

BAB IV

HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Hasil Uji Pendahuluan

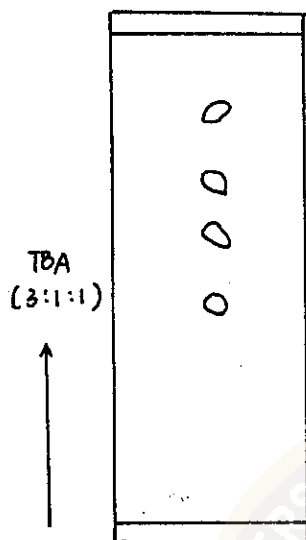
Pengujian adanya fenol yang dilakukan pada sampel menggunakan larutan FeCl_3 1% menghasilkan larutan hijau kehitaman, yang berarti terdapat fenol di dalamnya. Pada pengujian dengan menggunakan serbuk Mg dan HCl pekat, warna larutan adalah merah muda. Hasil pengujian ini menunjukkan adanya kandungan senyawa flavonoid dalam sampel. Hasil pengujian adanya gula dengan pereaksi Fehling menunjukkan adanya endapan oranye ini menunjukkan hasil yang positif adanya gula dalam sampel.

4.2. Hasil Pengujian Ekstrak

Hasil pengujian pada ekstrak dengan menggunakan larutan FeCl_3 1% menunjukkan perubahan warna dari coklat tua menjadi hijau kehitaman. Sedangkan pada pengujian dengan menggunakan serbuk Mg dan HCl pekat larutan berubah menjadi coklat muda. Hasil pengujian ini menunjukkan adanya senyawa flavonoid dalam ekstrak.

Pengujian adanya gula dengan menggunakan pereaksi Fehling menunjukkan adanya endapan coklat. Hasil ini menunjukkan adanya gula dalam ekstrak.

Kromatogram hasil kromatografi lapis tipis ekstrak awal menggunakan fasa diam silika gel G F₂₅₄ serta fasa gerak TBA (3:1:1) menunjukkan adanya 4 noda seperti yang ditunjukkan pada gambar IV.1.



Gambar IV.1. Hasil kromatografi lapis tipis terhadap ekstrak awal.

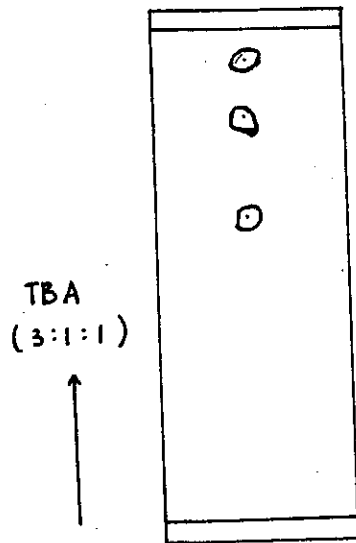
4.3. Hasil Hidrolisis dan Pemisahan

Pemutusan ikatan glikosida flavonoid agar terurai menjadi komponen-komponennya yakni gula dan aglikon pada padatan glikosida dilakukan hidrolisis menggunakan metanol : HCl 2N (1:1). Hidrolisat yang diperoleh dinetralkan dengan NaOH, lalu diuapkan sampai metanol hilang.

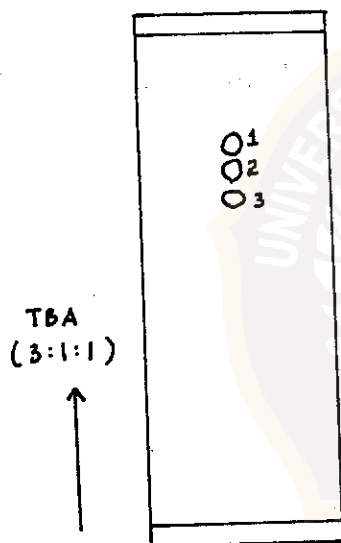
Untuk mendapatkan aglikon maka hidrolisat berturut-turut diekstraksi dengan menggunakan eter untuk aglikon yang kurang polar dan etil asetat untuk aglikon yang polar. Pada kedua fraksi diatas dilakukan penguapan sampai kering sehingga diperoleh kristal putih dengan jumlah sangat sedikit dari fraksi eter dan padatan berwarna kuning kecoklatan dari fraksi etil asetat seberat 0,47 gram. Kedua fraksi kemudian dikromatografi lapis tipis dengan pelarut TBA (3:1:1). Fraksi eter menghasilkan 3 noda seperti tampak pada gambar IV.2. Sedang fraksi etil asetat menghasilkan 3 noda seperti tampak pada gambar IV.3. Harga-harga rf dari senyawa-senyawa dalam cuplikan pada ketiga kromatogram diatas tertera pada tabel IV.1.

Tabel IV.1. Harga-harga rf senyawa-senyawa dalam cuplikan.

Senyawa	Cuplikan		
	ekstrak awal	fraksi eter	fraksi etil asetat
1	0,847	0,939	0,775
2	0,701	0,824	0,730
3	0,597	0,626	0,674
4	0,458	-	-



Gambar IV.2. Hasil kromatografi lapis tipis dengan pelarut TBA (3:1:1) terhadap fraksi eter.



Gambar IV.3. Hasil kromatografi lapis tipis dengan pelarut TBA (3:1:1) terhadap fraksi etil asetat.

