

### **III. METODE PENELITIAN**

#### **A. Tempat dan Waktu Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan di Balai Riset dan Standarisasi Industri Bandar Lampung dan Laboratorium Analisis Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada bulan Agustus sampai dengan Desember 2013.

#### **B. Bahan dan Alat**

Bahan baku utama yang digunakan yaitu onggok yang diperoleh dari PT. Umas Jaya Agrotama di Lampung Tengah, enzim  $\alpha$ -amilase (Thermamyl 120 l), enzim glukoamilase (Glukoamilase SAN 150 l) diperoleh dari Balai Besar Teknologi Pati (B2TP) di Sulusuban Lampung Tengah, dan enzim selulase (SQzyme CS P-acid cellulase). Bahan kimia yang digunakan adalah Nelson A, Nelson B, arsenomolibdat,  $K_2SO_4$  10%, asam sitrat,  $Na_2CO_3$  anhidrat,  $CuSO_4$ , natrium tiosulfat 0,1 N, alkohol 96%, air suling, asam sitrat, natrium sitrat, NaOH, HCl,  $H_2SO_4$  yang didapatkan dari Balai Riset dan Standarisasi Industri Bandar Lampung.

Alat-alat yang digunakan antara lain shaker inkubator (YIH DER, LM-570D), waterbath (Polyscience), spektrofotometer UV 1601 (Shimadzu, USA), mikropipet 1000 $\mu$ L (Thermo Scientific, Finnpiptette F3), oven (Philip Harris Ltd),

timbangan 3 digit (Mettler M3000 Swiszerlan), shifter shaker (Endecotts EFL1 Sleeve Shaker) ukuran 60 mesh, hot plate (Cimerec3), pH-meter (Eutech), penangas air, pendingin balik, aluminium foil, cawan porselin, desikator, kertas saring, pipet bubble, serta peralatan gelas seperti corong, erlenmeyer, buret, labu ukur, pipet, cawan petri, cawan porselin, gelas ukur, beaker glass, dan tabung reaksi.

