

III. BAHAN DAN METODE

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Hasil Pertanian, Laboratorium Pengolahan Hasil Pertanian, dan Laboratorium Pengolahan Limbah Agroindustri Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada bulan Juli 2009 – Oktober 2010.

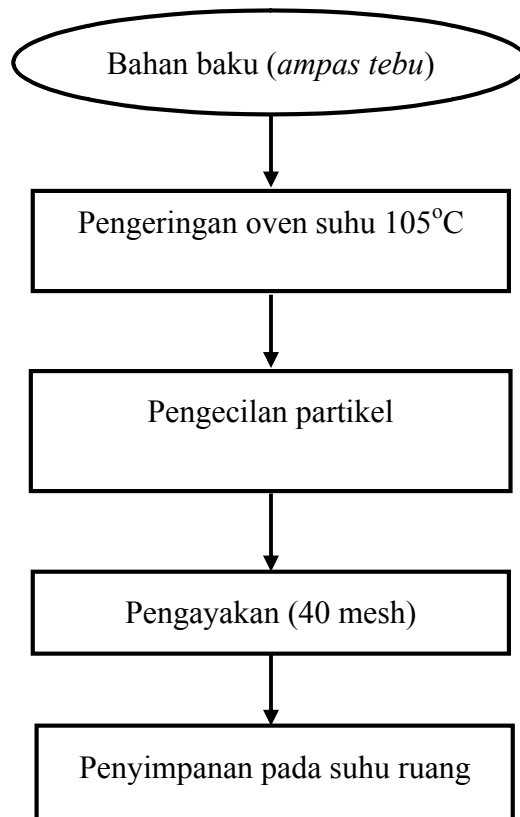
3.2. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Ampas tebu yang di dapat dari Gunung Madu Plantation (GMP), enzim selulase di dapat dari BPPT Sulusuban Lampung Tengah, glukosa, H_2SO_4 , Hidrogen Peroksida (H_2O_2), NaOH, KH_2PO_4 , $MgSO_4$, $(NH_4)_2SO_4$, Na-sitrat, air destilat, dan lain-lain. Adapun alat-alat yang digunakan antara lain hammer mill (Changchong), autoklaf (Wise Clave TM Daihan scientific Made in Korea), shaker water bath (PolyScience Model 20 L B/S/C), centrifuge (Thermo Electron Corporation, Model IEC Centra CL2, Made in China), Mikropipet (Finnpipette F3), Spektrophotometer (UV DRU/4000 Made in Japan), Shaker “Lab-Shaker” (Adolf Kuhner AG Schweiz), Oven (Philip Harris Ltd Made in England), pH meter (Lovibond Made in China), Neraca 4 digit (Shimadzu AUY 220 Made in Japan), termometer, dan alat-alat lain untuk analisis.

3.3. Metode Penelitian

3.3.1 Persiapan bahan

Ampas tebu dikeringkan sampai dengan berat tetap (kadar air $\leq 0\%$) menggunakan oven pada suhu 105°C . Selanjutnya dilakukan pengecilan ukuran dengan cara digiling sampai dengan ukuran 40 mesh. Ampas tebu yang sudah kering dengan ukuran 40 mesh selanjutnya disimpan di bawah kondisi kering (Samsuri, *et al.*, 2007). Bubuk kering ini kemudian digunakan sebagai substrat hidrolisis. Gambar persiapan bahan baku ditunjuk pada Gambar 14.



Gambar 14. Persiapan bahan baku (Samsuri *et al.*, 2009)

3.3.2. Tahapan Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara bertahap tahap; (1) mencari tingkat degradasi lignin terbaik dari dua jenis konsentrasi basa (NaOH dan H₂O₂), (2) untuk menemukan konsentrasi substrat dan waktu inkubasi hidrolisis holoselulosa ampas tebu menjadi gula reduksi. adapun tahap – tahap penelitiannya sebagai berikut : tahapan penelitian secara keseluruhan disajikan pada Gambar 15.

