

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dimulai sejak Januari sampai dengan Juni 2013. Penelitian yang dilakukan ialah sintesis cairan ionik, pertukaran anion, studi kelarutan biomassa dan hidrolisis enzimatis ampas tebu (bagas) dilakukan di Laboratorium Riset Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA Universitas Pendidikan Indonesia. Analisis spektroskopi *Fourier Transform Infrared* (FTIR) dan analisis UV-VIS untuk menganalisis kadar glukosa dilakukan di Laboratorium Kimia Analitik Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI. Analisis *X-ray diffraction* (XRD) dilakukan di Pusat Penelitian dan Pengembangan Geologi dan Kelautan Bandung.

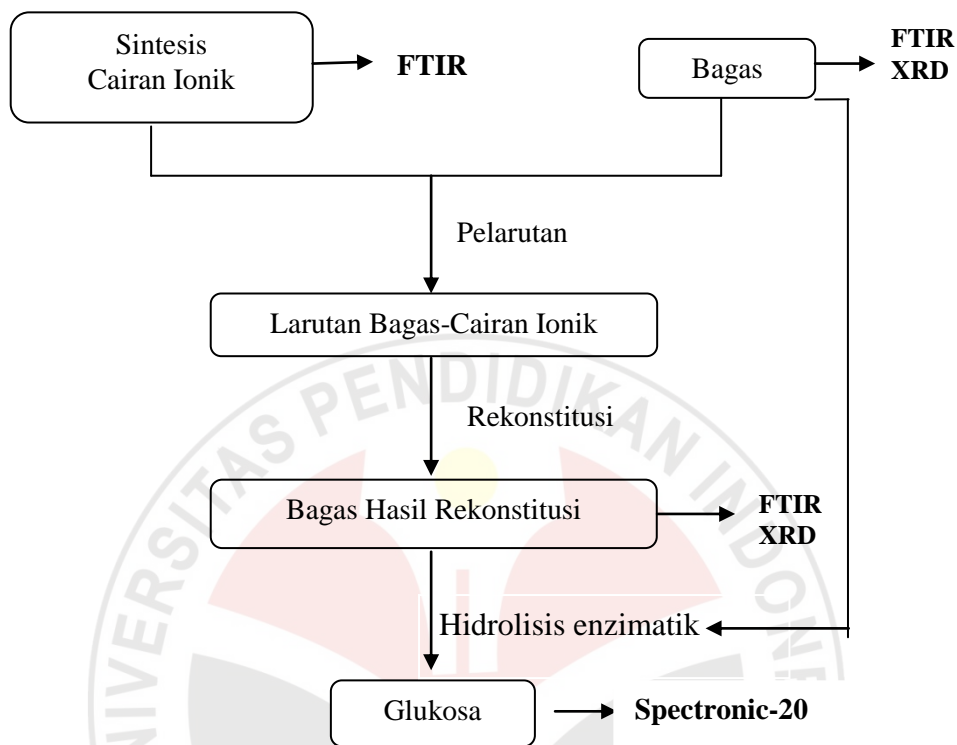
3.2 Sistematika Penelitian

Sistematika penelitian dibagi dalam empat tahap, yaitu preparasi (sintesis) cairan ionik, karakterisasi struktur cairan ionik, studi pelarutan dan hidrolisis enzimatis bagas serta tahap karakterisasi bagas sesudah dan sebelum dilakukan pengolahan awal menggunakan cairan ionik.

Pada tahap ini akan dilakukan sintesis tiga jenis cairan ionik dari garam *fatty* imidazolinium yaitu dengan memvariasikan tiga substitusi anion pada kation oleil cis [*cis*- ω -9-CH₃(CH₂)₁₆CH₂-], dengan anion iodida, tiosianat dan asetat. Cairan ionik ini disintesis berdasarkan adaptasi prosedur yang telah dikembangkan dalam literatur (Forsyth, *et.al.*, 2003).

Setiap garam hasil sintesis akan dilakukan karakterisasi struktur menggunakan *Fourier Transform Infra Red* (FTIR), dan dilakukan penentuan kristalinitas menggunakan *X-ray diffraction* (XRD) pada sesudah dan sebelum rekonstitusi.

Penelitian akan dilakukan berdasarkan disain yang dapat digambarkan pada skema berikut:



Gambar 3.1 Bagan Alir Penelitian

3.2.1 Alat dan Bahan

3.2.1.1 Alat

Peralatan yang digunakan untuk tahapan preparasi dan sintesis cairan ionik antara lain 1 set alat *rotary evaporator* (BUCHI), 1 *microwave*, 1 set alat *sentrifuse*, 1 set *water bath shaker*, 1 set alat refluks, *microscop*, neraca analitik, alat-alat gelas, *melting block*, spatula, *magnetic stirrer*, *mantle heater*, *freezer*, corong *Buchner* dan *aluminum foil*. Alat-alat untuk karakterisasi hasil yang didapat digunakan instrument FTIR (SHIMADZU, FTIR-8400), UV-VIS (Mini SHIMADZU 1240), XRD (PANalatyca, X'Pert PRO PW3040).

