

### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Alat dan Bahan

##### 3.1.1 Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain terdiri dari timbangan digital, pH-meter, pengepres, gelas ukur, *beaker glass*, pengaduk, thermometer, *waterbath*, saringan, blender, *mortar*, *freezer*, pipet volume, dan oven.

##### 3.1.2 Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain terdiri dari bahan baku dan bahan pembantu. Bahan baku yaitu rumput laut merah *Gracillaria* yang diperoleh dari lima lokasi yang berbeda yaitu Pasuruan, Probolinggo, Tuban, Gresik, Situbondo. Sedangkan bahan untuk proses ekstraksi antara lain HCl, NaOH, CH<sub>3</sub>COOH, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, dan aquadest. Bahan untuk proses analisa yaitu KCl, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, HCl, BaSO<sub>4</sub>, dan BaCl<sub>2</sub>.

#### 3.2 Metode Penelitian

##### 3.2.1 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen dengan observasi langsung mengenai proses pembuatan agar-agar dan analisis kualitas serta rendemen agar-agar yang dihasilkan. Menurut Gaspersz (1991), bahwa kegiatan penelitian pada hakekatnya adalah suatu proses belajar yang terarah mengenai suatu masalah. Tujuan dari penelitian adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dan perlakuan

perbedaan jenis lokasi budidaya dan umur panen terhadap rendemen dan kualitas agar-agar yang dihasilkan.

### 3.2.2 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap pola Faktorial (RAL Faktorial) dengan 2 faktor dan 3 kali ulangan, yaitu: faktor pertama umur panen (A) terdiri dan umur panen 5 minggu (A1) dan umur panen 6 minggu (A2). Faktor kedua yaitu perbedaan lokasi asal sampel (B), yang terdiri dan Probolinggo (B 1), Pasuruhan (B2), Gresik (B3), Tuban (B4), dan Situbondo (B5). Desain penelitian disajikan pada tabel 6.

**Tabel 6. Bentuk Rancangan Penelitian**

Spesies X

No	Umur panen (A)	Ulangan	Lokasi asal sampel (B)				
			B1	B2	B3	B4	B5
1.	< 2 bulan	1	A1B11	A1B21	A1B31	A1B41	A1B51
		2	A1B12	A1B22	A1B32	A1B42	A1B52
		3	A1B13	A1B23	A1B33	A1B43	A1B53
2.	> 2 bulan	1	A2B11	A2B21	A2B31	A2B41	A2B51
		2	A2B12	A2B22	A2B32	A2B42	A2B52
		3	A2B13	A2B23	A2B33	A2B43	A2B53

Model statistik yang digunakan berdasarkan Yitnosumarto (1991) adalah sebagai berikut :

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dimana :

$Y_{ijk}$  = nilai pada pengamatan untuk faktor A level ke-i, faktor B level ke-j dan pada ulangan ke-k

$\mu$  = nilai rata-rata harapan

$\alpha_i$  = pengaruh faktor A pada level ke-i

$\beta_j$  = pengaruh faktor B pada level ke-j

$(\alpha\beta)_{ij}$  = interaksi faktor A dan B pada level ke-i dan ke-j

$\epsilon_{ijk}$  = kesalahan percobaan

i = umur panen

j = lokasi asal sampel

k = ulangan percobaan 1, 2, dan 3

Data yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan ANOVA (*Analysis of Variance*) dan dianalisis lebih lanjut dengan uji Duncan (SPSS versi 12) yang bertujuan untuk mengetahui ada tidaknya perbedaan yang terjadi diantara faktor perlakuan yang digunakan beserta interaksinya (Iriawan dan Pujiastuti, 2006). Adapun tabel hasil analisa parameter lingkungan disajikan pada tabel 7 dibawah ini:

