

BAB III

METODE PENELITIAN

Bagian ketiga dari tulisan ini akan menerangkan mengenai tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini. Secara umum, penelitian ini terdiri dari dua bagian rangkaian analisa yaitu analisa utama dan analisa tambahan. Alur kerja analisa-analisa tersebut dapat dilihat melalui sub bab 3.1 sedangkan rincian prosedurnya dijelaskan pada sub bab 3.2. Untuk mempermudah penulisan, dalam bahasan-bahasan selanjutnya frasa gelombang mikro akan disingkat menjadi GM.

3.1 Diagram alir penelitian

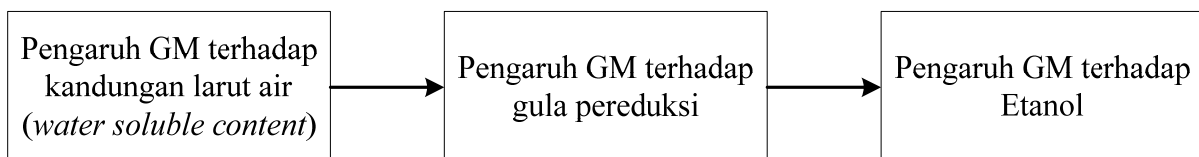
Sub bab ini akan menggambarkan tahapan-tahapan yang dilakukan dalam penelitian ini. Penggambaran ini dibagi menjadi dua, bagian pertama adalah diagram besar yang akan mendeskripsikan seluruh jalan penelitian secara umum dan kaitan antara tahapan yang dilakukan. Bagian kedua adalah diagram kecil yang akan memperlihatkan langkah-langkah yang menyusun tahapan tersebut.

3.1.1 Diagram besar penelitian

Di awal bab ini telah dijelaskan bahwa secara garis besar penelitian ini tersusun atas dua tahapan analisa yaitu analisa utama dan analisa tambahan. Kedua bagian tersebut akan dipaparkan lebih lanjut pada paragraf-paragraf berikut.

3.1.1.1 Analisa Utama

Analisa utama penelitian ini terdiri dari tiga bagian yaitu analisa untuk mengetahui pengaruh GM terhadap kandungan air, gula pereduksi, dan etanol. Ketiga bagian analisa tersebut merupakan tahapan yang saling berhubungan dan merealisasikan tujuan dari penelitian ini. Peta dari ketiga analisa itu ditampilkan melalui Gambar 3.1 berikut.



Gambar 3.1. Diagram alir analisa utama

3.1.1.2 Analisa Tambahan

Analisa tambahan merupakan bagian pendukung dalam proses pembuktian hipotesis-hipotesis yang dibentuk dalam penelitian ini. Analisa ini terdiri dari dua tahap yang berbeda dan tidak saling berhubungan seperti analisa utama. Bagian analisa tambahan ini digambarkan melalui Gambar 3.2 berikut.

