

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Sampel Tumbuhan

Sampel tumbuhan yang digunakan untuk penelitian ini adalah biji species *Theobroma cacao* L. jenis lindak yang telah difermentasi, dikeringkan, dikuliti dan dihaluskan. Sampel diambil dari Kebun Percobaan Pusat Penelitian Kopi dan Kakao Jember.

3.1.2. Alat-alat

- Tabung reaksi
- Pipet tetes
- Perkulator
- Erlenmeyer
- Beaker glass
- Blender
- Pengaduk
- Gelas ukur
- Labu takar
- Corong
- Corong pisah
- Neraca analitis
- Corong Buchner
- Lampu UV

- 1 set peralatan kromatografi lapis tipis
- 1 set peralatan refluks
- Rotavapor
- Alat penentu titik leleh "Fisher John"
- Spektrofotometer ultraviolet-tampak "S1000PC Secomam"
- Spektrofotometer inframerah "Buck Scientific Inc, M 500"
- Spektrometer massa "JEOL - JMS DX 303".
- Kromatografi cair kinerja tinggi "SHIMADZU"

3.1.3. Bahan-bahan Kimia

- Akuades
- Akuabides
- Metanol p.a.
- Etil asetat p.a.
- Asam klorida pekat
- Asam asetat glasial
- t-butanol p.a.
- Ferri klorida
- Serbuk magnesium
- Pereaksi fehling
- Kloroform p.a.
- Natrium hidroksida
- Aluminium klorida
- Natrium asetat anhidrat
- Asam borat anhidrat
- Kalium bromida
- Eter

3.1.4. Pembuatan Larutan

Larutan FeCl_3 1 %

Sebanyak 1 g FeCl_3 dilarutkan dalam air suling dalam labu takar 100 ml hingga tanda batas.

Larutan TBA (3:1:1)

Dibuat dengan mencampur 30 ml t-butanol, 10 ml asam asetat glasial dan 10 ml air suling.

Larutan TBA (1:1:3)

Dibuat dengan mencampur 10 ml t-butanol, 10 ml asam asetat glasial dan 30 ml air suling.

Larutan HCl 2 N

HCl pekat sebanyak 17 ml diencerkan dengan air suling dalam labu takar 100 ml hingga tanda batas.

Larutan NaOH 2 M

Sebanyak 8 g NaOH dilarutkan dalam air suling hingga 100 ml lalu dididihkan dan setelah dingin disimpan dalam botol kaca.

Larutan HCl sebagai pereaksi geser dalam spektroskopi ultraviolet-tampak.

Sebanyak 50 ml HCl pekat ditambahkan ke dalam 100 ml air suling.

Larutan Fase Gerak KCKT

Dibuat dengan mencampur aquabides, metanol dan asam asetat glasial dengan perbandingan volume 87:8:5.

3.2. Metoda Kerja

3.2.1. Perlakuan terhadap Bahan

Buah kakao (*Theobroma cacao L*) jenis lindak dibelah, diambil bijinya lalu difermentasi selama 5 hari. Setelah itu biji dikeringkan, kemudian dikuliti. Keping biji yang diperoleh dihaluskan.

3.2.2. Uji Pendahuluan

Pengujian Adanya Fenol

Sampel ditambah dengan air suling kemudian dipanaskan hingga mendidih. Air rebusan disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ke dalamnya ditambahkan larutan FeCl_3 1 %. Adanya perubahan warna dari hijau sampai hitam menunjukkan adanya fenol dalam sampel.

Pengujian Adanya Gula

Sampel di ekstrak dengan air. Filtratnya disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Ke dalam filtrat ini ditambahkan pereaksi Fehling dan dipanaskan. Perubahan warna dari biru, hijau, kuning, kemerah-merahan dan akhirnya terbentuk endapan merah bata, menunjukkan adanya gula dalam sampel.

Uji Shinoda

Sampel diekstrak dengan etanol. Filtratnya disaring dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ke dalamnya ditambahkan berturut-turut serbuk Mg dan beberapa tetes HCl pekat. Apabila terjadi warna merah lembayung bila diperiksa dengan latar belakang putih maka didalam ekstrak terdapat flavanoid.

3.2.3. Pembuatan Ekstrak dan Pengujian Ekstrak

Serbuk keping biji kakao lindak sebanyak 1 kg diekstrak dalam dua tahap : pertama dengan metanol - air (9:1) dan kedua dengan metanol - air (1:1), masing-masing direndam selama 2 x 24 jam. Penyaringan untuk memisahkan ekstrak dari serbuk keping biji kakao dilakukan dengan menggunakan corong Buchner. Kedua ekstrak kemudian disatukan dan diuapkan dengan menggunakan alat rotavapor hingga volumenya menjadi sepertiga volume asal.