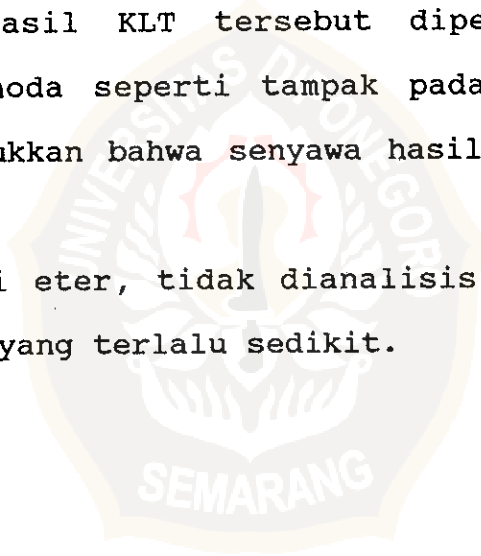
4.4. Hasil Pemurnian Senyawa

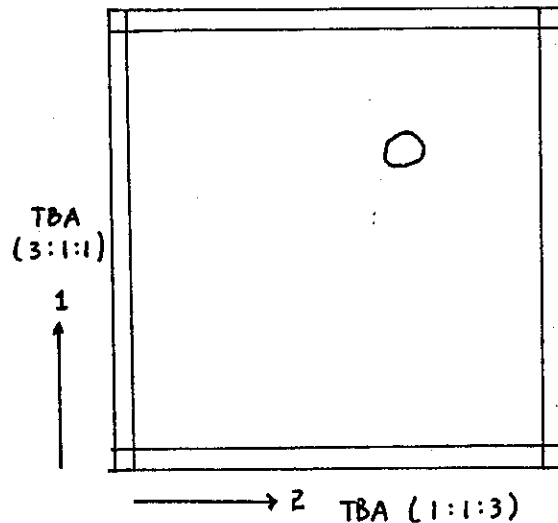
Padatan yang diperoleh dari fraksi etil asetat dilarutkan dalam pelarut metanol sesedikit mungkin.

Larutan dipanaskan kemudian disaring panas-panas. Filtrat panas ini didiamkan sehingga terbentuk endapan. Selanjutnya dilakukan penyaringan sehingga diperoleh padatan putih dan filtrat hasil rekristalisasi berwarna kuning kecoklatan. Setelah dilakukan 6 kali rekristalisasi diperoleh padatan putih dengan titik leleh 243-245°C.

Hasil rekristalisasi ini dikromatografi lapis tipis dua dimensi dengan beberapa pelarut. Pertama dengan pelarut TBA (3:1:1) dan kedua dengan pelarut TBA (1:1:3). Dari hasil KLT tersebut diperoleh masing-masingnya satu noda seperti tampak pada gambar IV.4. Hasil ini menunjukkan bahwa senyawa hasil isolasi telah murni.

Untuk fraksi eter, tidak dianalisis lebih lanjut, karena jumlahnya yang terlalu sedikit.



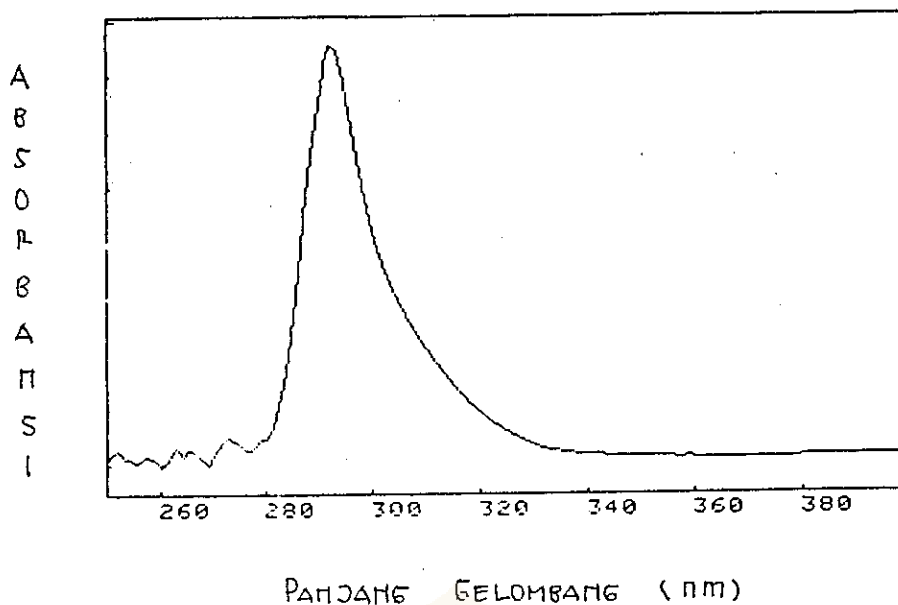


Gambar IV.4. Hasil kromatografi lapis tipis dua dimensi dengan pelarut pertama TBA (3:1:1) dan pelarut kedua TBA (1:1:3) terhadap senyawa hasil rekristalisasi.

4.5. Hasil Analisis Spektroskopi

4.5.1. Hasil Analisis Spektroskopi Ultraviolet - Tampak

Analisis spektroskopi Ultraviolet-tampak pada senyawa hasil isolasi menggunakan spektroskopi Ultraviolet-tampak "S1000PC Secomam". Dengan menggunakan pelarut metanol memberikan serapan maksimum pada 292 nm, seperti pada gambar IV.5.

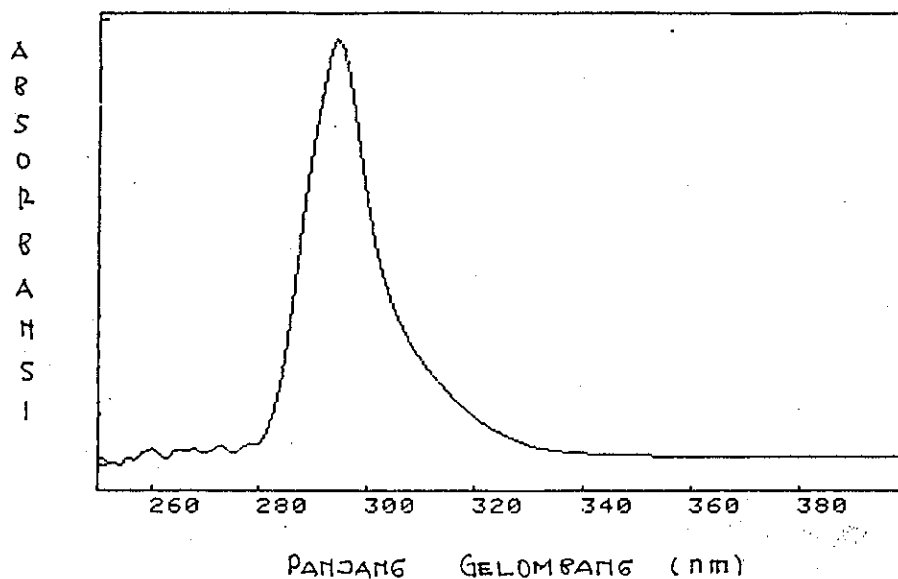


Data Primer : Widia Purwaningrum

Gambar IV.5. Spektrum ultraviolet-tampak senyawa hasil isolasi dengan menggunakan pelarut metanol.

Kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti flavonoid dapat diketahui dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi.

