

## BAB III

### METODOLOGI PENELITIAN

---

#### 3.1 Sampel, Alat, dan Bahan

##### 3.1.1 Sampel

Sampel yang digunakan adalah tempe gembus yang dibuat melalui fermentasi ampas tahu menggunakan ragi tempe. Ampas tahu diperoleh dari pengrajin tempe di daerah Peterongan, Semarang. Ragi tempe yang digunakan berupa serbuk putih dengan merek Raprima (dikeluarkan oleh Koperasi Bina Kimia Bandung).

##### 3.1.2 Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian adalah peralatan laboratorium yang umum. Untuk ekstraksi lemak digunakan alat soxhlet. Rotary evaporator Buchi digunakan untuk penguapan pelarut. Untuk pemisahan ekstrak digunakan kromatografi kolom vakum dengan diameter kolom 5 cm dan panjang kolom 15 cm. Ruang pengembang (TLC chamber) digunakan untuk mengelusi plat kromatografi lapis tipis (KLT) dengan pengembang. Lampu ultraviolet "spectroline" dengan spesifikasi "long wave" (365 nm) dan "short wave" (254 nm) digunakan untuk identifikasi noda pada analisis dengan KLT. Untuk analisis struktur secara spektrofotometri digunakan Spektrofotometer Ultraviolet Milton Roy Spectronic 3000 Array dan Spektrofotometer Inframerah Shimadzu FTIR-8201 PC.

### 3.1.3 Bahan

Pelarut yang digunakan untuk isolasi berderajat teknis, sedangkan untuk keperluan analisis digunakan pelarut berderajat pro analysis (p.a.). Pelarut-pelarut yang digunakan meliputi n-heksana, sikloheksana, metanol, butanol, aquades, kloroform, diklorometana, etil format, asam format, etil asetat, dan asam asetat. Uap amonia dan larutan  $\text{AlCl}_3$  5 % digunakan sebagai penampak noda pada analisis warna noda dengan KLT. Sebagai pereaksi geser pada analisis engan spektrofotometer ultraviolet digunakan natrium hidroksida, natrium asetat, dan aluminium klorida. Plat Aluminium dengan penyerap Silica Gel 60 F<sub>254</sub> Merck digunakan sebagai fasa diam untuk analisis dengan KLT. Silica Gel 60 Merck dengan ukuran 200-400 mesh digunakan sebagai fasa diam untuk pemisahan dengan kromatografi kolom vakum. Standar genistein murni digunakan sebagai pembanding dalam analisis struktur menggunakan KLT secara ko-kromatografi.

### 3.2 Metode Kerja

Penelitian secara garis besar dilaksanakan dalam dua tahap:

1. Isolasi dan pemisahan, dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro Semarang
2. Identifikasi senyawa hasil isolasi, dilakukan di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro Semarang dan Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

### 3.2.1 Persiapan Sampel

Ampas tahu difermentasi dengan ragi tempe selama 48 jam. Tempe hasil fermentasi selanjutnya diiris-iris, dikeringkan dan digiling, sehingga berbentuk serbuk.

### 3.2.2 Pemisahan Lemak dari Tepung Tempe

Tepung tempe gembus di-soxhlet menggunakan pelarut n-heksana selama 4 jam<sup>[32]</sup>.

### 3.2.3 Isolasi Isoflavon dari Tepung Tempe Gembus Bebas Lemak

Sebanyak 60 gram tepung tempe gembus bebas lemak dilarutkan dalam 600 mL metanol 80 % dan disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C selama 12 jam. Campuran disaring, kemudian filtratnya diambil dan pelarut diuapkan dengan rotary evaporator pada suhu 40 °C. Bagian residu dilarutkan dalam 240 mL metanol murni, selanjutnya pelarut diuapkan hingga volume campuran menjadi setengahnya. "Crude" ini kemudian disimpan dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C selama 12 jam. Campuran hasil pendinginan disaring dan filtratnya digunakan untuk uji selanjutnya<sup>[34]</sup>.

### 3.2.4 Pemisahan dan Pemurnian

#### 3.2.4.1 Analisis dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Filtrat hasil isolasi dianalisis dengan kromatografi lapis tipis menggunakan berbagai eluen untuk memperoleh pemisahan terbaik.

