

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Sampel, Alat, Bahan

3.1.1 Lokasi Pengambilan Sampel

Tempe kedelai yang digunakan pada penelitian ini diambil dari Sentral Pembuatan Tempe di Lamper Tengah, Semarang. Proses pembuatan tempe kedelai dilakukan secara tradisional.

3.1.2 Alat

Alat-alat yang digunakan pada penelitian:

1. Satu set peralatan sokhlet
2. Kompor listrik
3. Lemari pendingin
4. Rotary evaporator dari Buchi Switserland
5. Lampu UV "Spectroline" dengan spesifikasi "long wave" (365 nm) dan "short wave" (254 nm)
6. Peralatan gelas: erlenmeyer, gelas beker, gelas ukur, labu takar, corong gelas

3.1.3 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan:

1. Tempe kedelai dengan waktu fermentasi 0, 24, 48 dan 72 jam
2. N-heksana teknis
3. Metanol p.a
4. Aquades

5. N-butanol p.a
6. Asam asetat p.a
7. Benzena p.a
8. H_2O_2
9. $FeCl_3$
10. NH_4CNS 30 %
11. HCl 10 N
12. Larutan $FeCl_2$
13. Plat berlapis silika gel Merck Kiesel gel 60 F₂₅₄
14. Larutan fehling A
15. Larutan fehling B

3.2 Metode Kerja

Penelitian yang dilakukan meliputi tahap-tahap sebagai berikut:

1. Ekstraksi dan isolasi sampel dilakukan di Laboratorium Penelitian Tugas Akhir Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas MIPA UNDIP.
2. Analisa antioksidan dilakukan di Laboratorium Kimia Fakultas Teknologi Pertanian UGM, Yogyakarta.

3.2.1 Ekstraksi dan Isolasi

Tempe dibuat dengan variasi waktu fermentasi 0, 24, 48 dan 72 jam. Masing-masing tempe dikeringkan dan digiling hingga berbentuk serbuk dan diekstraksi lemaknya dengan pelarut n-heksana menggunakan peralatan sokhlet.

Tepung tempe bebas lemak dicampur dengan metanol 80 % dan disimpan dalam lemari pendingin selama semalam. Kemudian disaring, filtrat diuapkan pelarutnya dengan rotary evaporato vakum pada suhu 40 °C. Residu dilarutkan dalam metanol p.a. Bagian supernatan diuapkan hingga volumenya menjadi setengah volume awal. Setelah itu disaring dan filtratnya disimpan di lemari pendingin untuk analisis lebih lanjut.

3.2.2 Analisa Senyawa Fenol

Senyawa isoflavon termasuk golongan senyawa fenolik untuk itu dilakukan analisa pendahuluan senyawa fenol. Masing-masing filtrat tempe ditambah dengan larutan FeCl_3 1% dan diamati perubahan warnanya. Adanya senyawa fenolik ditunjukkan dengan adanya perubahan warna dari hijau sampai hitam.

3.2.3 Analisa Komponen dalam Tempe dengan KLT

Untuk mengetahui komponen dalam tempe dilakukan uji Kromatografi Lapis Tipis (KLT) pada plat silika gel F_{254} menggunakan eluen n-butanol, asam asetat, air dengan perbandingan 4:1:5. Sebagai penampak noda digunakan lampu UV dan diamati noda yang berflouresensi pada panjang gelombang 365 nm.

3.2.4 Analisa Kadar Gula secara Kualitatif

Masing-masing filtrat tempe ditambah dengan larutan fehling A dan fehling B kemudian dipanaskan.

3.2.5 Analisa Antioksidasi Tempe

Penentuan aktivitas antioksidan dilakukan melalui pengukuran angka peroksida minyak kelapa yang ditambah masing-masing filtrat tempe dan dibandingkan dengan minyak kelapa tanpa penambahan (minyak standar). Pengukuran angka peroksida menggunakan metode Hill and Thiel yang dimodifikasi oleh Adnan (1980).

3.2.5.1 Pembuatan Kurva Standar

Larutan standar dibuat dari 0,25 g FeCl_3 yang dilarutkan dalam 25 mL HCl 10 N dan ditambah dengan 2 mL H_2O_2 . Kemudian dididihkan dan diencerkan sampai 250 mL dengan HCl 10 N untuk menghilangkan H_2O_2 . Diambil 0,5 mL dan diencerkan sampai 250 mL dengan campuran benzena, metanol (7:3 v/v). Larutan standar ini diambil 0 mL, 1 mL, 2 mL, 3 mL, 4 mL, 5 mL dan diencerkan sampai 10 mL. Pada tiap-tiap larutan tersebut ditambahkan 1 tetes NH_4CNS dan 1 tetes FeCl_2 . Kemudian digojok dan masing-masing larutan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm. Kurva standar dibuat dengan konsentrasi ion feri sebagai absis dan absorbansi sebagai ordinat.

3.2.5.2 Pengukuran Sampel

Masing-masing filtrat tempe diuapkan pelarutnya dengan rotary evaporator, kemudian ditambahkan pada minyak kelapa dengan konsentrasi 20 % v/v dan dibiarkan di tempat terbuka selama 14 hari. Masing-masing minyak tersebut ditimbang dan dilarutkan dalam campuran benzena, metanol (7:3 v/v). Setelah digojok, ditambah 1 tetes NH_4CNS dan 1 tetes FeCl_2 dan dipanaskan dalam water

bath pada suhu 50 °C selama 2 menit. Didinginkan pada suhu kamar dan diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 510 nm.

Angka peroksida diukur dengan rumus:

$$PV = \frac{A \times B}{55,84 \times C}$$

PV: Angka peroksida (mek/kg minyak)

A: Konsentrasi ion feri ($\mu\text{g Fe}/10 \text{ mL}$)

B: Volume larutan mula-mula (mL)

C: Berat minyak (mg)

Skema kerja dapat dilihat pada lampiran 1.