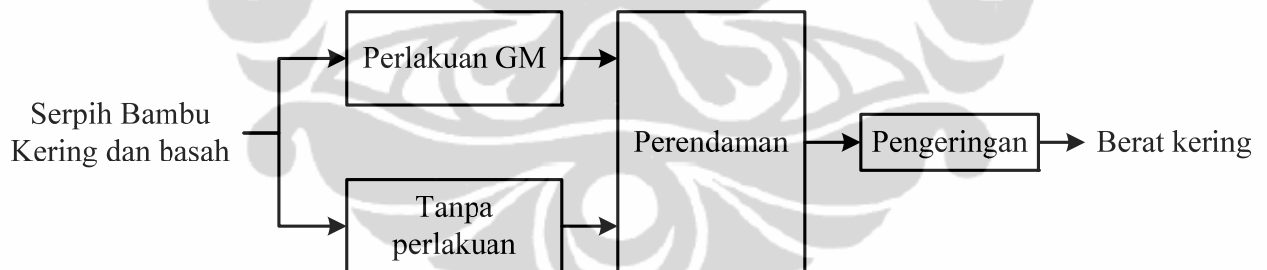


Gambar 3.2. Diagram alir analisa tambahan

3.1.2 Diagram kecil penelitian

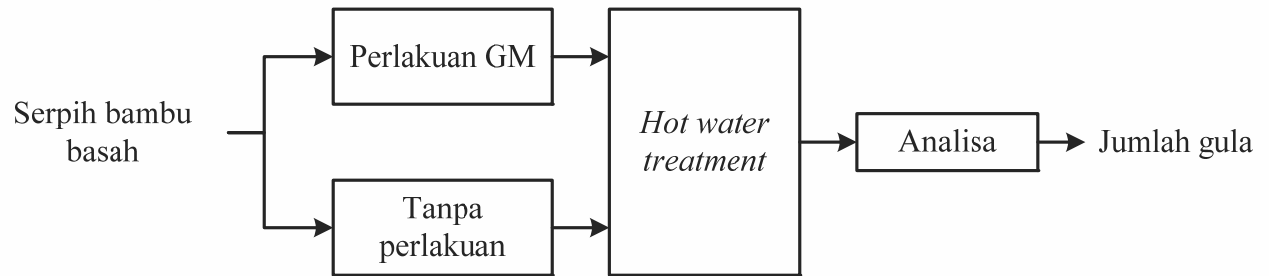
Sub bab ini merupakan deskripsi lebih rinci tahapan penelitian yang telah disebutkan di bagian diagram besar penelitian.

3.1.2.1 Pengaruh GM terhadap kandungan larut air



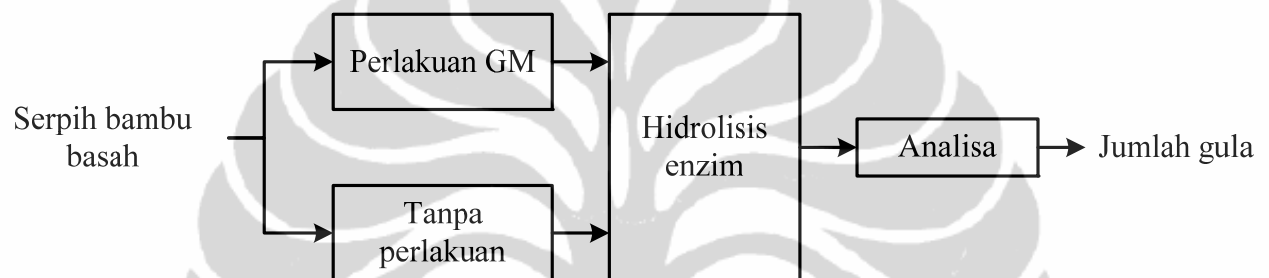
Gambar 3.3 Diagram alir penelitian pengaruh perlakuan GM terhadap kandungan larut air

3.1.2.2 Pengaruh GM terhadap gula pereduksi



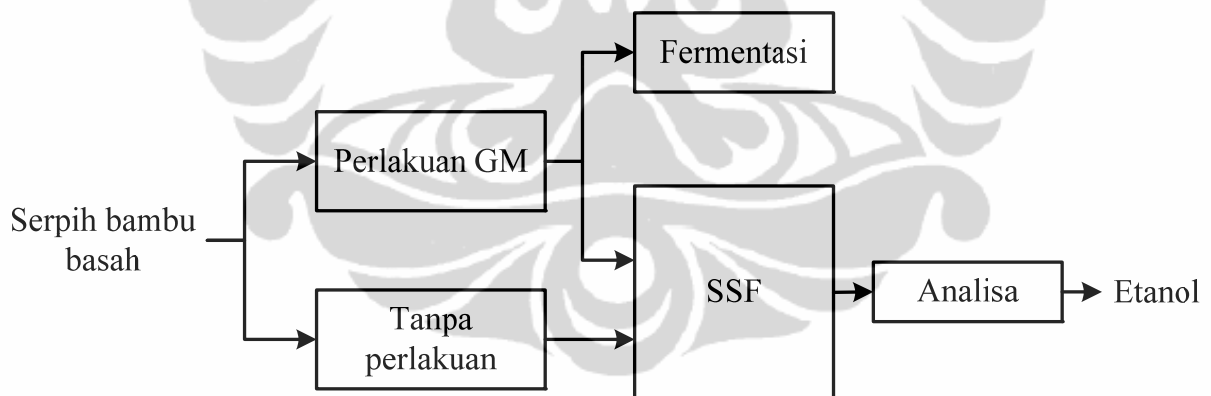
Gambar 3.4 Diagram alir penelitian pengaruh perlakuan GM terhadap gula pereduksi

