

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari alat ekstraksi agar-agar, alat pembuatan agar-agar, alat pengujian sulfat, dan alat pengujian *gelling* dan *melting point*. Alat ekstraksi agar-agar terdiri dari *beaker glass* 1000 mL, spatula, *waterbath*, *beaker glass* 500 mL, nampan, gelas ukur 100 mL, oven, cawan petri, baskom, sendok bahan, timbangan digital, *thermometer*, loyang, jirigen, gunting, dan pisau. Alat yang digunakan dalam pembuatan agar-agar *beaker glass* 1000 mL, gelas ukur 100 mL, baskom, kain blancu, *waterbath*, timbangan digital, sendok bahan, spatula, nampan. Alat untuk pengujian sulfat terdiri dari *beaker glass* 1000 mL, *waterbath*, kurs porselen, *muffle*, erlenmeyer 250 mL, corong, pipet volume 10 mL, desikator, sendok bahan, bola hisap, gelas ukur 100 mL, oven, timbangan digital, crushable tank, timbangan analitik. Alat yang digunakan pengujian *gelling* dan *melting point* yaitu *waterbath*, gelas ukur 100 ml, tabung reaksi, rak tabung reaksi, nampan, baskom, *thermometer*, gotri, *freezer*.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini meliputi bahan ekstraksi agar-agar, bahan pembuatan agar-agar kontrol, bahan untuk pengujian sulfat dan bahan pengujian *gelling* dan *melting point*. Bahan baku utama penelitian ini menggunakan rumput laut jenis *G. verrucosa* yang didapatkan dari petambak rumput laut di desa Tanjungsari kecamatan Jabon kabupaten Sidoarjo, akuades, CaO, NaOH, kain blancu, pH paper, kertas label, tissue, air, dan plastik. Bahan yang digunakan dalam pembuat agar-agar antara lain *G. verrucosa*. KCl,

akuades, kain putih, dan air. Bahan untuk pengujian sulfat yaitu HNO_3 , akuades, HCHO 40%, HCl , BaCl_2 , BaSO_4 0,25 M, kertas saring, *aluminium foil*, air, tissue, *silica gel*. Bahan untuk pengujian *gelling* dan *melting point* antara lain karet, es batu, kertas label, dan akuades.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Metode ini mengarahkan ke penelitian yang secara sengaja dilakukan oleh peneliti terhadap variabel yang data-datanya belum ada sehingga perlu adanya perlakuan tertentu terhadap subyek penelitian guna diamati pengaruhnya. Pondasi yang dibangun pada penelitian ini merupakan riset-riset yang telah terdahulu, studi kasus, literatur yang disebutkan serta data sekunder yang lainnya (Williams, 2007). Penelitian ini menjadikan topik baru lebih dikenal oleh masyarakat luas, memberikan gambaran dasar mengenai topik bahasan, mengembangkan teori yang bersifat *tentative*, membuka kemungkinan akan diadakannya penelitian lanjutan terhadap topik yang dibahas, serta menentukan teknik dan arah yang akan digunakan dalam penelitian berikutnya (Ida, 2004).

Menurut Hartanto (2003), variabel adalah semua ciri atau faktor yang dapat menunjukkan variasi. Berdasarkan fungsinya ada 3 macam variabel yaitu variabel bebas, terkontrol dan terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya atau faktor yang menjadi pokok permasalahan yang ingin diteliti. Variabel terkontrol adalah variabel yang dikendalikan dan dibuat sama antara kelompok yang diteliti. Variabel terikat yaitu variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah suhu ekstraksi yaitu suhu 100 °C, 105 °C, dan 110 °C. sedangkan untuk variabel terikat adalah parameter

yang diamati antara lain rendemen, kadar sulfat, viskositas, *gel strength*, *gelling* and *melting point*, dan spektra infra merah.

