3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah rumput laut coklat *Turbinaria sp.* yang diperoleh dari perairan Kabupaten Sumenep, Kepulauan Madura, Jawa Timur. Adapun bahan kimia yang digunakan dalam proses penelitian ini antara lain CaCO₃, asam sulfat (H₂SO₄), natrium hidroksida (NaOH), hidrogen klorida (HCl), kalium iodida (Kl), plastik wrap, plastik klip, alumunium foil, kertas saring, selang, silika gel dan aquades.

3.1.2 Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi peralatan untuk delignifikasi dan hidrolisis serta peralatan untuk analisis. Alat – alat yang digunakan untuk delignifikasi dan hidrolisis antara lain kompor gas, botol kaca 1000 ml, erlenmayer 300 ml, gelas ukur 150 ml, beakerglas 500 ml, timbangan digital, waterbath, corong, dan spatula. Adapun peralatan yang digunakan untuk proses analisa antara lain pendingin balik, boiling plask, desikator, botol timbang, timbangan analitik, timbang digital, oven, cawan porselin, pipet, spatula, corong, spektrofotometer, tabung reaksi dan rak tabung reaksi.

BRAWIJAYA

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen eksploratif atau yang bersifat menjelajah, yang artinya penelitian ini dilakukan bila pengetahuan tentang gejala yang diteliti masih sangat kurang. Penelitian ini juga bertujuan untuk memformulasikan pertanyaan penelitian yang lebih tepat, sehingga hasil penelitian ini dapat menjawab pertanyaan-pertanyaan selanjutnya di masa yang akan datang. Metode eksploratif adalah suatu metode yang bertujuan untuk menghimbau informasi awal yang akan membantu upaya menetapkan masalah dan merumuskan hipotesis (Amirin, 2009). Penelitian eksploratif juga bertujuan untuk menggambarkan suatu keadaan atau fenomena tertentu secara sistematis, faktual dan akurat melalui berbagai sifat dan faktor yang mempengaruhinya (Chusairi, 2013). Eksperimen dalam penelitian ini dibagi menjadi dua tahap, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Penjelasan lebih lanjut dapat dilakukan dengan mencari tahu kolerasi antar variabel penelitian menggunakan metode kolerasional yang bertujuan untuk menentukan apakah terdapat asosiasi antara dua variabel atau lebih, serta seberapa jauh kolerasi yang ada diantara veriabel yang diteliti.

3.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini dibagi dalam dua tahap, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

3.3.1 Analisis Kandungan Lignoselulosa pada Rumput Laut Coklat (*Turbinaria sp.*) Segar dengan Metode Chesson

Pada penelitian pendahuluan ini bertujuan untuk mencari kandungan, selulosa, hemiselulosa dan lignin pada rumput laut coklat *Turbinaria sp.* segar

BRAWIJAYA

sebagai acuan dalam penelitian tahap I dan penelitian tahap II. Analisa prosedur pengujian kadar lignoselulosa dapat dilihat pada Gambar 8.

Hasil dari penelitian tahap I untuk mengetahui presentase kandungan lignoselulosa pada rumput laut yang didapat data yaitu kandungan selulosa sebesar 21,28 %, hemiselulosa sebesar 14,42 %, dan lignin sebesar 10,25 %, hasil perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 1.

3.3.2 Penelitian Tahap I

3.3.2.1 Mencari Konsentrasi NaOH yang Terbaik untuk Proses Delignifikasi

Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi NaOH yang terbaik dalam proses delignifikasi dengan rancangan penelitian RAL yang dihitung dengan menggunakan ANOVA dimana ada tiga perlakuan yang digunakan, yaitu 5%, 10%, dan 15% dengan menggunakan parameter kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin. Penentuan kadar NaOH mengacu pada penelitan Wiratmaja *et al.* (2011), yang menggunakan konsentrasi NaOH 5%, 10%, dan 15% pada proses *pretreatment* rumput laut merah *E. cottoni* Prosedur penelitian pendahuluan untuk mengetahui kadar konsentrasi yang terbaik dalam proses delignifikasi dapat dilihat pada Gambar 9.