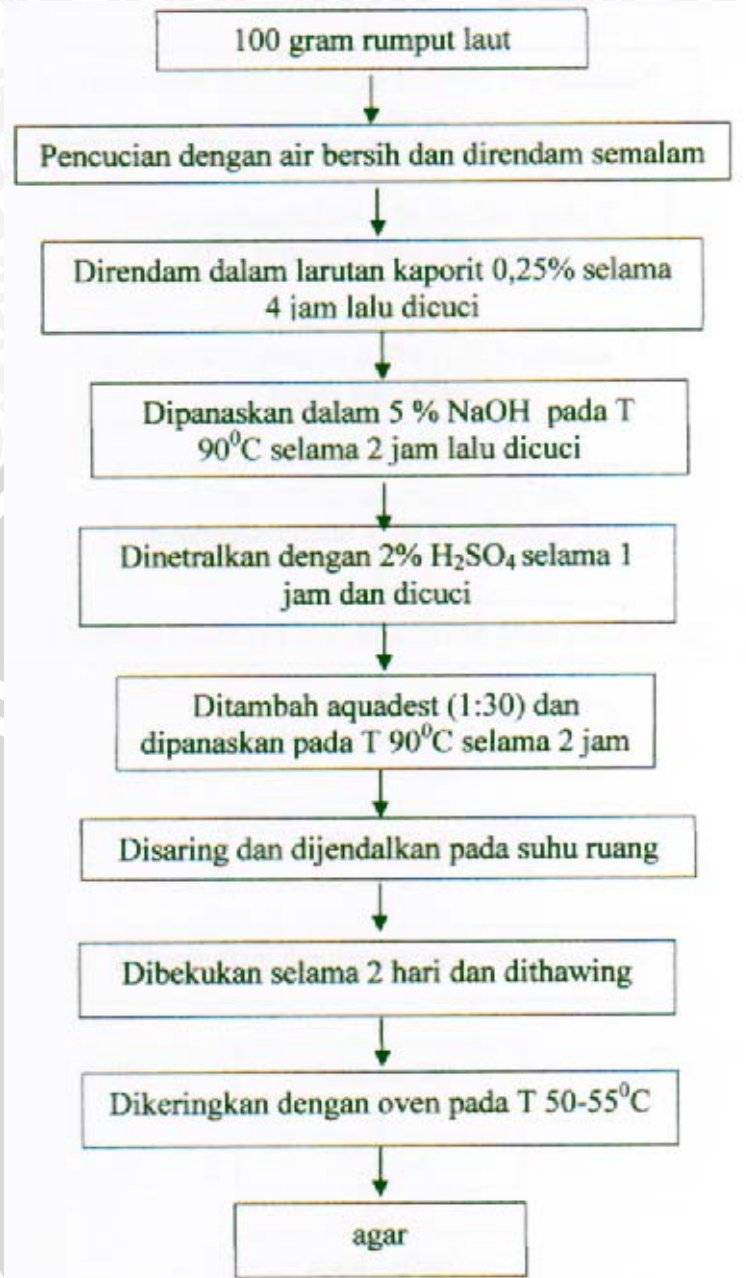
**Tabel 7. Tabel Hasil Analisis Parameter Lingkungan**