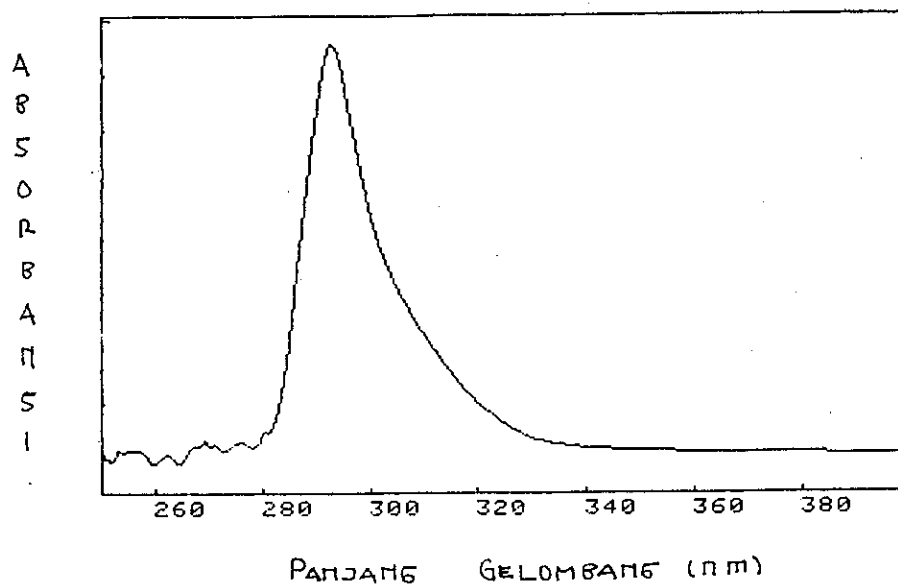
Penambahan larutan NaOH 2N pada senyawa hasil isolasi dengan pelarut metanol menghasilkan spektrum seperti pada gambar IV.6. dengan serapan maksimum pada 294,1 nm. Pergeseran panjang gelombang sebesar 2,1 nm akibat penambahan larutan NaOH 2N pada larutan cuplikan menandakan bahwa pada larutan tersebut tidak terdapat gugus hidroksil fenol bebas.



Data Primer : Widia Purwaningrum

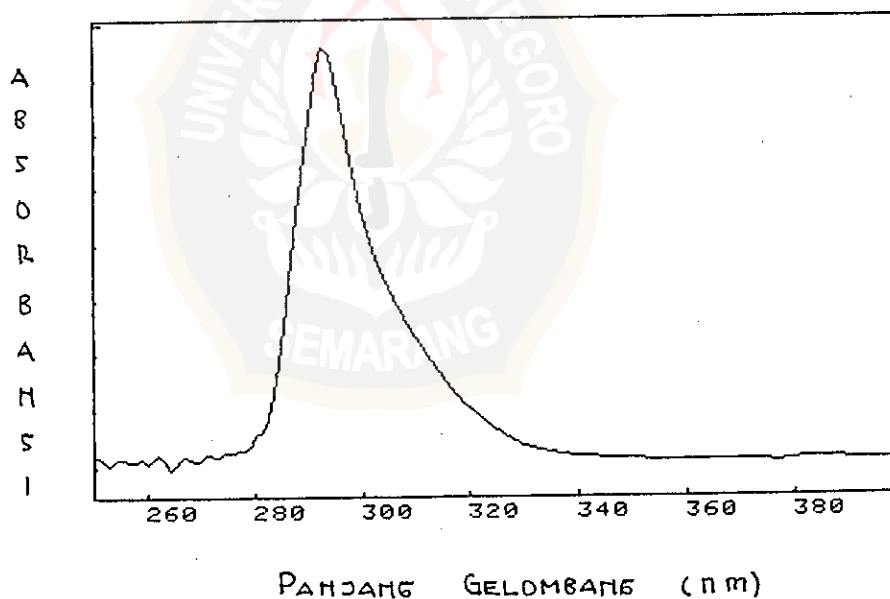
Gambar IV.6. Spektrum ultraviolet-tampak senyawa hasil isolasi dengan menggunakan pelarut metanol pada penambahan NaOH 2N.

Sedangkan penambahan NaOAc pada senyawa hasil isolasi dengan pelarut metanol menghasilkan spektrum dengan serapan maksimum pada 292,3 nm seperti terlihat pada gambar IV.7. Dengan serapan maksimum yang sama diperoleh jika kedalam larutan tersebut diatas ditambah H_3BO_3 seperti tampak pada gambar IV.8. Pergeseran panjang gelombang yang sama sebesar 0,3 nm akibat penambahan NaOAc dan H_3BO_3 menandakan bahwa pada larutan tersebut tidak terdapat adanya gugus o-dihidroksi.



Data Primer : Widia Purwaningrum

Gambar IV.7. Spektrum Ultraviolet-tampak senyawa hasil isolasi dengan menggunakan pelarut metanol pada penambahan NaOAc.

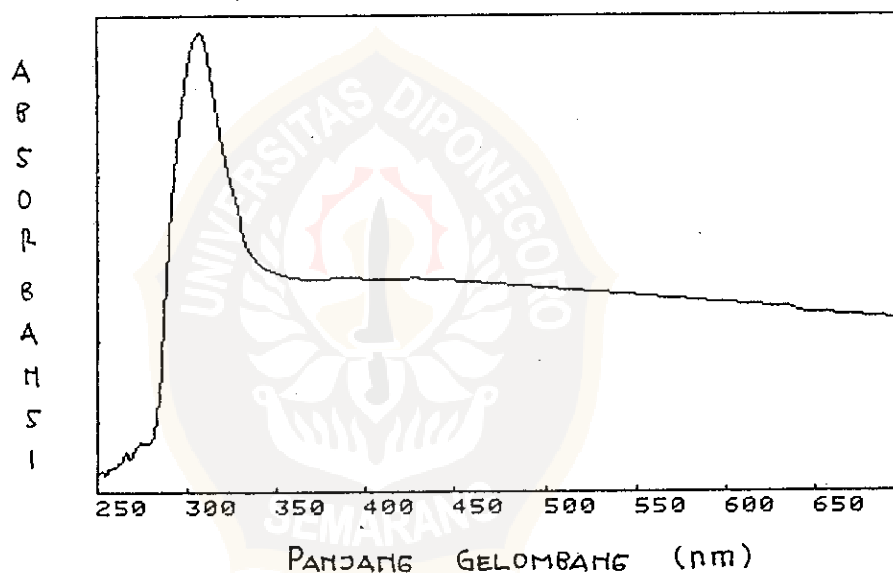


Data Primer : Widia Purwaningrum

Gambar IV.8. Spektrum ultraviolet-tampak senyawa hasil isolasi dengan menggunakan pelarut metanol pada penambahan NaOAc dan H_3BO_3 .