3.2.1.2 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, asetonitril teknis produk Bratachem, metilen klorida teknis produk Bratachem, etil asetat teknis produk Bratachem, metanol teknis produk Bratachem; K-Na-Tartarat produk Merck; Natrium bikarbonat produk Merck; Natrium sulfat anhidrat produk Merck; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ produk Merck; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ produk Merck; H_2SO_4 produk Merck; $\text{NaHAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ produk Bratachem; glukosa p.a. produk Merck; aquades, serta bagas dengan ukuran partikel 100 mesh.

3.2.2 Prosedur Penelitian

3.2.2.1 Sintesis cis-Oleil Imidazolina

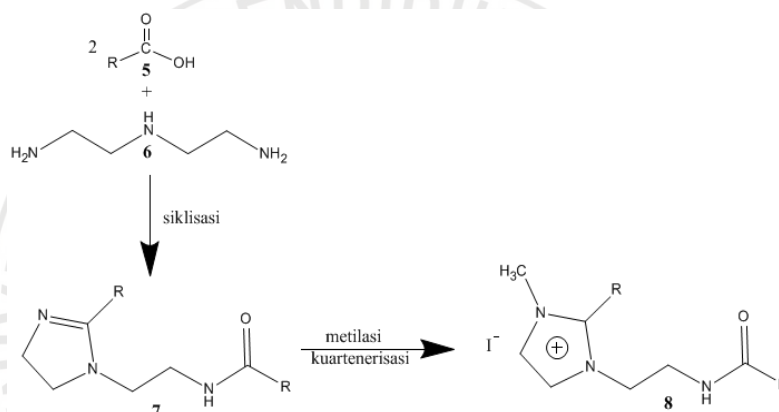
Ke dalam gelas kimia pyrex ukuran 500 mL, dimasukkan 2,06 gram (20 mmol) dan dietilenatriamina 40 mmol asam lemak (asam oleat-*cis*) secara hati hati dan diaduk hingga merata. Campuran pereaksi dipanaskan menggunakan *microwave* dengan daya 800W selama waktu tertentu dan suhu akhir dicatat. Campuran reaksi dibiarkan hingga mencapai suhu ruangan. Kemudian campuran dipindahkan ke dalam labu dasar bulat leher tiga. Etilasetat ditambahkan sebanyak 80 mL dan campuran kemudian dipanaskan sampai mendekati titik didih (40°C) kurang lebih dibutuhkan waktu 30 menit. Campuran disaring dalam keadaan panas menggunakan corong buchner yang dihubungkan dengan pompa vakum. Kemudian filtrat dipisahkan dengan evaporator dengan cara memisahkan pelarut etil asetat. Produk merupakan semi-padatan berwarna coklat kekuningan. Hasil dikarakterisasi menggunakan instrumen FTIR.

3.2.2.2 Sintesis cis-Oleil Imidazolinium Iodida

Sebanyak 1 mol cis-oleil-Imidazolina ditambahkan metilen klorida hingga larut dan kemudian dimasukkan ke dalam labu dasar bulat leher tiga yang telah dilapisi dengan *aluminium foil*. Kemudian ditambahkan 2 mol metil iodida kedalam labu dasar bulat dan direfluks pada suhu konstan 40°C sambil diaduk

menggunakan *magnetic stirrer* kurang lebih selama 4 jam. Kemudian hasil yang didapatkan didinginkan hingga mencapai suhu ruangan dan dilakukan pemekatan menggunakan evaporator pada suhu 80°C, selanjutnya dilakukan pengeringan didalam lemari asam dan karakterisasi menggunakan instrument FTIR.

Sintesis cis-Oleil Imidazolinium iodida terdapat 2 tahap. Tahap pertama pembentukan *fatty* imidazolina (no 7) dari asam lemak (no 5) dan dietilinetriamina (no 6) melalui reaksi siklisasi dan tahap kedua reaksi metilasi-kuartenerisasi terhadap *fatty* imidazolina (no 7) menggunakan metil iodida.



