

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3. 1. Sampel, Alat, dan Bahan

3. 1. 1. Sampei

Kacang koro benguk (umur \pm 4 bulan) diambil dari Kulon Progo, Yogyakarta dan tempe benguk dibuat secara tradisional menggunakan serbuk ragi tempe tradisional tanpa merek (Pasar Jatingaleh, Semarang) sebagai inokulan.

3. 1. 2. Alat

Alat-alat yang dipergunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Satu set peralatan Ekstraksi (Soxhlet),
2. *Buchie Vacuum Rotary Evaporator*,
3. Plat Kromatografi Lapis Tipis Merck GF₂₅₄,
4. Kromatografi Kolom dengan diameter 2,5 cm dan panjang kolom 75 cm,
5. Peralatan gelas,
6. Spektrofotometer Ultraviolet-Tampak S1000PC Secomam.

3. 1. 2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Tempe benguk dengan waktu fermentasi selama 48 jam
2. Silika gel G 60 untuk kolom
3. Metanol p. a. (pro analisis)
4. Metanol teknis

5. Etil asetat p. a.
6. Etil asetat teknis
7. Kloroform p. a.
8. Kloroform teknis
9. n-Heksana
10. Petroleum benzena

3. 2. Cara Kerja

Penelitian ini meliputi beberapa tahapan. Adapun tahapan-tahapan tersebut adalah : pembuatan tempe benguk, penyiapan ekstrak tempe benguk, pemisahan komponen senyawa menggunakan peralatan soxhlet, Kromatografi Lapis Tipis, Kromatografi Kolom, serta identifikasi struktur senyawa menggunakan Spektrofotometer Ultraviolet-Tampak, yang semua dilakukan di Laboratorium Penelitian Kimia Organik FMIPA Universitas Diponegoro.

3. 2. 1. Pembuatan Tempe Benguk

Satu kilogram kacang koro benguk direbus bersama abu gosok selama 2 jam. Selanjutnya dikuliti, dan diiris-iris kecil-kecil. Hasil irisan kacang koro benguk direndam selama tiga malam dalam air dan setiap 4 jam air rendaman diganti, kemudian direbus kembali selama 30 menit dan ditiriskan. Selanjutnya kacang tersebut diinokulasi dengan ragi tempe. Kacang hasil inokulasi dimasukkan ke dalam beberapa kantung plastik bening berlubang-lubang, dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang 30 °C.

3. 2. 2. Penyiapan Ekstrak Tempe Bungkus Menurut Metode Wuryani

Tempe bungk yang diperoleh diiris dan dikeringkan dalam oven dan kemudian digiling hingga menjadi tepung. Selanjutnya minyak dari tepung tempe bungk dipisahkan dengan metode soxhletasi menggunakan n-heksana selama 3 – 4 jam. Tepung tempe bungk bebas lemak sebanyak 40 gram dicampur dengan 400 mL metanol 80 %, lalu disimpan dalam lemari pendingin pada temperatur 4 °C selama satu malam. Campuran ini selanjutnya disaring dan pelarutnya diuapkan di bawah tekanan rendah pada temperatur 40 °C. Residu yang tertinggal dilarutkan kembali dengan 120 mL metanol murni, bagian supernatan kembali diuapkan sampai setengahnya. Ekstrak tempe bungk dalam metanol ini selanjutnya diuapkan sehingga diperoleh cairan kental (*crude*).

3. 2. 3. Penentuan Eluen Untuk Pemisahan Isoflavon

Cuplikan *crude* dilarutkan dalam 5 mL metanol. Kemudian ditotolkan pada plat KLT GF₂₅₄, dimasukkan dalam bejana pengembang dengan menggunakan beberapa pengembang seperti metanol, etil asetat, kloroform, n-heksana, dan campuran pelarut dengan beberapa perbandingan. Selanjutnya plat disinari dengan sinar ultraviolet pada panjang gelombang 254 nm dan 366 nm untuk mendeteksi adanya bagian yang berfluoresensi. Jenis pengembang KLT ini selanjutnya digunakan sebagai pelarut Kromatografi Kolom.