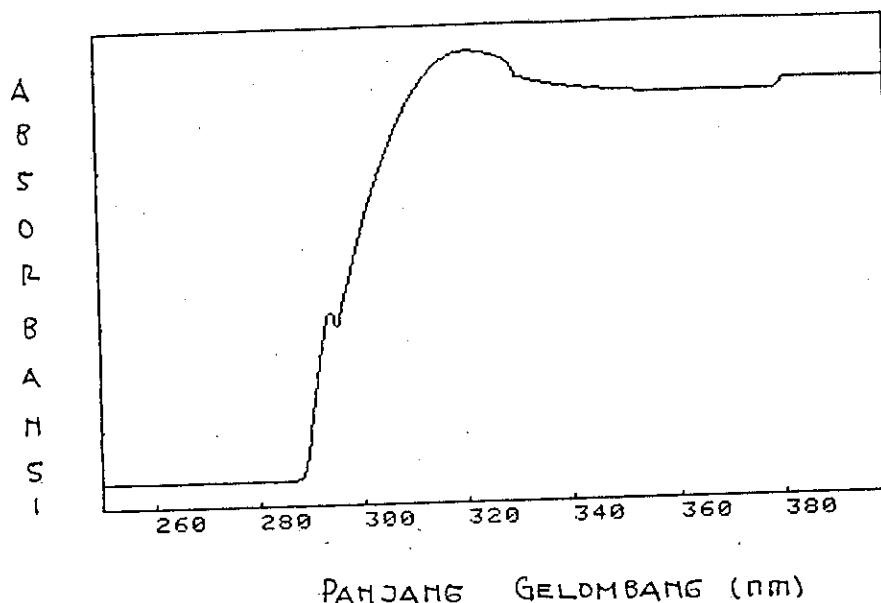
Spektrum pada gambar IV.9. dengan serapan maksimum pada 306,4 nm diperoleh jika kedalam larutan senyawa hasil isolasi dengan pelarut metanol ditambahkan larutan AlCl_3 5%. Dan bila ditambahkan HCl ke dalam larutan diatas akan dihasilkan spektrum dengan serapan maksimum pada 293,6 nm seperti pada gambar IV.10.

Pergeseran panjang gelombang sebesar 14,4 nm akibat penambahan larutan AlCl_3 5% dan 1,6 nm akibat penambahan larutan HCl menandakan tidak adanya gugus hidroksil dan keton yang bertetangga pada larutan tersebut.



Data Primer : Widia Purwaningrum

Gambar IV.9. Spektrum ultraviolet-tampak senyawa hasil isolasi dengan menggunakan pelarut metanol pada penambahan AlCl_3 5%.



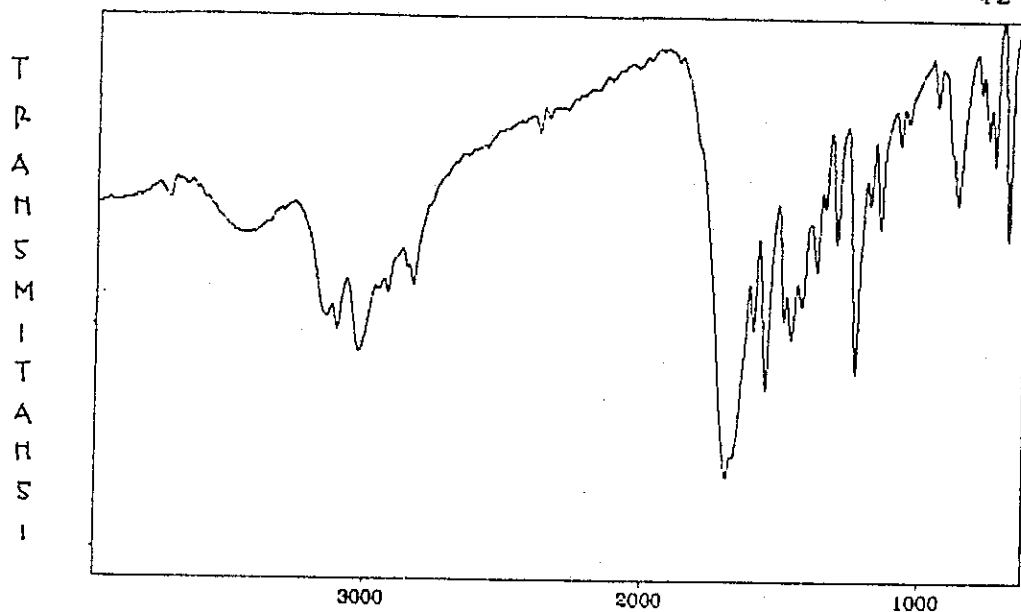
Data Primer : Widia Purwaningrum

Gambar IV.10 Spektrum ultraviolet-tampak senyawa hasil isolasi dengan menggunakan pelarut metanol pada penambahan AlCl_3 5% dan HCl .

Melihat perubahan-perubahan spektrum yang dihasilkan dengan menambahkan pereaksi geser ke dalam larutan senyawa hasil isolasi dengan pelarut metanol, maka diperkirakan bahwa senyawa tersebut tidak mempunyai gugus fungsi hidroksil ($-\text{OH}$).

4.5.2. Hasil Analisis Spektroskopi Inframerah

Analisis spektroskopi inframerah terhadap senyawa hasil isolasi menghasilkan spektrum seperti pada gambar IV.11. dengan puncak-puncak spektrum seperti tercantum pada tabel IV.2.



Data Primer : Widia Purwaningrum

Gambar IV.11 Spektrum inframerah senyawa hasil isolasi.

