

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

3.1.1. Tempat Penelitian

Preparasi sampel, hidrolisis sampel, ekstraksi sampel, analisis isoflavon dengan KLT, dan uji aktivitas antioksidan 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 2002 sampai dengan bulan November 2002 (6 bulan).

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

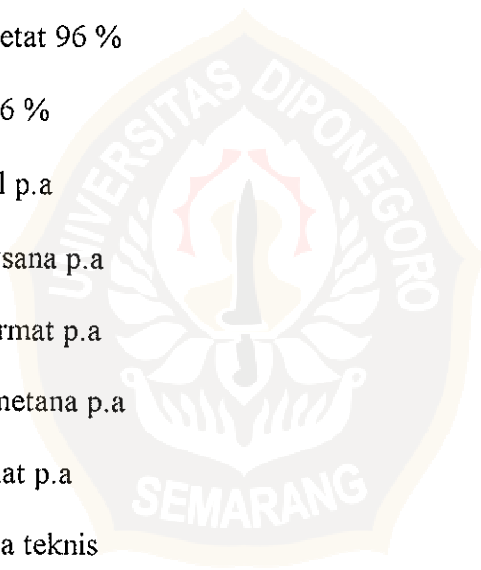
- Gelas beker
- Pipet tetes
- Labu takar
- Pengaduk
- Gelas arloji

- Corong gelas
- Corong pisah
- Gelas ukur
- Spatula
- Kertas saring
- Statif I set
- Blender
- Oven
- Rotaryevaporator Buchie
- Timbangan
- Lemari pendingin
- Seperangkat alat UV – Visible
- Pelat Kromatografi Lapis Tipis Merek GF₂₅₄
- Satu set alat soxhlet
- Piknometer
- Pipa kapiler
- Chamber
- Botol vial
- Satu set alat refluks
- Mesin KCKT

3.2.2. Bahan

Bahan-bahan yang diperlukan dalam penelitian ini adalah:

- Kedelai
- Tauco
- Aquadest
- Metanol teknis
- Metanol p.a
- HCl 35 %
- Etil asetat p.a
- Asam asetat 96 %
- Etanol 96 %
- Propanol p.a
- Sikloheksana p.a
- Asam format p.a
- Diklorometana p.a
- Etil format p.a
- n-heksana teknis
- Kristal I₂
- Kloroform p.a
- Eter
- Pereaksi DPPH
- Na₂SO₄ anhidrat



3.3. Prosedur Penelitian

3.3.1. Pembuatan Tauco

Satu kilogram kedelai disortir dan dicuci terlebih dahulu untuk menghilangkan kotorannya. Kemudian direndam selama 12 jam untuk memudahkan pengelupasan kulit, dan selanjutnya direbus selama 2 jam. Kedelai yang telah dingin tersebut dicampur dengan tepung beras, tepung ketan, laru tauco, dan diperam selama 3 hari sampai ditumbuhi dengan kapang. Setelah waktu pemeraman selesai, kedelai tersebut dijemur sampai kering dan gumpalan-gumpalannya dihancurkan. Selanjutnya kedelai hasil pemeraman dimasukkan ke dalam air garam dan dibiarkan selama 1 bulan. Kemudian dimasak dengan gula aren sambil diaduk secara periodik hingga tidak terbentuk buih-buih lagi.

3.3.2. Preparasi Sampel

Tauco dikeringkan dibawah sinar matahari, kemudian digiling sampai halus. Selanjutnya lemak dari tepung tauco dipisahkan dengan metode soxhletasi menggunakan pelarut n-heksan selama 3-4 jam. Tepung tauco sebanyak 100 gram yang telah bebas lemak tersebut, disoxhlet kembali menggunakan pelarut metanol. Filtrat metanol yang diperoleh dari proses soxhletasi, selanjutnya diuapkan dengan rotary evaporator (penguap putar) pada suhu 70°C sehingga diperoleh cairan kental (*crude*). Preparasi sampel dari kedelai dilakukan dengan prosedur yang sama.

3.3.3. Hidrolisis Asam

Sebanyak 4 gram crude dari sampel tauco dicampur dengan 20 mL metanol dan 100 mL HCl 6 %, serta dimasukkan ke dalam labu alas bulat. Selanjutnya campuran tersebut direfluks diatas penangas air selama 2 jam. Sampel dari kedelai sebanyak 4 gram dihidrolisis sama seperti prosedur untuk sampel dari tauco.