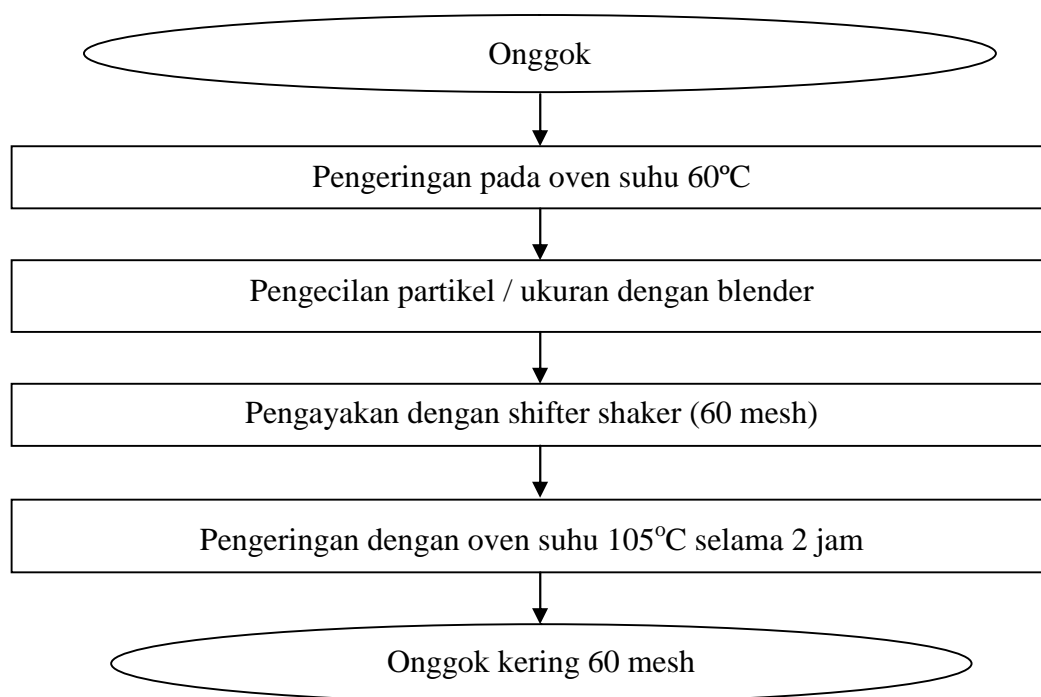
### **C. Metode Penelitian**

Penelitian ini dilakukan dengan dua tahapan, yaitu tahap pertama adalah hidrolisis onggok menggunakan enzim selulase yang terdiri dari 5 taraf konsentrasi (5, 10, 15, 20 dan 25 FPU) yang dilakukan sebanyak tiga kali ulangan pada suhu 40°C selama 20 menit dengan kecepatan 200 rpm. Perlakuan konsentrasi enzim selulase pada tahap pertama tersebut dilanjutkan ke tahap kedua. Tahap kedua adalah hidrolisis pati dari sisa hidrolisis tahap pertama dengan konsentrasi enzim -amilase 0,58; 1,15; 1,37  $\mu\text{l/g}$  berat kering onggok pada suhu 100°C, pH 5,5 dan selama 2 jam dan enzim glukamilase 1,1  $\mu\text{l/g}$  berat kering onggok pada suhu 60°C, pH 4,5 selama 24 jam dengan kecepatan 200 rpm yang dilakukan sebanyak tiga kali ulangan. Sampel yang telah dihidrolisis dengan berbagai perlakuan tersebut kemudian dianalisis kadar gula reduksinya, kadar serat sisa hidrolisis, dan kadar pati sisa hidrolisis. Data disajikan dalam tabel dan grafik, serta dianalisis secara deskriptif.

## D. Pelaksanaan Penelitian

### 1. Persiapan bahan baku

Persiapan bahan baku ditentukan dengan menggunakan metode yang mengacu pada penelitian Silaputri (2011). Onggok dikeringkan dan dilanjutkan dengan pengecilan ukuran dengan blender dan disaring menggunakan shifter shaker ukuran 60 mesh. Bahan baku yang sudah kering dengan ukuran 60 mesh selanjutnya dikeringkan kembali pada oven dengan suhu 105°C hingga berat konstan, dan disimpan dalam kondisi kering. Diagram alir persiapan bahan baku dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Diagram alir persiapan bahan baku  
Sumber : Silaputri (2011)

### 2. Penentuan aktivitas enzim

Penentuan aktivitas enzim selulase diuji dengan metode Mandels (1987) yang dimodifikasi. Sebanyak 0,5 mL enzim selulase dengan pengenceran  $10^1 - 10^{14}$

dicampurkan 1 mL natrium sitrat (0,05 M, pH 4,8) dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi, serta dimasukkan kertas saring Whatman No.1 dengan ukuran 1x6 cm (50 mg). Tabung reaksi yang sudah berisi enzim selulase dan buffer sitrat diinkubasi pada suhu 50°C selama 60 menit. Setelah itu didinginkan, filtrat diukur kadar gula reduksi dengan metode Nelson-Somogyi pada panjang gelombang 540 nm. Hasil pengukuran diplotkan pada kurva standar sehingga didapatkan kadar gula reduksi. Pengenceran enzim yang menghasilkan kadar gula reduksi sebanyak 2 mg dihitung aktivitasnya dengan persamaan Mandels (1987) sebagai berikut.

Satuan FPU berdasarkan pada International Unit (IU) :

$$\begin{aligned} 1 \text{ IU} &= 1 \mu\text{mol}\cdot\text{menit}^{-1} \text{ dari substrat yang dikonversi} \\ &= 1 \mu\text{mol}\cdot\text{menit}^{-1} \text{ dari glukosa (gula reduksi) yang terbentuk selama hidrolisis} \\ &= 0,18 \text{ mg}\cdot\text{menit}^{-1} \text{ glukosa yang diproduksi} \end{aligned}$$

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 selama 60 menit, dalam FPU:

$$\begin{aligned} 2 \text{ mg glukosa} &= 2/0,18 \times 0,5 \times 60 \mu\text{mol}\cdot\text{menit}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1} \\ &= 0,37 \mu\text{mol}\cdot\text{menit}^{-1}\cdot\text{mL}^{-1} \text{ (IU}\cdot\text{mL}^{-1}) \end{aligned}$$