3.1.2.3 Pengaruh GM terhadap hidrolisis enzim



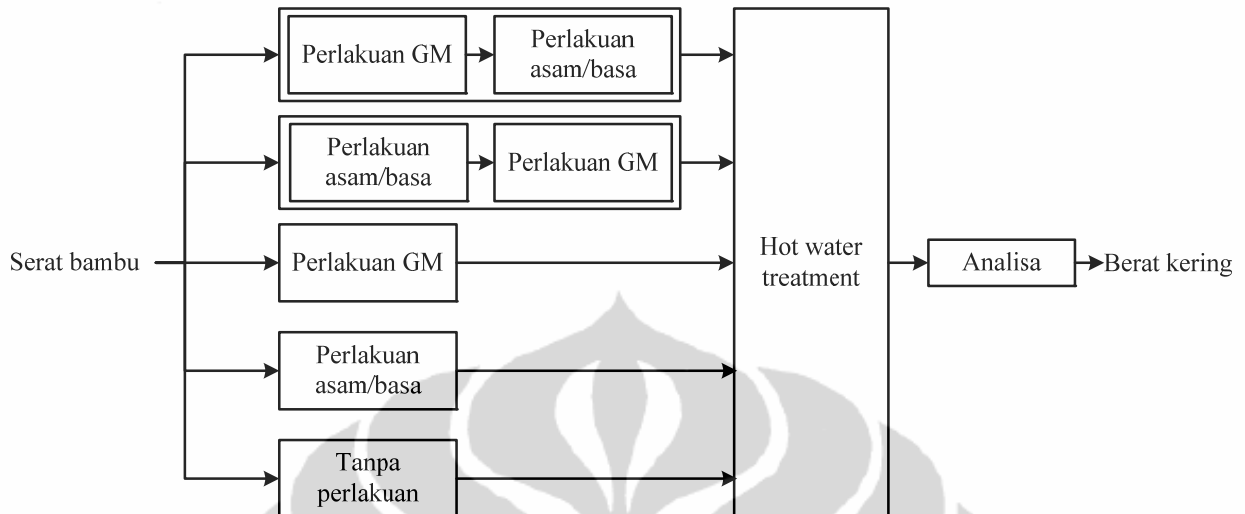
Gambar 3.5 Diagram alir penelitian pengaruh perlakuan GM terhadap gula pereduksi

3.1.2.4 Pengaruh GM terhadap etanol



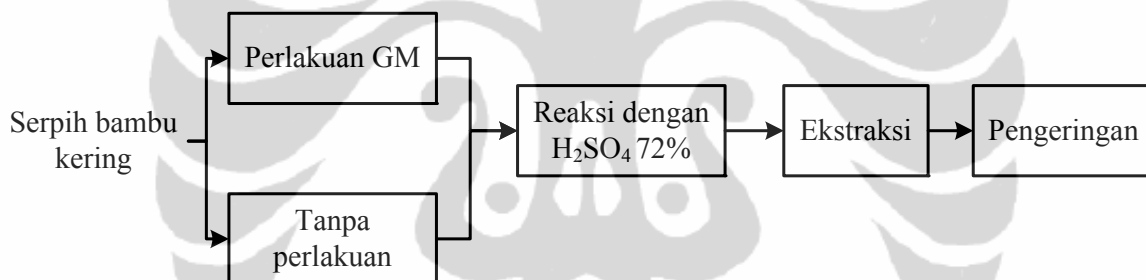
Gambar 3.6 Diagram alir penelitian pengaruh perlakuan GM terhadap etanol

3.1.2.5 Pengaruh asam/ basa terhadap kandungan larut air



Gambar 3.7 Diagram alir penelitian pengaruh asam/basa terhadap gula kandungan larut air

3.1.2.6 Pengaruh GM terhadap lignin



Gambar 3.8 Diagram alir penelitian pengaruh perlakuan GM terhadap lignin

3.2 Variabel penelitian

Variabel bebas:

1. Daya GM: 100, 300, 450, dan 600 watt
2. Waktu perlakuan GM: 5, 10, 15, dan 20 menit
3. Konsentrasi asam/basa: 1, 3, dan 5% v/v

Variabel terikat:

1. Kandungan larut air (% gram/gram)
2. Gula pereduksi (mmol)
3. Etanol (% v/v)

3.3 Prosedur penelitian

Sub bab ini akan menjabarkan langkah-langkah terperinci setiap bagian analisa yang telah disebutkan sebelumnya.