Tabel IV.2. Tabel hasil analisis spektroskopi inframerah. (17)

Puncak spektrum (cm ⁻¹)	Interpretasi data
3428,7	CONH amida (laktam)
3102,2	C-H metilen
3019,8	N-H amina / amida
2826,9	C-H metil
1691,5	C=C terkonjugasi dengan C=O
	C=O, puncak amida I
1623,6	C=N amina
1549,0	C=O, puncak amida II
1455,4	C=C metilen
1226,5	C-N amina/amida
861,7	C-H deformasi

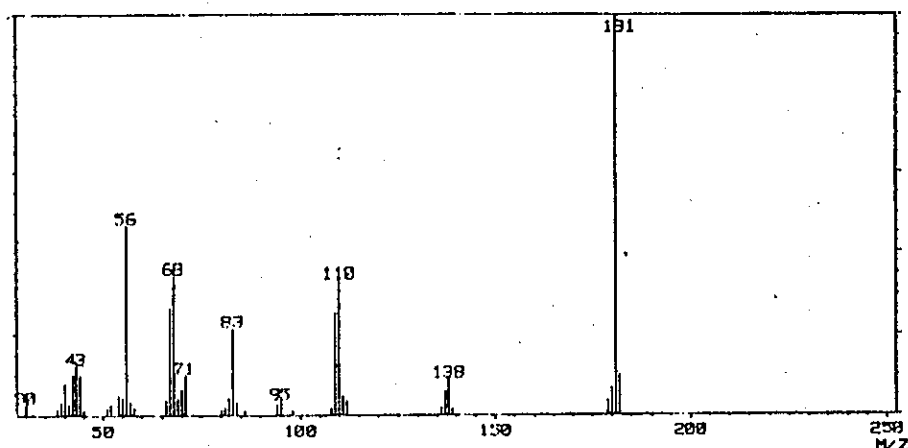
Puncak spektrum pada $1691,5 \text{ cm}^{-1}$ tampak seperti dua puncak spektrum yang menyatu. Hal ini disebabkan karena adanya ikatan C=C dan C=O yang terletak pada daerah yang berimpitan.

Gugus fungsi C=O terdapat pada dua daerah yakni pada $1691,5 \text{ cm}^{-1}$ sebagai puncak amida I dan $1549,0 \text{ cm}^{-1}$ sebagai puncak amida II. Hal ini biasa terjadi pada senyawa amida dimana puncak amida II terletak pada daerah dengan bilangan gelombang yang lebih rendah.

Analisis spektroskopi inframerah terhadap senyawa hasil isolasi memberikan keterangan tentang gugus fungsi yang terdapat pada senyawa tersebut yakni adanya gugus karbonil, alkena, amina/amida.

4.5.3. Hasil Analisis Spektrometri Massa

Spektrum massa senyawa hasil isolasi diperoleh setelah isolat diukur spektrumnya menggunakan alat spektrometer Massa "JEOL - JMS DX 303" tampak pada gambar IV.12.



Data Primer : Widia Purwaningrum

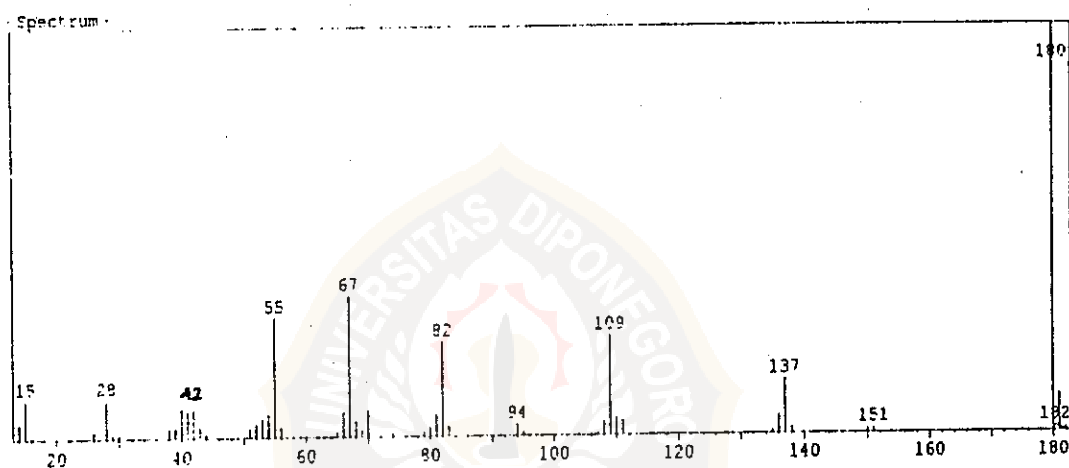
Gambar IV.12. Spektrum Massa Senyawa Hasil Isolasi.

Dari gambar diatas tampak bahwa spektrum massa isolat memberikan puncak-puncak ion molekul 43, 56, 68, 71, 83, 95, 110 dan 138, serta puncak ion dasar pada 181. Namun spektrum ini dihasilkan dengan adanya penambahan berat satu satuan massa terhadap puncak ion dasar maupun puncak-puncak ion molekul. Hal ini disebabkan karena adanya tumbukan ion molekul. Dengan demikian berarti senyawa hasil isolasi mempunyai berat molekul 180.

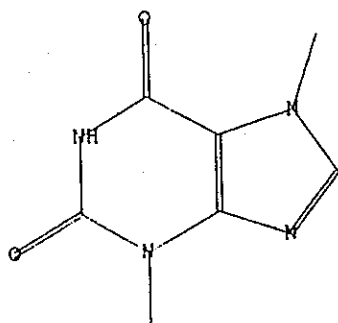
Dilihat dari pola fragmentasinya, senyawa hasil isolasi mempunyai pola fragmentasi yang mirip dengan senyawa Theobromin yang memberikan puncak-puncak ion molekul 42, 55, 67, 70, 82, 94, 109 dan 137, serta puncak ion dasar pada 180 seperti tampak pada gambar IV.13.

Berdasarkan data spektrum ultraviolet-tampak, inframerah dan spektrum massa diatas maka diduga bahwa senyawa hasil isolasi adalah theobromin.

Compound Information
 Library : NIST162
 Entry : 17601
 CAS : 81-67-0 Mol.Wgt. : 180
 Class : 2, 3
 Mol.Form. : C7H8N4O2
 Name : 1H-purine-2,6-dione, 3,7-dihydro-3,7-dimethyl- \$\$ Theobromine \$\$ Diurobromine \$\$ Santheose
 or 14090 \$\$ Teobromin \$\$ Theosalyose \$\$ Theostene \$\$ Theosal \$\$ 3,7-Dimethylxanthine \$\$ Xant
 e, 3,7-dimethyl- \$\$ 3,7-Dihydro-3,7-dimethyl-1H-purine-2,6-dione \$\$ Theosodate



Gambar IV.13 Spektrum Massa Senyawa Theobromin.