Oleh karena itu, perkiraan jumlah enzim (*critical enzym concentration* = mL.mL<sup>1</sup>) yang melepaskan 2 mg glukosa dalam FPU mengandung 0,37 unit, dan

$$\text{Konsentrasi enzim} = \frac{1}{\text{pengenceran}}$$

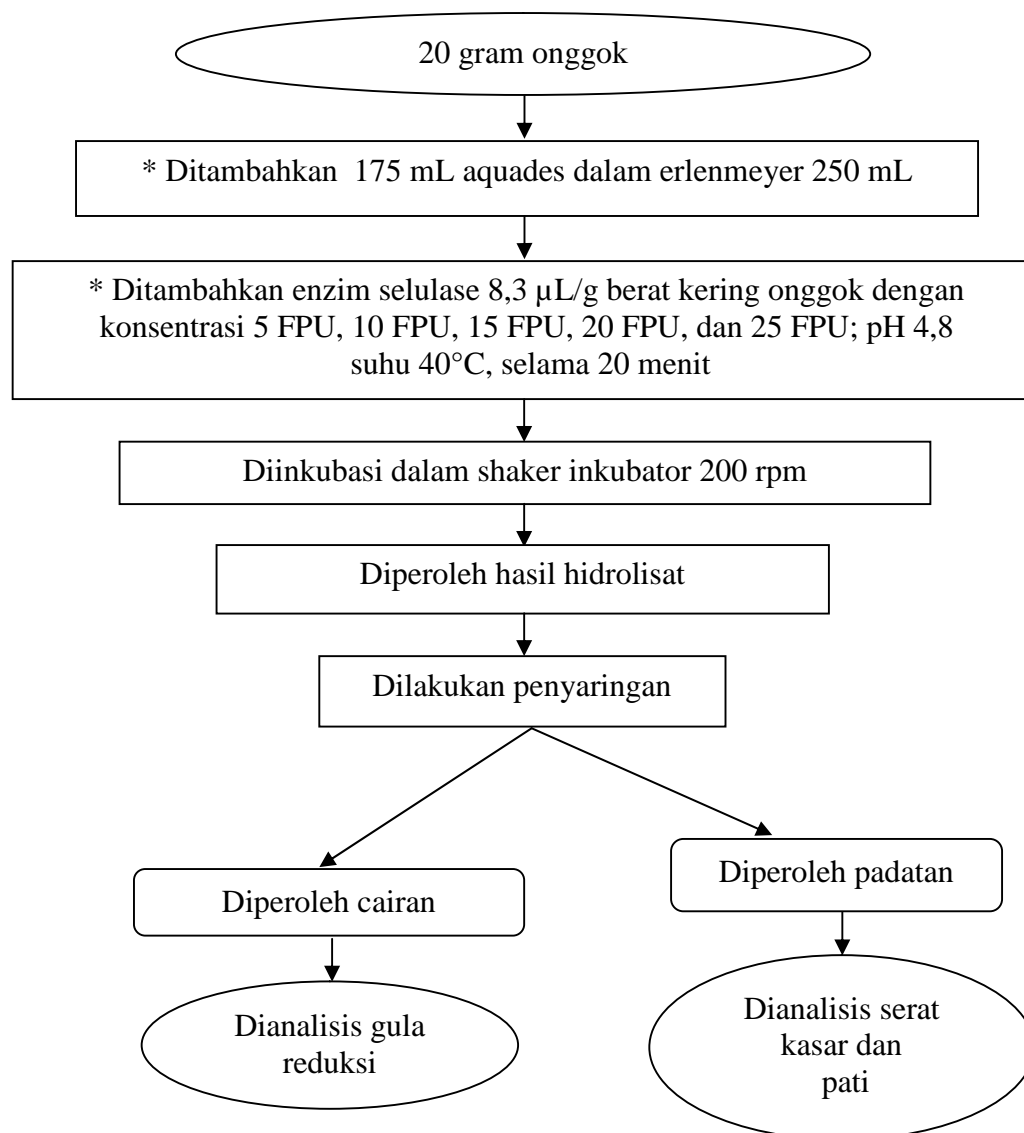
$$\text{FPU} = \frac{0,37}{\text{konsentrasi enzim yang melepaskan 2 mg glukosa}} \text{ unit/ml}$$

### 3. Hidrolisis secara enzimatis

Hidrolisis onggok dilakukan secara enzimatis menggunakan enzim selulase, -amilase dan glucoamilase. Hidrolisis dilaksanakan secara bertahap yaitu tahap pertama untuk menentukan konsentrasi enzim selulase yang menghasilkan kadar gula reduksi tertinggi. Setelah diperoleh hasil terbaik dari tahap pertama tersebut dilanjutkan ke tahap kedua. Tahap kedua, untuk menentukan konsentrasi enzim -amilase dan enzim glucoamilase yang menghasilkan kadar gula reduksi tertinggi.