3.3 Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 3 kali ulangan. Kombinasi perlakuan dan ulangan dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Rancangan Percobaan Suhu Ekstraksi Terhadap Kualitas Agar

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-rata
	1	2	3		
G1	(G1) ₁	(G1) ₂	(G1) ₃	TG1	RG1
G2	(G2) ₁	(G2) ₂	(G2) ₃	TG2	RG2
G3	(G3) ₁	(G3) ₂	(G3) ₃	TG3	RG3

Keterangan :

G1 : Perlakuan ekstraksi dengan suhu 100 °C

G2 : Perlakuan ekstraksi dengan suhu 105 °C

G3 : Perlakuan ekstraksi dengan suhu 110 °C

Penelitian ini menggunakan analisis data statistik dengan metode Analysis of Variance (ANOVA), dengan model analisis sebagai berikut:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Dimana :

Y_{ij} : hasil pengamatan (parameter kualitas agar-agar *G. verrucosa*)

μ : nilai rata-rata umum

T_i : pengaruh suhu ekstraksi pada taraf ke-I terhadap parameter

ϵ_{ij} : pengaruh galat percobaan pada taraf ke-I dan ulangan pada taraf ke-j

i : perbedaan suhu ekstraksi

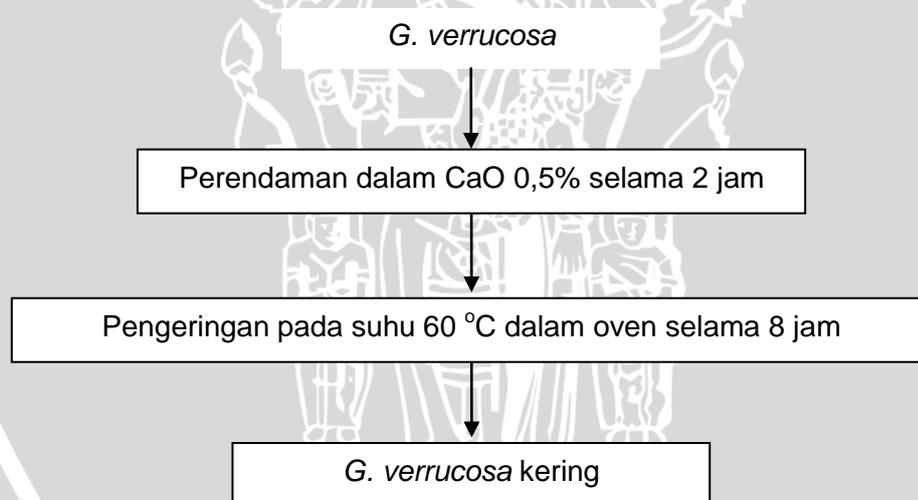
j : ulangan (1, 2, 3)

Selang kepercayaan yang digunakan dalam penelitian ini adalah 95%

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Ekstraksi Agar-agar (Kumar dan Fotedar, 2009)

Ekstraksi agar-agar terdiri dari 2 tahap, yaitu preparasi bahan uji dan ekstraksi *G. verrucosa* menjadi agar-agar. Preparasi bahan uji yaitu *G. verrucosa* didapatkan dari tambak di desa Tanjungsari, kecamatan Jabon, kabupaten Sidoarjo. *G. verrucosa* ditimbang sebanyak 500 g dengan timbangan digital, lalu direndam dengan CaO 5% selama 2 jam. Tujuan dari perendaman ini agar didapatkan *G. verrucosa* yang lebih bersih dan mampu meningkatkan kekuatan gel agar-agar yang dihasilkan. Setelah 2 jam, *G. verrucosa* dicuci dengan air untuk menghilangkan sisa CaO yang tertinggal, kemudian dikeringkan dengan suhu 60 °C selama 8 jam menggunakan oven untuk mendapatkan *G. verrucosa* yang kering. Prosedur preparasi sampel dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Preparasi Bahan Uji

Ekstraksi agar-agar terdiri dari beberapa tahap, yaitu proses perendaman, perlakuan basa, pemanasan I, netralisasi, pengecilan ukuran, pemanasan II, filtrasi, pencetakan, pengovenan, dan penepungan.

1. Perendaman

Disiapkan *G. verrucosa* kering sebanyak 20 g. Setelah itu direndam dengan akuades selama 1 jam 12 menit suhu 25,3 °C yang didapatkan dari penelitian sebelumnya dengan perbandingan 1:200 (Kumar dan Fotedar, 2009). Tujuan perendaman yaitu melembabkan rumput laut dan mempermudah untuk melarutkan polisakarida yang ada.

2. Perlakuan Basa

Setelah itu *G. verrucosa* direndam pada larutan NaOH 3% selama 3 jam pada suhu ruang. Perlakuan basa ini bertujuan mengubah L-galaktosa-6-sulfat menjadi 3,6-anhidro-L-galaktosa yang dapat meningkatkan kekuatan gel. Digunakan larutan NaOH karena larutan ini dapat merusak struktur lignin, bagian kristalin dan amorf, memisahkan sebagian lignin dan hemiselulosa serta menyebabkan pengembangan struktur selulosa.