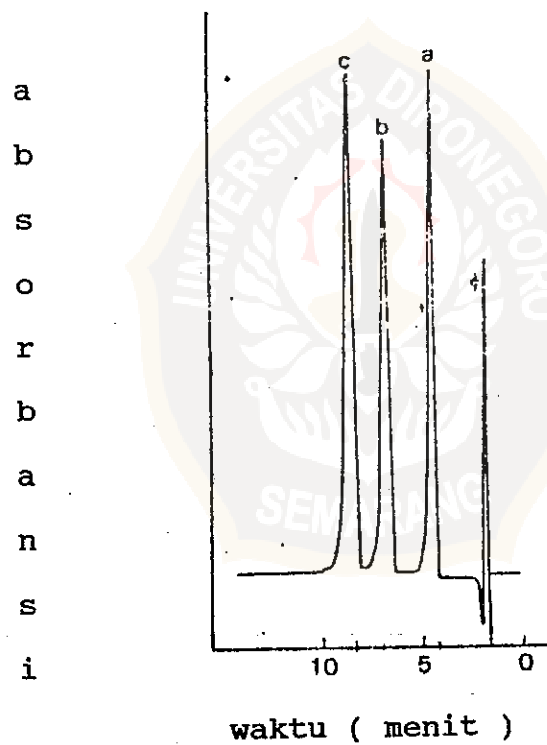
Gambar IV.14 Struktur senyawa theobromin.

4.5.4. Hasil Analisis Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Analisis pada filtrat berwarna kuning kecoklatan yang diperoleh dari rekristalisasi dilakukan dengan kromatografi cair kinerja tinggi. Penentuan komposisi eluen yang dipakai untuk analisis didasarkan pada hasil penelitian terdahulu. Sebelum dilakukan analisis, sampel yang akan diinjeksikan disaring dulu menggunakan saringan Membran Filter WTP Type Pore Size 0,5 μm . Eluen yang akan digunakan dimasukkan dalam bak ultrasonik "BRANSON 1210" untuk menghilangkan gelembung udara yang dapat mengganggu pada proses analisis KCKT.

Berikut adalah kondisi alat KCKT yang digunakan sebagai pembanding. (5).

Kolom : μ Bondapak C₁₈, 30 x 0,4 cm
Detektor : UV
Range : 2 AUFS
Panjang gelombang : 280
Eluen : Akuabides : metanol : asam asetat glasial (87:8:5)
Pelarut : Metanol.
Kecepatan alir : 2 ml/menit



Sumber : Kim dan Keeney, 1983

Gambar IV.15 Kromatogram pemisahan polifenol kakao.

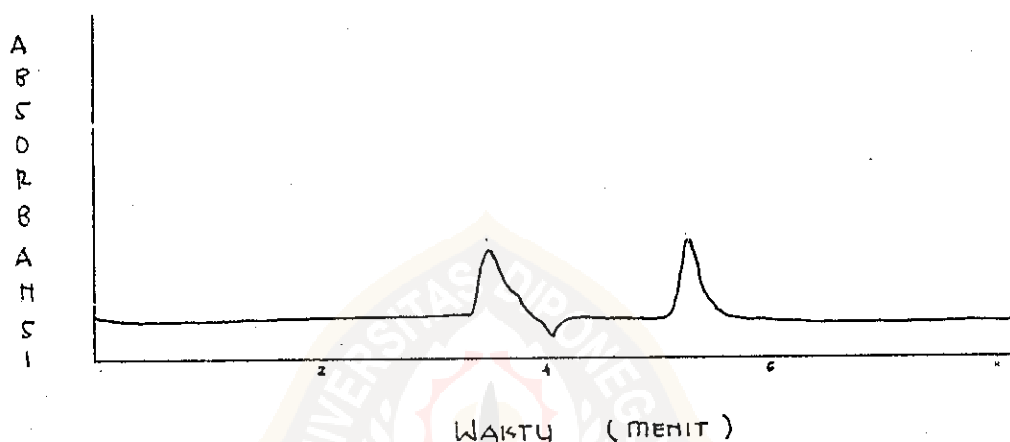
Sedangkan kondisi alat KCKT yang digunakan untuk pemisahan sampel adalah sebagai berikut :

Alat yang digunakan : KCKT "SHIMADZU"
Kolom : Shim-pack C₁₈ 25 x 0,46 cm
Detektor : UV
Range : 1 AUFS
Panjang gelombang : 280
Eluen : Akuabides : metanol : asam asetat
glasial (87:8:5)
Kecepatan alir : 2 ml/menit
Pelarut : Metanol

Kondisi ini sedikit berbeda dengan kondisi KCKT yang digunakan untuk pemisahan polifenol kakao pada referensi. Perbedaan terletak pada panjang kolom dan range. Panjang kolom mempengaruhi waktu retensi, sedangkan perbedaan range mempengaruhi sensitifitas pencatat.

Bila kita lihat definisi waktu retensi yakni waktu yang menunjukkan berapa lama suatu senyawa tertahan dalam kolom, maka semakin panjang kolom semakin lama pula waktu yang diperlukan senyawa untuk dapat keluar dari kolom. Selain panjang kolom, ukuran partikel kolom juga mempengaruhi waktu retensi, semakin kecil ukuran partikel, semakin lama senyawa akan tertahan di kolom. (18)

Karena panjang kolom yang digunakan berbeda dengan kolom pada referensi maka untuk mengetahui berapa perbandingannya dilakukan elusi terlebih dahulu terhadap pelarut yang dipakai. Metanol diinjeksikan ke alat KCKT menggunakan jarum "Syring μL 702".



Gambar IV.16 Kromatogram KCKT pelarut metanol.

