

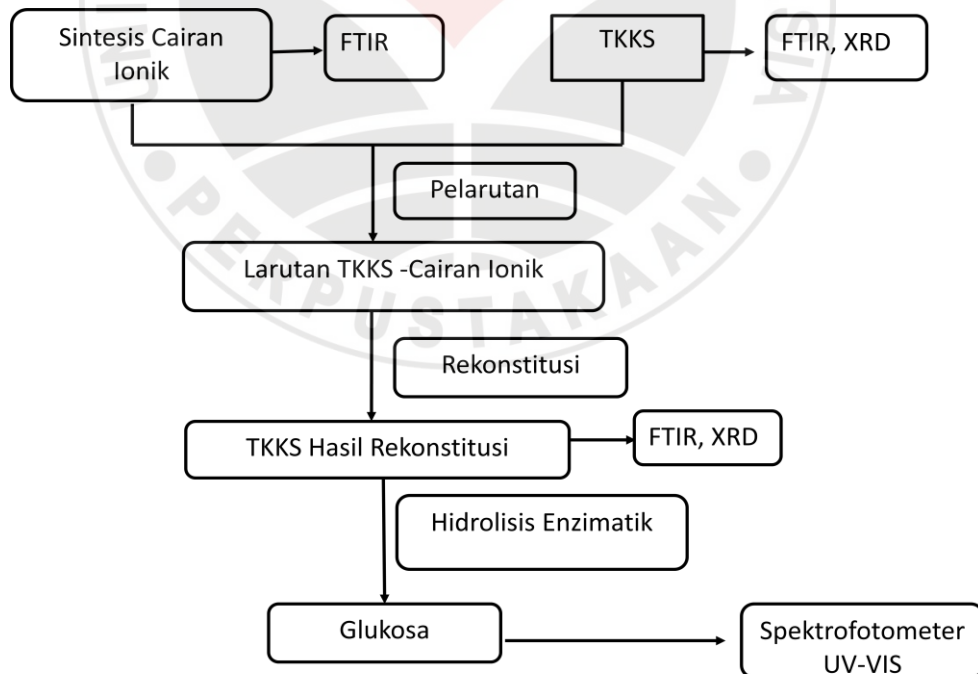
## BAB III METODE PENELITIAN

### 3.1 Waktu dan Lokasi Penelitian

Pelaksanaan penelitian dimulai sejak minggu ke-4 bulan Januari sampai Juni 2013 di Laboratorium Riset Kimia Makanan dan Material Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia. Untuk karakterisasi struktur menggunakan FTIR dan analisis menggunakan spektrofotometer UV-VIS dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik Instrumen FPMIPA UPI. Analisis *X-ray diffraction* (XRD) dilakukan di Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi dan Kelautan (PPGL) Bandung.

### 3.2 Sistematika Penelitian

Penelitian akan dilakukan berdasarkan disain yang dapat digambarkan pada skema berikut