Hasil penelitian ini untuk mencari konsentrasi NaOH yang terbaik dapat dihitung dengan menggunakan ANOVA diperoleh konsentrasi yang terbaik pada konsentrasi NaOH 15%, dimana selulosa, hemiselulosa dan lignin mengalami kenaikan dengan seiring bertambahnya konsentrasi NaOH, tetapi pada proses hidrolisis selulosa, hemiselulosa dan lignin terdegradasi oleh larutan H₂SO₄ sehingga hasil akhir ketiganya mengalami penurunan. Hal ini sesuai dengan penelitian Wiratmaja *et al.* (2011), konsentrasi NaOH yang terbaik dalam proses

pretreatment rumput laut merah *E. cottoni* adalah konsentrasi NaOH 15%. Hasil perhintungan dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.3.2.2 Mencari Perlakuan yang Terbaik Setelah Proses Delignifikasi

Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui hasil yang yang terbaik dengan menggunakan rancangan penelitian RAL yang dihitung dengan menggunakan ANOVA dimana menggunakan tiga perlakuan yang berbeda setelah proses delignifikasi yaitu dengan tanpa dikeringkan, dikeringkan dengan sinar matahari selama 3 hari dan dikeringkan dengan menggunakan oven suhu 60°C selama 10 jam dengan menggunakan parameter kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin. Hal ini sesuai dengan penelitian Hidayat (2013), dilakukan proses pengeringan dengan dijemur pada sinar matahari dengan menggunakan sampel rumput laut *C. Racemosa* setelah proses deliginifikasi menggunakan NaOH konsentrasi 0,05 N dan 0,1 N. Prosedur penelitian untuk menentukan perlakuan yang terbaik setelah proses delignifikasi dapat dilihat pada Gambar 10.

Hasil penelitian ini untuk mencari perlakuan yang terbaik setelah proses delignifikasi yang dihitung dengan menggunakan ANOVA menunjukkan hasil yang terbaik pada perlakuan yang dikeringkan dengan sinar matahari, dimana selulosa, hemiselulosa dan lignin mengalami penurunan yang menunjukkan adanya proses hidrolisis karena selulosa, hemiselulosa dan lignin terdegradasi menadi gula pereduksi dan senyawa lain. Hal ini sesusai dengan peryataan Hidayat (2013), bahwa setelah rumput laut di *treatment* dengan menggunakan NaOH kemudian dikeringkan diawah sinar matahari dapat mengurangi kadar air dan NaOH yang tersisa, sehingga proses hidrolisis berjalan dengan baik. Hasil perhitungan ANOVA dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.3.2.3 Mencari Konsentrasi H₂SO₄ yang Terbaik Pada Proses Hidrolisis

Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tiga perlakuan konsentrasi H_2SO_4 yang terbaik dalam proses hidrolisis dengan rancangan penelitian RAL yang dihitung dengan menggunakan ANOVA dimana ada tiga perlakuan, yaitu 1%, 1,5%, dan 2% dengan menggunakan parameter kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin. Penggunaan kosentrasi 2% mengacu pada penelitian Hidayat (2013), proses hidrolisis pada rumput laut C. Racemosa dengan menggunakan katalis asam H_2SO_4 konsentrasi 2% v/v. Prosedur penelitian pendahuluan untuk mengetahui kadar konsentrasi H_2SO_4 yang terbaik dalam proses hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 11.