Lokasi Budidaya	Kedalaman	Suhu	Salinitas	pH air
B1				
B2				
B3				
B4				
B5				

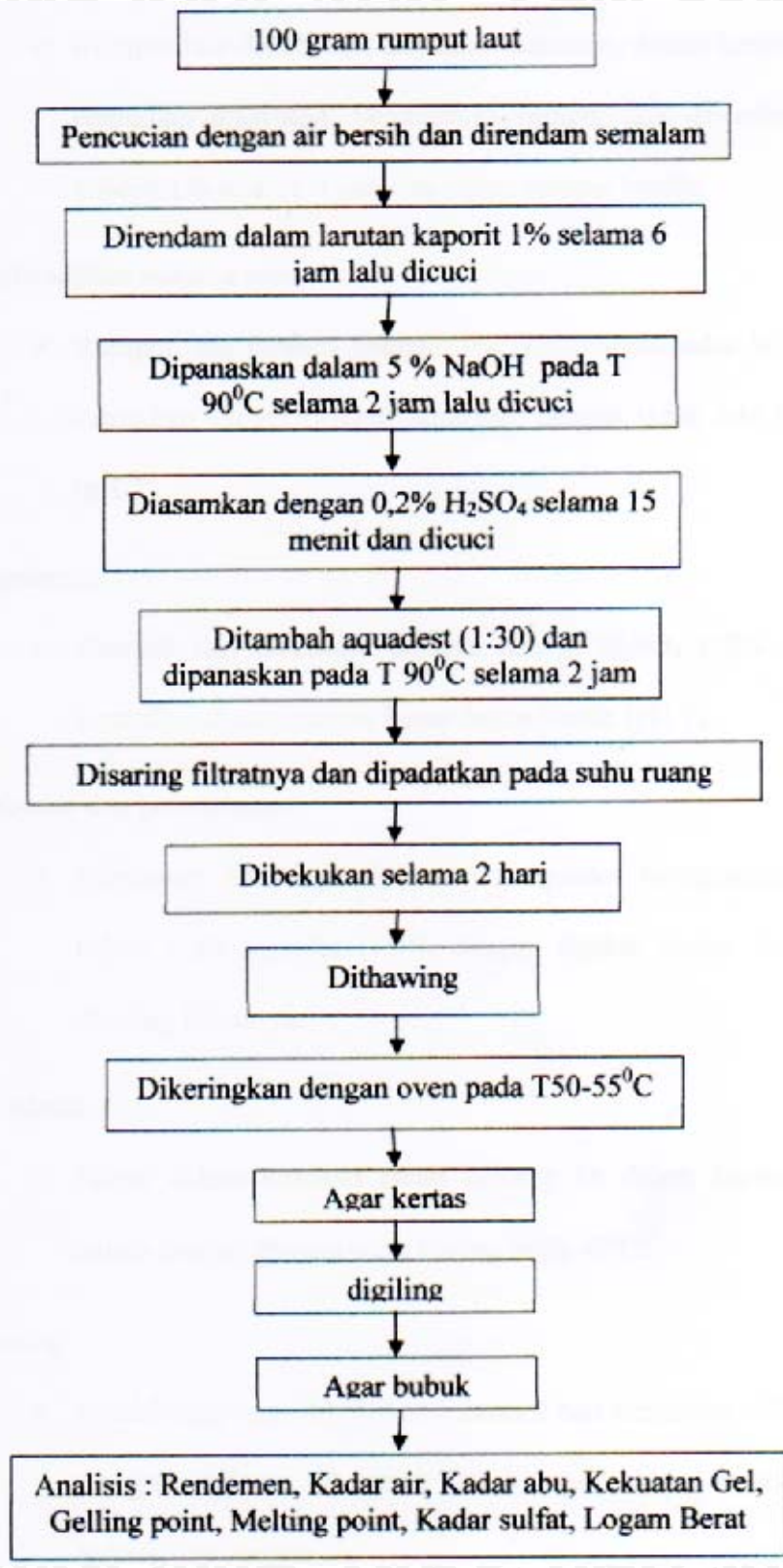
### 3.3 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian dibagi menjadi 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Pada penelitian pendahuluan dilakukan ekstraksi agar-agar dengan menggunakan 3 macam metode ekstraksi yang berbeda. Metode ekstraksi terbaik yang menghasilkan rendemen paling tinggi digunakan untuk penelitian inti. Metode ekstraksi yang digunakan adalah metode Praibon *et al.*, (2006) yang dimodifikasi seperti tersaji pada gambar 10 dan 11.





Gambar 10. Proses Pembuatan Agar-agar (Praibon, *et al*, 2006)



Gambar 11. Alur Penelitian (Praibon, *et al*, 2006 yang dimodifikasi)

### 1. Pencucian

Rumput laut dicuci lalu direndam semalam, dicuci kembali sampai bersih kemudian ditiriskan. Selanjutnya rumput laut direndam dalam larutan kaporit 1% selama 6jam dan dicuci sampai bersih.

