### III. BAHAN DAN METODE

# 3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung, Bandar Lampung. Penelitian ini dilakukan pada bulan Februari sampai dengan Desember 2014.

### 3.2 Bahan dan Alat

Bahan utama yang digunakan dalam penelitian ini yaitu biomasa limbah agroindustri tandan kosong kelapa sawit (TKKS) yang diperoleh dari perkebunan kelapa sawit PTPN VII di Bekri Lampung Tengah, dan Enzim selulase (SQzyme CS P-acid cellulose) CSP-B Suntag. Bahan penunjang penelitian antaralain, natrium hidroksida (NaOH), H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, aquades, larutan buffer pH 4,8, Nelson A, Nelson B,arsenomolibdat, yang didapatkan dari Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, FakultasPertanian, Universitas Lampung.

Alat yang digunakan antara lain Erlenmeyer 100 mL (Pyrex), Erlenmeyer 250 mL (Pyrex), Erlenmeyer 1000 mL (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), tabung ukur 500 mL (Pyrex), gelas ukur 500 mL (Pyrex), labu ukur 1000 mL (Pyrex), gelas beker (Pyrex), mikropipet 1000µL (Thermo Scientific, Finnpipette F3), loyang,

timbangan 4 digit (Mattler M3000 Switzerland), ayakan (40 mesh), baskom, jerigen, corong, termometer, spatula, kertas saring, alumunium foil, cawan porselin, spektrophotometer (Thermo Scientific Genesys 20), grinder, *reciprocating shaker waterbath* (Polyscience), autoclave manual, oven (Philip Harris Ltd), desikator, dan hot plate (Cimerec3).

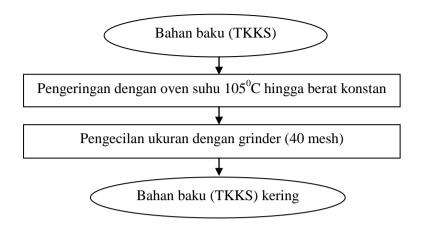
### 3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan 2 tahap dan 3 ulangan. Tahap pertama yaitu perlakuan awal basa dengan 2 faktor. Faktor pertama yaitu konsentrasi NaOH dengan 2 taraf yaitu 1,0 M dan 2,0 M. Faktor kedua yaitu waktu pemanasan dengan 3 taraf yaitu 30 menit, 45 menit, dan 60 menit. Tahap kedua yaitu prehidrolisis enzimatis dengan 2 faktor. Faktor pertama yaitu suhu prehidrolisis dengan 3 taraf yaitu 40°C, 45°C, 50°C. Faktor kedua yaitu kecepatan goyangan dengan empat taraf yaitu 0, 100 rpm, 125 rpm dan 150 rpm. TKKS dianalisis kadar selulosa, hemiselulosa, lignin, dan gula reduksi. Kemudian data disajikan dalam bentuk grafik dan dibahas secara deskriptif.

#### 3.4 Pelaksanaan Penelitian

# 3.4.1 Persiapan bahan baku

Menurut Samsuri *et al.* (2007) TKKS sebelum digunakan harus dikeringkan dengan oven pada suhu 105<sup>o</sup>C sampai berat konstan (3-5 jam). Setelah berat konstan kemudian di grinder dan disaring dengan ukuran 40 mesh dan disimpan dalam kondisi kering (Gambar 8).

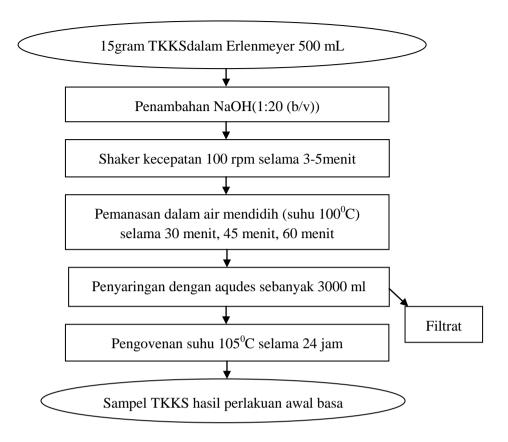


Gambar 8. Persiapan bahan baku

Sumber: Samsuri et al., 2007 yang dimodifikasi

### 3.4.2 Perlakuan awal basa

Perlakuan awal atau *pretreatment* dilakukan menurutmetode Septiyani (2011) yang telah dimodifikasi. Sampel TKKS ditimbang sebanyak 15 gram dan dimasukkan kedalam Erlenmeyer 500 mL, kemudian ditambahkan larutan NaOH (1:20b/v), dan dihomogenkan dengan menggunakan shaker pada kecepatan 100 rpm selama 3-5 menit. Selanjutnya sampel dipanaskan pada air mendidih (suhu 100°C) selama 30, 45 dan 60 menit. Kemudian disaring dengan kain saring dan dibilas dengan aquades sebanyak 3000 mL, dan kemudian padatan dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C hingga berat konstan (Gambar 9).