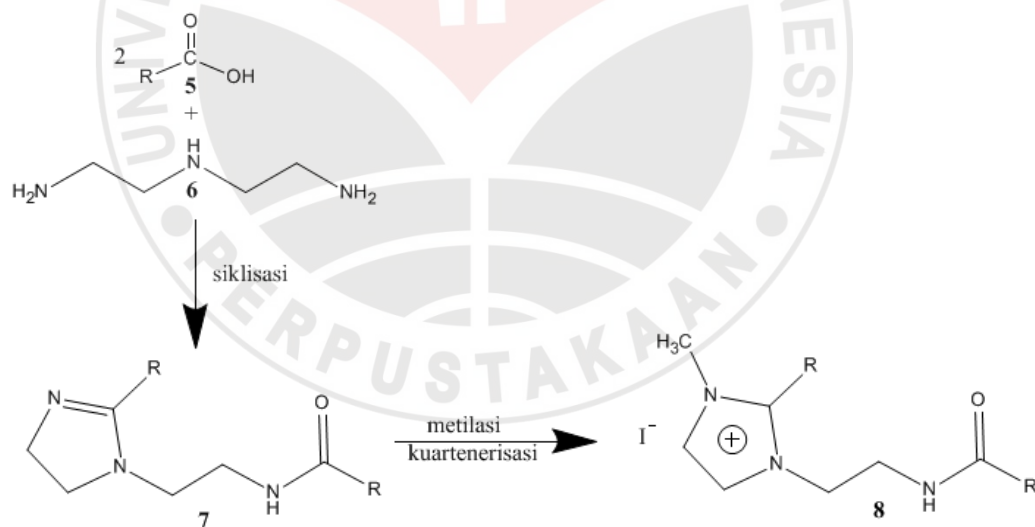


**Gambar 3.1** Bagan Alir Penelitian

Sistematika penelitian dibagi dalam enam tahap, yaitu sintesis cairan ionik dengan total jumlah garam *fatty imidazolinium* yang akan disintesis sebanyak tiga, dengan memvariasikan tiga substitusi gugus alkil pada kation dengan gugus oleil cis [*cis*- $\omega$ -9-CH<sub>3</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>16</sub>CH<sub>2</sub>-] dengan anion iodida [I<sup>-</sup>], tiosianat [SCN<sup>-</sup>] dan asetat [CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>], 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.

### 3.2.1 Sintesis Cairan Ionik Berbasis Fatty Imidazolinium

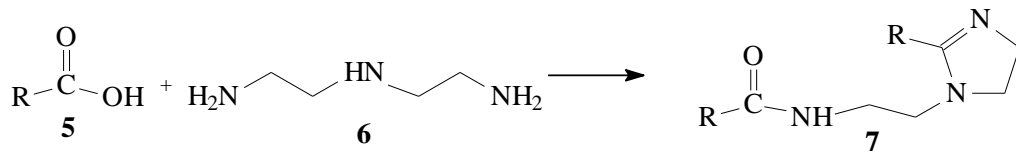
Garam *fatty imidazolinium* dengan berbagai gugus alkil disintesis berdasarkan dua tahap reaksi (1) pembentukan *fatty imidazolina* **7** dari asam lemak **5** dan dietilinetriamina (DETA) **6** melalui reaksi siklisasi dan (2) metilasi-kuartenerisasi terhadap *fatty imidazolina* **7** menggunakan metil iodida.



**Gambar 3.2** Mekanisme Proses Sintesis Garam *Fatty Imidazolinium Iodida*

#### Tahap Pertama: Pembentukan *Fatty imidazolina*

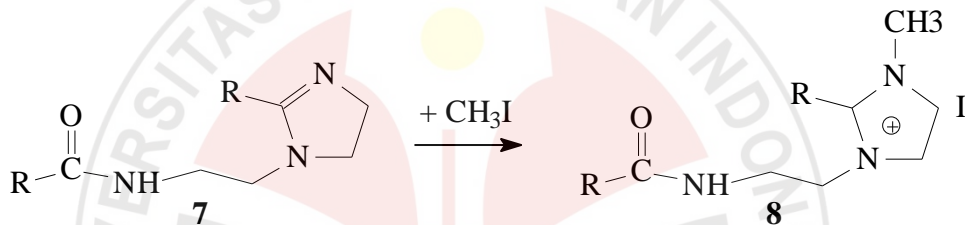
Untuk keperluan ini akan digunakan asam lemak **5** dengan R yaitu cis oleil dan dietilinetriamina (DETA) **6** melalui reaksi siklisasi seperti yang dikembangkan Bajpai dan Tyagi (2008) dengan metode gelombang mikro (*microwave*).



**Gambar 3.3** Reaksi Pembentukan *Fatty imidazolina*

**Tahap Kedua:** Metilasi-Kuartenerisasi Terhadap *Fatty imidazolina*

Pada tahap ini akan dilakukan metilasi dan pembentukan garam kuartener *fatty imidazolinium* dari reaksi antara *fatty imidazolina* 7 dengan metil iodida ( $\text{CH}_3\text{I}$ ) seperti yang dikembangkan oleh Rumpun Cairan Ionik, KBK Kimia Material UPI (Mudzakir, 2004).



**Gambar 3.4** Persamaan Reaksi Metilasi-Kuarternisasi Terhadap *Fatty imidazolina*

**3.2.1.1 Alat dan Bahan**

**Alat**

Peralatan yang digunakan untuk tahapan preparasi dan sintesis kristal cair ionik *fatty imidazolinium* antara lain: *microwave* 800 W, alat-alat gelas, satu set alat refluks, penangas listrik, termometer alkohol  $110^\circ\text{C}$ , termometer raksa  $250^\circ\text{C}$ , *magnetic stirrer*, corong *Buchner*, pompa vakum, satu set alat *rotary evaporator*, neraca analitik, *plastic wrap*, *aluminium foil*, kertas saring *Whatman 41*. Sedangkan untuk karakterisasi struktur digunakan FTIR (SHIMADZU, FTIR-8400).