3.3.1 Pengaruh GM terhadap kandungan larut air

10 gram serpih bambu kering dan basah berukuran 2 x 2 x 2 cm ditimbang sebanyak 48 kali. Kemudian pada substrat-substrat tersebut diberikan perlakuan GM pada variasi daya dan waktu paparan dengan masing-masing variasi mendapatkan 3 kali pengulangan. Substrat yang telah di beri perlakuan kemudian direndam dalam air demin dengan perbandingan 2 gram substrat per 5 ml cairan. Substrat kemudian digoyang selama 10 menit dengan kecepatan 30 rpm dan ditiriskan. Substrat padatan kemudian dikeringkan di oven pada temperatur 150 °C hingga mencapai berat konstan.

3.3.2 Pengaruh GM terhadap gula pereduksi

4-5 gram serpih bambu basah diberikan perlakuan GM dengan variasi daya: 300 dan 450 watt serta variasi waktu: 5, 10, 15, dan 20 menit. Substrat yang telah mengalami perlakuan kemudian dilarutkan ke dalam 25 ml air demin dan direbus dalam air mendidih (*hot water treatment*) selama 30 menit. Substrat cair kemudian dipisahkan dari padatannya. Pada substrat cair kemudian dilakukan prosedur analisa gula tereduksi menggunakan metode Somogyi termodifikasi.

3.3.3 Pengaruh GM terhadap hidrolisis enzim

10 gram serpih bambu basah diberikan perlakuan GM dengan daya 300 watt selama 10 menit. Setelah itu substrat kemudian dilarutkan ke dalam 150 ml air demin dan disterilisasi selama 1 jam. Kemudian ke dalam substrat steril yang telah mencapai temperatur ruang ditambahkan enzim cellulase sebanyak 0.008 gram. Reaksi hidrolisis enzim ini berjalan selama 96 jam dengan pengambilan sampel dilakukan tiap 24 jam. Terhadap sampel kemudian dilakukan prosedur analisa gula pereduksi yang langkah-langkahnya akan dijelaskan di sub bab berikutnya. Bersamaan dengan prosedur ini juga dilakukan proses hidrolisis enzim pada substrat bambu yang tidak mengalami perlakuan GM.

3.3.4 Pengaruh GM terhadap etanol

- a. Perlakuan awal

10 gram serpih bambu basah diberikan perlakuan GM dengan daya 300 watt dan variasi waktu: 10 dan 15 menit

b. Pengkondisian substrat

Serpih bambu yang telah dipanaskan kemudian dilarutkan dalam 150 ml air demin pada labu erlenmeyer 250 ml. Kedalam substrat kemudian ditambahkan nutrisi berupa $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, yeast extract dengan rasio masing-masing terhadap volume substrat cair yaitu: 0,05 g/L, 1,0 g/L, dan 2,0 g/L. Pengkondisian selanjutnya adalah pengaturan pH substrat sesuai dengan rentang pH optimum untuk hidrolisis enzim dan fermentasi yaitu 4,5-5,0. Tiap labu erlenmeyer yang berisikan substrat kemudian ditutup dengan kapas dan disterilisasi di pressure cooker selama 1 jam. Setelah sterilisasi selesai, substrat kemudian didinginkan hingga mencapai temperatur ruang.

c. *Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF)*

Ke dalam masing-masing substrat kemudian ditambahkan enzim cellulase dengan perbandingan 0,004 gram/5 gram substrat dan baker's yeast dengan perbandingan 3,3 gram/L substrat. Penambahan enzim dan yeast dilakukan di dalam kotak steril menggunakan prosedur aseptik.

d. Pengambilan sampel

Sampel dari tiap substrat diambil mulai dari jam ke-0 hingga jam ke-96 dan dianalisa menggunakan GC-FID.

3.3.5 Pengaruh GM terhadap lignin

1 gram serpih bambu kering diletakkan di dalam beaker glas 100 ml. Ke dalam wadah tersebut kemudian ditambahkan secara perlahan 15 ml H_2SO_4 72% dingin sambil terus diaduk. Beaker kemudian diletakkan ke dalam penangas air yang suhunya dijaga pada 20 °C. Pengadukan dilakukan secara kontinu dan reaksi berjalan hingga 2 jam. Setelah itu, substrat dipindahkan ke dalam labu bulat 1 L dan larutan diencerkan dengan 560 ml aquadest. Kondenser Allihn dipasangkan pada mulut flask dan rangkaian peralatan ini lalu diletakkan dalam air mendidih selama 4 jam. Setelah selesai, labu bulat kemudian dipindahkan dari air dan didinginkan. Isi labu lalu disaring menggunakan pompa vakum dan padatan yang diperoleh kemudian dikeringkan hingga mencapai berat keringnya.