### 2. Pengkondisian suasana basa

Rumput laut direbus dengan 5% NaOH pada suhu 90°C selama 2 jam kemudian dicuci dengan aquadest sampai tidak ada basa yang tersisa (pH 7).

### 3. Pengasaman

Rumput laut direndam dengan larutan H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,2% selama 15 menit kemudian dicuci sampai benar-benar bersih (pH 7).

### 4. Perebusan dan penyaringan

Perebusan dilakukan dengan air aquades menggunakan perbandingan bahan : air aquades (1:30) dengan diaduk secara kontinyu kemudian disaring filtratnya.

### 5. Pematatan

Filtrat dalam keadaan panas dituang ke dalam loyang dan dibekukan dalam freezer dengan suhu kurang lebih -5°C.

### 6. Thawing

Setelah agar-agar dibekukan selama 2 han kemudian dithawing dengan air mengalir selama 30 menit untuk memisahkan antara agar-agar yang terkandung dengan air.

#### 7. Pengepresan

Setelah *dithawing* kemudian dilakukan pengepresan dengan kain saring untuk mengeluarkan air di dalam agar-agar. Pengepresan dihentikan jika lembaran agar-agar sudah cukup tipis.

#### 8. Pengeringan

Lembaran agar-agar yang sudah tipis dikeringkan dengan alat pengering (oven) dengan T 55°C selama kurang lebih 6 jam.

#### 9. Penggilingan

Agar-agar yang sudah kering kemudian dihancurkan dengan blender dan diayak dengan ayakan.

### 3.4 Pengamatan

Pengamatan dalam penelitian ini meliputi pengamatan sifat fisik dan kimia. Pengamatan sifat fisik pada agar-agar tepung dalam bentuk gel sedangkan pengamatan sifat kimianya dalam bentuk kering. Analisa kimia yaitu kadar air dan kadar abu serta pengamatan fisik meliputi rendemen, *gelling point*, dan *melting point*, kekuatan gel, kadar sulfat, dan logam berat.

### 3.5 Parameter Uji

Parameter uji yang digunakan dalam penelitian ini meliputi uji rendemen, kadar air, *gelling point*, dan *melting point*, kekuatan gel, kadar sulfat, dan logam berat.



### 3.5.1 Rendemen

Rendemen adalah berat akhir agar yang diperoleh dan ekstraksi rumput laut. Tujuan dan uji rendemen ini adalah mengetahui hasil akhir (kuantitatif) agar-agar dan sejumlah bahan yang diekstraksi. Prinsip kerja uji rendemen ini dengan membandingkan berat akhir sampel dengan berat awal sampel sebelum diekstraksi. Perhitungan rendemen diperoleh dan rumus berikut:

$$\text{Rendemen} = \frac{\text{Berat.akhir.agar}}{\text{Berat.awal.rumputlaut}} \times 100\%$$

### 3.5.2 Kadar air (Sudarmadji, et al, 1989)

Tujuan dan analisa kadar air ini adalah untuk mengetahui kandungan air yang terkandung dalam tepung agar-agar hasil pengeringan. Prinsip dasar penentuan kadar air ini adalah sampel dipanaskan pada suhu 105°C sampai diperoleh berat konstan. Alat-alat yang dibutuhkan pada analisa kadar air ini antara lain oven, botol timbang, penjepit, dan desikator. Sedangkan bahan yang digunakan antara lain agaragar tepung hasil pengeringan sebagai sampel kering.

Prosedur pengujian kadar air terbagi menjadi dua tahap yaitu tahap preparasi dan tahap analisa. Untuk tahap preparasi dilakukan pengeringan botol timbang dalam oven pada suhu 105°C semalam. Selanjutnya dilakukan penimbangan awal untuk mendapatkan berat awal botol timbang. Tahap selanjutnya adalah tahap analisis, yaitu ditimbang 2 gram bahan, dimasukkan dalam botol timbang dan ditimbang beratnya sebagai berat sampel. Setelah penimbangan awal selesai, botol timbang yang berisi sampel dimasukkan desikator, lalu dioven lagi path suhu 105°C untuk dikeringkan lagi. Kemudian ditimbang lagi sampai beratnya konstan dengan selisih penimbangan 0,2 mg. Kadar air dihitung

berdasarkan kehilangan berat setelah pemanasan. Kehilangan berat dibagi dengan berat sampel mula-mula adalah persentase kadar air.