Hasil penelitian ini untuk mencari konsentrasi H₂SO₄ yang terbaik dihitung dengan mengunakan ANOVA diperoleh konsentrasi yang terbaik yaitu 2% dimana seiring dengan tingginya konsentrasi selulosa, hemiselulosa dan lignin mengalami penurunan yang dimana menunjukkan bahwa pada konsentrasi tersebut selulosa dan hemiselulosa telah terdegradasi. Hal ini didukung dengan pernyataan Cleaments dan Beek (1985), bahwa Semakin tinggi konsentrasi asam maka semakin banyak ion (H+) yang terbentuk sehingga reaksi hidrolisis untuk memecah senyawa polisakarida menjadi monosakarida semakin besar. Hasil perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.3.2.4 Mencari Lama Waktu yang Terbaik Pada Proses Hidrolisis

Pada penelitian ini bertujuan untuk mengetahui lama waktu proses hidrolisis yang terbaik dengan rancangan penelitian RAL yang dihitung dengan menggunakan ANOVA dimana ada tiga perlakuan, yaitu suhu ruang (suhu 27°C) selama 8 jam, suhu 100°C selama 30 menit dan suhu 100°C selama 60 menit dengan menggunakan parameter kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin. Hal ini mengacu pada penelitian Saputra *et al.* (2012), yang menggunakan waktu hidrolisis selama 30 menit, 60 menit dan 120 menit pada suhu 100 °C untuk

menghidrolisis rumput laut coklat S. Duplicatum. Prosedur penelitian ini untuk mengetahui lama waktu yang terbaik dalam proses hidrolisis dapat dilihat pada Gambar 12.

Hasil penelitian ini untuk mencari lama waktu proses hidrolisis yang terbaik yang dihitung dengan menggunakan ANOVA menunjukkan lama waktu yang terbaik yaitu proses hidrolisis pada suhu 100 °C selama 60 menit dimana selulosa, hemiselulosa dan lignin mengalami penurunan yang menunjukkan terdegradasinya selulosa dan hemiselulosa menjadi senyawa lain selama proses hidrolisis. Menurut Hidayat (2013), semakin tinggi konsentrasi padatan, semakin banyak kandungan polisakarida pada bahan yang dapat dikonversi menjadi gula sederhana sehingga meningkatkan kadar gula pereduksi. Peningkatan konsentrasi padatan diimbangi dengan peningkatan konsentrasi asam karena asam sulfat 2% (v/v) optimum untuk hidrolisis. Hasil perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 5.

1 gram sampel kering (berat a) ditambahkan150 ml H₂O dan direfluk pada suhu 100°C dengan waterbath selama 1 jam.

Hasilnya di saring residu dicuci dengan air panas

Residu kemudian dikeringkan dengan oven sampai beratnya konstan dan kemudian ditimbang (berat b)

Residu ditambah 150 ml H₂SO₄ 1 N, kemudian direfluk pada suhu 100°C dengan water bath selama 1 jam.

Hasilnya disaring dan dicudi sampai netral (300 mL) dan residunya dikeringkan hingga beratnya konstan. Berat ditimbang (berat c).

Residu kering ditambahkan 100 mL H₂SO₄ 72% dan direndam pada suhu kamar selama 4 jam.

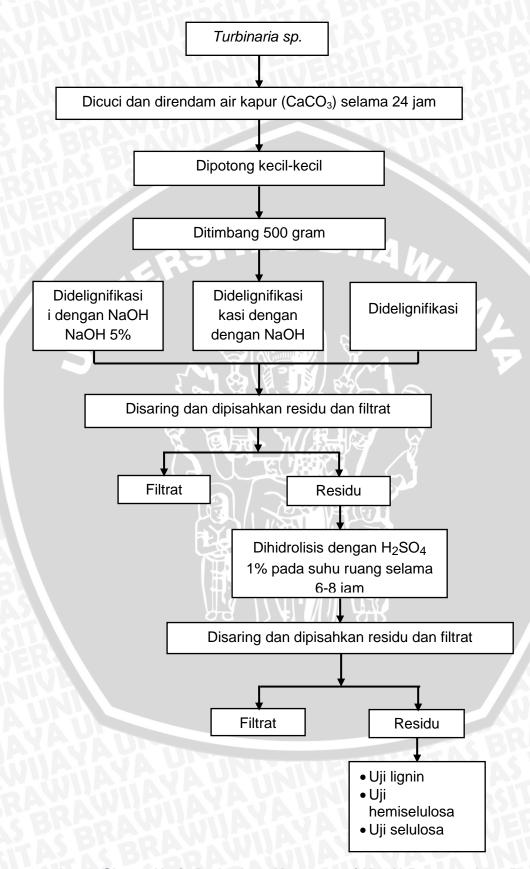
Ditambahkan 150 mL H₂SO₄ 1 N dan direfluk pada suhu 100°C dengan water bath selama 1 jam.

