

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Sampel , Alat , dan Bahan

3.1.1 Sampel

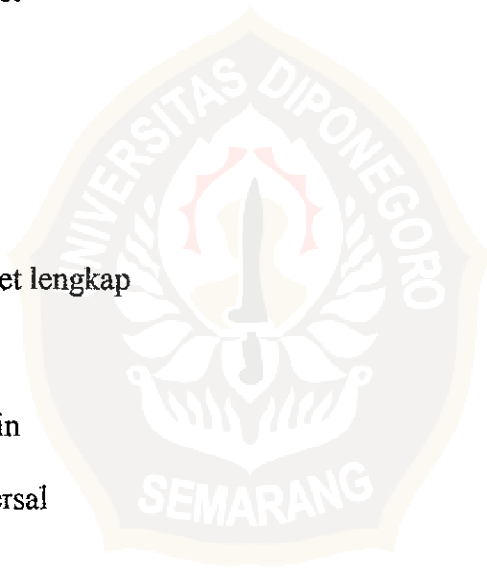
Sampel adalah tempe gembus yang diperoleh dari pengrajin tempe gembus di daerah Peterongan, Semarang. Tempe gembus ini dibuat dari ampas tahu yang difermentasikan oleh ragi tempe berupa serbuk putih yang dibeli di pasaran dengan merk Raprima (dikeluarkan oleh Koperasi Bina Kimia Bandung). Ampas tahu ini difermentasikan dengan variasi waktu fermentasi: 0; 12; 24; 36; dan 48 jam.

3.1.2 Alat

Alat yang digunakan adalah sebagai berikut :

1. gelas ukur
2. pipet tetes
3. corong gelas
4. erlenmeyer
5. penggerus
6. gelas piala
7. chamber
8. kertas saring
9. kertas Whatman

10. plat KLT
11. pipa kapiler
12. botol gelas
13. pengaduk
14. tabung reaksi
15. labu takar
16. pompa vakum
17. neraca analitik
18. rotary evaporator
19. oven
20. penangans
21. kompor listrik
22. peralatan soxhlet lengkap
23. lampu UV
24. lemari pendingin
25. kertas pH universal



3.1.3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan adalah :

1. n-heksana
2. metanol
3. aquades
4. etil asetat

5. asam format
6. asam asetat
7. butanol
8. sikloheksana
9. dikloro metana
10. etil format
11. reagen Fehling

3.2 Metode Kerja

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Diponegoro Semarang. Analisa penentuan harga peroksida dilakukan di laboratorium Kimia Bahan Pangan Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gajah Mada Yogyakarta.

3.2.1 Persiapan sampel

Pada tahap ini tempe gembus dengan variasi waktu fermentasi, masing-masing diiris-iris dan dikeringkan dalam oven dengan suhu 50°C selama 12 jam. Setelah itu digiling sehingga berbentuk serbuk.

3.2.2 Pemisahan lemak dari tepung tempe gembus ^[20]

Sampel yang sudah berbentuk serbuk diperlakukan proses soxhletasi menggunakan pelarut n-heksana selama 3-4 jam. Hasil ekstrak (berupa larutan berwarna kuning) dimasukkan dalam botol. Tepung tempe gembus yang telah

bebas lemak ditimbang sebanyak 30 g, kemudian dimasukkan pada campuran metanol-air (80 %) dengan perbandingan 1:10 dan disimpan dalam lemari pendingin (4°C) selama semalam.

3.2.3 Isolasi isoflavon dari tepung tempe gembus bebas lemak ^[20]

Campuran tepung tempe gembus dan pelarut yang telah disimpan semalaman disaring. Filtrat diuapkan dengan vakum evaporator pada suhu 40° C. Residu dilarutkan dengan 120 mL metanol murni . Bagian supernatan diuapkan hingga volumenya menjadi setengah volume awal. Setelah itu disaring. Filtrat disimpan kembali di lemari pendingin.

3.2.4 Analisa Hasil

3.2.4.1 Uji KLT

Filtrat dan endapan yang diperoleh dianalisa dengan kromatografi lapis tipis dengan eluen berbagi pelarut untuk memperoleh pemisahan terbaik

3.2.4.2 Uji Gula

Dilakukan uji gula secara kualitatif dengan menggunakan campuran pelarut Fehling A dan Fehling B

3.2.4.3 Uji Aktivitas Antioksidan ^[18]

Dilakukan dengan membandingkan harga peroksida minyak kedelai (M) dengan harga peroksida minyak kedelai yang telah ditambahkan filtrat tempe gembus (M1, M2, M3, M4, M5). Penentuan harga peroksida mengikuti metode

Hills and Thiele (1949) yang dimodifikasi oleh Adnan (1980) yang dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Pembuatan kurva standar

Larutan standar adalah larutan ion Ferri terbuat dari 0,25 g FeCl_3 yang dilarutkan dengan 25 mL HCl 10 N dan dioksidasikan dengan 2 mL H_2O_2 . Sisa H_2O_2 dihilangkan dengan cara mendidihkan larutan dan diencerkan menjadi 250 mL dengan HCl 10 N. Diambil 0,5 mL dan diencerkan sampai hingga 100 mL dengan benzen-metanol (7:3). Larutan standar ini dipipet 0; 1; 2; 3; 4; dan 5 mL dalam tabung reaksi dan diencerkan menjadi 10 mL. Pada tiap tabung ditambahkan 1 tetes larutan amonium thiosianat dengan FeCl_3 dan digojok. Perubahan warna diukur pada panjang gelombang 510 nm.

2. Pengukuran absorbansi dari sampel

Sampel ditimbang lalu dilarutkan dengan benzena-metanol (7:3). Setelah itu ditambahkan 1 tetes larutan ammonium thiosianat dan 1 tetes larutan FeCl_2 . Larutan FeCl_2 dibuat dengan melarutkan 0,4 g BaCl_2 yang dilarutkan dalam 50 mL aquades, diaduk lalu ditambahkan 0,5 g FeSO_4 dalam 50 mL aquades sambil diaduk. Sebanyak 2 mL HCL 10 N ditambahkan kemudian BaSO_4 dibiarkan mengendap. Selanjutnya disaring. Tabung yang berisi sampel minyak digojok dan dipanaskan dengan water bath pada 50°C selama 2 menit kemudian didinginkan pada suhu kamar. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 nm.

3. Penentuan harga peroksida

Harga peroksida ditentukan dengan menggunakan persamaan:

$$PV = \frac{AB}{55,84 C}$$

Keterangan : PV = harga peroksida (mequiv/kg minyak)

A = $\mu\text{g Fe}/10 \text{ mL}$ larutan

B = volume larutan mula-mula

C = berat sampel (g)