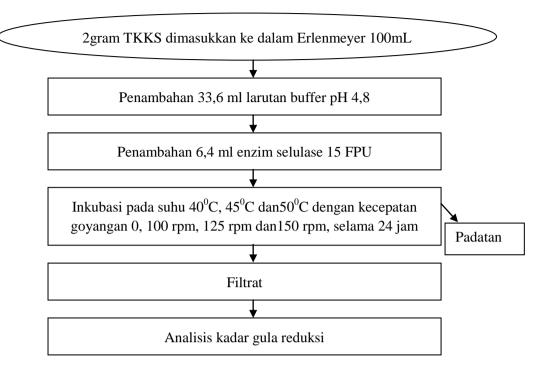


Gambar 9. Perlakuan awal basa

Sumber: Septiyani, 2011 yang dimodifikasi

### 3.4.3 Hidrolisis enzimatis

Hidrolisis enzim dilakukan menurut metode Widyasari (2011) yang telah dimodifikasi. Sebanyak 2 gram residu TKKS yang telah *pretreatment* dimasukan ke dalam Erlenmeyer 100 mL, ditambahkan buffer sitrat 33,6 mL pH 4,8 dan ditambahkan enzim selulase 15 FPU sebanyak 6,4 mL. Larutan kemudian diinkubasi dalam *shaker waterbath* dengan suhu 40°C, 45°C, 50°C dan goyangan 0, 100 rpm, 125 rpm, 150 rpm selama 24 jam (Gambar 10). Filtrat hasil hidrolisis diukur dan dihitung kadar gula reduksinya.



Gambar 10. Hidrolisis enzimatis

Sumber: Widyasari, 2011 yang telah dimodifikasi

# 3.5 Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini adalah kadar lignin, hemiselulosa, selulosa pada tahap perlakuan awal basa, dan kadar gula reduksi pada tahap prehidrolisis.

# 3.5.1 Kadar hemiselulosa, selulosa, lignin

Pengukuran kadar lignoselulosa ini dilakukan mengacu pada metode Chesson. Penentuan kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin menggunakan sampel tandan kosong kelapa sawit sebelum dan sesudah perlakuan awal dengan NaOH. Pengamatan kadar lignoselulosa dengan metode Chesson terdapat dalam 4 tahap. Tahap pertama, sampel TKKS dikeringkan dengan oven pada suhu 105°C sampai berat konstan. Sebanyak 1 gram dimasukan dalam erlenmayer 250 mL dan

ditambahkan aquades sebanyak 150 mL lalu dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* pada suhu 100°C selama 2 jam. Kemudian sampel disaring dengan kertas saring dan dibilas dengan aquades sampai volume filtrat 300 mL. Residu di oven pada suhu 105°C sampai berat konstan, dan dianggap berat a.

Tahap kedua yaitu residu dari berat a dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL lalu ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N sebanyak 150 mL. Kemudian residu dipanaskan dengan *hot plate* pada suhu 100°C selama 60 menit. Setelah pemanasan, sampel disaring dan dibilas dengan aquades sampai volume filtrat 300 mL dan dikeringkan sampai berat konstan, dan dianggap sebagai berat b.

Tahap ketiga yaitu residu dari berat b dimasukkan kembali ke dalam Erlenmeyer 250 mL lalu ditambahkan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 72% sebanyak 10 mL dan selanjutnya direndam selama 4 jam pada suhu ruang. Selanjutnya larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 N ditambahkan sebanyak 150 mL dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 jam. Setelah pemanasan, sampel disaring dan dibilas dengan aquades sampai volume filtrat 400 mL dan dikeringkan sampai berat konstan, dan dianggap berat c.

Selanjutnya tahap keempat yaitu residu dari berat c dilakukan pengabuan dengan menggunakan furnace pada suhu 600°C selama 4 jam lalu ditimbang dan dianggap sebagai berat d. Perhitungan kadar hemiselulosa, selulosa dan lignin dilakukan dengan cara berikut:

Kadar Hemiselulosa dapat dihitung dengan rumus:

Hemiselulosa (%) = 
$$\frac{a - b}{Berat \ Sampel} x100$$

Kadar Selulosa dapat dihitung dengan rumus:

Selulosa (%) = 
$$\frac{b - c}{Berat \ Sampel} x100$$

Kadar Lignin dapat dihitung dengan rumus:

$$Lignin (\%) = \frac{c - d}{Berat Sampel} x100$$

# 3.5.2 Kadar gula reduksi

Pengukuran kadar gula reduksi mengacu pada metode Nelson Somogyi yaitu sebanyak 1 mL filtrat hasil hidrolisis ditambahkan dengan larutan 1 mL reagensia Nelson, dan panaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit. Ambil tabung dan segera didinginkan dengan air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C. Setelah dingin1 mL reagensia Arsenomolybdat ditambahkan dan divortex sampai semua endapan CuSO<sub>4</sub> yang ada larut kembali. Setelah semua endapan CuSO<sub>4</sub> larut sempurna, 7 mL air suling ditambahkan kedalam tabung tersebut dandi vortex sampai homogen. Absorbansi diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