3.3.4. Analisis Hasil Hidrolisis Asam Dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT)

Sampel dari tauco dan kedelai yang belum dihidrolisis asam beserta sampel dari tauco dan kedelai yang telah dihidrolisis asam, dianalisa isoflavonnya dengan Kromatografi Lapis Tipis (KLT) menggunakan berbagai macam pengembang, antara lain :

- Etil asetat : asam format : air = 10:2:3
- Sikloheksana
- Asam asetat 96 %
- Etil format
- BAA (Butanol : asam asetat : air = 4 : 1 : 5)
- Diklorometana
- Sikloheksan : diklorometana : etil format : asam format = 7 : 6 : 6 : 1
- Etil format : diklorometana = 1 : 1
- Etil format : diklorometana = 3 : 1
- Etil format : diklorometana = 1 : 3

- Kloroform : metanol = 9 : 1
- Kloroform : metanol = 5 : 1

Dimana, sampel dari tauco dan kedelai yang akan dianalisis ditotolkan pada pelat KLT kemudian dimasukkan ke dalam bejana pengembang yang masing-masing berisi berbagai eluen diatas. Selanjutnya noda-noda yang terbentuk pada pelat-pelat tersebut diamati dengan lampu ultraviolet pada panjang gelombang 365 nm. Pelat-pelat KLT yang telah diamati fluoresensinya, kemudian diletakkan di atas gelas beker yang berisi kristal I₂.

3.3.5. Ekstraksi Isoflavon Aglikon

Filtrat metanol dari sampel tauco dan kedelai yang telah diperoleh dari proses hidrolisis, diekstrak dengan pelarut eter menggunakan corong pisah. Selanjutnya fraksi eter tersebut dicuci dengan aquadest hingga netral (pH = 7), dan eternya dihilangkan dengan menggunakan penguap putar yang diatur pada suhu 38 - 40°C. Residu yang diperoleh ditambah dengan Na₂SO₄ anhidrat dan disaring, lalu residu yang tertinggal diuapkan kembali pada suhu 38 - 40 °C.

3.3.6. Analisis Komponen Isoflavon dengan Kromatografi Cair Kinerja Tinggi (KCKT)

Sampel isoflavon dari tauco dan kedelai yang telah dilarutkan dalam kloroform diinjeksikan ke dalam mesin KCKT dengan menggunakan alat penyuntik Rheodyne sebanyak 20 μL . Kolom yang digunakan untuk memisahkan senyawa isoflavon tersebut adalah Lichrosorb RP 18, dan dideteksi dengan spektromonitor UV pada panjang gelombang 260 nm. Perubahan komposisi fasa gerak diatur dengan menggunakan dua buah pompa jenis L-7100. Fasa gerak yang digunakan 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% setiap perioda 5 menit. Untuk analisis kualitatifnya, dilakukan dengan cara membandingkan masing-masing puncak yang muncul pada kromatogram dengan puncak senyawa standar dari tempe kedelai.

3.3.7. Uji Aktivitas Antioksidan

3.3.7.1. Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kualitatif

Pengujian aktivitas senyawa isoflavon dari tauco dan kedelai sebagai antioksidan secara kualitatif ini dilakukan dengan cara menyemprotkan larutan DPPH ke atas pelat KLT yang telah digunakan untuk memisahkan senyawa yang dianalisis, dimana pelat KLT yang

dipakai adalah pelat KLT dengan pemisahan terbaik. Larutan penyemprot tersebut dibuat dengan jalan melarutkan pereaksi DPPH sebanyak 4 mg ke dalam 50 mL etanol 96 %. Selanjutnya dilakukan pengamatan terhadap bercak noda yang terbentuk.

3.3.7.2. Uji Aktivitas Antioksidan Secara Kuantitatif

a. Preparasi Larutan

Noda yang terlihat terfluoresensi setelah proses penyemprotan tersebut dikerok dan dilarutkan dalam 2,5 mL larutan DPPH, lalu diencerkan dengan etanol 96 % hingga volume menjadi 5,0 mL. Prosedur ini dilakukan untuk membuat larutan sampel dari tauco dan kedelai masing-masing sebanyak 3 buah larutan.

b. Pengujian

Masing-masing larutan sampel dari tauco dan kedelai diukur serapannya sebanyak dua kali pengulangan pada panjang gelombang 517 nm menggunakan spektrofotometer UV-Visibel. Selanjutnya dihitung persentase dekolorasi dari masing-masing larutan sampel tersebut.