3. 2. 4. Metode Pemisahan

3. 2. 4. 1. Kromatografi Kolom

Kolom kromatografi dengan diameter 2,5 cm dan panjang 75 cm dicuci dengan menggunakan detergen, dibilas dengan akuades, kemudian dibilas dengan pelarut yang dipergunakan. Fasa diam Silika gel G 60 untuk kolom sebanyak 60 g dilarutkan dalam pelarut sampai homogen dan dimasukkan dalam kolom. Untuk memadatkan fasa diam, kolom dielus menggunakan pelarut sambil dipukul pelan-pelan.

Selanjutnya 1,54 g sampel dimasukkan dalam kolom dan dielus menggunakan campuran metanol:etil asetat dengan perbandingan volume sebesar 9:1. Fraksi-fraksi ditampung dalam wadah dengan selang waktu yang teratur per 10 mL, dan kemudian setiap fraksi dianalisa dengan KLT dan fraksi-fraksi yang mempunyai R_f sama digabung.

3. 2. 4. 2. Kristalisasi dan Rekrystalisasi

Fraksi-fraksi yang diperoleh diuapkan hingga membentuk padatan kristal. Kristal dilarutkan dalam berbagai macam variasi pelarut organik. Kristalisasi yang baik adalah bila kristal larut dalam pelarut panas dan akan mengendap membentuk kristal yang murni. Untuk memperoleh kristal yang cukup murni, maka kristalisasi dilakukan beberapa kali. Sebagai pendahuluan, kemurnian suatu kristal dapat diuji dengan menggunakan metode Kromatografi Lapis Tipis.

3. 2. 4. 3. Kromatografi Lapis Tipis Preparatif

Fraksi dilarutkan dalam metanol, kemudian dielusi menggunakan KLT dan noda-noda yang terjadi diamati dengan lampu ultraviolet dengan $\lambda = 366$ nm. Masing-masing noda dipisahkan dengan mengeroknya dan dilarutkan dalam metanol. Untuk memisahkan larutan dengan silika gel plat KLT dilakukan penyaringan sehingga diperoleh filtrat.

3. 2. 4. 4. Uji Gula Secara Kualitatif

Masing-masing senyawa dalam metanol hasil KLT preparatif ditambahkan dengan pereaksi Fehling A dan B kemudian campuran dipanaskan.

3. 2. 4. 5. Uji Kemurnian

Uji kemurnian dilakukan dengan mengelusi senyawa yang diperoleh menggunakan KLT dengan berbagai eluen.

3. 2. 5. Metode Identifikasi

3. 2. 5. 2. Uji Warna

Fraksi yang diperoleh dilarutkan dalam metanol dan dielusi menggunakan plat KLT. Noda yang dihasilkan diuji dengan pereaksi-pereaksi sebagai berikut:

- a. Uap NH_3 , dilakukan dengan meletakkan plat KLT di atas botol yang berisi larutan ammoniak pekat, kemudian diangkat dan diamati perubahan warna noda menggunakan lampu ultraviolet dengan $\lambda = 366$ nm
- b. FeCl_3 , dilakukan dengan menyemprotkan larutan FeCl_3 1 % pada plat KLT dan dikeringkan, warna yang dihasilkan langsung diamati menggunakan

- c. AlCl_3 , dilakukan dengan menyemprotkan larutan AlCl_3 5 % pada plat KLT dan dikeringkan. Perubahan warna yang terjadi diamati langsung dengan menggunakan lampu ultraviolet dengan $\lambda = 366 \text{ nm}$.

3. 2. 5. 3. Analisis Spektrofotometri Ultraviolet-Tampak

Sampel hasil KLT preparatif, dilarutkan dalam metanol dan disaring, untuk selanjutnya diukur spektrum ultravioletnya menggunakan 3 macam pereaksi geser yaitu:

- a. NaOH , sampel yang telah dilarutkan dalam metanol dimasukkan ke dalam kuvet dan diukur spektrum cuplikan dalam metanol, kemudian ditambahkan tiga tetes larutan NaOH 2 M, dikocok dan diukur spektrumnya,
- b. AlCl_3 , larutan sampel dimasukkan ke dalam kuvet dan ditambahkan enam tetes larutan AlCl_3 dikocok dan kemudian diukur spektrumnya,
- c. NaOAc , larutan sampel dimasukkan ke dalam kuvet, kemudian ditambahkan sedikit serbuk NaOAc dan diukur spektrumnya.

Selain itu juga dilakukan perbandingan pola spektrum antara sampel dengan genistein murni dalam metanol.