**Bahan**

Bahan-bahan yang digunakan untuk keseluruhan penelitian ini adalah: asam oleat-*cis ekstrak pure* produk Merck, metil iodida p.a produk Aldrich, dietilenatriamina p.a produk Aldrich, metilen klorida teknis produk Bratachem, etil asetat teknis produk Bratachem, metanol teknis produk Bratachem,

AgCH<sub>3</sub>COO p.a produk Merck, AgNO<sub>3</sub> p.a produk Merck, kalium tiosianat p.a produk Merck.

### 3.2.1.2 Prosedur Penelitian

#### Sintesis Garam *Fatty Imidazolinium Iodida*

Sintesis kristal cair ionik *fatty imidazolinium* dibagi ke dalam empat tahap diantaranya sintesis Cis-Oleil Imidazolina, sintesis cis-Oleil-Imidazolinium Iodida, sintesis AgSCN dan AgCH<sub>3</sub>COO, sintesis cis-Oleil-Imidazolinium Asetat dan sintesis cis-Oleil Imidazolinium Tiosianat. Dalam sintesis *fatty imidazolina* yang sering digunakan ialah metode refluks, namun pada penelitian ini digunakan metode *microwave* yang berhasil diujicobakan oleh Divya Bajpai dan Tyagi (2008) dan hasilnya sangat baik. Sedangkan dalam sintesis *fatty imidazolinium* (metilasi-kuatenerisasi) digunakan metode refluks sesuai dengan yang digunakan dalam penelitian Divya Bajpai dan Tyagi (2008).

#### Tahap I. Sintesis Cis-Oleil-Imidazolina

Ke dalam gelas kimia pyrex ukuran 500 mL, dimasukkan 2,06 gram (20 mmol) dietilenatriamina dan 40 mmol asam lemak (asam oleat) secara hati-hati dan diaduk hingga merata. Campuran pereaksi diiradiasi menggunakan *microwave* dengan daya 800 W selama waktu tertentu dan suhu akhir dicatat. Pertama kali, dilakukan penentuan waktu optimal reaksi dengan cara mengukur suhu dari campuran setiap 1 menit. Setelah menunjukkan dua suhu maksimum, maka kemudian reaksi dihentikan. Setelah waktu optimal reaksi diketahui, untuk reaksi selanjutnya *microwave* di set pada waktu tersebut.

Campuran reaksi dibiarkan hingga mencapai suhu ruangan. Kemudian campuran dipindahkan ke dalam labu dasar bulat leher tiga. Etil asetat ditambahkan sebanyak 80 mL dan campuran kemudian dipanaskan sampai mendekati titik didih (40°C) etil asetat, kurang lebih dibutuhkan waktu 30 menit. Campuran disaring dalam keadaan panas menggunakan corong buchner yang dihubungkan dengan pompa vakum. Kemudian filtrat dipekatkan dengan

evaporator dengan cara memisahkan pelarut etil asetat. Produk merupakan semi-padatan berwarna coklat kekuningan.

### **Tahap II. Sintesis Cis-Oleil-Imidazolinium Iodida**

1 mol *fatty imidazolina* ditambahkan metilen klorida hingga larut dan kemudian dimasukkan ke dalam labu dasar bulat leher tiga. Ke dalam labu dasar bulat ditambahkan 1,5 mol metil iodida, selanjutnya campuran direfluks pada suhu konstan 40°C sambil diaduk dengan *magnetic stirrer* kurang lebih selama 4 jam. Kemudian hasilnya didinginkan hingga mencapai suhu ruangan, dan selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan evaporator pada suhu dibawah 80°C.

### **Tahap III. Sintesis AgSCN**

Sebanyak 3 gram  $\text{AgNO}_3$  dimasukkan ke dalam gelas kimia 400 mL, dilarutkan dalam 300 mL aquades, diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 10-15 menit. Disaring menggunakan kertas saring dan corong biasa. Sebanyak 5 gram KSCN dimasukkan ke dalam gelas kimia 100 mL, ditambahkan 80 mL aquades, diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen. Larutan  $\text{AgNO}_3$  yang telah dingin ditetesi dengan larutan KSCN hingga jenuh. Setelah itu, disaring menggunakan corong *buchner* yang di vakum dengan keadaan tertutup rapat agar sinar matahari tidak dapat mengenai senyawa AgSCN. AgSCN yang telah terbentuk kemudian dikeringkan selama dua hari tanpa menggunakan panas matahari maupun oven. Produk yang dihasilkan merupakan padatan berwarna putih.