### 3.5.2.1 Pembuatan kurva standar

Kurva standar dibuat dengan cara melarutkan 10 mg glukosa anhidratdalam 100 mL air suling. Larutan glukosa dilakukan pengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/100 mL. Larutan glukosa diambil masing-masing 1 mL dan dimasukkan ke tabung reaksi sesuai konsentrasinya, dan satu tabung ditambahkan 1 mL air suling sebagai blanko. Larutan glukosa dan blanko selanjutnya ditambahkan 1 mL reagensia Nelson, dan dipanaskan semua tabung pada penangas air mendidih selama 20 menit. Setelah pemanasan, tabung reaksi segera didinginkan bersama-

sama dalam gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C. Setelah dingin ditambahkan 1 mL reagensia Arsenomolybdat dan di*vortex* sampai endapan CuSO<sub>4</sub> yang ada larut. Setelah semua larutan larut sempurna air suling ditambahkan 7 mL dan diaduk sampai homogen. Absorbansi masingmasing larutan tersebut dengan panjang gelombang 540 nm. Kemudian kurva standar dibuat untuk menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan absorbansi.

### 3.5.2.2 Cara pembuatan reagensia

# 1. Reagensia Nelson

Reagensia Nelson A: 12,5 g natrium karbonat anhidrat, 12,5 g garam Rochelle, 10 g natrium bikarbonat dan 100 g natrium sulfat anhidrat dilarutkan dalam 350 mL air suling kemudian diencerkan sampai 500 mL. Reagensia Nelson B: 7,5 g CuSO<sub>4</sub>. 5H<sub>2</sub>O dilarutkan dalam 50 mL air suling dan ditambahkan 1 tetes asam sulfat pekat. Reagensia Nelson dibuat dengan cara mencampur 25 bagian Reagensia Nelson A dan 1 bagian Reagensia Nelson B. Pencampuran dikerjakan pada setiap akan digunakan.

### 2. Reagensia Arsenomolybdat

Reagen arsenomolybdat diperoleh dari Medical Arsenomolibdat Yogyakarta. Pembuatan reagen arsenomolybdat sebagai berikut sebanyak 25 g ammonium molybdat dilarutkan dalam 450 mL air suling dan ditambahkan 25 mL asam sulfat pekat. Larutkan pada tempat yang lain 3 g Na<sub>2</sub>HASO<sub>4</sub>. 7H<sub>2</sub>O dalam 25 mL air suling. Kemudian larutan ini dituang kedalam larutan yang pertama. Simpan

dalam botol berwarna coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Reagensia ini baru dapat digunakan setelah masa inkubasi tersebut, reagensia ini berwarna kuning.

# 3.5.3 Pengujian aktifitas enzim selulase

Pengujian aktifitas enzim selulase dilakukan menurut metode Mandels yang dimodifikasi. Enzim selulase sebanyak 0,5 mL dan natrium sitrat 1 mL (0.05 M, pH 4.8) dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kertas saring Whatman No.1 dengan ukuran 1x6 cm (50 mg) dimasukan dalam tabung reaksi yang sudah berisi enzim dan buffer sitrat kemudian sampel tersebut diinkubasi selama 60 menit pada suhu 50°C dengan kecepatan goyangan 100 rpm. Setelah diinkubasi, sampel tersebut diukur absorbansinya dengan panjang gelombang 540 nm. Hasil pengukuran kemudian diplotkan dengan grafik kurva standar. Konsentrasi pengenceran enzim dihitung yang menghasilkan kadar gula reduksi kertas saring sebanyak 2 mg, aktivitasnya dihitung sebagai berikut:

### Persamaan Mandels:

Satuan FPU berdasarkan pada International Unit (IU):

- 1 IU = 1 μmol.menit<sup>-1</sup> dari substrat yang dikonversi
  - = 1 µmol.menit<sup>-1</sup> dari glukosa (gula reduksi) yang terbentuk selama hidrolisis
  - = 0,18 mg.menit<sup>-1</sup> glukosa yang diproduksi

Jumlah glukosa yang dilepaskan dalam pengujian aktivitas (FPU) pada pengenceran adalah 2 mg:

 $2 \text{ mg glukosa} = 2/0.18 \,\mu\text{mol}$ 

Jumlah glukosa ini telah dihasilkan oleh 0,5 ml enzim dalam 60 menit, dalam FPU:

2 mg glukosa = 
$$\frac{2\mu \text{mol}}{0.18x0.5mLx60menit}$$
$$= 0.37 \ \mu \text{mol.menit}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1} (\text{IU.ml}^{-1})$$

Oleh karena itu, perkiraan jumlah enzim (*critical enzym concentration* = ml/ml) yang melepaskan 2 mg glukosa dalam FPU mengandung 0,37 unit, dan

Konsentrasienzim= 
$$\frac{1}{\text{pengenceran}}$$

FPU =  $\frac{0.37}{\text{konsentrasi enzim yang melepaskan 2 mg glukosa}}$  unit/ml