a. Penelitian tahap pertama

Penelitian tahap pertama dilakukan menggunakan 2 jenis basa (NaOH dan H₂O₂) masing masing dilakukan 3 kali ulangan tujuannya adalah untuk mencari konsentrasi dari 2 jenis basa yang menghasilkan tingkat degradasi lignin terbaik. Perlakuan yang dilakukan adalah : Substrat ampas tebu diberi perlakuan NaOH konsentrasi (0,2,0,5, 1M) kemudian di kocok \pm 3 menit, di panaskan selama 30 menit pada suhu 121 °C ditambah H₂O₂ konsentrasi 0,5 M kemudian di kocok \pm 3 menit, di panaskan selama 30 menit pada suhu 121 °C. Substrat ampas tebu diberi perlakuan NaOH konsentrasi (0,2,0,5, 1M), kemudian di kocok \pm 3 menit, panaskan selama 15 menit pada suhu 121 °C ditambah H₂O₂ konsentrasi (0,5 M) kemudian di kocok \pm 3 menit, panaskan selama 15 menit pada suhu 121 °C. Substrat ampas tebu dengan perlakuan konsentrasi NaOH (0,2,0,5, 1M) kocok \pm 3 menit, panaskan selama 15 menit pada suhu 121 °C. Substrat ampas tebu dengan perlakuan hanya H₂O₂ konsentrasi 0,5 M, kemudian di kocok \pm 3 menit di panaskan selama 15 menit pada suhu 121 °C. Substrat ampas tebu dengan perlakuan konsentrasi NaOH (0,2,0,5, 1M) kemudian di kocok \pm 3 menit, biarkan selama 24 jam pada suhu ruang setelah 24 jam ditambah H₂O₂ konsentrasi 0,5 M kocok \pm 3 menit biarkan selama 24 jam pada suhu

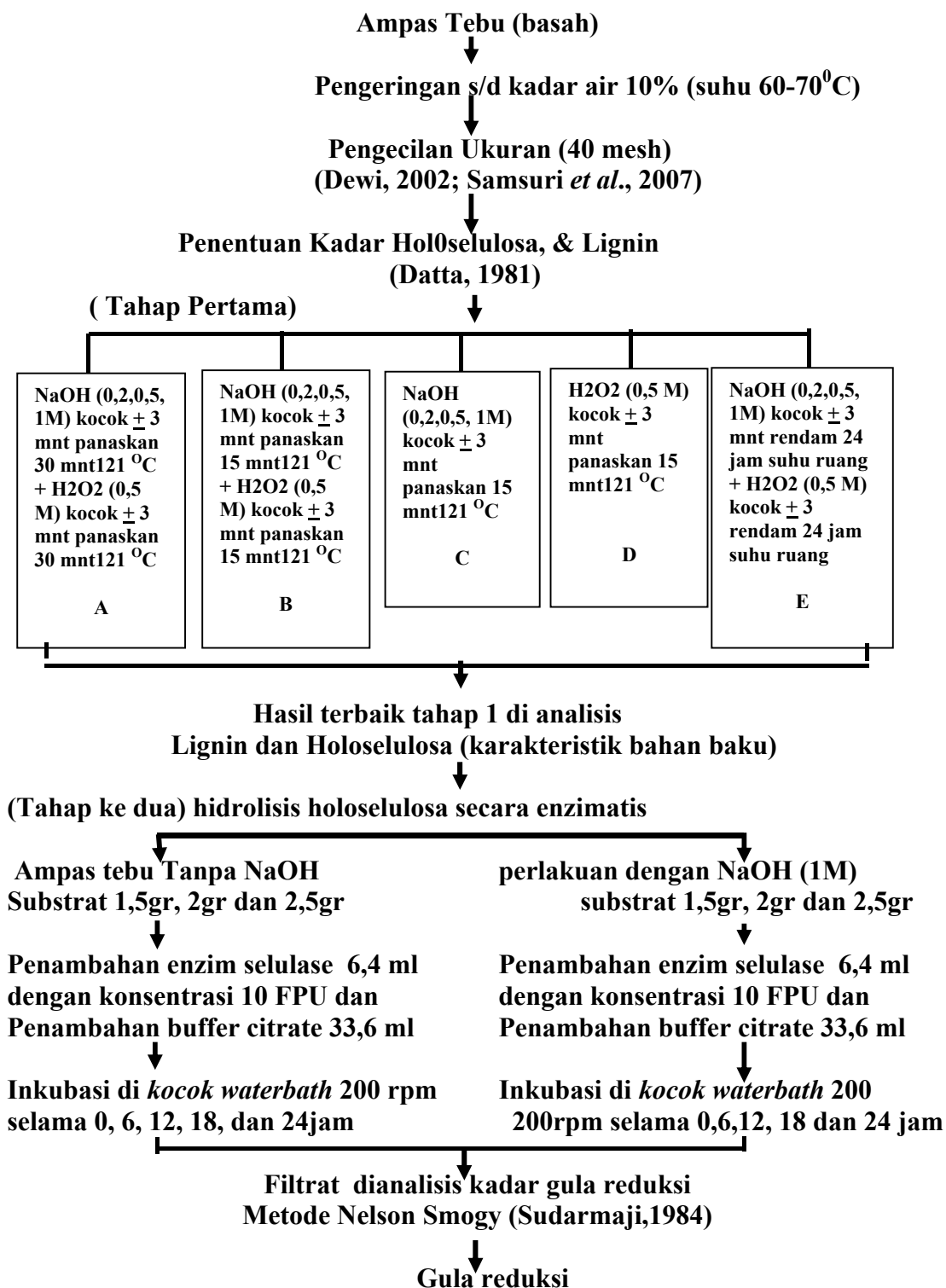
ruang. Data yang dihasilkan dianalisis secara deskriptif menggunakan nilai rata rata dan di tampilkan dalam bentuk grafik. Diagram alir tahap pertama disajikan pada gambar 16.