Kadar air bahan berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Kadar Air} = \frac{B-C}{A} \times 100\%$$

- A = Berat awal sampel
- B = Berat botol timbang + sampel
- C = Berat botol timbang + sampel setelah dioven

### 3.5.3 Kadar Abu (Sudarmadji, *et al*, 1989)

Tujuan dan analisa kadar abu mi adalah untuk mengetahui jumlah kadar abu yang terdapat dalam agar-agar hasil ekstraksi. Prinsip dasar penentuan kadar abu dan suatu bahan adalah berdasarkan kehilangan berat setelah pemijaran. Bila suatu contoh dipijarkan pada suhu 650°C, maka semua zat organik dalam contoh tersebut abu (Anonymous, 1975).

Alat-alat yang dibutuhkan dalam analisis kadar abu ini antara lain oven, kurs porselen, timbangan analitik, penjepit, desikator, petri disk. Sedangkan bahan yang dibutuhkan dalam analisis ini adalah agar-agar kering hasil ekstraksi.

Prosedur pengujian kadar abu ini dibagi menjadi dua bagian, yaitu tahap preparasi sampel dan tahap analisa kadar abu. Untuk tahap preparasi kadar abu sebelum digunakan, kurs porselen dibersihkan dan dikeringkan dalam oven suhu 105°C. Hari berikutnya kurs porselen diambil dengan penjepit. Selanjutnya kurs porselen dimasukkan desikator untuk mendinginkan kurs selama 30 menit. Kemudian cawan ditimbang untuk mengetahui berat awalnya. Selanjutnya sampel kering yang telah dikeringkan semalam pada suhu 105°C, ditimbang 1 gram sebanyak 2 kali sampel untuk dimasukkan kedalam kurs porselen.

Selanjutnya cawan yang berisi sampel diabukan dalam oven bersuhu 650°C. Kemudian ditimbang keesokan harinya, setelah abu berwarna putih yang menandakan proses pengabuan selesai.

Kadar abu total merupakan kadar abu yang terdapat dalam contoh dan dapat diketahui dengan menimbang abu yang diperoleh dan pengabuan contoh (Anonimous, 1981). Perhitungan kadar abu hasil analisa berdasarkan pada rumus berikut:

$$\text{Rumus Kadar Abu} = \frac{(\text{Berat.Akhir}-\text{Berat Kurs Porselen})}{\text{Berat Sampel Agar}} \times 100 \%$$

#### 3.5.4 Gelling Point (Stanley, 1966)

Sebanyak 15 gram agar-agar ditimbang dan dilarutkan dalam aquades sehingga konsentrasinya 1,5%. Larutan tersebut dididihkan dalam waterbath selama 5 menit. Kemudian dituang sekitar 15 ml ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi tersebut diletakkan pada rak lalu didinginkan dalam waterbath yang suhunya 60°C. Air dingin dialirkan ke dalam *waterbath* untuk menurunkan suhu sekitar 0,3-0,5°C per menit, Selama pendinginan tabung reaksi tersebut secara periodik dimiringkan sambil mengamati larutan di dalamnya. Jika setelah dimiringkan 45°C tidak mengalir, dengan cepat termometer disisipkan ke dalam tabung reaksi tersesut. Suhu yang teramati dicatat sebagai *gelling point*.

#### 3.5.5 Melting Point (Stanley, 1966)

Tabung reaksi berisi gel agar-agar hasil pengukuran *gelling point* didiatkan selama 1 jam sampai terbentuk gel dengan sempurna. Pada permukaan gel diletakkan bola yang terbuat dari timah yang berdiameter 1 mm dan beratnya 0,25 mg. Tabung

reaksi tersebut kemudian dimasukkan dalam *waterbath* yang suhunya lebih dan  $80^{\circ}\text{C}$ . Saat bola tenggelam, suhu *waterbath* dicatat sebagai suhu *melting point* dengan cara mengurangi suhu *waterbath*  $5^{\circ}\text{C}$ .