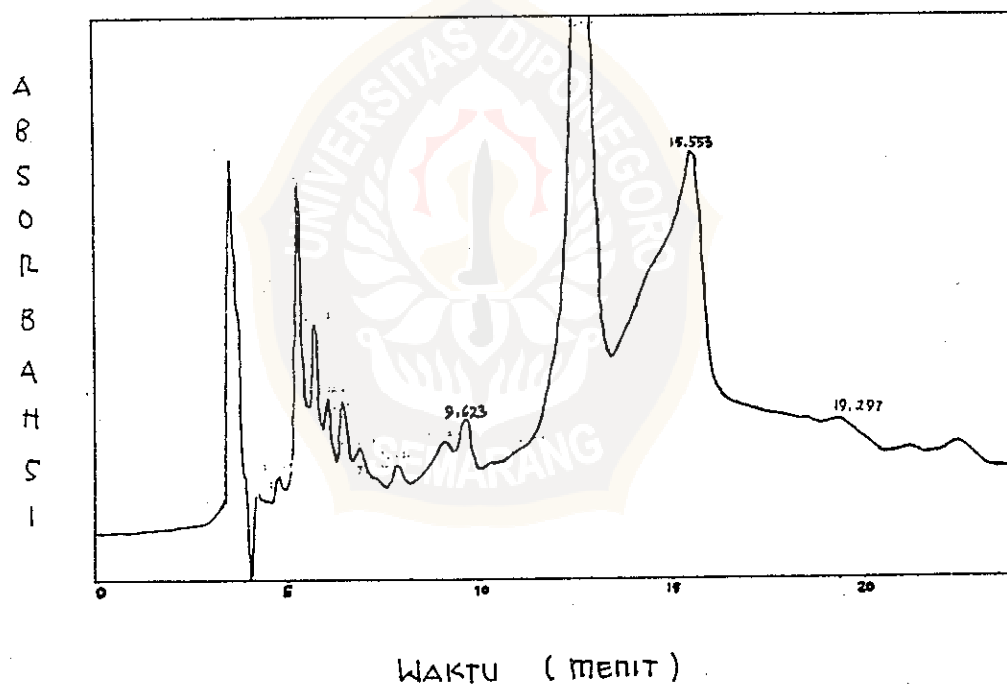
Dari kromatogram tersebut diatas diperoleh bahwa waktu retensi pelarut $\pm 3,482$, sedangkan waktu retensi pelarut pada referensi adalah $\pm 1,552$. Jadi perbandingannya :

$$\frac{3,482}{1,552} = 2,243$$

Disini terlihat bahwa waktu retensi pelarut pada analisis lebih besar daripada waktu retensi pelarut pada referensi padahal panjang kolom pada analisis lebih pendek. Hal ini mungkin disebabkan karena perbedaan ukuran partikel kolom

tersebut, dimana ukuran partikel kolom pada analisis mungkin lebih kecil dibandingkan ukuran partikel kolom pada referensi.

Kemudian sampel diinjeksikan ke alat KCKT untuk dianalisis dengan menggunakan eluen akuabides : metanol : asam asetat glasial (87:8:5). Harga waktu retensi yang diperoleh dibandingkan dengan harga waktu retensi yang sudah diketahui. Hasil pemisahan senyawa yang terdapat pada filtrat dari rekristalisasi ditunjukkan pada gambar IV.17.



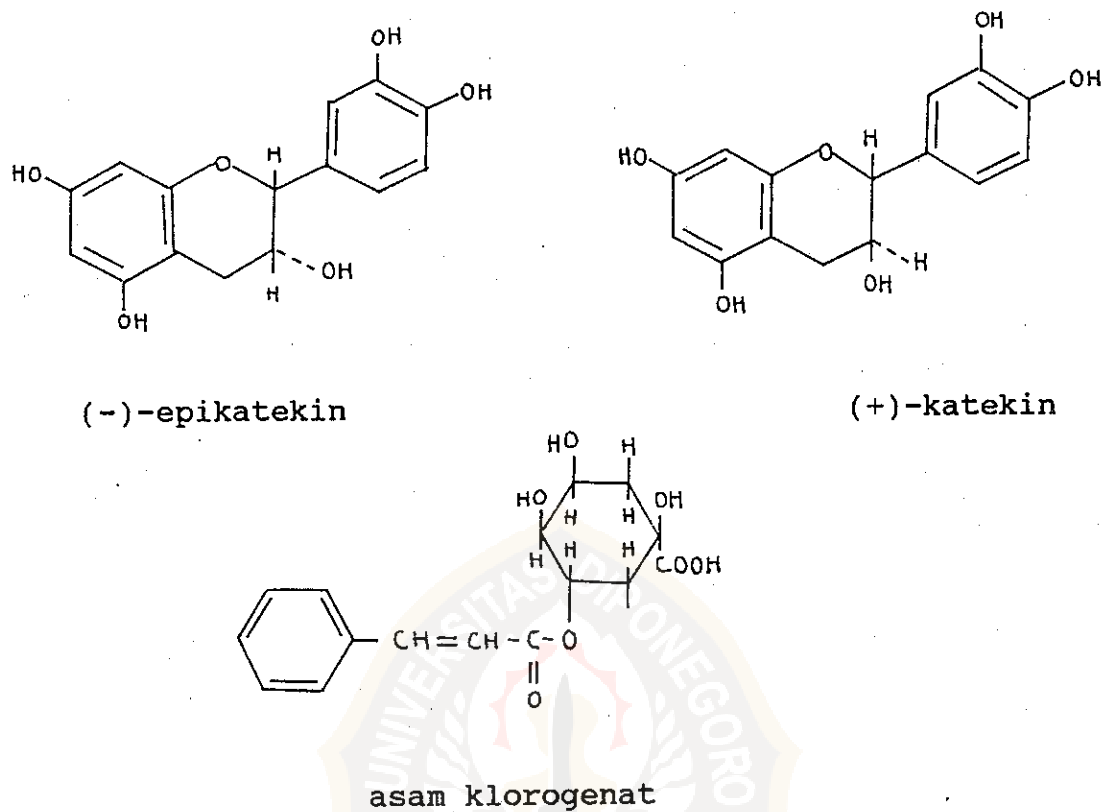
Data Primer : Widia Purwaningrum

Gambar IV.17 Kromatogram pemisahan senyawa yang terdapat pada filtrat hasil rekristalisasi.

Dari kromatogram diatas diperoleh puncak yang muncul dengan waktu retensi 19,297 menit. Dari perhitungan seharusnya muncul pada waktu retensi 18,949 menit. Perbedaan ini mungkin disebabkan oleh ketepatan waktu injeksinya yang tidak sama. Disamping itu muncul pula senyawa-senyawa dengan waktu retensi 15,553 menit dan 9,623 menit yang dari perhitungan seharusnya muncul pada waktu retensi 15,856 menit dan 9,667 menit.

