

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

Penelitian ini terdiri atas tiga tahap utama. Tahap pertama adalah penapisan fitokimia biji kapuk. Tahap kedua adalah isolasi dan analisis minyak biji kapuk. Tahap ketiga adalah sintesis etil ester dari minyak biji kapuk melalui reaksi transesterifikasi dengan katalis kalium hidroksida (KOH).

3.1. Penapisan Fitokimia Biji Kapuk

Penapisan fitokimia biji kapuk meliputi penentuan adanya saponin, flavonoid, tanin dan steroid dilakukan dengan prosedur yang sesuai seperti yang ditulis oleh J. B. Harborne (1996).

3.2. Isolasi dan Analisis Minyak Biji Kapuk

Minyak diisolasi dari biji kapuk dengan metode ekstraksi sokslet menggunakan pelarut n-heksan. Selanjutnya minyak yang diperoleh dipisahkan dari asam-asam lemak bebasnya menggunakan metode ekstraksi cair dengan pelarut etanol 96 %. Analisis komponen asam lemak penyusun trigliserida minyak biji kapuk dilakukan dengan metode GC-MS.

3.3. Reaksi Transesterifikasi

Reaksi transesterifikasi dilakukan dengan merefluks minyak biji kapuk yang telah diminimalisir kadar FFA-nya, etanol p.a. (99,8 %) dan kalium hidroksida pada suhu 50 °C selama 45 menit. Reaksi transesterifikasi dalam penelitian ini melibatkan satu variabel bebas serta beberapa variabel yang dikonstantkan. Variabel-variabel tersebut adalah:

1. Variabel bebas : massa katalis KOH.
2. Variabel konstan : Kecepatan pengadukan, volume total, suhu reaksi, waktu reaksi dan konsentrasi alkohol.

3.4. Alat dan Bahan

Penelitian ini menggunakan sejumlah peralatan gelas yang diperlukan. Seperangkat alat refluks untuk melangsungkan reaksi. *Buchi rotary evaporator* untuk pemisahan pelarut dari minyak biji kapuk. Piknometer untuk menentukan berat jenis minyak biji kapuk. Instrumen GC-MS Shimadzu QP-5000 untuk identifikasi residu asam lemak dalam trigliserida minyak biji kapuk. Instrumen GC-MS dioperasikan menggunakan kolom dengan panjang 25 meter, fasa diam CP-Sil 5CB, temperatur diprogram antara 60-270 °C (kenaikan temperatur 10 °C/5 menit), gas pembawa helium bertekanan 26 kPa dan detektor TCD dengan temperatur 280 °C.

Bahan yang digunakan adalah minyak yang diekstraksi sendiri dari biji kapuk sebagai bahan dasar sintesis etil ester. Pelarut n-heksan untuk mengekstraksi minyak. Etanol 96 % untuk pemisahan FFA. Etanol p.a. dan kalium hidroksida berturut-turut sebagai reaktan dan katalis dalam reaksi transesterifikasi. Fenolftalein (PP) untuk

indikator dalam titrasi penentuan bilangan asam. Natrium sulfat anhidrat (Na_2SO_4) sebagai bahan pengering.

3.5. Metode Kerja

3.5.1. Penapisan fitokimia biji kapuk Menurut J. B. Harborne (1996)

a. Saponin

Sebanyak 5 g serbuk biji kapuk dididihkan dalam 10 mL air selama 5 menit, kemudian disaring dalam keadaan panas. Selanjutnya larutan tersebut dikocok kuat secara vertikal selama 10 detik. Jika terbentuk busa dengan tinggi 1-10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang pada penambahan setetes asam klorida 2 N menunjukkan adanya saponin.

b. Flavonoid

Sebanyak 5 mL filtrat dari larutan (a) ditambah 1 mg serbuk magnesium, 1 mL asam klorida pekat dan 2 mL amil alkohol, dikocok kuat dan dibiarkan memisah. Adanya flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah, kuning atau jingga pada lapisan amilalkohol.

c. Tanin

Sebanyak 10 g serbuk biji kapuk dididihkan dalam 10 mL air selama 5 menit, kemudian didinginkan dan disaring. Filtrat yang diperoleh dibagi tiga. Larutan pertama ditambahkan larutan besi(III) klorida 1 %, timbulnya warna hijau violet oleh terbentuknya senyawa kompleks menunjukkan adanya tanin.

d. Steroid

Sebanyak 5 g serbuk biji kapuk dimaserasi dengan 20 mL eter selama 2 jam, kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh diuapkan sampai kering. Residu yang diperoleh ditambahkan 2 tetes asam asetat anhidrat dan 1 tetes asam sulfat pekat. Jika timbul warna merah yang kemudian berubah menjadi hijau dan akhirnya biru menunjukkan adanya steroid.

