

BAB III

METODE PENELITIAN

Penelitian ini terdiri atas lima tahap, tahap pertama adalah penapisan fitokimia, tahap kedua adalah isolasi minyak biji turi dengan metode sokletasi dengan pelarut n-heksana, tahap ketiga adalah penurunan bilangan asam minyak biji turi dengan metode ekstraksi cair menggunakan pelarut etanol untuk menurunkan kadar FFA dan penentuan bilangan penyabunan minyak, tahap keempat adalah identifikasi asam lemak utama penyusun trigliserida minyak biji turi dengan metode GC-MS, dan tahap kelima adalah reaksi transesterifikasi minyak biji turi dengan menggunakan katalis NaOH dan identifikasi produk yang diperoleh menggunakan metode GC-MS.

3.1. Alat dan Bahan

3.1.1. Alat

Penelitian ini menggunakan sejumlah peralatan gelas yang di perlukan, seperangkat alat sokletasi, *Buchi rotary evaporator* untuk pemisahan pelarut dari minyak biji turi, piknometer untuk menentukan berat jenis minyak biji, seperangkat alat titrasi untuk penentuan bilangan asam, seperangkat alat refluks untuk reaksi transesterifikasi minyak biji turi dan seperangkat instrumen GC-MS shimadzu QP-5000 untuk identifikasi residu asam lemak dalam trigliserida minyak biji turi dan identifikasi produk reaksi transesterifikasi.

3.1.2. Bahan

Bahan yang digunakan adalah minyak biji turi (*Sesbania grandiflora* (L) Pers) yang diisolasi sendiri dengan ekstraksi soklet menggunakan pelarut

n-heksan. Sampel diperoleh dari daerah Gubug, Grobogan, Jawa Tengah. Pelarut akuades dan etanol untuk penurunan bilangan asam, sodium hidroksida (NaOH) 0,1 N sebagai titran dan fenolftalein sebagai indikator dalam proses titrasi penentuan bilangan asam, natrium sulfat anhidrat sebagai agen pengering, sedangkan pereaksi yang digunakan untuk penapisan fitokimia adalah pereaksi Meyer, ferriklorida (FeCl_3) 1 %, anhidrida asetat, asam sulfat pekat dan sodium hidroksida (NaOH) 1 N, metanol pa untuk reaksi transesterifikasi dan kristal sodium hidroksida (NaOH) padat sebagai katalisator.

3.2. Metode Kerja

Penelitian dilakukan di laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Diponegoro, Semarang. Analisis GC-MS dilakukan di laboratorium Kimia Organik, Jurusan Kimia, FMIPA, Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

3.2.1. Penapisan Fitokimia

Penapisan fitokimia dilakukan terhadap biji turi dan minyak hasil soklet. biji turi yang telah kering ditumbuk hingga menjadi serbuk kemudian dilakukan penapisan fitokimia yang meliputi : uji golongan alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid/steroid, kuinon dan saponin.

a. Alkaloid

Serbuk biji turi ditambahkan 3 mL NH_4OH 25% dan ditambahkan kloroform kemudian digerus dan disaring. Filtrat ditambah H_2SO_4 2 N sebanyak 10 tetes lalu dikocok, didiamkan, lapisan asam diambil dan diletakkan dalam plat

tetes kemudian dilakukan tes dengan Mayer. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih.

b. Flavonoid

Sampel ditambah akuades kemudian dipanaskan hingga mendidih dan disaring. Filtrat dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan pita Mg dan HCl kemudian dikocok, didiamkan hingga terjadi pemisahan. Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan warna kuning.

c. Tanin

Filtrat yang sudah didapat ditambah dengan larutan 1 % FeCl_3 . Adanya tanin ditandai dengan timbulnya warna hijau violet.

d. Triterpenoid / Steroid

Serbuk biji turi dimaserasi dengan eter, kemudian filtratnya diambil. Fasa eter dan minyak hasil isolasi secara terpisah dimasukkan dalam cawan porselin dan ditambah 10 tetes anhidrida asetat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Adanya triterpenoid ditandai dengan perubahan warna merah ungu sedangkan warna biru menunjukkan adanya steroid.

e. Kuinon

Serbuk direbus dengan akuades, kemudian filtrat diambil dalam tabung reaksi, ditambah beberapa tetes larutan 1 N NaOH. Adanya kuinon ditandai dengan terbentuknya warna merah.

f. Saponin

Sampel dimasukkan dalam tabung reaksi kemudian ditambah akuades dan dididihkan. Setelah sampel dingin kemudian dikocok kuat-kuat. Adanya saponin ditunjukkan dengan adanya busa yang stabil selama 30 menit.