b. Penelitian tahap kedua

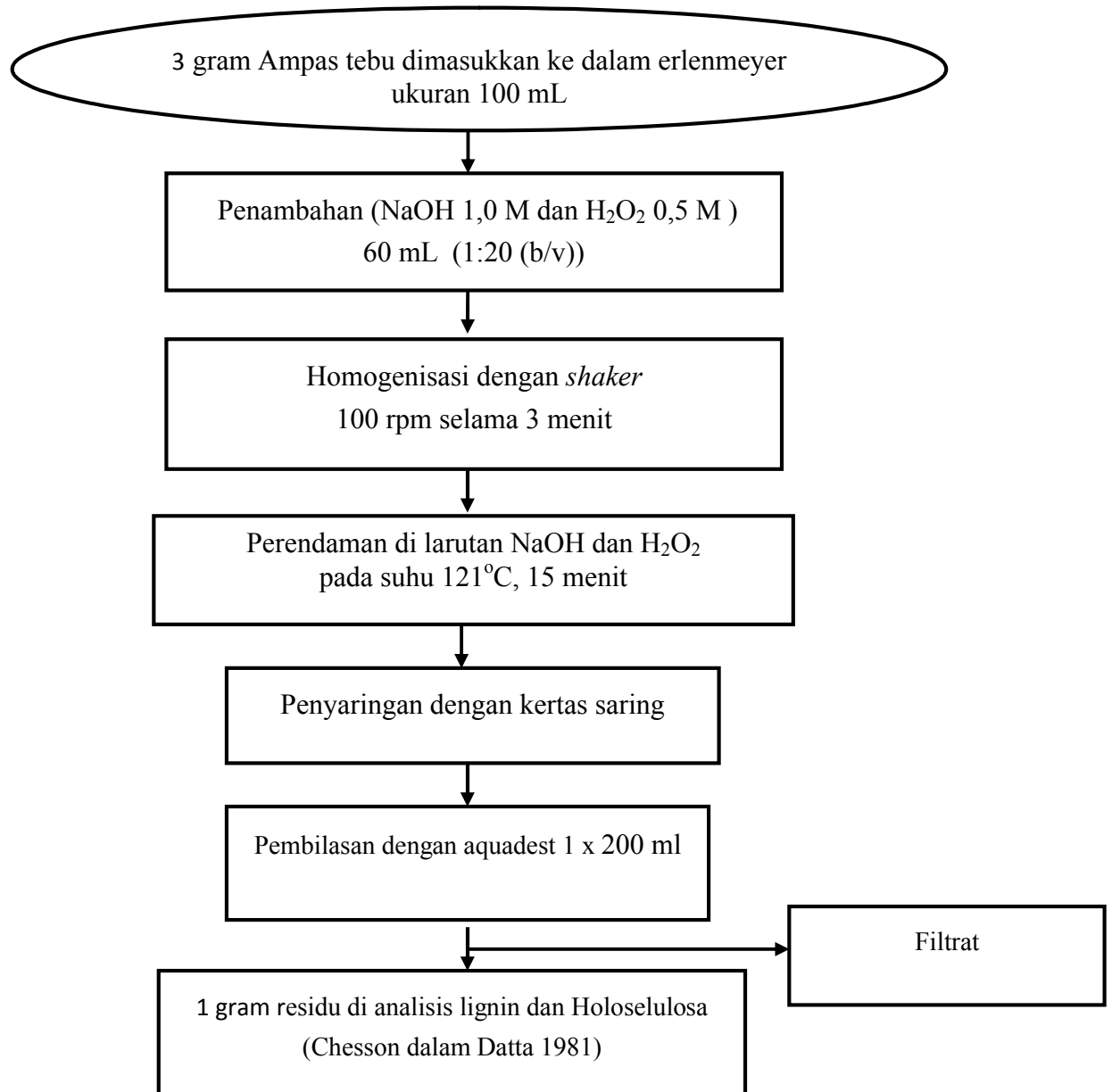
Penelitian tahap kedua mencari konsentrasi substrat dan lama inkubasi yang terbaik dari hasil perlakuan tahap pertama. Setelah perlakuan awal dan didapatkan konsentrasi basa terbaik selanjutnya dihidrolisis dengan menggunakan enzim cellulast (untuk menghidrolisis Holoselulosa) menjadi glukosa. Perlakuan enzim ini yaitu :

