

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1 Tempat Penelitian

Preparasi sampel, analisis isoflavon dengan KLT dan hidrolisis sampel dilakukan di Laboratorium Riset Kimia Organik, Jurusan Kimia, Fakultas MIPA, Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis isoflavon dengan KCKT dilakukan di Balai Pengembangan Jasa Iptek P3KT-LIPI, Bandung.

3.1.2 Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan dari bulan Juni 2000 sampai dengan bulan November 2000 (6 bulan).

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Penelitian

Bahan utama yang digunakan adalah tempe yang diperoleh dari pabrik tempe di sentra industri tempe dan tahu di Lamper Tengah, Kec. Candisari, Kodia Semarang. Bahan pendukung adalah garam dapur, n-heksana teknis, metanol p.a. (Merck), kloroform p.a. (Merck), asam asetat glasial p.a. (Merck), asam klorida p.a. (Merck).

3.2.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan adalah neraca, blender, peralatan ekstraksi (soxhlet), penguap vakum putar, oven, lemari pendingin, corong buchner, pompa vakum, botol semprot, bejana pengembang KLT, pipa kapiler, lampu UV, pelat lapis tipis silica gel 60 F-254 dengan tebal 2 mm (Merck), sentrifugal, kertas saring, alat-alat laboratorium dari gelas, mesin KCKT (Hitachi).

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Pembuatan Tauco^[2]

Tempe dipotong kecil-kecil dengan ukuran 0,5 x 1 x 1 (cm) dan dimasukkan sebanyak 200 g ke dalam botol bersih. Ke dalam botol dituangkan air garam 20 %. Perbandingan tempe dan air garam adalah 1:2, setelah itu botol ditutup dengan kain kasa dan diinkubasi pada temperatur kamar selama 2 bulan, campuran diaduk secara periodik.

3.3.2 Preparasi Sampel^[2]

Tauco dikeringkan dalam oven pada suhu 50 °C selama 12 jam, lalu digiling sampai halus. Ekstraksi lemak dari 100 g tepung tauco dilakukan dalam peralatan soxhlet dengan menggunakan pelarut n-heksana teknis selama 3-4 jam. Tauco bebas lemak yang dihasilkan sebanyak 86 g, dicampur dengan campuran metanol:air (80 % metanol, 20 % air), lalu disimpan semalam dalam lemari pendingin pada suhu 4 °C. Perbandingan tauco bebas lemak dan larutan metanol

adalah 1:10. Campuran ini selanjutnya disaring, pelarutnya diuapkan menggunakan penguap vakum putar pada suhu 40 °C. Fraksi residu dilarutkan kembali dengan 120 mL metanol murni, bagian supernatan kembali diuapkan sampai setengahnya dan disimpan di lemari es pada suhu 4 °C semalam. Campuran disaring, filtratnya diuapkan, sehingga diperoleh residu sekitar 1 mL. Residu diencerkan kembali dengan metanol murni, volume akhir 12 mL, dan disimpan pada suhu 4 °C. Preparasi sampel dari 100 g tempe dilakukan dengan prosedur yang sama. Tempe bebas lemak yang dihasilkan sebanyak 84 g, residu diencerkan dengan metanol murni, volume akhir 10 mL.

3.3.3 Analisis Isoflavon dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel yang telah disentrifugasi, diambil sebanyak 2 tetes, dilarutkan dalam 5 mL metanol, lalu dibubuhkan pada pelat lapis tipis. Pelat-pelat ini dimasukkan ke dalam bejana pengembang berisi campuran pelarut kloroform:metanol (9:1). Kemudian pelat disinari dengan sinar ultra-violet pada panjang gelombang 365 nm untuk mendeteksi adanya bagian yang berfluoresensi. Ekstrak isoflavon yang telah dihidrolisis asam dianalisis KLT juga dengan prosedur yang sama.

3.3.4 Hidrolisis Asam^[13] dan Ekstraksi Isoflavon Aglikon

Sampel dari Tauco: Sampel sebanyak 2 mL dicampur dengan 10 mL asam klorida 2N:metanol (1:1) dalam labu alas bulat 50 mL. Campuran direfluks pada penangas air selama 60 menit, lalu diuapkan dengan penguap vakum putar pada 40 °C untuk menghilangkan metanol. Residu diekstraksi dengan kloroform dalam

tabung reaksi, fraksi air diatas fraksi kloroform. Fraksi kloroform dipisahkan dari fraksi air dan diuapkan pada 61 °C untuk menghilangkan kloroform. Residu dilarutkan dalam metanol sampai volume 4 mL, disentrifuge lalu diambil 3,3 mL dan diencerkan sampai 60 mL dengan metanol.

Sampel dari Tempe: Sampel sebanyak 1 mL diencerkan dengan metanol hingga volume 5 mL. Sampel encer sebanyak 2 mL dihidrolisis sama seperti sampel dari tauco. Sampel yang telah dihidrolisis, diekstraksi seperti prosedur untuk sampel dari tauco. Isoflavon aglikon diencerkan dengan metanol sampai volume 4 mL, disentrifuge lalu diambil 2,3 mL dan diencerkan sampai 40 mL dengan metanol.

3.3.5 Analisis Isoflavon dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)^[2]

Sampel hasil hidrolisis di atas diinjeksikan ke dalam mesin KCKT dengan menggunakan alat Rheodyne dengan ukuran loop 20 µL. Pemisahan dilangsungkan pada kolom Lichrosorb RP 18 berukuran 250 x 4 mm, 5 mm, dengan sistem gradien. Deteksi dilakukan dengan mengukur absorbansi pada sinar UV pada panjang gelombang 260 nm menggunakan UV-VIS Detector L-7450. Kecepatan pemisahan dari setiap analisis dipertahankan pada 1,0 mL/menit. Perubahan komposisi fasa gerak diatur dengan menggunakan dua buah pompa jenis L-7100. Fasa gerak berupa pelarut A yaitu air:asam asetat (97:3) dan pelarut B yaitu metanol:asam asetat (97:3). Pada 5 menit pertama, fasa gerak berupa 100 % pelarut A. Setelah itu perbandingan pelarut B meningkat secara linear sampai 100 %, lalu diturunkan sampai 0 % perioda 5 menit. Perhitungan kadar

isoflavon dilakukan dengan cara membandingkan luas masing-masing puncak yang muncul pada kromatogram dengan luas puncak senyawa standarnya.