3.2.2. Isolasi Minyak Biji Turi

Isolasi minyak biji turi dilakukan dengan metode sokletasi menggunakan pelarut n-heksana. Sebanyak 100 gram serbuk biji turi kering dimasukkan ke dalam labu ekstraktor soklet dalam timbel. Pelarut n-heksana 200 mL dimasukkan ke dalam labu alas bulat kemudian peralatan dirangkai dan dipanaskan dengan penangas air dan suhu dalam labu dipertahankan pada 70-80 °C. Sokletasi dilakukan selama 6-7 jam kemudian minyak dipisahkan dari pelarutnya dengan *rotary evaporator* pada suhu 70°C. Ekstrak dalam n-heksana diambil kemudian dikeringkan dengan Na₂SO₄ anhidrat sedangkan pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh minyak. Selanjutnya minyak kasar yang diperoleh ditimbang untuk menentukan rendemen dan ditentukan berat jenisnya menggunakan piknometer.

3.2.3. Penurunan Bilangan Asam Minyak Biji Turi dan Penentuan bilangan Penyabunan

Minyak yang diperoleh diturunkan bilangan asamnya dengan metode ekstraksi cair menggunakan etanol (rasio etanol : minyak biji turi adalah 1:1 v/v). FFA pada lapisan atas dipisahkan dan etanol yang tersisa di lapisan minyak dipisahkan dengan *rotary evaporator* pada suhu 80 °C. Perlakuan ekstraksi tersebut dilakukan kembali dengan bervariasi konsentrasi pelarut etanol yaitu 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 96 % dan 100 %.

Penentuan bilangan asam dilakukan dengan memasukkan sebanyak 4 gram minyak ke dalam labu leher tiga yang dirangkai dengan kondensor, tabung CaCl₂ yang berisi silika gel, pengaduk magnet dan termometer. Selanjutnya ke dalam

labu leher tiga ditambahkan 10 mL etanol absolut. Campuran dipanaskan di atas penangas selama 30 menit dan suhu dijaga 80 °C. Larutan yang sudah dingin dititrasi menggunakan larutan NaOH 0,1 N dengan indikator pp.

Penentuan bilangan penyabunan dilakukan dengan memasukkan sebanyak 1,5 gram minyak ke dalam labu leher tiga yang dirangkai dengan kondensor, tabung CaCl₂ yang berisi silika gel, pengaduk magnet dan termometer. Selanjutnya ke dalam labu leher tiga ditambahkan 15 mL NaOH metalonat. Campuran dipanaskan di atas penangas selama 30 menit dan suhu dijaga 70 °C. Larutan yang sudah dingin dititrasi menggunakan larutan HCl 0,5 N dengan indikator pp.

3.2.4. Identifikasi Residu Asam Lemak Dengan GC-MS

Minyak biji turi bilangan asam minimum kemudian dianalisis menggunakan GC-MS dengan cara sebagai berikut:

Minyak biji turi direfluks dengan boron trifluorida dalam metanol selama 15 menit. Larutan kemudian didinginkan pada temperatur kamar hingga terbentuk dua lapisan dan dipisahkan. Produk pada lapisan atas diinjeksikan sebanyak 40 μ L ke dalam GC-MS yang dioperasikan menggunakan kolom dengan panjang 25 meter, diameter 0,25 mm dan ketebalan 0,25 μ m dan fasa diam CP-Sil 5CB pada temperatur yang diprogram antara 60-270 °C dengan kenaikan temperatur 10 °C/menit dan temperatur detektor 280 °C. Kromatogram dan spektrogram masing-masing senyawa yang diperoleh diidentifikasi menggunakan perbandingan pada data yang terdapat dalam pustaka. Kesamaan spektra disimpulkan berdasarkan indek kemiripan (*Similarity Indeks*), kesamaan ion molekul dan puncak dasar.

3.2.5. Reaksi Transesterifikasi

Sebanyak 10 gram minyak biji turi dimasukkan ke dalam labu leher tiga dipanaskan hingga pada temperatur 50 °C sambil diaduk menggunakan *magnetic steerer*, kemudian ditambahkan larutan NaOH dalam 2,199 gram metanol. Pemanasan dilanjutkan hingga temperatur larutan mencapai 70 °C selama 45 menit. Larutan didiamkan selama 30 menit hingga terbentuk dua lapisan. Kedua lapisan kemudian dipisahkan dengan menggunakan corong pisah, lapisan atas ditimbang sedangkan lapisan bawah dipanaskan kembali pada temperatur 60 °C selama 15 menit, kemudian didinginkan pada temperatur kamar dan ditimbang. Proses tersebut dilakukan kembali untuk persen berat NaOH terhadap minyak biji turi 0,1 %; 0,3 %; 0,5 %; 0,7 %; 0,9 %; 1,1 % dan 1,3 %. Produk dari reaksi transesterifikasi minyak biji turi ini kemudian dianalisis menggunakan GC-MS.

