

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Lokasi Penelitian**

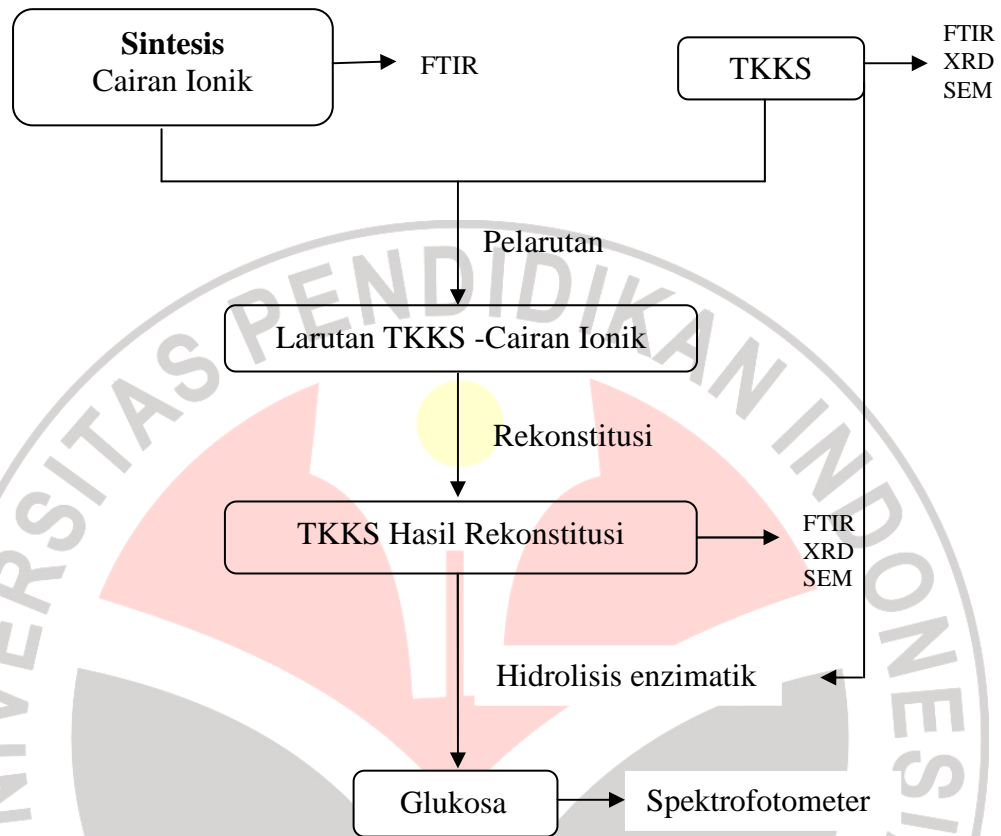
Pelaksanaan penelitian dimulai sejak Januari sampai Juni 2010. Sintesis cairan ionik, studi kelarutan biomassa dan hidrolisis enzimatis tandan kosong kelapa sawit dilakukan di Laboratorium Riset Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia. Analisis spektroskopi infra merah (FTIR) dan analisis kadar glukosa dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI. Analisis *scanning electron microscopy* (SEM) dan *X-ray diffraction* (XRD) dilakukan di Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi dan Kelautan Bandung.

#### **3.2 Sistematika Penelitian**

Sistematika penelitian dibagi dalam enam tahap, yaitu preparasi (sintesis) cairan ionik, karakterisasi struktur cairan ionik, studi pelarutan dan rekonstitusi tandan kosong kelapa sawit, tahap karakterisasi tandan kosong kelapa sawit sebelum dan setelah dilarutkan dalam cairan ionik serta tahap hidrolisis enzimatis dan penentuan kadar glukosa.

Secara keseluruhan penelitian dapat digambarkan seperti bagan alir

berikut:



**Gambar 3.1** Bagan Alir Penelitian

### 3.2.1 Sintesis Cairan Ionik Berbasis Garam Benzotriazolium

Pada tahap ini akan dilakukan sintesis tiga jenis cairan ionik yaitu 1,3-metiloktil-1,2,3-benzotriazolium bromida ([MOBzt]Br), 1,3-metiloktil-1,2,3-benzotriazolium tiosianat ([MOBzt]SCN), 1,3-metiloktil-1,2,3-benzotriazolium asetat ([MOBzt]CH<sub>3</sub>COO). Cairan ionik ini disintesis berdasarkan adaptasi prosedur yang telah dikembangkan dalam literatur (Forsyth, *et al.*, 2003; Masahiro, *et al.*, 1976; dan Mudzakir, 2004).

