

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1 Metode Penelitian

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Diponegoro dan analisa KG-SM dilakukan di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia FMIPA Universitas Gadjah Mada. Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahap, yaitu:

1. Preparasi sampel untuk menghindari pembusukan dan memperbesar luas kontak dengan pelarut.
2. Pemisahan melalui ekstraksi terutama ekstraksi kontinyu dan ekstraksi cair-cair karena metode tersebut relatif murah dan mempunyai teknik pengerjaan yang sederhana (Williamson, 1987 dan Wilcox, 1995).
3. Pengujian golongan untuk menunjukkan keberadaan asam-asam lemak dan pengotornya.
4. Analisa struktur asam-asam lemak menggunakan instrumen KG-SM melalui transformasi ke bentuk ester.

3.2 Sampel, Bahan dan Alat

3.2.1 Sampel

Sampel berupa gonad kerang *Amusium* sp. dari perairan pantai Utara Jawa Tengah, khususnya perairan Brebes, yang dikumpulkan dari TPI Kluwut Kecamatan Kluwut Kabupaten Brebes, pada bulan September 2002. Pemilihan lokasi merupakan rangkaian studi pendahuluan dari peneliti terdahulu.

3.2.2 Bahan

Larutan Na_2CO_3 1 %, H_2SO_4 10 % dan boron triflorida dalam metanol diperlukan untuk perlakuan sampel. Sebagai pelarut adalah *n*-heksana, petroleum eter, dietil eter dan etanol 96 % serta akuades. Serta Na_2SO_4 anhidrat untuk mengikat sisa air.

3.2.3 Alat

Selain alat-alat gelas standar seperti gelas beker, gelas ukur, labu takar, corong gelas dan pipet, peralatan utama yang diperlukan antara lain corong pemisah, kompor listrik, oven listrik, seperangkat evaporator putar merek Buchi serta seperangkat alat soklet 250 mL. Asam-asam lemak hasil ekstraksi dianalisa dengan instrumen GC-MS QP 5000 merek Shimadzu.

3.3 Prosedur Kerja

3.3.1 Preparasi Sampel

Gonad kerang dipisahkan dari jaringan dan ototnya, kemudian dikeringkan dalam oven sampai tidak terjadi perubahan pada beratnya. Setelah kering, kemudian sampel gonad dihaluskan hingga menjadi serbuk (Sudarmadji, 1984).

3.3.2 Pemisahan Senyawa Asam-asam Lemak

Serbuk kering gonad *Amusium* sp. diekstraksi kontinyu dengan pelarut *n*-heksana menggunakan soklet. Ekstrak *n*-heksana dikeringkan dan kemudian digunakan sebagai *crude* pada ekstraksi cair-cair. Selanjutnya ekstrak *n*-heksana diuji golongan untuk memastikan keberadaan senyawa lipida. Untuk memisahkan asam-asam lemak dari senyawa lipida lain, asam lemak diubah menjadi garam dengan Na_2CO_3 1 %. Pemisahan dilakukan dengan pencucian menggunakan

petroleum eter, dietil eter dan etanol 96 %. Pencucian dengan etanol 96 % dan pengubahan menggunakan Na_2CO_3 1 % diulang dua kali terhadap ekstrak campuran eter. Kemudian ekstrak campuran eter dicuci sekali lagi dengan menggunakan akuades.

Kumpulan garam-garam pada ekstrak etanol-akuades dibebaskan kembali menjadi asam lemak dengan H_2SO_4 10 % yang selanjutnya dikumpulkan melalui pencucian menggunakan campuran pelarut petroleum eter dan dietil eter dengan perbandingan 1 : 1 (dalam mL). Pencucian ekstrak etanol-akuades diulang sampai tiga kali. Untuk mengikat akuades yang terambil dalam ekstrak campuran eter ditambahkan Na_2SO_4 anhidrat. Setelah dilakukan penyaringan, filtrat dikeringkan sampai semua eter menguap.

3.3.3 Analisa Struktur

Sebelum analisa, asam lemak perlu ditransformasi menjadi metil ester asam lemak melalui esterifikasi menggunakan reagen boron triflorida dalam metanol. Proses berlangsung dalam refluks tertutup pada temperatur ± 100 °C selama 2 jam yang semua dilakukan di laboratorium Kimia Organik Universitas Gajah Mada. Pada analisa kromatografi gas-spektrometer massa (KG-SM) dengan merek Shimadzu QP 5000 digunakan kolom CP-Sil. 88 panjang 50 meter, pada suhu yang diprogram antara 80 - 210 °C (10 °C/menit) dengan tekanan gas pembawa Helium 10 kPa dan detektor pada suhu 220 °C serta injektor split 1 : 60 pada suhu 220 °C. Spektrum masing-masing senyawa yang diperoleh dianalisa dengan membandingkan pada data yang terdapat dalam pustaka. Kesamaan

spektra disimpulkan berdasarkan indeks kemiripan (SI) minimum 80 %, kesamaan ion molekul dan puncak dasar.

3.3.4 Uji Steroida

Pengujian dilakukan sebelum pemisahan yakni pada ekstrak *n*-heksana dan sesudah pemisahan yakni pada ekstrak campuran eter setelah pembebasan garam. Senyawa hasil ekstraksi dipanaskan hingga mencair kemudian ditambahkan asam asetat anhidrid dan asam sulfat pekat. Adanya senyawa steroida ditandai dengan terjadinya perubahan warna dari hijau kemudian biru dan akhirnya ungu.