Gambar 3.2 Sintesis *Fatty* Imidazolinium Iodida

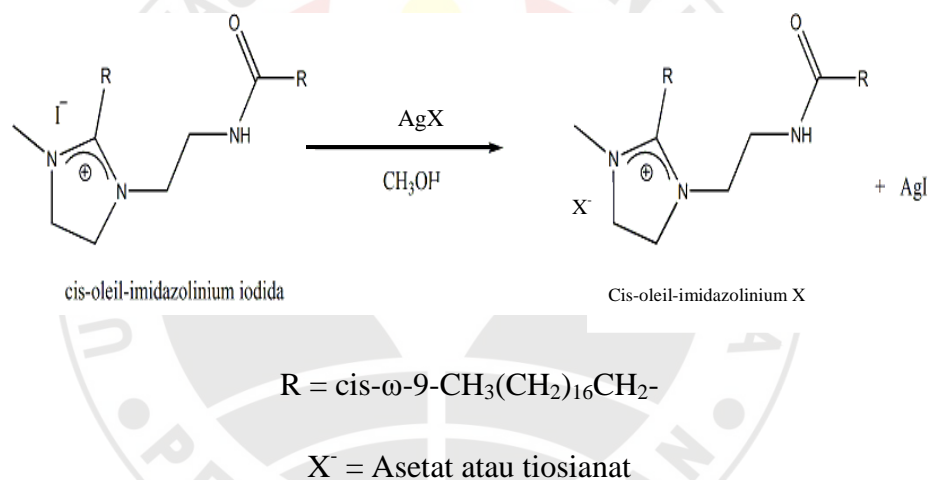
Sintesis cis Oleil imidazolinium (metilasi-kuatenerisasi) digunakan metode refluks sesuai dengan yang digunakan dalam penelitian Divya Bajpai dan Tyagi, (2008).

3.2.2.3 Sintesis *Fatty* Imidazolinium Tiosianat dan *Fatty* Imidazolinium Asetat

Sebanyak 0,01 mol cis-oleil imidazolinium iodida dimasukkan ke dalam gelas kimia yang telah dibungkus oleh *aluminium foil* kemudian dilarutkan dalam 100 mL metanol dan ditambahkan 0,01 mol AgX. X merupakan Tiosianat atau Asetat. Larutan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* selama 4 jam. Hasil yang diperoleh didekantasi, disaring menggunakan membran selulosa-nitrat dan

diuapkan pada lemari asam hingga jenuh. Hasil yang diperoleh dikarakterisasi menggunakan instrumen FTIR.

Sintesis *cis*-oleil-imidazolinium asetat dan *cis*-imidazolinium tiosianat melalui reaksi metatesis atau pertukaran anion. Reaksi metatesis yang dilakukan adalah mengganti anion iodida pada *cis*-oleil-imidazolinium iodida dengan anion asetat dan tiosianat dengan penambahan senyawa perak dan metanol sebagai pelarut. Perak asetat atau perak tiosianat digunakan karena kation perak akan dengan mudah bereaksi dengan anion iodida membentuk senyawa AgI (padatan putih) yang memiliki kelarutan rendah sehingga akan mudah untuk dipisahkan. Reaksi metatesis ditunjukkan pada gambar 3.3



Gambar 3.3 Persamaan Reaksi Metatesis Terhadap *cis*-Oleil-Imidazolinium Iodida.

3.3 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).

3.3.1 Preparasi Biomassa Bagas

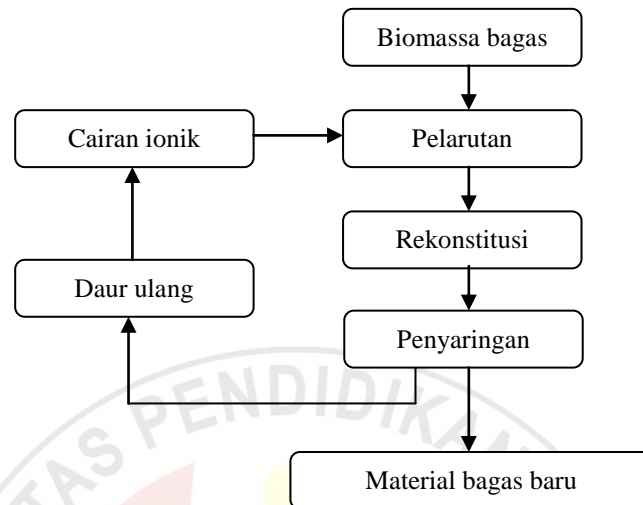
Limbah bagas diambil dari Probolinggo (Jawa Timur), Indonesia. Bagas dicuci terlebih dahulu menggunakan aquades kemudian dikeringkan dibawah terik matahari. Setelah kering, serat selulosa dihaluskan menggunakan blender dan disaring menggunakan penyaring berukuran 100 mesh. Serat dikarakterisasi menggunakan metode spektroskopi FTIR dan XRD.