### 3.2.1.1 Alat dan Bahan

#### Alat

Peralatan yang digunakan untuk tahapan preparasi dan sintesis cairan ionik antara lain 1 set alat *rotary evaporator* (BUCHI); 1 set alat refluks; neraca analitik; alat-alat gelas; *melting block*; spatula; *magnetic stirrer*; *mantle heater*; *freezer*, corong *Buchner*, *aluminum foil*, *microwave* LG MS-2327ARB 850W dan *waterbath shaker* EYELA. Adapun untuk karakterisasi struktur, kristalinitas, struktur permukaan dan analisis kadar glukosa ditentukan menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (SHIMADZU, FTIR-8400), *Scanning Electron Microscope* (JEOL JSM-6360LA), *X-ray diffraction* Panalytical, *Spectrophotometer* CAMSPEC M106.

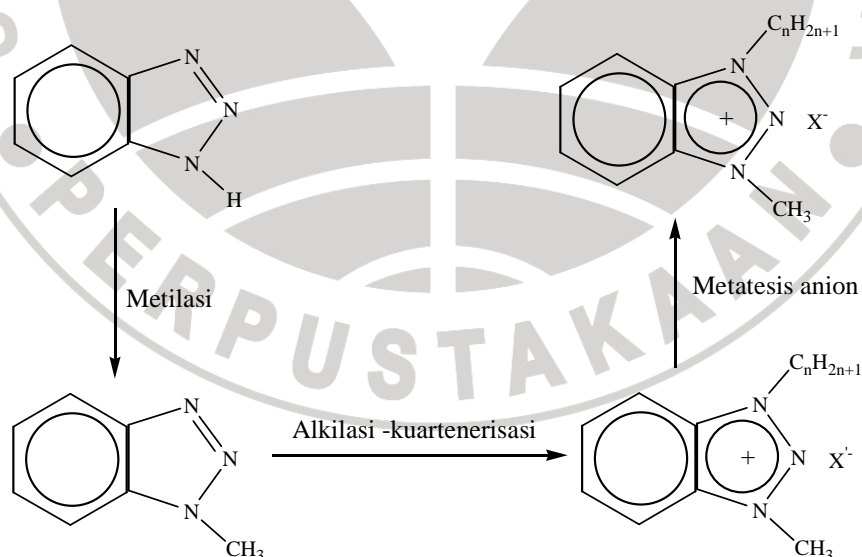
#### Bahan

Bahan-bahan yang digunakan untuk keseluruhan penelitian ini adalah: 1H-benzotriazol p.a. produk *Merck* dan *Fluka*; dimetil sulfat p.a. produk *Bratachem*; oktil bromida p.a. produk *Fluka*; NaOH p.a. produk *Merck*; MgSO<sub>4</sub> p.a. produk *Merck*; etil asetat teknis produk *Bratachem*; n-Heksan teknis produk *Bratachem*; asetonitril p.a. produk *Merck*; metanol teknis produk *Bratachem*; etanol teknis produk *Bratachem*; perak nitrat p.a. produk *Merck*; kalium tiosianat p.a. produk *Merck*, natrium asetat p.a. produk *Merck*; Natrium karbonat anhidrat produk *Merck*; K-Na-Tartarat produk *Merck*; Natrium bikarbonat produk *Merck*; Natrium sulfat anhidrat produk *Merck*; CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O produk *Merck*; (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>.4H<sub>2</sub>O produk *Merck*; H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> produk *Merck*; Na<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O produk *Merck*; glukosa p.a.

produk *Merck*; tandan kosong kelapa sawit dengan ukuran partikel 0,1 – 2 mm dan aquades.