3.5.2. Isolasi dan analisis minyak biji kapuk

Biji kapuk dikeringkan di bawah sinar matahari kemudian ditumbuk halus. Labu ekstraktor sokslet diisi dengan 100 g serbuk biji kapuk kering dalam *thimble*. Labu alas bulat diisi dengan 200 mL n-heksan teknis kemudian dipanaskan dengan penangas air dan suhu dalam labu dipertahankan pada 70-80 °C. Soksletasi dihentikan setelah 5 jam dan minyak dipisahkan dari pelarut n-heksan dengan *rotary evaporator* pada suhu 70 °C. Ekstrak dalam n-heksan diambil kemudian dikeringkan dengan Na₂SO₄ anhidrat, sedangkan pelarutnya diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh minyak. Selanjutnya minyak yang diperoleh ditimbang untuk menentukan rendemen minyak biji kapuk yang diperoleh.

Minyak yang diperoleh dipanaskan pada suhu 60-80°C selama 3 jam. Lalu didinginkan selama 4-5 jam sampai kotoran mengendap. Kotoran dipisahkan dengan cara dekantasi. Minyak kasar diekstraksi dengan etanol 96 % dengan rasio volume etanol terhadap minyak biji kapuk adalah 1 : 1. FFA pada lapisan atas dipisahkan dan etanol yang tersisa di lapisan minyak dipisahkan menggunakan *rotary evaporator*

pada suhu 80 °C. Selanjutnya dilakukan penentuan bilangan asam untuk mengetahui kadar FFA dalam minyak.

Minyak biji kapuk yang kadar FFA-nya telah diminimalisir lalu dianalisis menggunakan GC-MS. Dalam metode ini, minyak tersebut harus ditransformasi dengan boron trifluorida dalam metanol menjadi senyawa metil-ester yang memiliki titik didih lebih rendah untuk menghindari kerusakan kolom GC-MS.

Minyak biji kapuk dengan bilangan asam rendah direfluks dengan reagen boron trifluorida dalam metanol selama 15 menit. Kemudian didinginkan pada temperatur kamar hingga terbentuk dua lapisan dan dipisahkan. Produk pada lapisan atas diinjeksikan sebanyak 40 µL ke dalam GC-MS.

Spektrogram masing-masing senyawa yang diperoleh lalu dianalisis dengan menggunakan perbandingan pada data yang terdapat dalam pustaka. Kesamaan spektra disimpulkan berdasarkan indeks kemiripan (*Similarity Indeks*), kesamaan ion molekul dan puncak dasar (minimum 80%).

3.5.3. Reaksi transesterifikasi

Sebanyak 20 gram minyak biji kapuk dimasukkan ke dalam labu refluks leher tiga. Pada saat yang bersamaan 5,28 g etanol dicampur dengan 0,2 g KOH (persen berat KOH terhadap minyak 1,0 %) dan dimasukkan ke dalam labu yang telah berisi minyak. Kemudian campuran direfluks pada suhu 50 °C selama 45 menit sambil diaduk menggunakan *magnetic steerer*. Setelah itu campuran didiamkan selama 60 menit.

Campuran diaduk kembali menggunakan *magnetic steerer* selama 20 menit, kemudian ditambahkan 3 mL akuades dan diaduk kembali selama 20 menit. Setelah pendiaman selama 60 menit, gliserol yang terbentuk pada lapisan bawah dipisahkan dari lapisan ester, kemudian masing-masing lapisan ditimbang. Proses dilakukan kembali untuk persen berat KOH terhadap minyak biji kapuk 0,40 %; 0,50 %; 0,60 %; 0,70 %; 0,75 %; 0,80 %; 1,25 %; 1,5 % dan 1,75 %.