1,5 gram ampas berat kering dari perlakuan awal terbaik, kemudian tambahkan larutan buffer citrat pH 4,8 sebanyak 33,6 ml dan enzim cellulast sebanyak 6,4 ml dengan konsentrasi 10 FPU pada suhu 50 °C dengan kecepatan 200 rpm lama inkubasi 0, 6, 12, 18 dan 24 jam, 2 gram ampas berat kering dari perlakuan awal terbaik, kemudian tambahkan larutan buffer citrat pH 4,8 sebanyak 33,6 ml dan enzim cellulast sebanyak 6,4 ml dengan konsentrasi 10 FPU pada suhu 50 °C dengan kecepatan 200 rpm lama inkubasi 0, 6, 12, 18 dan 24 jam, 2,5 gram ampas berat kering dari perlakuan awal terbaik, kemudian tambahkan larutan buffer citrat pH 4,8 sebanyak 33,6 ml dan enzim cellulast sebanyak 6,4 ml dengan konsentrasi 10 FPU pada suhu 50 °C dengan kecepatan 200 rpm lama inkubasi 0, 6, 12, 18 dan 24 jam,

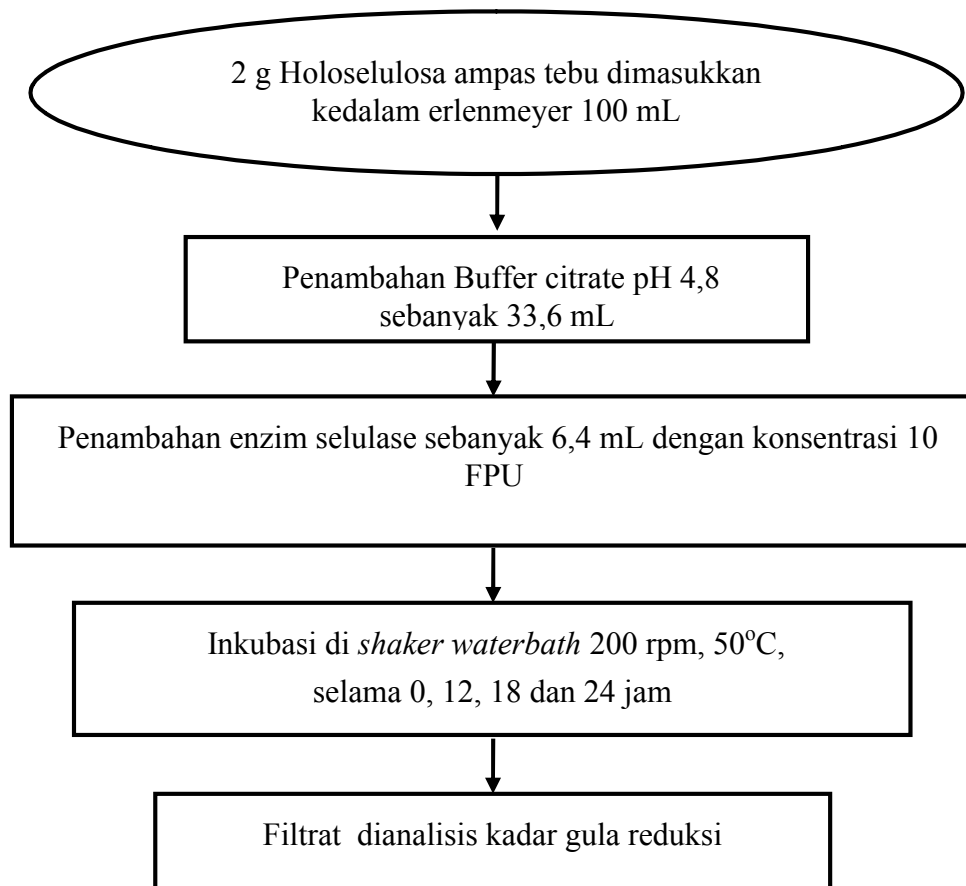
Selanjutnya kadar gula reduksi dianalisis dengan menggunakan metode Nelson-Somogy yang dibaca pada spektrophotometer dengan panjang gelombang 540 nm (Sudarmaji, 1984). Data yang dihasilkan dianalisis secara deskriptif menggunakan nilai rata rata dan di tampilkan dalam bentuk grafik. Diagram alir penelitian tahap kedua disajikan pada Gambar 17.