### 3.5.6 Kekuatan Gel (Kramer dan Twigg, 1970)

Agar-agar sebanyak 0,8 gram, KCl sebanyak 0,08 gram dan  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  didispersikan ke dalam aquadest dan dipanaskan dalam *waterbath* dengan pengadukan secara teratur sampai suhu  $80^{\circ}\text{C}$ , kemudian volume larutan ditetapkan menjadi 50 ml dengan menambahkan aquadest. Selama larutan masih panas dimasukkan ke dalam cetakan berdiameter 4 cm dan dibiarkan pada suhu  $10^{\circ}\text{C}$  selama 2 jam (dalam pendingin). Gel yang terbentuk dalam cetakan dikeluarkan dan siap diukur dengan penetrometer.

### 3.5.7 Kadar Sulfat (FMC Corp. 1977)

Prinsip yang dipergunakan adalah gugus sulfat yang telah ditimbang dan dihidrolisa diendapkan sebagai  $\text{BaSO}_4$ . Contoh ditimbang sebanyak 1g dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer yang ditambahkan 50 ml HCl 0,2 N kemudian direfluks sampai mendidih selama 6 jam sampai larutan menjadi jernih. Larutan mi dipindahkan ke dalam gelas piala dan dipanaskan sampai mendidih. Selanjutnya ditambahkan 10 ml larutan  $\text{BaCl}_2$  di atas penangas air selama 2 jam. Endapan yang terbentuk disaring dengan kertas saring tak berabu dan dicuci dengan akuades mendidih hingga bebas klorida. Kertas saring dikeringkan ke dalam oven pengering, kemudian diabukan pada suhu  $1000^{\circ}\text{C}$  sampai diperoleh abu berwarna putih. Abu didinginkan dalam desikator kemudian ditimbang.

Perhitungan kadar sulfat adalah sebagai berikut:

$$\text{Kadar Sulfat (\%)} = \frac{Px 0,4416}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

0,4416 = massa atom relatif  $\text{SO}_4$  dibagi dengan massa atom relatif  $\text{BaSO}_4$

$P$  = berat endapan  $\text{BaSO}_4$  (g).

### 3.5.8 Logam Berat (Apriyantono *et al.* 1989)

Prinsip yang digunakan adalah penghilangan bahan-bahan organik dengan pengabuan kering, residu dilarutkan dalam asam encer. Larutan disebarkan dalam nyala api yang ada di dalam alat AAS sehingga absorpsi atau emisi logam dapat dianalisis dan diukur pada panjang gelombang. Kandungan logam berat yang ingin dianalisis adalah Pb, Zn, Cu dan As menggunakan Spektrofotometer Absorpsi Atom (AAS). Prosedurnya sebanyak 5-6 ml HCl 6 N ditambahkan ke dalam cawan berisi abu, kemudian dipanaskan di atas hot plate (pemanas) dengan pemanasan rendah sampai kering. Setelah itu ditambahkan 15 ml HCl 3 N, lalu cawan dipanaskan di atas pemanas sampai mulai mendidih. Setelah didinginkan dan disaring, filtrat dimasukkan ke dalam labu takar yang sesuai. Diusahakan padatan tertinggal sebanyak mungkin dalam cawan, dan diencerkan dengan air sampai tanda tera. Blanko disiapkan menggunakan pereaksi yang sama. Alat AAS diset sesuai petunjuk dalam manual alat tersebut. Diukur larutan standar logam, blanko dan larutan sampel. Selama penetapan sampel, dilakukan pemeriksaan apakah nilai standar tetap konstan. Kemudian dibuat kurva standar untuk masing-masing logam (nilai absorpsi/emisi vs konsentrasi logam dalam  $\mu\text{g/ml}$ ).