3. Pemanasan

Setelah perendaman basa selama 3 jam, hal berikutnya dilakukan pemanasan selama 1 jam pada suhu 80 °C menggunakan *waterbath*. Pemanasan ini dapat membantu proses ekstraksi. Karena pemecahan struktur cenderung lebih cepat dengan pemanasan.

4. Netralisasi

Setelah pemanasan, dilakukan netralisasi dengan pencucian menggunakan air mengalir hingga pH normal. Hal ini dilakukan untuk menghilangkan NaOH yang masih tersisa.

5. Pengecilan ukuran

Terdapat modifikasi, yaitu adanya proses pengecilan menggunakan blender. *G. verrucosa* yang telah netral, ditambah akuades perbandingan 1:200. Proses ini dimaksudkan untuk memperluas permukaan, dimana semakin

kecil ukuran semakin bertambah luas permukaannya semakin mudah diekstraksi.

6. Ekstraksi

Setelah pengecilan ukuran, kemudian dipanaskan kembali selama 2,5 jam menggunakan *waterbath* dengan perlakuan suhu yang berbeda yaitu pertama, dipanaskan pada suhu 100 °C, perlakuan kedua dipanaskan pada suhu 105 °C, dan perlakuan ketiga dipanaskan pada suhu 110 °C. Perbedaan perlakuan suhu pada proses pemanasan II diharapkan mampu memberikan pengaruh pada kualitas tepung agar-agar.

7. Filtrasi

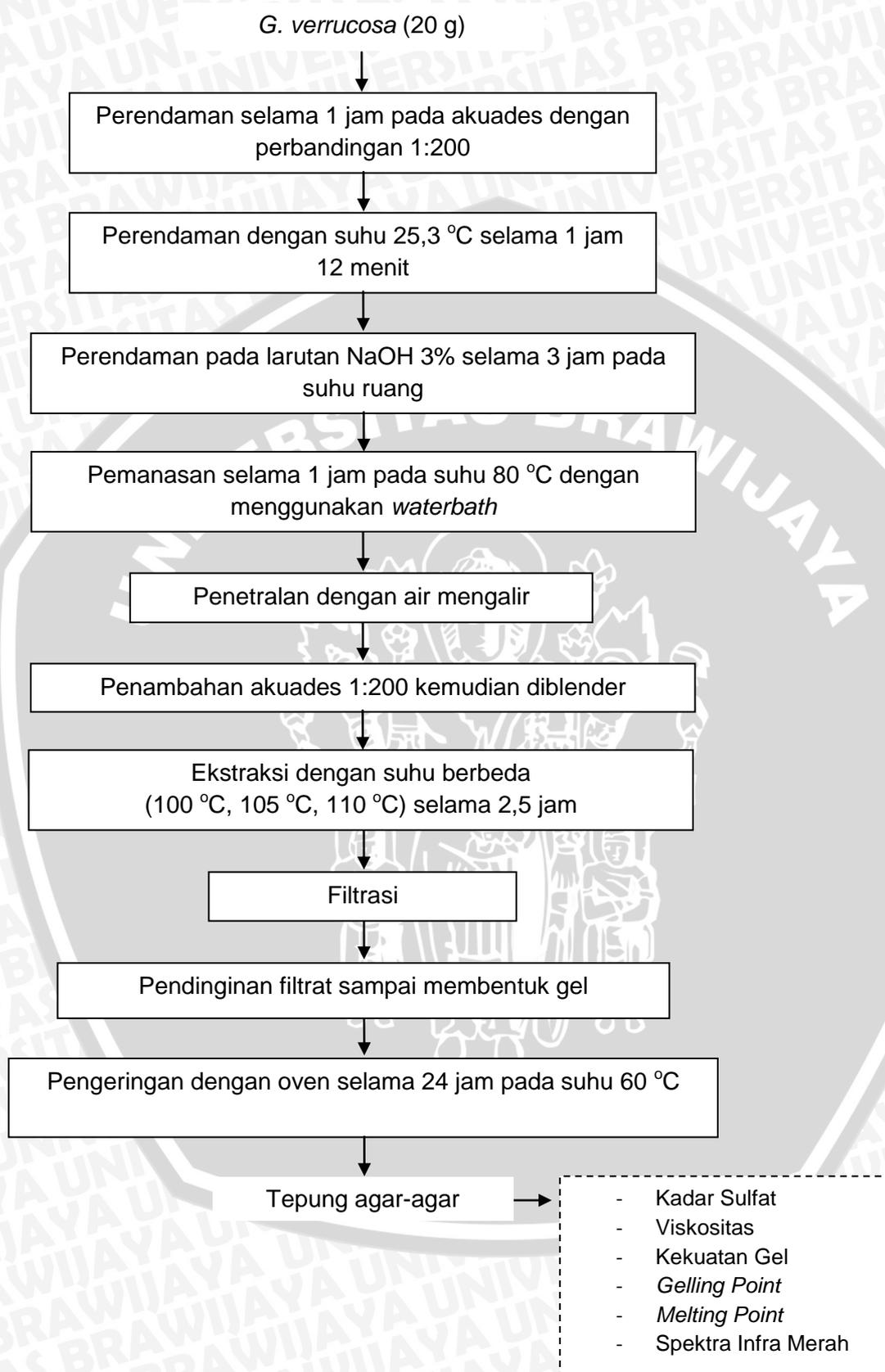
Kemudian hasil dari pemanasan II difiltrasi dengan menggunakan kain blacu dan kertas saring. Hal ini dilakukan untuk memisahkan antara residu *G. verrucosa* dan filtratnya. Selanjutnya filtrat yang akan digunakan dituangkan pada cawan petri dan ditunggu hingga padat.