3.3.2 Studi Pelarutan dan Rekonstitusi Bagas

Dalam tahap ini tiga jenis cairan ionik yang telah disintesis disiapkan dengan menimbang dan menempatkannya dalam cawan krus. Sampel serbuk bagas disiapkan dengan menimbang sampel tersebut sebanyak 1% dari massa cairan ionik yang digunakan. Campuran tersebut kemudian dimasukkan ke dalam *oven microwave* menggunakan *microwave* LG dengan daya rendah (*low*) yaitu sebesar 100 W. Selama pemanasan, cawan krus dikeluarkan, dikocok, dan dimasukkan kembali dalam *microwave* hingga serbuk bagas tersebut melarut seluruhnya. Penambahan serbuk bagas ke dalam cairan ionik tersebut dilakukan terus menerus hingga cairan ionik sudah tidak mampu lagi melarutkan serbuk bagas.

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

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



Gambar 3.4 Diagram Alir Studi Pelarutan dan Rekonstitusi Biomassa

3.3.3 Karakterisasi Bagas Sebelum dan Sesudah Proses Pelarutan

Kajian pengaruh proses pelarutan pada biomassa bagas dibatasi pada struktur permukaan bagas dan kristalinitas. Kristalinitas bagas dianalisis menggunakan alat *X-ray Diffraction* (XRD). Kedua analisa ini dilakukan untuk mengetahui sampel serbuk bagas awal dan serbuk bagas hasil proses rekonstitusi setelah melalui proses pelarutan menggunakan cairan ionik. Serta analisis gugus fungsi menggunakan alat *Fourier Transform Infra Red* (FTIR). Penentuan nilai indeks kristalinitas dapat menggunakan persamaan Segal.

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

dimana CrI adalah indeks kristalinitas dalam persen, I_c dan I_a adalah intensitas pada daerah puncak kristalin dan amorp (Yue, 2007). Untuk menentukan ukuran partikel bagas dapat menggunakan persamaan Scherrer.

$$t = \frac{K\lambda}{\beta \cos\theta}$$

dimana t adalah ukuran kristalin (nm), K adalah faktor koreksi (0,9), λ adalah panjang gelombang yang digunakan (nm), β merupakan sudut koreksi pada setengah luas daerah puncak maksimum (radian) dan θ adalah sudut difraksi (Yue, 2007).

3.3.4 Hidrolisis Enzimatik Bagas

Pada tahap ini dilakukan hidrolisis enzimatik menggunakan enzim *selulase* terhadap bagas setelah proses rekonstitusi. Hidrolisis enzimatik ini dilakukan berdasarkan adaptasi prosedur yang telah dikembangkan dalam literatur (Lee, *et al.*, 2008).

Pada tahap ini, bagas hasil rekonstitusi sebanyak 20 mg ditambah enzim *selulase* komersial (aktivitas = 2000 FPU mL⁻¹). Enzim *selulase* ini diperoleh dari Solo yang sudah bersertifikat. 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.

3.3.5 Penentuan Kadar Glukosa

Campuran yang diperoleh dari tahap hidrolisis enzimatik selanjutnya disaring dan diambil filtratnya. Filtrat yang mengandung glukosa tersebut selanjutnya dianalisis dengan menambahkan pereaksi 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 bagas. Prosedur penentuan kadar glukosa dilakukan berdasarkan adaptasi dari literatur (Linda, 2007).

Tahap I. Pembuatan Pereaksi Nelson-Somogyi

Pembuatan pereaksi Somogyi I

Sebanyak 12 gram K-Na-tartarat dan 24 gram NaHCO₃, 24 g Na₂CO₃ dan 144 g NaSO₄ dilarutkan di dalam 400 mL aquades.

Pembuatan pereaksi Somogyi II

Sebanyak 4 gram CuSO₄.5H₂O dan 36 gram Na₂SO₄ dilarutkan di dalam 200 mL aquades.

Pembuatan pereaksi Nelson

Sebanyak 25 gram amonium molibdat dilarutkan dalam 450 mL aquades ditambah 21 mL H₂SO₄ pekat dan 3 g NaHAsO₄.7H₂O yang dilarutkan dalam 24 mL aquades. Larutan kemudian dinkubasi pada suhu 37°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 pada panjang gelombang 702 nm, dilakukan scanning panjang gelombang terlebih dahulu.

Tahap III. Penentuan Kadar Bagas

Sebanyak 1 mL filtrat hasil hidrolisis enzimatik 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 menggunakan alat spektrofotometer UV-VIS pada serapan cahaya λ 702 nm. Data absorbansi yang diperoleh kemudian dikonversikan ke dalam persamaan regresi kurva standar glukosa.