#### **3.2.4.2 Pemisahan dengan Kromatografi Kolom Vakum**

Filtrat hasil isolasi sebanyak 2 gram dimasukkan ke dalam kolom. Sebagai fasa diam digunakan silika gel. Sebagai fasa gerak digunakan suatu seri pelarut dari yang non polar sampai ke pelarut polar. Pelarut pertama adalah n-heksana, dilanjutkan dengan kloroform, etil asetat, dan terakhir metanol. Pelarut yang digunakan untuk satu kali elusi adalah 100 mL. Kepolaran pelarut dinaikkan bila satu pelarut sudah tidak mampu lagi mengelusi senyawa. Fraksi-fraksi yang diperoleh dianalisis dengan KLT. Fraksi yang mengandung senyawa dengan pola noda sama digabung menjadi satu. Fraksi-fraksi hasil elusi dengan kloroform diberi kode A dan B, sedangkan fraksi-fraksi hasil elusi dengan etil asetat diberi kode C dan D.

#### **3.2.4.3 Pemisahan dengan Kromatografi Lapis Tipis Preparatif**

Pemisahan komponen-komponen dalam fraksi A dilakukan dengan KLT preparatif. Elusi pada KLT preparatif dilakukan dengan pelarut metanol, selanjutnya plat dikeringkan. Dua komponen yang terpisah, yaitu komponen I dan II, masing-masing dikerok dan dikumpulkan. Komponen II digunakan untuk analisis selanjutnya.

#### **3.2.4.4 Uji Kemurnian**

Komponen II hasil KLT preparatif ditotolkan pada plat KLT dan dielusi dengan berbagai sistem pengembang, yaitu metanol, butanol, etil asetat, dan n-heksana.

### 3.2.5 Identifikasi Senyawa Isoflavon

#### 3.2.5.1 Analisis dengan Metode Uji Warna

Komponen II hasil KLT preparatif dilarutkan dalam metanol dan dielusikan pada plat KLT, noda yang dihasilkan diuji dengan pereaksi-peraksi berikut:

1. Uap  $\text{NH}_3$ , dilakukan dengan meletakkan plat KLT diatas uap  $\text{NH}_3$  kemudian diangkat dan diamati perubahan warna yang terjadi dengan lampu UV pada panjang gelombang 365 nm.
2.  $\text{AlCl}_3$ , dilakukan dengan menyemprotkan larutan  $\text{AlCl}_3$  5 % pada plat KLT dan dikeringkan. Perubahan warna yang terjadi diamati dibawah lampu UV pada panjang gelombang 365 nm.

#### 3.2.5.2 Analisis dengan Spektrofotometer Ultraviolet Menggunakan Pereaksi Geser

Komponen II dilarutkan dalam metanol untuk selanjutnya diukur spektra ultravioletnya menggunakan 3 macam pereaksi geser:

1.  $\text{NaOH}$ , sampel yang telah dilarutkan dalam metanol dimasukkan dalam kuvet dan diukur spektrumnya, kemudian ditambah dengan tiga tetes larutan  $\text{NaOH}$ , dikocok, dan diukur spektranya (spektra  $\text{NaOH}$ ).
2.  $\text{AlCl}_3$ , larutan sampel dimasukkan dalam kuvet dan ditambah dengan tiga tetes larutan  $\text{AlCl}_3$ , dikocok, kemudian diukur spektranya (spektra  $\text{AlCl}_3$ ).

3. NaOAc, larutan sampel dimasukkan dalam kuvet dan ditambah sedikit serbuk NaOAc, dikocok, kemudian diukur spektranya (spektra NaOAc).

### **3.2.5.3 Analisis dengan Spektrofotometer Inframerah**

Komponen II dilarutkan dalam kloroform, kemudian diuapkan pelarutnya dan diukur spektra inframerahnya.

### **3.2.5.4 Analisis Secara Ko-Kromatografi Menggunakan Standar Genistein**

Komponen II dan standar genistein murni ditotolkan pada satu plat KLT dan dielusi menggunakan berbagai sistem pengembang yang berbeda, yaitu sikloheksana-diklorometana-etil format-asam format (7:6:6:1 v/v), butanol, metanol, dan metanol-kloroform (1:1 v/v).

