

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

#### 3.1. Sampel, Bahan dan Alat

##### 3.1.1. Sampel

Bahan dasar kacang koro benguk diperoleh dari daerah Kulon Progo Yogyakarta. Tempe benguk dibuat secara tradisional menggunakan usar sebagai inokulan.

##### 3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah :

- n- heksana
  - Metanol
  - Aquadest
  - Plat K.I.T GF<sub>254</sub>
  - Butanol
  - Asam asetat
- 
- Benzena
  - Larutan FeCl<sub>2</sub>
  - Larutan Amonium tiosianat 30 %

- FeCl<sub>3</sub>
- HCl 10 N
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Minyak kedelai

### 3.1.3. Alat

Alat yang digunakan adalah peralatan laboratorium yang umum, peralatan sokhlet, perlengkapan KLT, lampu UV "spectroline", lemari pendingin, rotary evaporator, Spektrofotometer UV-Vis Milton Roy Spectronic 21.

## 3.2. Cara Kerja

### 3.2.1. Persiapan Sampel dan Ekstraksi Isoflavon

Kacang koro benguk dicuci dan direbus bersama abu kayu selama 2 jam. Kemudian kacang koro dikuliti, diiris kecil-kecil dan direndam dalam air bersih, dan setiap 4 jam air rendaman diganti. Perendaman dilakukan sampai air rendaman tidak berwarna. Selanjutnya kacang koro direbus kembali selama 30 menit dan ditiriskan. Kemudian kacang koro diinokulasi dengan *Rhizopus sp* dan dikemas kemudian diinkubasi pada suhu kurang lebih 30°C selama : 0, 24, 48 dan 72 jam. Tempe benguk dengan berbagai variasi waktu fermentasi dipotong-potong, dikeringkan dan dibuat serbuk tempe.

Ekstraksi minyak dari masing-masing tepung tempe (100 g) dilakukan dengan sokhlet menggunakan pelarut n-heksan selama 3-4 jam. Tepung tempe

bebas lemak (30 g) dicampur dengan 300 mL campuran metanol : air ( 80 % metanol : 20 % air), lalu disimpan dalam lemari pendingin semalam (4°C). Campuran kemudian disaring, pelarut diuapkan dibawah tekanan rendah pada suhu 40°C. Residu yang tertinggal dilarutkan kembali dalam metanol murni (120 mL), bagian supernatan diuapkan sampai setengahnya dan disimpan dalam lemari pendingin (4°C). Endapan yang terbentuk dianalisis kandungan isoflavonnya secara kromatografi (KLT, butanol : asam asetat : air,). Apabila hasil pengecekan menunjukkan bahwa isoflavon telah terekstrak seluruhnya, endapan dibuang dan filtrat diuapkan dan disimpan.<sup>[19]</sup>

### 3.2.2. Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Filtrat tempe (100 mg) dilarutkan dalam metanol (5 mL). Kemudian ditotolkan pada plat KLT GF<sub>254</sub>, dimasukkan dalam bejana pengembang yang berisi butanol : asam asetat : air, 4:1:5. Selanjutnya plat disinari dengan sinar UV pada gelombang pendek (254 nm) dan gelombang panjang (365 nm) untuk mendeteksi adanya bagian yang berfluoresensi.

### 3.2.3. Penentuan Angka Peroksida Hills dan Thiel yang Dimodifikasi oleh

Adnan<sup>[23]</sup>

Analisa angka peroksida dilakukan di Laboratorium Kimia Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Teknologi Pertanian Universitas Gajah Mada

Yogyakarta. Adapun tahapan dalam penentuan angka peroksida adalah sebagai berikut :

- **Pembuatan larutan  $\text{FeCl}_2$**

$\text{BaCl}_2$  0,4 g dilarutkan dalam 50 mL air bebas ion, diaduk, ditambah 0,5 g  $\text{FeSO}_4$  dalam 50 mL air bebas ion sambil diaduk. Kemudian ditambahkan 2 mL HCl 10 sampai terbentuk endapan  $\text{BaSO}_4$ . Larutan disaring dengan kertas Whatman no. 1.

- **Larutan amonium tiosianat 30 %**

Dibuat dengan cara melarutkan 30 g amonium tiosianat dalam air deionisasi sampai volume 100 mL.

- **Pembuatan larutan standar**

Larutan ion ferri dibuat dengan melarutkan 0,25 g  $\text{FeCl}_3$  dalam 25 mL HCl 10 N dan ditambahkan dengan 2 mL  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Sisa  $\text{H}_2\text{O}_2$  dihilangkan dengan cara mendidihkan larutan. Larutan kemudian diencerkan menjadi 250 mL dengan HCl 10 N. Larutan ini dipakai sebagai larutan standar.

- **Pembuatan Kurva Standar**

a. 0,5 mL larutan standar diencerkan sampai volume 250 mL dengan benzena

: metanol (70 : 30)

b. Sebanyak 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0 mL larutan standar dimasukkan dalam tabung reaksi dan masing-masing diencerkan dengan benzena : metanol (70:30) menjadi 10 ml.

- c. Pada tiap-tiap tabung ditambahkan 1 tetes larutan amonium tiosianat dan  $\text{FeCl}_2$  dan digojok.
- d. Masing-masing larutan diukur absorbansinya pada 510 nm.
- e. Dibuat kurva standar, absis adalah  $\mu\text{g Fe}/10 \text{ mL}$  larutan dan ordinat adalah nilai absorbansi pada 510 nm.

- **Penentuan Angka Peroksida**

- a. Filtrat tempe bengkuk pada masing-masing waktu fermentasi dipisahkan dengan rotary evaporator.
  - b. Masing-masing krude tempe bengkuk (20 % v/v) ditambahkan ke dalam minyak kedelai dan dibiarkan dalam udara terbuka selama 45 hari.
  - c. Minyak kedelai yang sudah ditambah krude tempe bengkuk dibiarkan dalam udara terbuka selama 45 hari.
  - d. Minyak kedelai tanpa penambahan krude tempe bengkuk juga dibiarkan dalam udara terbuka selama 45 hari.
  - e. Satu tetes masing-masing sampel tempe bengkuk dengan waktu fermentasi 0, 24, 48, dan 72 jam dalam tabung reaksi ditimbang dan dilarutkan dalam 10 mL campuran benzena : metanol (70 :30)
- 
- f. Ke dalam masing-masing tabung ditambahkan satu tetes amonium tiosianat dan satu tetes larutan  $\text{FeCl}_2$ .
  - g. Tabung digojok dan dipanaskan dalam water bath  $50^\circ\text{C}$  selama 2 menit, kemudian didinginkan pada  $25^\circ\text{C}$ .

- h. Larutan diukur absorbansinya pada 510 nm.
- i. Nilai peroksida dihitung sebagai mek Fe/kg sampel minyak, dengan perhitungan sebagai berikut :

$$\text{Angka Peroksida} = \frac{A \times B}{C \times 55,84}$$

dimana :

A : konsentrasi ( $\mu\text{g Fe}/10 \text{ mL}$ )

B : volume larutan mula-mula (mL)

C : berat sampel (mg)