8. Pengovenan

Setelah filtrat padat, dioven selama 24 jam pada suhu 60 °C untuk menghilangkan kadar air, sehingga didapatkan agar-agar kering.

9. Penepungan

Lembaran agar-agar kering, kemudian ditepungkan untuk mendapatkan tepung agar-agar.



Gambar 4. Ekstraksi Agar-agar

3.5 Analisis Data

3.5.1 Rendemen

Rendemen merupakan salah satu parameter penting dalam menilai efektif tidaknya proses pembuatan tepung agar-agar. Efektif dan efisiennya proses ekstraksi bahan baku untuk pembuatan tepung agar-agar dapat dilihat dari nilai rendemen yang dihasilkan. Perhitungan rendemen dilakukan untuk mengetahui persentase tepung agar-agar yang dihasilkan dari rumput laut kering yang digunakan berdasarkan perlakuan pencucian terhadap bahan baku.

Rendemen merupakan perbandingan antara berat agar kering dengan berat rumput laut kering. Rendemen agar menurut AOAC (1995) dihitung dengan menggunakan rumus :

$$\text{Rendemen} = \frac{W_a}{W_r} \times 100 \%$$

Keterangan: W_a = berat agar kering

W_r = berat rumput laut kering

3.5.2 Kadar Sulfat

Sampel agar kering diletakkan pada *beaker glass* dan ditambah 10 mL HNO_3 pekat. Kemudian dipanaskan pada *waterbath* dengan suhu 123°C selama 30 menit dengan volume akhir $\pm 2-3$ mL. Setelah itu ditambahkan 2-3 tetes larutan formaldehid 40% untuk mengurangi kelebihan HNO_3 . Kemudian campuran disaring ke dalam erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan 0,5 mL HCl pekat diikuti dengan penambahan akuades sampai volume 200 mL. Larutan tersebut dipanaskan sampai mendidih dan ditambahkan 10 mL 0,25 M BaCl_2 2-3 tetes dengan pengadukan konstan selama 5 menit dan ditiriskan selama 5 jam pada suhu ruang. Endapan BaSO_4 disaring dengan kertas saring (Whatman No 5) dan endapan dimasukkan ke dalam cawan porselen dan diabukan pada *muffle*

dengan suhu 700 °C selama 1 jam. Setelah itu cawan porselen dipindahkan ke desikator untuk pendinginan dan ditimbang untuk menentukan berat BaSO₄. Persentase sulfat dihitung dari persamaan berikut :

$$\% \text{ Kadar Sulfat} = \frac{41,16 \times \text{berat BaSO}_4}{\text{Berat Sampel}} \times 100$$

3.5.3 Viskositas

Larutan agar-agar tepung dengan konsentrasi 1,5% - 1,6% dipanaskan dalam bak air mendidih sambil diaduk secara teratur sampai suhu mencapai 76 – 77 °C. Viscometer diukur dengan *Spindel Viskometer Brookfield* yang berputar pada kecepatan 60 rpm dengan jarum spindel No. 2. Spindel terlebih dahulu dipanaskan pada suhu 75 °C kemudian dipasangkan ke alat ukur *Viscometer Brookfield*. Posisi spindel dalam larutan panas diatur hingga tepat, viscometer dapat diputar dan suhu larutan diukur. Ketika suhu larutan mencapai 75 °C termometer dikeluarkan dan nilai viskositas diketahui dengan pembacaan viscometer pada skala nilai 1 sampai 100. Pembacaan dilakukan setelah satu menit putaran penuh. Hasil bacaan digandakan 5 kali untuk spindel No. 2 bila dijadikan *centi poise*.