Gambar 15. Diagram pelaksanaan penelitian



Gambar 16. Perlakuan awal Basa termodifikasi (Mission ., *et al*, 2011)



Gambar 17. Hidrolisis holoselulosa termodifikasi (Samsuri,*et.al.*, 2009)

3.3.3. Pengamatan

a. Prosedur analisis kadar air (AOAC, 1984)

Timbang sampel yang telah dihaluskan sebanyak 2-3 g, kemudian masukkan sampel kedalam cawan porselen yang telah diketahui berat keringnya dan oven selama 2 jam pada suhu 100 – 105°C. Kemudian dinginkan dalam desikator selama 15 menit dan ditimbang. Panaskan kembali dalam oven selama 30 menit, dinginkan

dalam desikator dan ditimbang. Perlakuan ini diulangi sampai berat konstan (selisih penimbangan kurang dari 0,2 gr).

Perhitungan

$$\text{Kadar air (\%)} = \frac{b-c}{a} \times 100\%$$

Keterangan : a : berat sampel

b : berat sampel + cawan porselen sebelum dioven

c : berat sampel + cawan porselen setelah dioven

b. Kadar Hemiselulosa

Pengukuran kadar hemiselulosa dianalisis dengan metode *Chesson* (Datta, 1981), yaitu sebanyak 1-2 gram sampel dicampur dengan 150 ml air destilat, dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 jam, difiltrasi dengan kertas saring dan terakhir dibilas dengan air destilat, bagian padat dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai konstan dan ditimbang beratnya (a). Selanjutnya sampel dicampur dengan 150 ml larutan H₂SO₄ 1 N, dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam, difiltrasi dengan kertas saring dan terakhir dibilas dengan air destilat. Kemudian bagian padat dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai konstan dan ditimbang beratnya (b)

c. Kadar Selulosa

Pengukuran kadar selulosa dianalisis dengan metode *Chesson* (Datta, 1981), yaitu sampel yang telah dikeringkan pada analisis hemiselulosa (b) dicampur dengan larutan H₂SO₄ 72% sebanyak 10 ml, dilakukan perendaman selama 4 jam, lalu dicampur dengan 150 ml larutan H₂SO₄ 1 N, dipanaskan pada suhu 100°C selama 2

jam, difiltrasi dengan kertas saring dan terakhir dibilas dengan air destilat. Kemudian bagian padat dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai konstan dan ditimbang beratnya (c).

$$\text{Kadar hemiselulosa} = \frac{b - c}{\text{sampel}} \times 100\%$$

d. Kadar Lignin

Pengukuran kadar lignin dianalisis dengan metode *Chesson* (Datta, 1981), yaitu sampel yang telah dikeringkan pada analisis selulosa (c), selanjutnya dipanaskan pada suhu 600 °C selama 4-6 jam lalu ditimbang beratnya (d).