3.3.6 Pengaruh perlakuan asam/basa terhadap kandungan larut air

10 gram bambu basah ditimbang sebanyak 45 kali. Sebagian substrat direndam dalam HCl atau NaOH dengan perbandingan 1 gram substrat per 2 ml larutan (1%; 3%; dan 5%) selama 30 menit. Sebagian substrat lainnya diberi perlakuan GM dengan daya paparan 300 watt selama 10 menit. Substrat yang telah direndam kemudian ditiriskan dan diberi perlakuan gelombang mikro dengan daya paparan 300 watt selama 10 menit. Substrat yang diberi perlakuan GM kemudian direndam dalam HCl atau NaOH dengan perbandingan 1 gram substrat per 2 ml larutan (1%; 3%; dan 5%) selama 30 menit. Seluruh substrat kemudian direndam dalam air demin selama 3 jam. Substrat kemudian ditiriskan dan dikeringkan di oven pada temperatur 150 °C hingga mencapai berat konstan.

3.4 Bahan dan alat

Bahan baku yang digunakan pada penelitian ini adalah bambu yang diambil dari lingkungan Universitas Indonesia dan Puspiptek LIPI Serpong.

Tabel 3.1 Bahan dan alat

Bahan	Alat
Bambu	Oven GM
H ₂ SO ₄ p.a.	Oven
MgSO ₄ .7H ₂ O p.a.	Erlenmeyer 100 ml
(NH ₄) ₂ SO ₄ p.a.	Gelas ukur 100 ml
Yeast extract	Pipet tetes
Air demin	Spatula
Enzim cellulase	Cawan petri
Baker's yeast (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	Timbangan analitis
Alkohol 70%	Shaker
HCl p.a.	Kotak steril
NaOH p.a.	Bunsen.
	Aluminium foil
	Buret
	Labu bulat
	Penangas air

3.4 Metode Analisa

Etanol adalah produk akhir yang diharapkan terbentuk dari rangkaian penelitian ini. Oleh karena itu, metode analisa yang utama digunakan adalah kromatografi gas untuk mendeteksi keberadaan etanol dalam substrat. Namun demikian, diperlukan metode analisa lain yang bertujuan untuk melihat perubahan-perubahan yang terjadi pada struktur bambu baik fisik maupun kimia sebagai hasil dari pemberian perlakuan-perlakuan tertentu.

3.4.1 Analisa gula pereduksi (*Reducing sugars*)

Gula pereduksi adalah istilah yang diberikan pada monomer-monomer gula seperti glukosa, fruktosa dan maltosa karena dapat mereduksi ion Cu^{2+} menjadi Cu^+ . Metode analisa yang digunakan adalah metode Somogyi yang telah dimodifikasi dengan bahan-bahan yang digunakan ditampilkan melalui Tabel 3.2 berikut.

Tabel 3.2 Bahan-bahan penyusun reagent

	Bahan
Reagent A	Rochelle salt ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)
	Sodium phosphate Dodecahydrate ($\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$)
	Cupric Sulfate Pentahydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
	Potassium Iodate (KIO_3)
Reagent B	Potassium oxalate ($\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)
	Potassium Iodide (KI)
Na-Thiosulfate 0.1 N	Sodium Thiosulfate Pentahydrate ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)
	Sodium Carbonate anhydrous (Na_2CO_3)
Larutan kanji 1%	Tepung kanji

Prosedur pembuatan reagent

1. Reagent A

90 gram Rochelle salt dan 225 gram sodium phosphate dilarutkan dalam 600 ml air demin. Sementara itu, 30 gram $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dan 3.5 gram KIO_3 masing-masing dilarutkan dalam 100 ml air demin. Ketiga larutan yang telah dibuat kemudian dicampurkan ke dalam labu takar 1 L dan larutan diencerkan hingga mencapai 1 L.

2. Reagent B

90 gram $K_2C_2O_4 \cdot H_2O$ dan 40 gram KI dilarutkan ke dalam 1 L air demin.

3. Na-Thiosulfate 0.1 N

24.82 gram $Na_2SO_3 \cdot 5H_2O$ dan 0.2 gram Na_2CO_3 dilarutkan dalam 1 L air demin.