### 3.2.1.2 Prosedur Penelitian

Tahap sintesis cairan ionik dibagi ke dalam dua tahap, yaitu pembentukan kation yang diinginkan dan pergantian anion untuk membentuk produk yang diinginkan (Gordon, 2003). Pada penelitian ini, tahap pembentukan kation dilakukan melalui dua tahapan reaksi, yaitu metilasi 1H-benzotriazol dan alkilasi-kuartenerisasi 1-metil benzotriazol dengan menggunakan oktil bromida untuk mendapatkan kation  $[\text{MOBzt}]^+$ . Tahap selanjutnya adalah reaksi pergantian anion melalui reaksi metatesis dengan menggunakan garam perak yaitu perak tiosianat dan perak asetat dalam pelarut metanol. Alur preparasi cairan ionik berbasis benzotriazolium digambarkan secara rinci pada Gambar 3.2.



**Gambar 3.2** Skema Sintesis Garam 1,3-alkilmetil-1,2,3-Benzotriazolium  
(Sumber: Mudzakir, 2006)

## Tahap I : Metilasi 1H-Benzotriazol

### *Sintesis Kristal 1-Metil Benzotriazol (MBzt)*

Sebanyak 50 gram 1H-benzotriazol (0,42 mol) dilarutkan ke dalam larutan natrium hidroksida dalam air (0,84 mol). Ke dalam larutan tersebut ditambahkan 40 mL dimetilsulfat (0,42 mol) dan diaduk selama 24 jam pada suhu kamar. Setelah melalui proses pengadukan, larutan ditambahkan dengan asam klorida dan selanjutnya diekstrak menggunakan etil asetat. Larutan tersebut membentuk dua lapisan yang kemudian dipisahkan. Fasa organik (lapisan atas) kemudian ditambahkan dengan magnesium sulfat anhidrat untuk menghilangkan air. Setelah melalui proses penyaringan, dilakukan proses evaporasi terhadap filtrat yang dihasilkan menggunakan *rotary evaporator vacuum* pada suhu sekitar 60-70°C.

Setelah itu, hasil evaporasi didinginkan dengan cara dimasukkan dalam *freezer* sehingga terbentuk kristal 1-metil-benzotriazol. Kristal ini disaring secara cepat dengan menggunakan corong buchner dalam keadaan dingin kemudian dimurnikan dengan cara rekristalisasi menggunakan n-heksan. Kristal yang terbentuk dilarutkan dalam n-heksan dengan bantuan pemanasan. Setelah didekantasi, larutan tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *freezer* hingga terbentuk kristal murni 1-metil-benzotriazol. Kristal tersebut diuji titik lelehnya dengan menggunakan *melting block* dan dilakukan analisa menggunakan FTIR.

## **Tahap II : Oktilasi-Kuartenerisasi Terhadap 1-Metil-1,2,3-Benzotriazol**

Pada tahap ini akan dilakukan alkilasi dan pembentukan garam kuartener benzotriazolium dari reaksi antara 1-metil-1,2,3-benzotriazol dengan menggunakan oktil bromida.

### *Sintesis Cairan Ionik 1,3-Metiloktil-1,2,3-Benzotriazolium Bromida ([MOBzt]Br)*

Cairan ionik 1,3-metiloktil-benzotriazolium bromida disintesis melalui reaksi antara 1-metil benzotriazol dan oktilbromida. Sebanyak 10 gram kristal 1-metil benzotriazol (75 mmol) dilarutkan dalam asetonitril dan dimasukkan dalam labu dasar bulat pada set alat refluks. 15 mL oktilbromida (85 mmol) ditambahkan dan direfluks selama 24 jam pada suhu 75-85°C. Setelah direfluks, produk yang dihasilkan dievaporasi dengan *rotary evaporator vacuum* pada suhu 80°C. Cairan ionik yang terbentuk disimpan dalam botol dan ditutup dengan menggunakan *aluminium foil*.

## **Tahap III: Reaksi Metatesis Anion**

Pada tahap ini, dilakukan pergantian anion dengan mereaksikan garam 1,3-metiloktil benzotriazolium bromida dengan garam perak dari anion yang digunakan.