Pengamatan tingkat kekentalan agar-agar dilakukan dengan menggunakan uji viskositas dengan prinsip semakin tinggi viskositas maka semakin besar tahanan cairan yang bersangkutan dengan menggunakan alat ukur viskositas yaitu *Viscometer Brookfield*. Prosedur kerja yang dilakukan AOAC (1995) adalah sebagai berikut :

- Memanaskan dalam bak air mendidih larutan agar-agar konsentrasi 1,5 sambil diaduk secara teratur sampai suhu 75 °C
- Memanaskan *spindle* terlebih dahulu pada suhu 75 °C kemudian dipasang pada *Viscometer Brookfield*

- Mengatur *spindle* yang telah panas dalam larutan panas sehingga tepat dan menghidupkan *viscometer* serta mengukur suhu larutan
- Suhu larutan yang mencapai 75 °C nilai viskositas diketahui dengan pembacaan *viscometer* skala 1 sampai 100
- Pembacaan *viscometer* dilakukan setelah satu menit putaran penuh 2 kali untuk *spindle* no 1 dan tombol penekan jarum ditekan, kemudian dibaca angka yang ditunjukkan oleh jarum tersebut (A). angka konversi dari viskositas adalah poise (1 poise = 100 cP)
- Nilai viskositas dihitung dengan menggunakan rumus :
Viskositas (cP) = A x angka konversi

3.5.4 Kekuatan Gel (*Gel Strength*)

Kekuatan gel sangat penting untuk menentukan perlakuan yang terbaik dalam proses ekstraksi tepung agar-agar. Salah satu sifat penting adalah mampu mengubah cairan menjadi padatan atau mengubah bentuk sol menjadi gel yang bersifat *reversible*. Kemampuan inilah yang menyebabkan tepung agar-agar sangat luas penggunaannya (Indrawati, 2007).

Tepung agar-agar sebanyak 0,8 g dan KCl 0,08 g dilarutkan ke dalam 50 mL akuades dan kemudian dipanaskan sampai suhunya mencapai 80 °C sambil terus diaduk. Setelah itu, larutan dimasukkan ke dalam cetakan yang berdiameter 6 cm dan dibiarkan pada suhu 10 °C selama 2 jam. Gel yang terbentuk dalam cetakan dikeluarkan dan siap untuk diukur gelnya dengan *tensile strength*. Prinsip dasar pengujian adalah memberikan beban pada sampel per satuan luas. Prosedur pengujian kekuatan gel menurut AOAC (1995) sebagai berikut :

- Letakkan sampel pada tumpuan
- Tepatkan batang penekan pada permukaan sampel dengan cara memutar rode penekan
- Putar roda penekan perlahan-lahan sambil diamati jarum penunjuk beban sampai sampel mulai tertembus
- Bacaan maksimum merupakan gaya untuk menembus sampel

$$\text{Kekuatan Gel } \left(\frac{\text{N}}{\text{cm}^2} \right) = \frac{\text{Gaya untuk menembus sampel}}{\text{permukaan sampel yang tertembus}}$$

3.5.5 *Gelling Point* dan *Melting Point*

Pengamatan tingkat gelinitas dilakukan dengan uji *gelling point* dan *melting point*. Prinsip pengujian *gelling point* adalah mengukur titik jendal dari sampel dengan menggunakan termometer. Prosedur kerja yang dilakukan menurut Suryaningrum dan Utomo (2002) adalah sebagai berikut :

- Membuat larutan agar-agar konsentrasi 6,67% (melarutkan agar-agar sebanyak 1 g dalam akuades sebanyak 15 mL)
- Menurunkan suhu sampel secara perlahan-lahan dengan cara menempatkan wadah yang telah diberi pecahan es
- Mengukur titik jendal pada saat larutan agar-agar membentuk gel dengan menggunakan termometer.

