digunakan, kolom dicuci dengan deterjen dan dibilas dengan aquadest, kemudian dikeringkan. Kolom dibilas dengan pelarut pengelusi yang akan digunakan (etil asetat-metanol=9:1). Pada pengemasan kolom ini pelarut yang digunakan sama dengan pelarut pengelusi. Kolom diklem pada statif dan diisi pelarut seperempatnya lalu kertas saring berbentuk lingkaran sebesar diameter kolom dimasukkan.

Kromatografi kolom menggunakan adsorben silika gel 60 (70-230 mesh) yang telah diaktifkan pada 110°C selama 1 jam. Silika gel dibuat bubuk dengan pelarut dan dimasukkan ke dalam kolom melalui corong. Selama bubuk silika gel dimasukkan, kran pada kolom dibuka dan kolom diketuk-ketuk. Pengisian dilakukan hingga kira-kira dua pertiga kolom. Setelah selesai, pelarut tetap dialirkan dan dibiarkan keluar melalui kran sambil kolom juga tetap diketuk-ketuk. Hal ini dilakukan hingga silika gel dalam kolom cukup padat. Kemudian kran ditutup dengan pelarut masih melebihi permukaan silika gel. Kertas saring sebesar diameter kolom diletakkan pada permukaan silika gel.

Sampel ekstrak kental sebanyak 1,5 g ditambah pelarut seperlunya, dicampur dengan sedikit (2-3 g) silika gel, diaduk rata hingga kering dan kemudian dimasukkan pada bagian atas silika gel dalam kolom melalui corong lalu didiamkan selama 1 jam. Kolom dielusi dengan mengalirkan

pelarut, dan pelarut (bersama senyawa yang terbawa di dalamnya) yang keluar melalui kran ditampung dalam botol-botol kaca tiap 5 ml. Fraksi-fraksi yang didapat dalam botol-botol kaca tersebut diperiksa dengan KLT dan fraksi yang menunjukkan hasil yang sama dapat digabungkan.

3.2.6 Pemurnian dan pemeriksaan hasil pemurnian

Pemurnian endapan berkode E₁ dilakukan dengan cara rekristalisasi menggunakan pelarut metanol. Endapan berkode E₁ dilarutkan dalam metanol dan dipanaskan hingga larut semuanya. Dalam keadaan panas, larutan disaring dan filtratnya didinginkan hingga kristal terbentuk. Kristal tersebut disaring sedangkan filtratnya dapat langsung disimpan kembali dalam keadaan dingin. Proses tersebut diulang sekali lagi pada kristal yang diperoleh hingga kristal murni dan warnanya putih bersih. Kristal yang didapat dari kromatografi kolom juga dimurnikan dengan metanol.

Kristal hasil pemurnian diuji dengan KLT dua dimensi menggunakan pelarut pengembang pertama dan kedua berturut-turut etil asetat-metanol (9:1) dan (4:1). Untuk senyawa yang sesuai dilakukan KLT dengan membandingkannya dengan theobromin standar.

3.2.7 Identifikasi

Spektrum ultra violet sampel didapatkan dengan spektrofotometer "Secomam S 1000 PC" dengan pelarut metanol.

Spektrum infra merah didapatkan dengan spektrofotometer "Buck Scientific" dan "JASCO FT/IR-5300" menggunakan cara lempeng KBr.

Spektrum massa didapatkan dengan spektrometer "JEOL-JMS DX 303".