### *Sintesis Cairan Ionik 1,3-Metiloktil-1,2,3-Benzotriazolium Tiosianat ([MOBzt]SCN)*

Cairan ionik 1,3-metiloktil-benzotriazolium tiosianat disintesis melalui reaksi metatesis anion antara [MOBzt]Br dengan AgSCN berlebih dalam pelarut metanol. Sebanyak 1,655 gram [MOBzt]Br (5,07 mmol) ditambahkan dengan 0,872 gram AgSCN (5,25 mmol) dalam pelarut metanol kemudian diaduk dengan

menggunakan pengaduk magnet selama 6 jam pada suhu kamar. Produk kemudian disaring dan dievaporasi hingga diperkirakan pelarut tersebut menguap seluruhnya. Cairan ionik [MOBzt]SCN kemudian disimpan dalam botol vial kecil.

*Sintesis Cairan Ionik 1,3-Metiloktil-1,2,3-Benzotriazolium Asetat ([MOBzt]CH<sub>3</sub>COO)*

Cairan ionik 1,3-metiloktil-benzotriazolium asetat disintesis melalui reaksi metatesis antara [MOBzt]Br dengan CH<sub>3</sub>COOAg berlebih dalam pelarut metanol. Sebanyak 1,413 gram [MOBzt]Br (4,33 mmol) ditambahkan dengan 0,840 gram CH<sub>3</sub>COOAg (5,03 mmol) dalam pelarut metanol kemudian diaduk dengan menggunakan pengaduk magnet selama 6 jam pada suhu kamar. Produk kemudian disaring dan dievaporasi hingga diperkirakan pelarut tersebut menguap seluruhnya. Cairan ionik [MOBzt]CH<sub>3</sub>COO kemudian disimpan dalam botol vial kecil.

### **3.2.2 Karakterisasi Struktur Cairan Ionik**

Karakterisasi struktur senyawa hasil sintesis dilakukan dengan metode spektroskopi infra merah (FTIR). Analisis FTIR ini dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia dengan menggunakan alat FTIR (SHIMADZU, FTIR-8400).

### **3.2.3. Preparasi Tandan Kosong Kelapa Sawit**

Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) diambil dari Serang, Banten. Sebelumnya TKKS diberikan perlakuan awal yaitu pencucian menggunakan

aquabides untuk menghilangkan debu-debu yang melekat pada sampel kemudian TKKS tersebut dijemur di bawah sinar matahari sampai kering. Sampel yang telah dikeringkan siap untuk diproses, setelah sebelumnya dihaluskan menggunakan blender.

### 3.2.4 Studi Pelarutan dan Rekonstitusi Tandan Kosong Kelapa Sawit

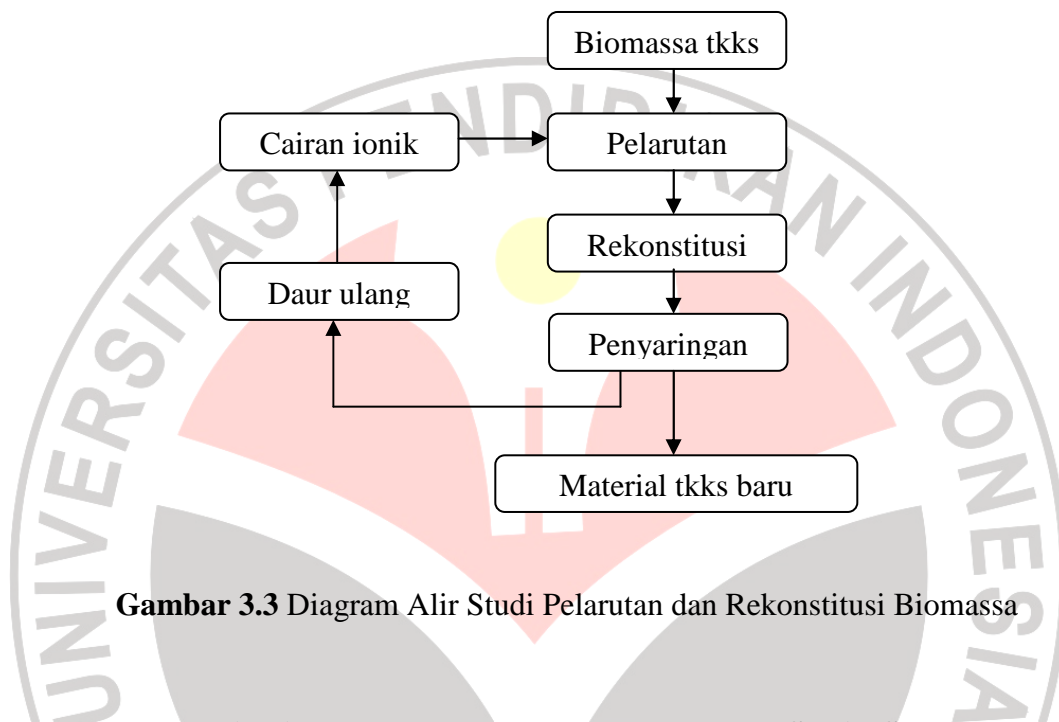
Dalam tahap ini tiga jenis cairan ionik yang telah disintesis disiapkan dengan menimbang dan menempatkannya dalam cawan krus. Sampel serbuk tandan kosong kelapa sawit (TKKS) disiapkan dengan menimbang sampel tersebut sebanyak 1% dari massa cairan ionik yang digunakan. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *oven microwave* menggunakan *microwave* LG MS-2327ARB dengan daya rendah (*low*) yaitu sebesar 90 W. Selama pemanasan, cawan krus dikeluarkan dan dikocok dan dimasukkan kembali dalam *microwave* hingga serbuk TKKS tersebut melarut seluruhnya. Penambahan serbuk TKKS ke dalam cairan ionik tersebut dilakukan terus menerus hingga cairan ionik sudah tidak mampu lagi melarutkan serbuk TKKS.