Residu disaring dan dicuci dengan H₂O sampai netral (400 mL)

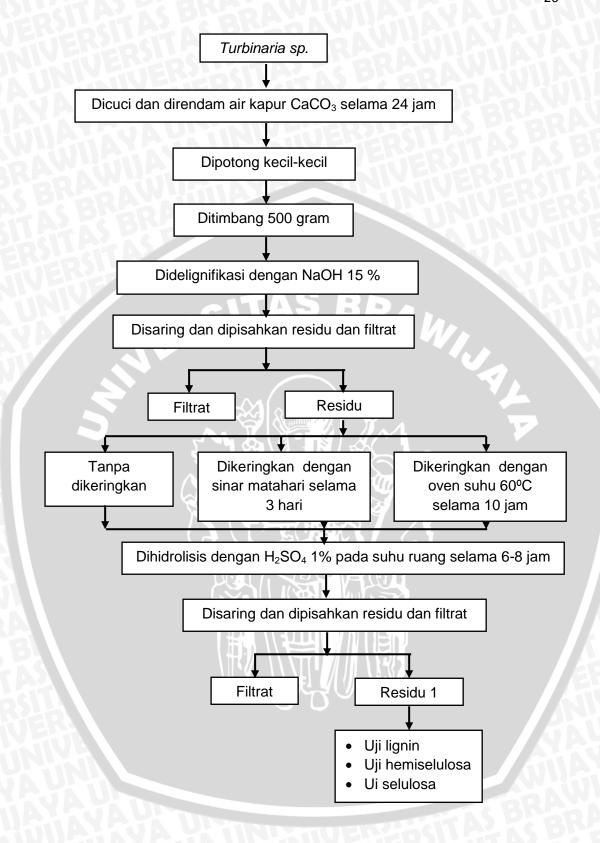
Residu kemudian dipanaskan dengan oven dengan suhu 105°C sampai beratnya konstant dan ditimbang (berat d)

Selanjutnya residu diabukan dan ditimbang (berat e)

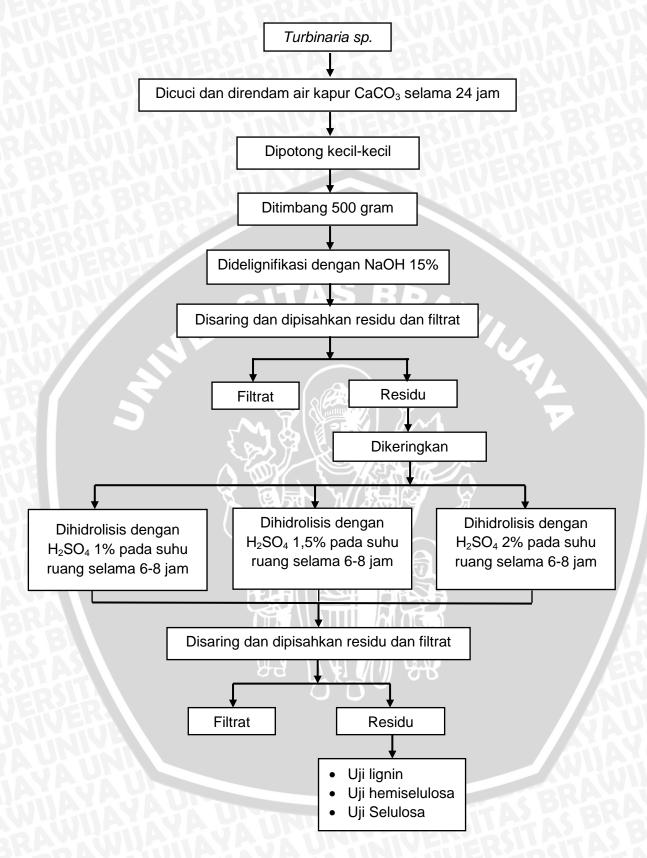
Gambar 8. Uji Lignoselulosa pada rumput laut coklat (Turbinaria sp.) (Metode Chesson)