Hasil membandingkan harga waktu retensi analisis dan waktu retensi referensi, dengan harga waktu retensi analisis berturut-turut 19,297 menit, 15,553 menit, 9,623 menit dan harga waktu retensi referensi berturut-turut 18,949 menit, 15,856 menit dan 9,667 menit maka disimpulkan bahwa pada filtrat terdapat senyawa (-)-epikatekin, asam krologemat dan (+)-katekin. Struktur kimia ketiga senyawa tersebut dapat dilihat pada gambar IV.18.

Dari hasil uji adanya fenol dengan larutan FeCl_3 1% pada filtrat hasil rekristalisasi memberikan warna hijau kehitaman.



Gambar IV.18 Struktur kimia senyawa (-)-epikatekin, asam klorogenat dan (+)-katekin.

Sedangkan senyawa-senyawa lain dalam filtrat belum bisa ditentukan, dalam hal ini perlu penelitian lebih lanjut.

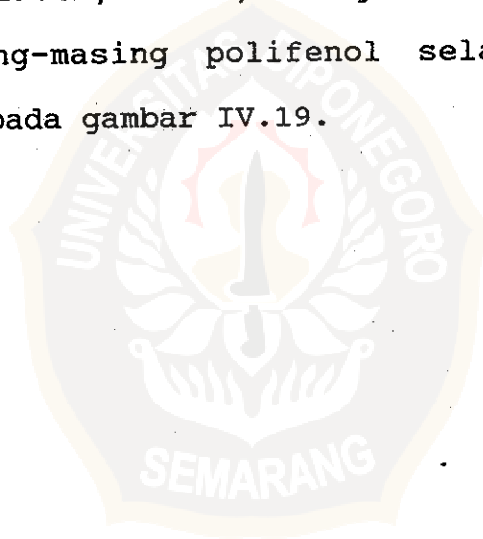
Melihat hasil penelitian bahwa senyawa hasil isolasi yang terbanyak adalah theobromin dan hanya terdapat sedikit flavonoid pada filtrat, hal ini dapat diterangkan sebagai berikut :

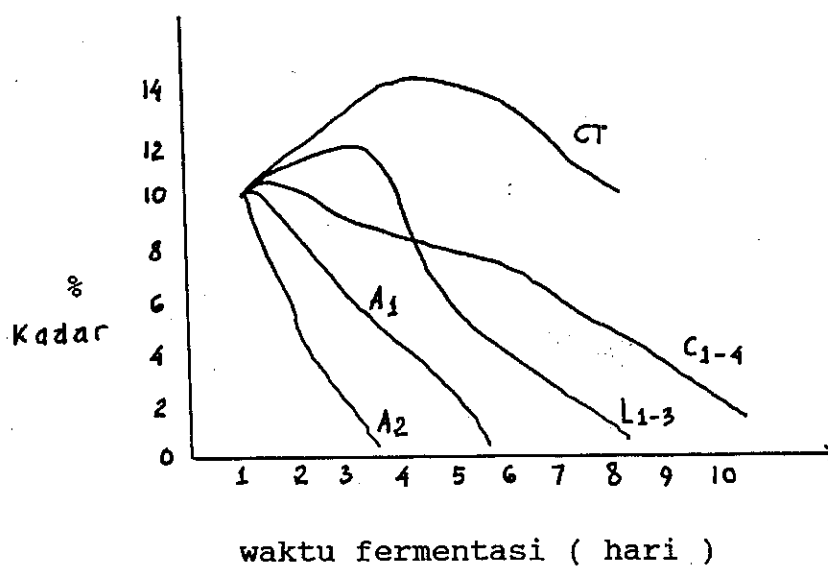
Pada biji kakao, kira-kira 12-18% dari seluruh berat biji terdiri dari polifenol.⁽⁴⁾ Selama fermentasi dan

pengeringan, perubahan kimia dalam polifenol terjadi, dimana perubahan tersebut mempengaruhi rasa dan warna dari kakao.(4,5)

Dalam biji kakao segar, polifenol terkonsentrasi dalam sel yang tak mengandung enzim. Selama fermentasi dan pengeringan, polifenol mengalami perubahan dan menurun dengan cepat. Ini terjadi ketika biji mulai memasuki fermentasi 24-28 jam yaitu ketika polifenol terdifusi dari sel untuk mengalami polimerisasi, oksidasi dan interaksi dengan protein.(4) .

Forsyth (1952b, 1957) menginformasikan tentang perubahan masing-masing polifenol selama fermentasi, seperti tampak pada gambar IV.19.





Sumber : Kim dan Keeney, 1983

Gambar IV.19 Perubahan polifenol kakao selama fermentasi.

Keterangan :

- CT : kompleks tanin
- C₁₋₄ : katekin
- L₁₋₃ : leukosianidin
- A₁ : Sianidin 3- α -L Arabinosida
- A₂ : Sianidin 3- β -D Galaktosida

Antosianin dihidrolisis oleh β -galaktosidase menjadi gula dan sianidin dan terhidrolisis total dalam waktu 6 hari. Sianidin yang terbentuk mengalami reaksi polimerisasi membentuk leukosianidin. Hasil polimerisasi sianidin menjadi leukosianidin pada awalnya meningkat, setelah itu leukosianidin bersama-sama dengan katekin menurun dengan cepat karena terdifusi, ke dalam pulp yang terfermentasi dan diubah menjadi kompleks tanin. Peningkatan kompleks tanin mencapai puncaknya pada hari ke

empat, kemudian menurun dikarenakan interaksinya dengan protein (komplek tanin-protein).⁽⁴⁾

Selama pengeringan, oksidasi enzimatis polifenol mempengaruhi warna coklat yang karakteristik dari kakao. Selama pengeringan, sebagian besar perubahan oksidatif dikatalis oleh polifenol oksidase (PPO).⁽⁴⁾ Studi Forsyth (1952 b) dan Griffith (1957) menunjukkan bahwa (-)-epikatekin dan leukosianidin adalah substrat mayor dari PPO biji kakao.

Dari keterangan diatas dan dari hasil penelitian yang diperoleh dapat disimpulkan bahwa didalam keping biji kakao lindak fermentasi 5 hari masih terdapat flavonoid yang menyumbang rasa menggigit dan pahit pada keping biji tersebut dan reaksi oksidasi enzimatis dengan (-)-epikatekin sebagai substrat mayor belum maksimal.