### **Tahap IV. Sintesis Cis-Oleil-Imidazolinium Asetat dan Sintesis Cis-Oleil-Imidazolinium Tiosianat**

Sintesis ini merupakan pertukaran anion (metatesis) yaitu antara anion Iodida dengan Tiosianat dan Asetat. Sebanyak 7,4390 gram (10 mmol) Cis-Oleil Imidazolinium Iodida dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer 250 mL yang telah ditutupi oleh aluminium foil lalu dilarutkan dengan 1000 mL metanol. Ke dalam

larutan tersebut ditambahkan AgSCN maupun AgCH<sub>3</sub>COO sebanyak 1,6593 gram (10 mmol) untuk AgSCN dan 1,66 gram (10 mmol) untuk AgCH<sub>3</sub>COO. Campuran tersebut kemudian diaduk dengan menggunakan *magnetic stirrer* selama 3-4 jam hingga timbul endapan kuning cerah. Filtrat dipisahkan dengan endapan dengan cara didekantasi dan disaring menggunakan membrane PTFE. Pelarut pada filtrat kemudian diuapkan dengan cara disimpan di dalam lemari asam. Setelah semua pelarut menguap, lalu hasil rekristalisasi di vakum selama ± 2 jam untuk memastikan tidak ada lagi pelarut dalam hasil rekristalisasi itu. Produk berupa padatan berwarna kuning cerah.

### 3.2.2 Karakterisasi Struktur Cairan Ionik

Karakterisasi struktur garam hasil sintesis akan dilakukan dengan metode spektroskopi infra merah FTIR (SHIMADZU, FTIR-8400) yang dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik Instrumen FPMIPA UPI. Metode ini akan berperan besar mengungkap pola interaksi sekunder kation-anion yang terjadi pada bahan. Frekuensi getaran tarik dan ulur ikatan CH pada kation serta pergeserannya karena pengaruh perubahan struktur kation akan direkam melalui metode spektroskopi infra merah (FTIR).

Analisis tersebut bertujuan untuk menentukan gugus fungsi suatu senyawa. Dari hasil pengujian ini dapat diambil keuntungan dengan membandingkan spektrum senyawa yang tidak diketahui terhadap spektrum cuplikan yang asli. Suatu kesesuaian puncak demi puncak merupakan bukti yang kuat tentang identitasnya. Hal itu pula yang diterapkan pada penelitian ini yaitu dengan membandingkan spektra sebelum dan sesudah sintesis, adanya kesesuaian ataupun perbedaan puncak yang teramati dapat menjelaskan dari kemungkinan struktur senyawa yang dihasilkan.

### 3.2.3 Preparasi Tandan Kosong Kelapa Sawit

Tandan kosong kelapa sawit (TKKS) didapat dari limbah pabrik di Riau. Sebelumnya TKKS diberikan perlakuan awal yaitu pencucian menggunakan aquades 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. Selanjutnya TKKS disaring menggunakan saringan yang berukuran seratus mesh. Sehingga didapatkan TKKS dengan ukuran seratus mesh.

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

Dalam tahap ini tiga jenis cairan ionik yang telah disintesis disiapkan dengan menimbang dan menempatkannya dalam pelat kaca. 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 *microwave* dengan daya rendah (*low*) yaitu sebesar 100 W yang digunakan untuk mengganggu ikatan hidrogen intramolekular selulosa yang ada di dalam TKKS. Proses pelarutan ini dilakukan selama 30 menit dan diselang setiap 2 menit untuk melihat perubahan struktur TKKS menggunakan mikroskop.

Dalam proses rekonstitusi TKKS, larutan serbuk TKKS dalam cairan ionik ini ditambahkan dengan metanol sebagai pelarut kemudian diaduk menggunakan *magnetic stirrer* sebesar 200 rpm. 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 XRD (PANalytical, X'Pert PRO PW3040) dan FTIR (SHIMADZU, FTIR-8400). Sedangkan filtrat hasil penyaringan dilakukan proses evaporasi sehingga cairan ionik dapat diperoleh kembali dan dapat digunakan kembali untuk proses pelarutan.