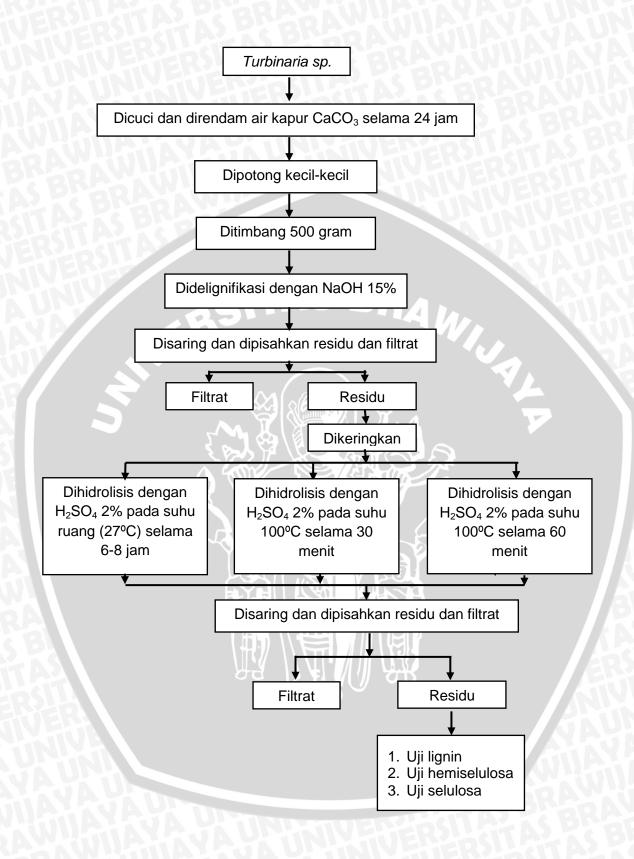
Gambar 9. Skema Kerja Perbedaan Konsentrasi NaOH 5%. 10% dan 15%



Gambar 10. Skema Kerja Perbedaan Setelah Proses Delignifikasi



Gambar 11. Skema Kerja Perbedaan Konsetrasi Asam pada Proses
Hidrolisis



Gambar 12. Skema Kerja Perbedaan Lama Waktu Hidrolisis

3.3.3 Penelitian Tahap II

Hasil penelitian tahap I digunakan sebagai dasar penelitian tahap II. Penelitian II ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi H₂SO₄ yang tepat, dalam proses hidrolisis rumput laut untuk menghasilkan lignin, selulosa, hemiselulosa, dan kadar gula perduksi. Kemudian diterapkan dan disimpulkan pada hidroisis rumput laut yang tepat dan memiliki nilai efektivitas yang tinggi dalam proses hidrolisis.

