

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Prinsip Metodologi

Prinsip metodologi optimasi rasio berat NaOH terhadap minyak biji karet (*Hevea brasiliensis*) dalam proses pembentukan produk transesterifikasi menggunakan metanol adalah mereaksikan alkohol dengan minyak biji karet dengan bilangan asam rendah di dalam alat refluks menggunakan katalisator NaOH pada temperatur 70 °C selama 45 menit. Variabel yang dijaga tetap adalah jenis alkohol, perbandingan mol alkohol terhadap trigliserida, temperatur dan waktu reaksi, sedangkan variabel yang dievaluasi adalah massa fasa gliserol yang dihasilkan sebagai akibat variasi rasio berat NaOH terhadap minyak biji karet.

Penapisan fitokimia dilakukan untuk mengetahui golongan senyawa yang terkandung dalam minyak biji karet. Penelitian ini dilakukan di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Diponegoro Semarang, sedangkan analisis GC-MS dilakukan di laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Gadjah Mada Yogyakarta.

3.2. Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1. Bahan

Minyak biji karet diisolasi tersendiri dengan metode soklet dari biji karet yang diperoleh dari PT. Perkebunan Nusantara IX, kebun Merbuh, Desa Kaliwringin,

Kecamatan Singorojo, Kabupaten Kendal, Jawa Tengah. Bahan yang digunakan sebagai pelarut untuk proses ekstraksi adalah *n*-heksan teknis, etanol 96 % teknis. Na₂SO₄ anhidrat sebagai pengering dalam proses pemurniannya. Pereaksi yang digunakan untuk penapisan fitokimia, yaitu: pereaksi Meyer, FeCl₃ 1 %, anhidrida asetat, asam sulfat pekat, NaOH 1 N, sedangkan bahan untuk proses transesterifikasi adalah metanol p.a. dan kristal NaOH.

3.2.2. Alat

Alat utama dalam penelitian ini adalah satu set alat soklet untuk isolasi minyak biji karet, satu set alat refluk untuk proses transesterifikasi, *rotary evaporator* merk Buchii untuk pemisahan minyak biji karet dari pelarut, buret dan erlenmeyer untuk penentuan bilangan asam dengan metoda titrasi dan GC-MS Shimadzu QP 5000 untuk menentukan berat molekul senyawa asam lemak penyusun trigliserida minyak biji karet.

3.3. Cara Kerja

3.3.1. Penapisan Fitokimia dan Isolasi Minyak Biji Karet

Biji karet dipecah dan diambil daging bijinya, dibersihkan, diiris halus kemudian diangin-angin dalam temperatur ruang hingga kering. Setelah kering, biji dihaluskan sehingga didapat serbuk biji karet kering. Terhadap serbuk biji karet dilakukan penapisan fitokimia terhadap golongan alkaloid, flavonoid, tanin, terpenoid/steroid, kuinon dan saponin.

Uji alkaloid

Serbuk biji karet ditambahkan NH_4OH 25 % 3 mL dan ditambahkan kloroform kemudian digerus dan disaring. Filtrat ditambah H_2SO_4 2N sebanyak 10 tetes lalu dikocok, didiamkan, lapisan asam diambil dan diletakkan dalam plat tetes kemudian dilakukan tes dengan reagen Mayer. Adanya alkaloid ditunjukkan dengan terbentuknya endapan putih.

Uji flavonoid

Serbuk biji karet direbus dengan air dan disaring. Filtrat ditambahkan pita Mg, HCl dan amil alkohol kemudian dikocok, didiamkan hingga terjadi pemisahan. Adanya senyawa flavonoid ditandai dengan terbentuknya warna kuning.

Uji tanin

Serbuk biji karet ditambah aquades kemudian dipanaskan hingga mendidih kemudian disaring. Air rebusannya dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambah larutan 1 % FeCl_3 . Adanya tanin ditandai dengan timbulnya warna hijau violet.

Uji kuinon

Serbuk biji karet ditambah aquades kemudian dipanaskan hingga mendidih kemudian disaring. Air rebusannya ditambah beberapa tetes larutan 1 N NaOH. Adanya kuinon ditandai dengan terbentuknya warna merah.