#### a. Penentuan konsentrasi enzim selulase

Konsentrasi enzim selulase ditentukan dengan menggunakan metode yang mengacu pada penelitian Silaputri (2011). Sebanyak 20 g onggok dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, kemudian ditambahkan aquades volumenya 175 mL. Enzim selulase ditambahkan sebanyak 8,3  $\mu\text{L/g}$  berat kering onggok dengan konsentrasi 5, 10, 15, 20, dan 25 FPU. Campuran tersebut diinkubasi dalam shaker inkubator pada suhu 40°C, pH 4,8 dengan goyangan 200 rpm selama 20 menit. Cairan hasil hidrolisis dianalisis gula reduksinya, sedangkan bagian padatnya dikeringkan dan dianalisis kadar serat kasar dan pati (Gambar 10). Setelah diperoleh hasil terbaik dari tahap pertama dilanjutkan ke tahap kedua dengan penambahan konsentrasi enzim -amilase dan enzim glucoamilase yang menghasilkan kadar gula reduksi tertinggi.

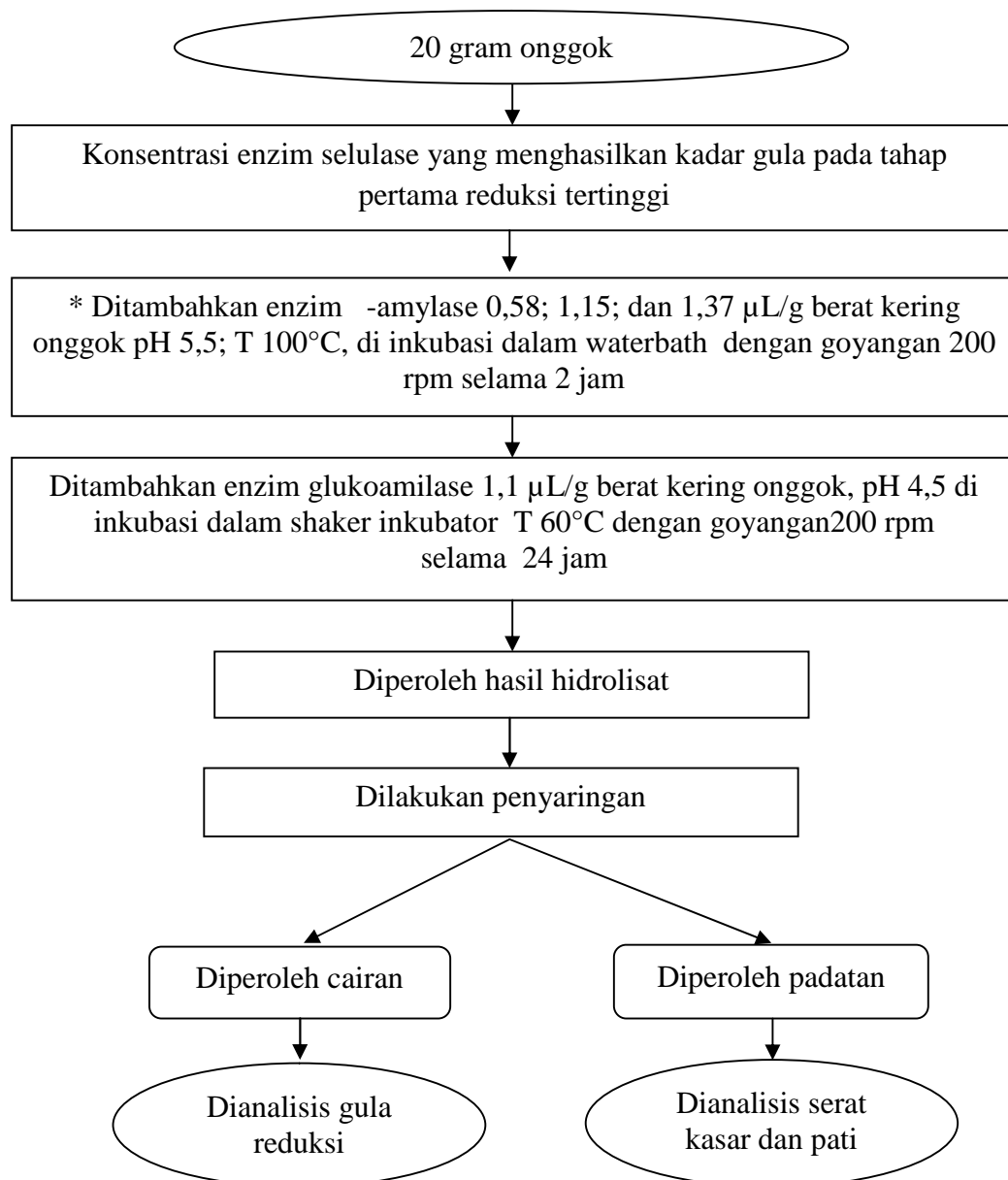


Gambar 10. Hidrolisis onggok oleh enzim selulase  
 Sumber : Silaputri (2011) dan Srinorakutara *et al.* (2004) yang telah dimodifikasi\*

#### b. Penentuan konsentrasi enzim $\alpha$ -amilase dan enzim glukoamilase

Perlakuan terbaik pada tahap pertama dilanjutkan ke tahap kedua dengan penambahan enzim  $\alpha$ -amilase sebanyak 0,58; 1,15; dan 1,37  $\mu\text{L/g}$  berat kering onggok pH substrat 5,5 dan diinkubasi pada waterbath suhu  $100^{\circ}\text{C}$ , goyangan 200 rpm selama 2 jam. Setelah itu, enzim glukoamilase ditambahkan sebanyak 1,1  $\mu\text{L/g}$  berat kering onggok dengan pH substrat 4,5 dan diinkubasi pada shaker

inkubator suhu 60°C, goyangan 200 rpm selama 24 jam. Hidrolisat yang terbentuk disaring untuk memisahkan padatan dan cairan. Bagian padatan dikeringkan dan dianalisis kadar serat kasar dan pati. Bagian cairan dilakukan analisis gula reduksi (Gambar 11).