3.3.4 Perlakuan dan Rancangan Percobaan

Menurut Surachmad (1994), ada dua macam variabel dalam penlitian, yaitu variabel bebas dan variabel terikat. Variabel bebas adalah variabel yang diselidiki pengaruhnya, sedangkan variabel terikat adalah variabel yang diperkirakan akan timbul sebagai pengaruh dari variabel bebas.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan yang digunakan. Perlakuan yang pertama yaitu faktor konsentrasi H₂SO₄ (F) dengan level 1% (F1), 2% (F2), 4% (F3), dan 6% (F4). Variabel terikat dalam penelitian ini adalah perameter yang diamati, yaitu kandungan lignin, selulosa, hemiselulosa, dan gula pereduksi dari sampel alga coklat Turbinaria sp.

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) sederhana yang terdiri dari 4 perlakuan dan 3 kali ulangan. Model matematika dari penelitian ini yaitu:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \Sigma_{ij}$$
; $i = 1, 2, t$
 $J = 1, 2, r$

Y_{ii}= respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j. μ= nilai tengah umum

T_i= pengaruh perlakuan ke-i

 Σ_{ij} = pengaruh galat percobaan perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

Asumsi yang digunakan agar dapat dilakukan pengujian secara statistika adalah:

- a. µ dan T_i bernilai tetap.
- b. μ , T_i dan Σ_{ii} saling additif.
- c. $\Sigma_{ij} \approx N(0, \sigma^2)$ artinya Σ_{ij} menyebar secara normal dengan nilai tengah = 0 dan ragam sebesar σ²
- d. Σ_{ii} bebas satu sama lain.

Model desain rancangan penelitian dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Desain Rancangan Penelitian

ULANGAN		Kosentrasi H ₂ SO ₄			TOTAL	Rata- rata
	F1	F2	F3	F4	W,	
U1	F1U1	F2U1	F3U1	F4U1		
U2	F1U2	F2U2	F3U2	F4U2		Y
U3	F1U3	F3U2	F3U3	F4U3		V

Keterangan

F1: Konsentrasi H₂SO₄ 1%

F2: Konsentrasi H₂SO₄ 2%

F3: Konsentrasi H₂SO₄ 4%

F4 : Konsentrasi H₂SO₄ 6%

Langkah selanjutnya adalah membandingkan F hitung dan F tabel:

- Jika F hitung < F tabel 5%, maka perlakuan tidak beda nyata
- Jika F hitung > F tabel 5%, maka perlakuan menyebabkan hasil sangat beda nyata

Apabila dari hasil perhitungan didapatkan perbedaan yang nyata (F hitung > F tabel 5%) maka dilanjutkan uji Beda Nyata Jujur (BNJ) untuk menentukan hasil terbaik.

3.3.5 Prosedur Penelitian Tahap II

3.3.5.1 Persiapan Sampel

Setelah sampel alga coklat sebanyak 5 kg diambil dari laut kepulauan Madura, sampel dicuci dengan air kran untuk menghilangkan kotoran yang masih menempel. Selanjutnya sampel direndam dalam larutan CaCO₃ selama 24 jam untuk menghilangkan bau rumput laut dan garam-garam mineral yang ada pada rumput laut. Kemudian sampel dipotong kecil-kecil dan ditimbang seberat 500 gram dan dimasukan ke dalam beaker glass 1000 ml.

