

III METODOLOGI PENELITIAN

Bab ini menguraikan mengenai : (1) Bahan dan Alat Penelitian, (2) Metode Penelitian dan (3) Prosedur Penelitian

1.1. Bahan dan Alat Penelitian

1.1.1. Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan di dalam penelitian ini adalah Jerami Nangka yang didapatkan dari Pasar Induk Caringin Kota Bandung dan biakan kapang *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* yang didapatkan dari labtek XI Sekolah Ilmu dan Teknologi Hayati, Institut Teknologi Bandung. Sedangkan Tween 80 didapatkan dari toko kimia Bratachem Bandung serta alumunium foil dari toko plastik daerah Cibadak Bandung.

Bahan-bahan kimia yang digunakan untuk menunjang proses hidrolisis enzimatik ini yaitu air, NaOH 2%, larutan Nutrisi, larutan Buffer sitrat (pH 4, 5, dan 6), kertas saring, dan aquades yang didapatkan dari laboratorium penelitian Universitas Pasundan.

1.1.2. Alat Penelitian

Alat-alat yang akan digunakan untuk penelitian ini antara lain pengering (*Cabinet dryer*), gunting, penggiling (*chopper*), pengayak (*Vibratory Screen*), seperangkat alat pemanas refluks (Electrothermal Engineering), Erlenmeyer 250 ml merk Iwaki, kawat ose, baskom, pH indikator, kain saring, timbangan digital merk TANITA kapasitas 10 oz, *Autoklaf*, inkubator, sentrifugator PLC series, dan *shaker* (Kotterman 4010).

1.2. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan melalui dua tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian utama.

1.2.1. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk menyiapkan bahan yaitu jerami nangka dan enzim dari kapang *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* sebelum dilakukan proses hidrolisis enzimatis. Penelitian pendahuluan yang dilakukan adalah :

1. Perlakuan awal (*Pretreatment*) terhadap jerami nangka

Tujuan dari *pretreatment* adalah untuk mempermudah proses hidrolisis enzimatis dengan metode fisik dan kimiawi. Proses *pretreatment* ini dilakukan dengan mengeringkan jerami nangka yang telah didapatkan kemudian dilakukan penggilingan dan pengayakan hingga 100 mesh. Bubuk jerami nangka selanjutnya dipanaskan bersamaan dengan NaOH 2% menggunakan refluks selama 6 jam pada suhu 85⁰C, kemudian dikeringkan kembali menggunakan *Cabinet dryer* selama 8 jam pada suhu 105⁰C.

2. Isolasi enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*

Isolasi enzim dilakukan untuk mendapatkan cairan enzim serta untuk mengetahui aktifitas enzim dari kedua mikroorganisme. Isolasi enzim dilakukan dengan cara kapang *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* diinkubasi pada media serbuk jerami nangka hasil *pretreatment* bersama larutan nutrisi selama 8 hari pada suhu 30⁰C. Kemudian cairan enzim

dipisahkan menggunakan sentrifugator sehingga didapatkan cairan enzim kasar dari kapang *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*.

Pengujian yang dilakukan pada penelitian pendahuluan adalah pengukuran aktivitas enzim dilakukan dengan penentuan kadar glukosa menggunakan metode Somogyi Nelson.

1.2.2. Penelitian Utama

Pada penelitian utama ini merupakan penelitian kelanjutan dari penelitian pendahuluan. Dimana setelah didapatkan cairan enzim dari mikroorganisme *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* selanjutnya dilakukan penelitian untuk mengetahui pengaruh nilai pH dan rasio enzim (*Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*) terhadap karakteristik glukosa yang dihasilkan.

1. Rancangan Perlakuan

Rancangan perlakuan pada penelitian utama terdiri dari dua faktor yaitu nilai pH (p), serta rasio enzim dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* (r).

a. Faktor pH (p) terdiri dari 3 taraf, yaitu :

$$p1 = \text{pH } 4$$

$$p2 = \text{pH } 5$$

$$p3 = \text{pH } 6$$

b. Faktor rasio enzim (*Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*) terdiri dari 5 taraf, yaitu :

$$r1 = 0:1$$

$$r2 = 1:0$$

$$r3 = 1:1$$

$$r_4 = 1:2$$

$$r_5 = 2:1$$

2. Rancangan Percobaan

Rancangan percobaan yang akan digunakan dalam penelitian adalah pola faktorial (3x5) dalam Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 2 kali ulangan, sehingga diperoleh sebanyak 30 kombinasi. Adapun variabel yang digunakan adalah nilai pH (P) yang merupakan faktor pertama ($p_1: 4, p_2: 5, p_3: 6$) dan rasio enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* (R) sebagai faktor kedua ($r_1; 0:1, r_2; 1:0, r_3; 1:1, r_4; 1:2, r_5; 2:1$). Model percobaan untuk penelitian ini adalah sebagai berikut:

$$Y_{ijk} = \mu + K_k + P_i + R_j + (PR)_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

Dimana:

k = 1,2,3 (banyaknya ulangan)

Y_{ijk} = Nilai pengamatan untuk taraf ke-i dari faktor pH dan taraf ke-j dari faktor rasio enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* dan ulangan ke-k.