Gambar 11. Hasil terbaik tahap pertama dilanjutkan tahap kedua dengan penambahan konsentrasi enzim  $\alpha$ -amilase dan enzim glucoamilase

Sumber : Silaputri (2011) dan Srinorakutara *et al.* (2004) yang telah dimodifikasi\*

## **E. Pengamatan**

Pengamatan dilakukan terhadap filtrat dan residu hasil hidrolisis onggok. Filtrat dianalisis gula reduksinya, sedangkan residunya yang telah dikeringkan dianalisis kadar serat kasar dan pati.

### **1. Analisis Gula Reduksi Dengan Metode Nelson – Somogyi**

#### **1.1. Penyiapan kurva standar**

Larutan glukosa standar dibuat dengan melarutkan 10 mg glukosa anhidrat dalam 100 mL aquades dan dilakukan 6 pengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi sebanyak 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/100 mL. Tabung reaksi yang bersih sebanyak 5 tabung reaksi disiapkan, masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa standar tersebut di atas. Satu tabung diisi 1 mL air suling sebagai blanko, ditambahkan ke dalam masing-masing tabung di atas 1 mL reagensia Nelson, dan dipanaskan semua tabung pada penangas air mendidih selama 20 menit. Ambil semua tabung dan didinginkan bersama-sama dalam gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C. Setelah dingin 1 mL reagensia Arsenomolybdat ditambahkan dan dikocok sampai semua endapan  $\text{CuSO}_4$  yang ada larut kembali. Setelah semua endapan  $\text{CuSO}_4$  larut sempurna, 7 mL air suling ditambahkan ke dalam tabung tersebut dan kocok sampai homogen. Absorbansi masing-masing larutan tersebut ditera pada panjang gelombang 540 nm. Kurva standar dibuat untuk menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan absorbansi (Sudarmadji *et al*, 1984). Hasil kurva standar disajikan pada Lampiran Gambar 19.