3.3.5.2 Delignifikasi dengan NaOH

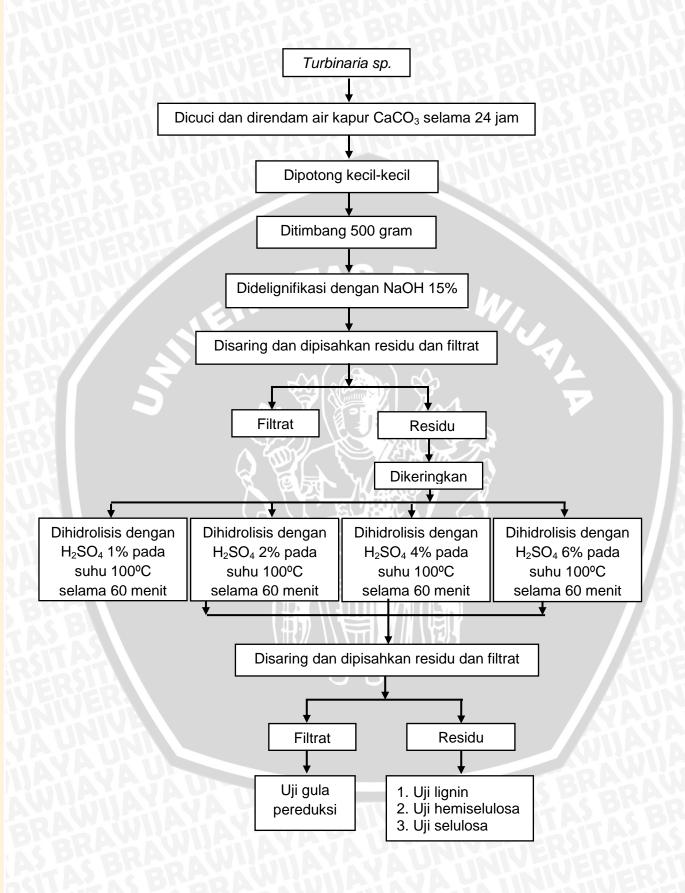
Proses pemisahan atau penghilangan lignin dari serat – serat selulosa disebut delignifikasi atau *pulping*. Sampel seberat 500 gram dimasukan ke dalam beaker glass 1000 ml, kemudian ditambahkan larutan NaOH 15% sebanyak 1000 ml yang bertujuan untuk menghilangkan kandungan lignin pada rumput laut sehingga didapatkan selulosa dan hemiselulosa, yang dapat mempermudah proses hidrolisis selulosa dan hemiselulosa menjadi monomernya. Selanjutnya beaker glass ditutup menggunakan alumunium foil dan ditunggu selama 1 jam agar lignin dapat rusak secara sempurna. Setelah 1 jam dipisahkan larutan antara residu dan filtrat dengan cara disaring menggunkan kertas saring. Kemudian residu dikeringkan hingga mencapai kadar air 50 - 60 % bertujuan untuk menguapkan NaOH yang masih tersisa.

3.3.5.3 Hidrolisis

Hidrolisis bertujuan untuk memecah hemiselulosa dan selulosa menjadi gula-gula sederhana/monosakarida (glukosa dan xylosa). Sampel kering setelah mengalami proses delignifikasi dimasukkan dalam beaker glass 1000 ml kemudian ditambahkan larutan H₂SO₄ dan beaker glass di

tutup dengan alumunium foil dan di wrap. Setelah itu disaring dipisahkan antara filtrat dan residu. Filtrat di uji kadar gula pereduksi dan residu di uji kadar lignin, selulosa dan hemiselulosa. Prosedur proses penelitian dapat dilihat pada Gambar 13.





Gambar 13. Skema Kerja Penelitian Tahap II

3.3.6 Analisis Kandungan Lignoselulosa dengan Metode Chesson

Metode ini adalah analisis gravimetri setiap komponen setelahdihidrolisis atau dilarutkan. Tahapan langkanya adalah: pertama, mengilangkan kandungan ekstraktif (dalam metode ini disebut *Hot Water Soluble* (HWS)), kemudian hidrolisis hemiselulosa dengan menggunakan asam kuat tanpa pemanasan, dilanjutkan dengan hidrolisis menggunakan asam encer pada suhu tinggi. Bagian terakhir yang tidak larut adalah lignin. Kandungan lignin dikoreksi dengan kandungan abu. Prosedur uji lignoselulosa dapat dilihat pada Gambar 8.

3.3.6.1 Analisa Hemiselulosa

Pengukuran kadar hemiselulosa dianalisis dengan metode *Chesson* (Datta,1981), yaitu sebanyak 1 gram (a) 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 (b). 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 (c).