Dalam proses rekonstitusi TKKS, larutan serbuk TKKS dalam cairan ionik ini disimpan dalam tempat yang rata kemudian ditambahkan dengan metanol. Serbuk TKKS yang terbentuk kembali tersebut kemudian dipisahkan dari larutannya dan dikeringkan. Untuk mengetahui pengaruh proses pelarutan terhadap serbuk TKKS maka serbuk TKKS ini kemudian dianalisis menggunakan metode *X-ray diffraction* (XRD), *Fourier Transform Infra Red* (FTIR) dan



*Scanning Electron Microscopy* (SEM) sedangkan filtrat hasil penyaringan dilakukan proses evaporasi sehingga cairan ionik dapat diperoleh kembali.

Secara keseluruhan tahap studi pelarutan dan rekonstitusi biomassa dapat digambarkan sebagai berikut.



**Gambar 3.3** Diagram Alir Studi Pelarutan dan Rekonstitusi Biomassa

### 3.2.5 Karakterisasi serbuk Tandan Kosong Kelapa Sawit Sebelum dan Setelah Proses Pelarutan

Kajian pengaruh proses pelarutan pada biomassa TKKS dibatasi pada struktur TKKS dan kristalinitas. Struktur permukaan TKKS dianalisa menggunakan alat *Scanning Electron Microscope* (JEOL JSM-6360LA), kristalinitas TKKS menggunakan alat *X-ray diffraction* (XRD) Panalytical dan gugus fungsi menggunakan alat *fourrier transform infra red* (FTIR). Kedua analisis tersebut dilakukan di Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi dan Kelautan Bandung. Kedua analisa ini dilakukan untuk mengetahui sampel serbuk

TKKS awal dan serbuk TKKS hasil proses rekonstitusi setelah melalui proses pelarutan menggunakan cairan ionik.

Indeks kristalinitas dari selulosa yang ada di dalam TKKS (CrI) dapat diketahui dari hasil pengukuran menggunakan XRD dan FTIR. Penentuan indeks kristalinitas untuk XRD menggunakan rumus:

$$\text{CrI} = (I_{002} - I_{\text{am}}) / I_{002} \times 100$$

dimana  $I_{002}$  dan  $I_{\text{am}}$  adalah intensitas pada saat  $2\theta = 22,6^\circ$  dan  $2\theta = 18,7^\circ$  (M. Yoshida, *et al.*, 2008).

### 3.2.6 Hidrolisis Enzimatik Serbuk Tandan Kosong Kelapa Sawit

Pada tahap ini dilakukan hidrolisis enzimatik menggunakan enzim selulase terhadap TKKS awal dan TKKS setelah proses rekonstitusi. Hidrolisis enzimatik ini dilakukan berdasarkan adaptasi prosedur yang telah dikembangkan dalam literatur (Lee, *et al.*, 2008). Akan tetapi, pada TKKS dilakukan uji kualitatif dan kuantitatif glukosa terlebih dahulu yaitu uji Benedict dan uji Nelson-Somogyi untuk mengetahui keberadaan glukosa sebelum hidrolisis enzimatik.