Prinsip pengujian *melting point* adalah mengukur titik leleh dari sampel dengan cara memanaskan gel sampel dalam pemanas air. Prosedur kerja yang dilakukan Suryaningrum dan Utomo (2002) adalah sebagai berikut :

- Membuat larutan agar-agar konsentrasi 6,67% (melarutkan agar-agar sebanyak 1 g dalam akuades sebanyak 15 mL)

- Menginkubasi sampel pada suhu 10 °C selama 2 jam
- Memanaskan sampel yang telah diinkubasi dalam pemanas air untuk mengetahui titik leleh gel yang sebelumnya di atas gel agar-agar diletakkan gotri dan ketika gotri jatuh ke dasar maka suhu tersebut dinyatakan sebagai titik leleh agar-agar.

3.5.6 Spektra Infra Merah

Prinsip FTIR adalah ketika sampel berinteraksi dengan sinar (radiasi elektromagnetik), maka ikatan kimia pada panjang gelombang tertentu akan menyerap sinar ini dan akan bervibrasi. Vibrasi ini dapat berupa vibrasi tekuk atau vibrasi ulur. Absorban atau vibrasi ini dihubungkan dengan ikatan tunggal atau gugus fungsi dari molekul untuk identifikasi senyawa yang tidak diketahui.

Prosedur kerja FTIR menurut (Hadik, 2008) sebagai berikut:

- Pembuatan Pelet KBr

KBr yang digunakan yaitu jenis Spektro Grade, langkah pertama KBr dioven pada suhu 105°C ± 1 jam, selanjutnya ditumbuk halus : apabila sampel padat maka langsung dicampurkan ke dalam KBr tersebut serta ditumbuk halus bersama KBr, dengan perbandingan KBr : Sampel (10:1). Setelah KBr ditumbuk halus kemudian dicetak/dipres pada alat pengepresan pellet siap diukur pada FT-IR, namun apabila sampel cair maka setelah KBr menjadi pellet barulah sampel diteteskan (antara 2-3 tetes), dan siap diukur pada FT-IR.

Prosedur penggunaan FTIR- 8400S SHIMADZU (Hadik, 2008).

- Tahap Awal

FTIR dihubungkan pada sumber tegangan 220 volt, selanjutnya dinyalakan alat FTIR dengan menekan tombol ON diikuti dengan menyalakan komputer, dipilih program {IR SOLUTION} dan diklik 2x pada program {IR SOLUTION} untuk masuk ke dalam program. Dilanjutkan memilih menu

{MEASUREMENT} yang ada pada *Function Tabs*, dan memilih menu {MEASUREMENT} yang ada pada *Menu Bardengan* mengklik {INITIALIZE} kemudian tunggu sampai komputer terhubung dengan alat FTIR.

- Pengukuran Sampel

Sebelum dilakukan pengukuran sampel, *Sample Compartment* (ruangan didalam alat yang disediakan untuk tempat sampel) dikosongkan terlebih dahulu dan diklik background {BKG} serta ditunggu hingga proses scanning selesai. Langkah selanjutnya membuka *sample compartment* dan masukkan sampel, kemudian ditutup alat FT-IR dan tunggu hingga proses *scanning* selesai. Untuk mencetak hasil, klik menu FILE dan dipilih PRINT selanjutnya dipilih bentuk TEMPLATE yang diinginkan dan tekan ENTER.

- Tahap Akhir

Untuk keluar dari program IR solution, diklik menu FILE dan dipilih CLOSE atau menutup tampilan yang ada, serta diklik EXIT. Selanjutnya komputer dimatikan diikuti FTIR.

Spektrofotometer FTIR dapat digunakan untuk analisa sampel berupa padatan, cairan, dan gas. Spektroskopi ini merupakan spektroskopi inframerah yang dilengkapi dengan transformasi Fourier untuk deteksi dan analisis hasil spektrumnya. Inti spektroskopi FTIR adalah interferometer Michelson, yaitu alat untuk menganalisis frekuensi dalam sinyal gabungan. Spektrum inframerah tersebut dihasilkan dari pentransmisian cahaya yang melewati sampel, pengukuran intensitas cahaya dengan detector dan dibandingkan dengan intensitas tanpa sampel sebagai fungsi panjang gelombang. Spektrum inframerah yang diperoleh kemudian diplot sebagai intensitas fungsi energi, panjang gelombang (μm) atau bilangan gelombang (cm^{-1}) (Anam *et al.*, 2007).