Kadar hemiselulosa =
$$\frac{b-c}{a}$$
 x 100%

3.3.6.2 Analisa selulosa

Pengukuran kadar selulosa dianalisis dengan metode *Chesson* (Datta, 1981),yaitu sampel yang telah dikeringkan pada analisis hemiselulosa (c) dicampur denganlarutan H₂SO₄ 72% sebanyak 10 ml, dilakukan perendaman selama 4 jam, laludicampur dengan 150 ml larutan H₂SO₄ 1 N, dipanaskan pada suhu 100°C selama 4 jam, difiltrasi dengan kertas saring dan terakhir dibilas

Kadar selulosa =
$$\frac{c-d}{a}$$
 x 100%

3.3.6.3 Analisa Lignin

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

Kadar lignin =
$$\frac{d-e}{a}$$
 x 100%

3.3.6.4 Penentuan Kadar Gula Preduksi (Metode Nelson)

Analisis gula reduksi menggunakan metode Nelson-Somogi (Sudarmaji et al., 1984). Prinsip analisis kadar gula reduksi menggunakan metde Nelson-Somogyi adalah gula reduksi akan mereduksi kuprioksida menjadi kuprooksida, kuproksida yang terbentuk akan direaksikandengna arsenomolibdat sehingga terbentuk molybdenum yang berwarna biru, intensitasnya diukur dengn pengukuran asorbansi menggnakan spektrofotometer pada panjang gelombang 510 - 600 nm. Abosrbansi yang ditunjukkan akan semakin besar apabila gula reduksi dalam bahan itu besar. Hal itu menunjukkan bahwa intensitas absorbansi secara tidak langsung menunjukan kadar gula reduksi pada sampel.

Penentuan kadar gula reduksi dengan metode Nelson-Somogyi dibuat larutan glukosa standar dengan konsentrasi 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ml, larutan standar tersebut masing-masing ditambah reagensia Nelson-Somogyi yang berwarna biru. Penambahan reagensia Nelson ini bertujuan untuk mereduksi kuprioksida menjadi kuprooksida yang mana K-Na-tartrat yang terkandung dalam Nelson berfungsi untuk mencegah terjadinya reagensia pengendapan kuprioksida. Selain 6 larutan standar tersebut, dibuat juga larutan blanko dari aquades yang digunakan sebagai pembanding. Dengan membandingkannya terhadap larutan standar, konsentrasi gula dalam sampel dapat ditentukan. Prosedur penelitian uji gula pereduksi dapat dilihat pada Gambar 14.

Pembuatan Kurva Standar Disiapkan 6 tabung reaksi masing-masing diisi dengan 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; dan 1 ml larutan glukosa standar Ditambahakan aquadest dalam tiap tabung tersebut hingga volume menjadi 1 ml Ditambahkan 1 ml reagensia Nelson pada tiap-tiap tabung, dan diapanaskan dalam air mendidih selama 15 menit Dinginkan semua tabung dengan cara direndam dalam air dingin hingga suhu ruang Ditambahkan 1 ml reagensia Arsenomolibdat pada tiap-tiap tabung reaksi Ditambahkan 7 ml aquadest pada tiap tabung kemudian homogenkan Diukur serapan pada spektrofotometri dengan panjang gelombang 540 nm b. Penentuan Kadar Gula Pereduksi Diambil 1 ml larutan yang jernih Ditambahkan 1 ml reagensia Nelson pada tiap-tiap tabung dan dipanaskan dalam air mendidih selama 15 menit Ditambahkan 1 ml reagensia Arsenomolibdat pada tiap-tiap tabung reaksi Ditambahkan 7 ml aquadest, kemudian divortex Diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm dengan spektrofotometer

Gambar 14. Skema Kerja Analisis Gula Pereduksi (Metode Nelson)

Ditentukan kadar gula reduksi dengan kurva gula standar