Ekstrak air yang diperoleh dapat dibebaskan dari senyawa yang kepolarannya rendah dengan ekstraksi dalam corong pisah menggunakan kloroform. Ekstraksi dilakukan beberapa kali (4 x 80 ml), kemudian ekstrak yang diperoleh disatukan.

Terhadap ekstrak air dilakukan pengujian untuk mengidentifikasi adanya flavonoid yaitu dengan

menggunakan larutan FeCl_3 1% serta dengan serbuk Mg dan HCl pekat. Adanya gula dalam ekstrak dapat diidentifikasi dengan menggunakan pereaksi fehling. Pengujian positif bila ekstrak ditambah pereaksi fehling A dan fehling B kemudian dipanaskan menghasilkan endapan merah bata.

Untuk mengetahui jumlah komponen senyawa dalam ekstrak dilakukan kromatografi lapis tipis dengan pelarut TBA (3:1:1). Deteksi noda kromatogram menggunakan sinar ultraviolet.

3.2.4. Hidrolisis

Ekstrak air diuapkan hingga kering. Padatan glikosida yang terbentuk (33,35 gr) dilarutkan dalam 100 ml metanol dan 100 ml HCl 2 N dalam labu bulat, kemudian direfluks pada penangas air selama 3 jam. Hidrolisat yang diperoleh dinetralkan dengan NaOH, setelah itu diuapkan sampai semua metanol menguap.

3.2.5. Pemisahan dan Pemurnian

Lapisan air diekstraksi dengan eter (8 x 40 ml). Fraksi eter dikromatografi lapis tipis dengan pengembang TBA (3:1:1). Lapisan air sisa ekstraksi eter dipanaskan pada 34°C selama 3 menit. Setelah dingin lapisan air tersebut diekstraksi dengan etil asetat (10 x 50 ml). Fraksi etil asetat yang

diperoleh dikromatografi lapis tipis dengan pengembang TBA (3:1:1). Setelah itu fraksi etil asetat diuapkan sampai kering, kemudian padatan yang diperoleh dimurnikan dengan pelarut metanol.

3.2.6. Analisis Spektroskopi

Struktur hasil isolasi dapat ditentukan dengan analisis spektroskopi yaitu dengan menggunakan metoda spektroskopi ultraviolet-tampak, spektroskopi inframerah dan spektrometri massa.

Analisis Spektroskopi Ultraviolet-tampak

Spektrofotometer yang digunakan adalah "SECOMAM S. 1000 PC". Pelarut yang digunakan adalah metanol. Kedudukan gugus hidroksi fenol bebas pada inti flavonoid ditentukan dengan penambahan pereaksi geser. Tahapan kerja penggunaan pereaksi geser adalah sebagai berikut :

- a. Setelah mengukur spektrum cuplikan dalam metanol, ke dalam kuvet ditambahkan tiga tetes NaOH 2 M lalu dikocok dan diukur spektrumnya. Kemudian cuplikan dibuang dan kuvet yang telah dicuci diisi lagi dengan larutan flavonoid persediaan.
- b. Enam tetes pereaksi $AlCl_3$ 5% ditambahkan ke dalam larutan flavonoid lalu dikocok dan diukur spektrumnya. Selanjutnya ditambahkan tiga tetes

HCl, dicampur dan diukur spektrumnya. Akhirnya cuplikan dibuang, kuvet dicuci dan diisi lagi dengan larutan flavonoid persediaan.

- c. Ke dalam larutan flavonoid persediaan dalam kuvet ditambahkan serbuk NaOAc. Campuran dicampur baik-baik dan diukur spektrumnya. Selanjutnya ditambahkan asam borat dan diukur spektrumnya.

Analisis Spektroskopi Inframerah

Spektroskopi yang digunakan adalah "Buck Scientific Inc, M500" dengan menggunakan pelet KBr.

Analisis Spektrometri massa

Spektrum massa sampel didapatkan dari spektrometer massa "JEOL-JMS DX 303".

3.2.7. Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi

Kromatogram sampel didapatkan dari kromatografi cair kinerja tinggi "SHIMADZU" dengan kolom C₁₈, detektor UV (280 nm) dengan laju aliran 2 ml/menit.

Pelarut yang dipakai adalah metanol dan fasa geraknya adalah akuabides-metanol-asam asetat glasial (87:8:5).