$$\text{Kadar lignin} = \frac{c - d}{\text{sampel}} \times 100\%$$

e. Tingkat Degradasi Lignin

Pengukuran tingkat degradasi lignin dilakukan dengan metode *Misson et al*, (2009) yang dibaca pada spektrofotometer. Sampel yang telah diberi perlakuan asam maupun basa dikeringkan sampai berat konstan, kemudian ditambah KMnO_4 dan H_2SO_4 dan digojag pada kecepatan 100 rpm. Selanjutnya larutan disaring dan filtratnya diukur tingkat degradasi ligninnya dengan spektrofotometer panjang gelombang 546 nm.

$$k = \frac{a}{w} \left(\frac{A_o - A_e}{A_o} \right) \quad L = 0,15 \text{ K}$$

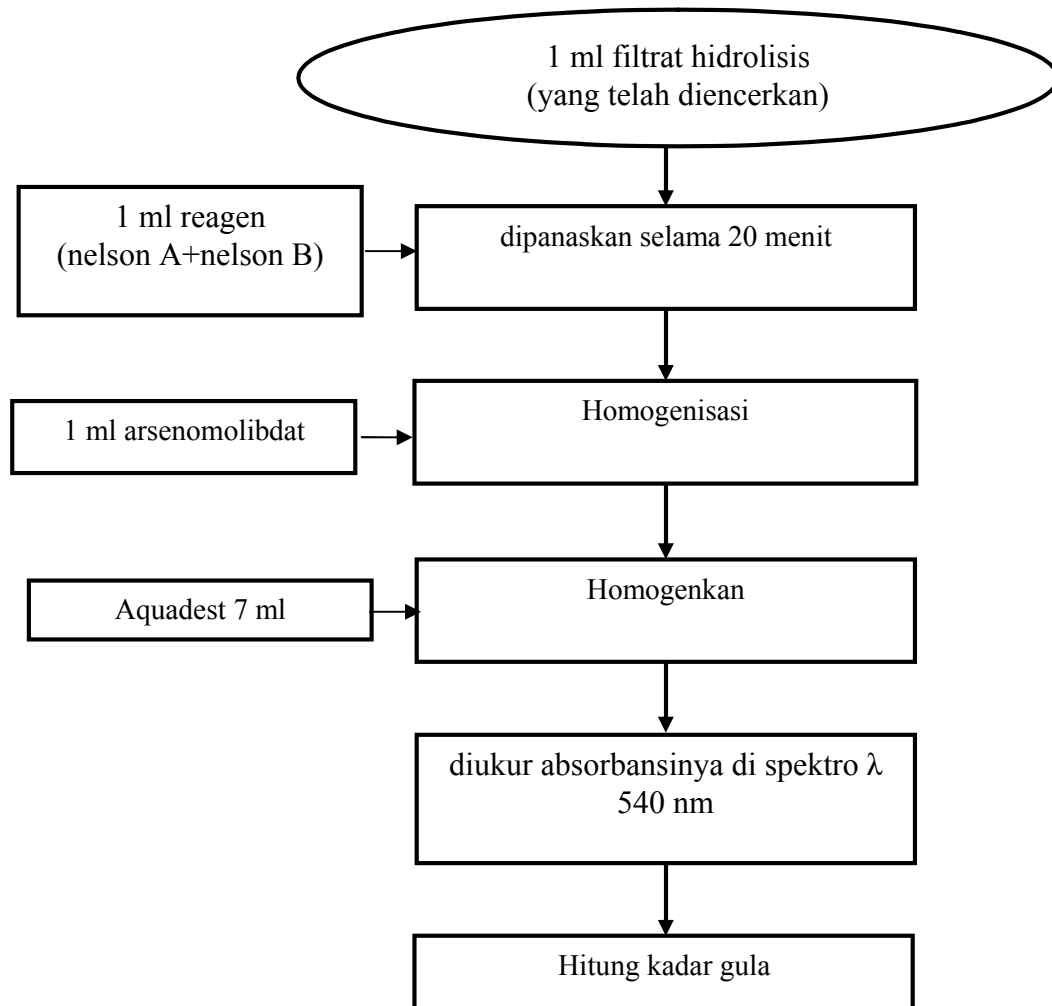
Keterangan :

- K = Nilai Kappa
- a = Volume KMnO_4
- w = Berat sampel
- Ao = Nilai absorbansi blanko