Pada tahap ini, sebanyak 20 mg TKKS awal dan TKKS hasil rekonstitusi ditambahkan enzim selulase komersial (aktivitas = 34 FPU mL<sup>-1</sup>). Enzim selulase ini diperoleh dari Laboratorium Fermentasi ITB. Hidrolisis enzimatik dilakukan di dalam botol vial 10 mL pada suhu 37°C selama 48 jam dengan menggunakan 50 mM buffer sitrat (pH 4,7) sebanyak 3,5 mL di dalam *water bath shaker* 200 rpm. Semua reaksi dilakukan doublet.

### 3.2.7 Penentuan Kadar Glukosa

Campuran yang diperoleh dari tahap hidrolisis enzimatis selanjutnya disaring dan diambil filtratnya. Filtrat yang mengandung glukosa tersebut selanjutnya dianalisis dengan menggunakan metoda Nelson-Somogyi. Pada tahap penentuan kadar glukosa dapat dibagi menjadi tiga tahap, yaitu pembuatan pereaksi Nelson-Somogyi, pembuatan kurva standar glukosa, dan penentuan kadar glukosa tandan kosong kelapa sawit. Prosedur penentuan kadar glukosa dilakukan berdasarkan adaptasi dari literatur (Norton Nelson, 1994 dan Michael Somogyi, 1952 dalam Linda, 2007).

#### **Tahap I : Pembuatan pereaksi Nelson-Somogyi**

##### *Pembuatan pereaksi Somogyi I*

Sebanyak 12 gram K-Na-tartarat dan 24 gram  $\text{NaHCO}_3$ , 24 g  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  dan 144 g  $\text{NaSO}_4$  dilarutkan di dalam 400 mL aquades.

##### *Pembuatan pereaksi Somogyi II*

Sebanyak 4 g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dan 36 g  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  dilarutkan di dalam 200 mL aquades.

##### *Pembuatan pereaksi Nelson*

Sebanyak 25 g amonium molibdat dilarutkan dalam 450 mL aquades ditambah 21 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat dan 3 g  $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  yang dilarutkan dalam 24 mL aquades. Larutan kemudian dinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam.

#### **Tahap II: Pembuatan kurva standar glukosa**

Kurva standar dibuat dengan cara melarutkan 1 gram glukosa ke dalam 1 liter aquades. Larutan glukosa kemudian diencerkan untuk memperoleh larutan

glukosa dengan variasi konsentrasi sebesar 40 mg/L, 80 mg/L, 120 mg/L, 160 mg/L dan 200 mg/L.

Pembuatan kurva standar glukosa dilakukan dengan menggunakan metode Nelson-Somogyi dengan menggunakan glukosa murni. Sebanyak 0,8 mL pereaksi Somogyi I dan 0,2 mL pereaksi Somogyi II ditambahkan ke dalam 1 mL larutan glukosa berbagai variasi konsentrasi di dalam tabung reaksi kemudian dikocok. Tabung-tabung kemudian dimasukkan ke dalam air mendidih selama 10 menit. Setelah itu, dibiarkan sampai dingin. Sebanyak 1 mL pereaksi Nelson dan 2 mL aquades dimasukkan ke dalam tabung dan dikocok. Kandungan glukosa kemudian diukur dengan spektrofotometer CAMSPEC M106 pada panjang gelombang 520 nm.

### **Tahap III: Penentuan kadar glukosa tandan kosong kelapa sawit**

Sebanyak 1 mL filtrat hasil hidrolisis enzimatis dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan 0,8 mL pereaksi Somogyi I dan 0,2 mL pereaksi Somogyi II. Larutan yang terbentuk kemudian dihomogenkan. Selanjutnya tabung reaksi diinkubasi di dalam penangas air mendidih selama 10 menit. Setelah didinginkan, kemudian ditambahkan 1 mL pereaksi Nelson dan 2 mL aquades ke dalam tabung reaksi. Larutan kemudian dikocok sehingga homogen dan diukur serapan cahayanya pada  $\lambda$  520 nm. Data absorbansi yang diperoleh kemudian dikonversikan ke dalam persamaan regresi kurva standar glukosa.