4. Larutan kanji 1%

1 gram kanji dilarutkan dalam air demin yang sedang mendidih. Setelah dilarutkan, larutan dibiarkan mendidih selama 1 menit.

Prosedur analisa

5 ml sampel dan 10 ml reagent A dicampurkan ke dalam erlenmeyer 100 ml, membentuk larutan transparan berwarna biru kehijauan. Larutan kemudian diencerkan hingga 30 ml dan dipanaskan di atas hot plate. Larutan kemudian dibiarkan mendidih selama 3 menit. Setelah pendidihan selesai, larutan sampel harus segera didinginkan menggunakan air yang mengalir. Setelah larutan mencapai temperatur ruang, ke dalam larutan kemudian ditambahkan 10 ml reagent B dan 10 ml HCl 2M hingga terbentuk larutan keruh berwarna coklat tua. Larutan ini kemudian segera dititrasi dengan Na-Thiosulfate 0.1 N hingga membentuk larutan transparan berwarna biru.

Larutan kanji adalah indikator yang digunakan untuk memastikan titrasi telah selesai. Jika saat ditambahkan indikator kanji larutan masih mengalami perubahan warna menjadi biru tua, maka titrasi masih diteruskan hingga tidak lagi terjadi perubahan warna.

Proses analisa gula pada sampel dilengkapi dengan analisa sampel kosong (blanko) yang dilakukan dalam satu waktu rangkaian analisa yang sama. Selisih volume titrasi blanko dan sampel adalah nilai yang digunakan pada penghitungan jumlah gula yang terkandung di dalam sampel.

Metode penghitungan jumlah gula

Selisih titrasi sampel dan blanko oleh Na-thiosulfate adalah nilai yang digunakan untuk menghitung jumlah kandungan gula. Proses analisa gula pereduksi menggunakan beberapa reagent yang telah disebutkan di atas melibatkan beberapa reaksi. Jumlah gula yang berada dalam sampel dapat dihitung dengan menelusuri satu per satu reaksi menggunakan data selisih titrasi antara blanko dan sampel. Reaksi-reaksi yang terjadi pada analisa gula pereduksi akan dipaparkan sebagai berikut.

Tahapan reaksi (Mundur)

Titration with thiosulfateOxidation of I⁻ (which does not react with Cu²⁺) by H⁺Reaction of Cu²⁺ (which does not react with glucose) with I⁻Reaction of Cu²⁺ with glucose**3.4.4 Analisa gula total**

10 gram bambu kering dimasukkan ke dalam labu bulat. Kemudian ke dalam labu tersebut ditambahkan 200 ml air demin dan 20 ml HCl 20%. Labu kemudian disambungkan dengan kondenser reflux dan dipanaskan pada mantel pemanas selama 2,5 jam. Setelah reaksi selesai, labu beserta sampel didinginkan dengan air mengalir. Setelah mencapai temperatur ruang, sampel dinetralkan menggunakan NaOH 20% hingga pH 6-7. Sampel kemudian diencerkan hingga 500 ml dan disaring. Dari filtrat kemudian diambil 100 ml dan diencerkan hingga 250 ml. Terakhir, pada sampel yang telah diencerkan tersebut dilakukan prosedur analisa gula pereduksi menggunakan metode yang telah dijelaskan di atas.

3.4.4 Gas Chromatography FID

Analisa senyawa menggunakan GC-FID adalah metode analisa yang tidak secara langsung memberikan hasil kuantitatif. Alat ini hanya menampilkan perbedaan konsentrasi antara satu senyawa dengan senyawa lainnya melalui perbedaan luas area peak yang diperoleh. Konsentrasi atau kuantitas suatu senyawa dapat diketahui setelah melakukan kalibrasi pada alat menggunakan beberapa larutan standar yang masing-masing konsentrasinya telah diketahui.

3.4.2 Scanning Electron Microscope

Scanning Electron Microscope adalah salah satu tipe mikroskop elektron yang memotret permukaan sampel dengan memindainya menggunakan tembakan elektron berenergi tinggi. Tujuan dari analisa ini adalah untuk melihat perubahan fisik yang terjadi pada struktur bambu setelah diberi perlakuan paparan gelombang mikro dan pengkondisian substrat (sterilisasi pada reaktor bertekanan dengan temperatur ± 120 °C).