A_e = Nilai absorbansi sampel
 L = Tingkat degradasi lignin

f. Kadar Gula Reduksi

Pengukuran kadar gula reduksi dilakukan berdasarkan metode Nelson Somogyi (Sudarmaji dkk., 1984), yaitu 2 gram sampel yang telah dihidrolisis asam maupun hidrolisis enzimatis yang telah diberi perlakuan awal alkali, disaring dengan kertas saring, lalu filtrat yang dihasilkan dilakukan pengujian kadar gula reduksi. Sebanyak 1 ml filtrat yang telah diencerkan dicampur dengan 1 ml larutan reagen nelson, dipanaskan selama 20 menit sampai mendidih, didinginkan, ditambahkan 1 ml larutan arsen, dilakukan pengadukan dan ditambah dengan 7 ml air destilat. Selanjutnya dilakukan pengukuran dengan Spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm untuk mendapatkan nilai absorbansi. Secara lengkap bisa dilihat pada Gambar 18.



Gambar 18. Analisis kadar gula reduksi(Nelson-Somogyi, 1984)

Prosedur analisis gula sederhana (gula reduksi) didahului melalui beberapa tahap yaitu :

1. Penyiapan kurva standar

Penyiapan kurva standar dilakukan berdasarkan metode Nelson Somogyi (Sudarmaji dkk., 1984). Larutan glukosa standar dibuat dengan cara 10 mg glukosa anhidrat dilarutkan dalam 100 mL air suling. Larutan glukosa standar tersebut

dilakukan 5 pengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/100 mL. Lalu menyiapkan 6 tabung reaksi yang bersih, masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa standar tersebut di atas. Satu tabung diisi 1 mL air suling sebagai blanko. Dalam masing-masing tabung di atas ditambahkan 1 mL reagensia Nelson, dan memanaskan semua tabung pada penangas air mendidih selama 20 menit. Kemudian mengambil semua tabung dan segera didinginkan bersama-sama dalam gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai suhu 25°C. Setelah dingin ditambahkan 1 mL reagensia Arsenomolybdat, aduk sampai semua endapan CuSO_4 yang ada larut kembali. Setelah semua endapan CuSO_4 larut sempurna, ditambahkan 7 mL air suling dan diaduk sampai homogen. Kemudian ditera "optical density" (OD) masing-masing larutan tersebut pada panjang gelombang 540 nm. Kemudian membuat kurva standar yang menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan OD (Sudarmadji dkk., 1984).

Penyiapan kurva standar bertujuan untuk menentukan nilai regresi linear sebagai rumus yang menjadi dasar untuk perhitungan kadar gula reduksi pada sampel. Adapun rumus regresi linear yang diperoleh adalah sebagai berikut :

$$Y = ax + b$$

Keterangan :

Nilai a = 0,161

Nilai b = 0,053

2. Penentuan Kadar Gula Reduksi Pada Contoh

Larutan contoh yang mempunyai kadar gula reduksi sekitar 2-8 mg/100mL disiapkan. Perlu diperhatikan bahwa larutan pada contoh harus jernih, apabila dijumpai larutan contoh yang keruh atau berwarna maka perlu dilakukan penjernihan terlebih dahulu dengan menggunakan Pb-asetat atau bubuk Aluminium hidroksida. Kemudian sebanyak 1 mL larutan contoh yang jernih tersebut dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang bersih dan ditambahkan 1 mL reagensia Nelson, dan selanjutnya diperlakukan seperti pada penyiapan kurva standar di atas. Jumlah gula reduksi dapat ditentukan berdasarkan OD larutan contoh dan kurva standar larutan glukosa.

3. 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 dan diencerkan sampai 500 mL. Reagensia Nelson B: 7,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 50 mL air suling dan ditambahkan 1 tetes asam sulfat pekat. Reagensia Nelson dibuat dengan cara mencampur 25 ml Reagensia Nelson A dan 1 ml Reagensia Nelson B. Pencampuran dikerjakan pada setiap hari akan digunakan.

2. Reagensia Arsenomolybdat

Reagensia Arsenomolybdat dibuat dengan melarutkan 25 g Ammonium molybdat dalam 450 mL air suling dan ditambahkan 25 mL asam sulfat pekat. Pada tempat yang lain 3 g $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 25 mL air suling, kemudian

larutan ini dituangkan kedalam larutan yang pertama. Larutan yang telah dicampurkan disimpan dalam botol berwarna coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (reagensia berwarna kuning). Reagensia baru dapat digunakan setelah masa inkubasi tersebut (Sudarmadji dkk., 1984).