Uji saponin

Serbuk biji karet dalam tabung reaksi dididihkan dengan air dan didinginkan kemudian disaring. Filtrat kemudian dikocok kuat-kuat. Adanya saponin ditunjukkan dengan adanya busa yang stabil selama 30 menit.

Uji triterpenoid/steroid

Serbuk biji karet dimaserasi dengan eter, kemudian diambil filtratnya. Fasa eter dan minyak hasil isolasi secara terpisah dimasukkan dalam cawan porselin dan diuji dengan pereaksi Liebermann Burchard. Adanya triterpenoid ditandai dengan perubahan warna merah sedangkan warna biru menunjukkan adanya steroid.

Sebanyak 50 g dari serbuk biji karet selanjutnya diekstraksi dengan soklet menggunakan pelarut *n*-heksan selama 9 jam pada temperatur 70-80 °C. Ekstrak minyak dalam *n*-heksan diambil dan ditambahkan dengan Na₂SO₄ anhidrat, disaring kemudian pelarut diuapkan dengan *rotary evaporator* sehingga didapatkan minyak biji karet. Bilangan asam dalam minyak ditentukan dengan metode titrasi dimana ke dalam 1 g minyak ditambahkan indikator pp dan dititrasi dengan NaOH 0,98 N. Minyak kemudian diturunkan bilangan asamnya dengan metode ekstraksi pelarut menggunakan etanol 96 % dengan tiap 30 g minyak diekstraksi menggunakan 15 mL etanol 96 %. Fasa minyak yang terbentuk kemudian diekstraksi kembali sebanyak 3 kali dengan pelarut yang sama. Pada tahap ini pelarut yang masih terdapat dalam fasa minyak diuapkan dengan *rotary evaporator*.

3.3.2. Penentuan Asam Lemak Utama Penyusun Trigliserida

Minyak biji karet dengan bilangan asam rendah direfluks dengan reagen 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 µL ke dalam GC-MS yang dioperasikan menggunakan kolom kaca dengan panjang 25 meter, diameter 0,25 mm dan

ketebalan 0,25 μm dan fasa diam CP-Sil 5CB pada temperatur yang diprogram antara 60-270 $^{\circ}\text{C}$ dengan kenaikan temperatur 10 $^{\circ}\text{C}/\text{menit}$, gas pembawa adalah helium laju 15 mL/menit dan temperatur detektor 280 $^{\circ}\text{C}$. Spektrogram masing-masing senyawa yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan perbandingan pada data yang terdapat dalam pustaka. Kesamaan spektra disimpulkan berdasarkan indeks kemiripan (*Similarity Indeks*), kesamaan ion molekul dan puncak dasar.

3.3.3. Reaksi Transesterifikasi

Dibuat larutan NaOH dalam 4,3754 g metanol dengan variasi NaOH sebagai berikut :

Larutan 1 : 0,02 g NaOH (0,1 % berat minyak)

Larutan 2 : 0,06 g NaOH (0,3 % berat minyak)

Larutan 3 : 0,10 g NaOH (0,5 % berat minyak)

Larutan 4 : 0,14 g NaOH (0,7 % berat minyak)

Larutan 5 : 0,18 g NaOH (0,9 % berat minyak)

Larutan 6 : 0,22 g NaOH (1,1 % berat minyak)

Selanjutnya setiap larutan tersebut secara terpisah dimasukkan ke dalam labu refluks yang berisi 20 g minyak yang telah dipanaskan pada temperatur 50 $^{\circ}\text{C}$. Pemanasan dilanjutkan hingga temperatur larutan mencapai 70 $^{\circ}\text{C}$ selama 45 menit. Larutan didiamkan selama 30 menit hingga terbentuk dua lapisan. Kedua lapisan kemudian dipisahkan dengan menggunakan corong pisah. Lapisan yang bawah dipanaskan pada temperatur 60 $^{\circ}\text{C}$ selama 15 menit, kemudian didinginkan pada temperatur kamar dan ditimbang.