## 1.2. Penentuan kadar gula reduksi pada contoh

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

## 1.3. Cara pembuatan reagensia

### 1. Reagensia Nelson

Reagensia Nelson A dapat dibuat dengan melarutkan 12,5 gram Natrium karbonat anhidrat, 12,5 gram garam rochelle, 10 gram natrium bikarbonat dan 100 gram natrium sulfat anhidrat dalam 350 mL air suling. Kemudian diencerkan sampai 500 mL. Reagensia Nelson B dibuat dengan cara dilarutkan 7,5 gram  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  dalam 50 mL air suling dan ditambahkan 1 tetes asam sulfat pekat. Reagensia Nelson dibuat dengan cara dicampur 25 bagian Reagensia Nelson A dan 1 bagian Reagensia Nelson B. Pencampuran dikerjakan pada setiap hari akan digunakan.

### 2. Reagensia Arsenomolybdat

Sebanyak 25 gram Ammonium molybdat dilarutkan dalam 450 mL air suling dan ditambahkan 25 mL asam sulfat pekat. Kemudian, dilarutkan pada tempat yang

lain 3 gram  $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  dalam 25 mL air suling. Larutan dituang ke dalam larutan yang pertama disimpan ke dalam botol berwarna coklat dan diinkubasi pada suhu  $37^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Reagensia ini baru dapat digunakan setelah masa inkubasi tersebut, reagensia ini berwarna kuning.

## 2. Analisis Kadar Serat Kasar

Sebanyak 3 gram bahan kering ditimbang dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 mL. Larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,25% ditambahkan 100 mL, kemudian dididihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin balik.  $\text{NaOH}$  3,25% ditambahkan 200 mL dan dididihkan selama 30 menit dengan menggunakan pendingin balik. Dalam keadaan panas, campuran tersebut disaring dengan corong Bucher yang berisi kertas saring tak berabu Whatman No.1 yang telah dikeringkan dan diketahui bobotnya. Endapan yang terdapat di dalam kertas saring dicuci dengan larutan  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1,25% panas, air panas, dan etanol 96%. Kertas saring beserta isinya diangkat, dikeringkan pada oven dengan suhu  $105^\circ\text{C}$  selama 2 jam lalu didinginkan dalam desikator. Kertas saring beserta isinya ditimbang bobotnya. Selanjutnya, kertas saring tersebut diabukan, didinginkan dalam desikator dan ditimbang bobotnya (SNI 01-2891, 1992). Kadar serat kasar ditentukan dalam rumus:

$$\text{Seratkasar} = \frac{j - z - x}{bc} \times 100\%$$

keterangan:

j : bobot endapan pada kertas saring setelah dioven (gram)

z : bobot abu (gram)

x : bobot kertas saring (gram)

bc : bobot contoh

### 3. Analisis Pati

Sampel sebanyak 3 gram dimasukkan dalam Erlenmayer 500 mL, ditambahkan 200 mL larutan HCL 3 % dan beberapa batu didih, didihkan selama 3 jam dengan menggunakan pendingin balik dan ditambahkan 2 - 3 tetes indikator pp. Larutan NaOH 30 % didinginkan dan dinetralkan  $\pm$  pH 7 lalu ditambahkan 1 tetes asam asetat 3% agar suasana larutan sedikit asam. Isi erlenmeyer dipindahkan ke dalam labu ukur 500 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda tera. Penyaringan dilakukan dan dipipet 10 mL ke dalam Erlenmeyer 500 mL, ditambahkan 25 mL larutan luff (dengan pipet) dan beberapa batu didih serta 15 mL aquades, dididihkan selama 10 menit dengan menggunakan pendingin balik (dihitung dari saat mendidih dan digunakan *stopwatch*), kemudian didinginkan dengan bak berisis es. Selanjutnya, ditambahkan 15 mL larutan KI 20% dan 25 mL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 25 % perlahan-lahan dan dititrasi dengan larutan tio 0,1 N (dengan penunjuk larutan kanji 0.5 %). Blanko dikerjakan seperti diatas tetapi tanpa menambahkan sampel. Berat glukosa dikalikan 0,9 merupakan berat pati (SNI 01-2891, 1992).

Perhitungan :

$$\text{Kadar pati (\%)} = \frac{Y \times fp \times 0,95}{bc} \times 100\%$$

Keterangan :

Y : glukosa yang diperoleh dari glukosa standar

fp : faktor pengenceran

bc : berat sampel