### **3.2.5 Karakterisasi Serbuk Tandan Kosong Kelapa Sawit Sebelum dan Sesudah Proses Pelarutan**

Kajian pengaruh proses pelarutan pada biomassa TKKS dibatasi pada ukuran partikel dan kristalinitas sebelum dan setelah proses pelarutan yang dilakukan menggunakan alat XRD (PANalytical, X'Pert PRO PW3040) dan gugus fungsi menggunakan alat FTIR (SHIMADZU, FTIR-8400). Kedua analisis

tersebut dilakukan di Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi dan Kelautan Bandung (PPGL) dan Laboratorium Instrumen FPMIPA UPI Bandung. Kedua analisis 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. Penentuan indeks kristalinitas untuk XRD menggunakan rumus:

$$CI(\%) = \frac{I_c}{I_c + I_a} \times 100\%$$

dengan CrI adalah indeks kristalinitas dalam persen,  $I_c$  dan  $I_a$  adalah intensitas pada daerah puncak kristalin dan amorf (Yue, 2007).

Sedangkan untuk ukuran partikel, hasil XRD dianalisis dengan formula Scherrer yang diameter partikelnya memenuhi persamaan (Bousquet, 2005) :

$$D = \frac{k \cdot \lambda}{B_o \cdot \cos \theta}$$

Dimana : D = ukuran butir kristal (nm)

k = konstanta dengan nilai 0,9

$\lambda$  = panjang gelombang sinar-X (Å) nilainya  $\text{CuK}\alpha$  : 1,54187

$B_o$  = lebar puncak pada setengah maksimum (FWHM) (rad)

$\theta$  = sudut Bragg ( $^\circ$ )

### 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.



## **Alat**

Tabung reaksi pyrex, rak tabung, gelas kimia 250 mL, gelas ukur 500 mL, spatula, batang pengaduk, pipet tetes, *water bath shaker*, neraca analitik, penjepit tabung, aluminium foil, plastik *wrap*.

## **Bahan**

Asam sitrat p.a produk Merck, natrium sitrat p.a produk Merck, aquades, enzim *selulase* 2000 U/mg.

### **Tahap I. Pembuatan Buffer Sitrat**

Proses pembuatan buffer sitrat terdiri dari tiga tahap yakni pembuatan larutan stok A yang terdiri dari 0,1 M larutan Asam sitrat (21,01 gram Asam sitrat dilarutkan dalam 1 L aquades), pembuatan larutan stok B yang terdiri dari 0,1 M larutan Natrium sitrat (29,41 gram Natrium Sitrat dilarutkan dalam 1 L aquades) dan pembuatan larutan untuk mendapatkan pH 5,5 dengan menambahkan 16 mL larutan stok A dan 34 mL larutan stok B, kemudian larutan dicukupkan volumenya hingga 100 mL.

### **Tahap II. Proses Inkubasi**

Pada tahap ini, sebanyak 20 mg TKKS awal dan TKKS hasil rekonstitusi ditambahkan enzim *selulase* komersial (aktivitas = 2000 U/mg). Hidrolisis enzimatis dilakukan di dalam tabung reaksi pada suhu 37°C selama 48 jam dengan menggunakan 50 mM buffer sitrat (pH 5,5) sebanyak 3,5 mL di dalam *water bath shaker* 200 rpm. Semua reaksi ini 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 (Nelson, 1994 dan Somogyi, 1952 dalam Linda, 2007).

### **Alat**

Tabung reaksi pyrex, rak tabung, gelas kimia 500 mL, gelas kimia 250 mL, labu dasar bulat 25 mL, labu dasar bulat 1000 mL, spatula, batang pengaduk, pipet tetes, inkubator, neraca analitik, penjepit tabung, aluminium foil, plastik wrap dan UV-VIS Mini SHIMADZU 1240.

### **Bahan**

Natrium asetat p.a. produk *Merck*, natrium karbonat anhidrat produk *Merck*, K-Na-Tartarat p.a produk *Merck*, natrium bikarbonat produk *Merck*, natrium sulfat anhidrat produk *Merck*,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  produk *Merck*,  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  p.a,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  produk *Merck*,  $\text{Na}_2\text{AsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  produk *Merck*, glukosa p.a., tandan kosong kelapa sawit dengan ukuran partikel 100 mesh dan aquades.

### **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 diinkubasi 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 UV-Vis Mini SHIMADZU 1240 pada panjang gelombang 702 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  $\lambda$  702 nm dengan spektrofotometer UV-Vis Mini SHIMADZU 1240. Data absorbansi yang diperoleh kemudian dikonversikan ke dalam persamaan regresi kurva standar glukosa.