μ = Nilai rata-rata yang sebenarnya.

K_k = Pengaruh kelompok ulangan ke-k.

P_i = Pengaruh aditif dari taraf ke-i faktor P (nilai pH)

R_j = Pengaruh aditif dari taraf ke-j faktor R (rasio enzim (*Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*))

PR_{ij} = Pengaruh dari interaksi antara taraf ke-i faktor P dan taraf ke-j faktor R.

ϵ_{ijk} = Pengaruh galat percobaan.

Tabel 1. Matrik Model Rancangan Acak Kelompok (pola faktorial 3 x 5)

Nilai pH (P)	Rasio Enzim (R)	Ulangan	
		I	II
p ₁ (4)	r ₁ (0:1)	p1r1	p1r1
	r ₂ (1:0)	p1r2	p1r2
	r ₃ (1:1)	p1r3	p1r3
	r ₄ (1:2)	p1r4	p1r4
	r ₅ (2:1)	p1r5	p1r5
p ₂ (5)	r ₁ (0:1)	p2r1	p1r1
	r ₂ (1:0)	p2r2	p1r2
	r ₃ (1:1)	p2r3	p1r3
	r ₄ (1:2)	p2r4	p1r4
	r ₅ (2:1)	p2r5	p1r5
p ₃ (6)	r ₁ (0:1)	p3r1	p1r1
	r ₂ (1:0)	p3r2	p1r2
	r ₃ (1:1)	p3r3	p1r3
	r ₄ (1:2)	p3r4	p1r4
	r ₅ (2:1)	p3r5	p1r5

Berdasarkan rancangan faktorial diatas, denah (*lay out*) rancangan faktorial 3x3 dari 3 ulangan, untuk lebih jelas dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 2. Denah (layout) Rancangan Percobaan Faktorial 3 x 5

Kelompok Ulangan I														
p2r1	p2r3	p1r2	p1r4	p3r3	p3r1	p3r5	p2r2	p2r4	p1r3	p3r4	p2r5	p1r5	p3r2	p1r1
Kelompok Ulangan II														
p2r2	p2r4	p1r5	p1r4	p3r2	p3r5	p3r1	p2r5	p2r1	p1r1	p3r3	p2r3	p1r2	p3r4	p1r3

3.2.3. Rancangan Analisis

Berdasarkan rancangan percobaan diatas, maka dapat dibuat analisis variansi (ANAVA) untuk mendapatkan kesimpulan mengenai pengaruh perlakuan seperti pada Tabel 7.

Tabel 3. Analisis Variansi (ANOVA) Percobaan Faktorial dengan RAK

Sumber Variansi	Derajat Bebas (db)	Jumlah kuadrat (JK)	Kuadrat Tengah (KT)	F Hitung	F Tabel
Kelompok	$r - 1$	JKK	KTK	-	-
Perlakuan	$ab - 1$	JKP	KTP	-	-
Faktor A	$r - 1$	JK(P)	KT(P)	KT(P)/KTG	-
Faktor B	$b - 1$	JK(R)	KT(R)	KT(R)/KTG	-
Interaksi AB	$(a-1)(b-1)$	JK (PxR)	KT(PxR)	KT(PxR)/KTG	-
Galat	$(r-1)(ab-1)$	JKG	KTG	-	-
Total	$rab-1$	JKT	-	-	-

Sumber : Gaspersz, 2005.

Keterangan :

r = replikasi (ulangan)

P = faktor nilai pH

R = faktor rasio enzim selulase (*Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*)

DB = derajat bebas

JK = jumlah kuadrat

KT = kuadrat tengah

Dalam sidik ragam digunakan nilai F hitung untuk menentukan tingkat pengaruh nyata dengan ketentuan sebagai berikut :

1. Hipotesis ditolak, jika $F \text{ hitung} \leq F \text{ tabel}$ pada taraf 5%, apabila nilai pH dan rasio enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* serta interaksinya tidak berpengaruh terhadap karakteristik glukosa, sehingga tidak perlu dilakukan uji lanjut.
2. Hipotesis diterima, jika $F \text{ hitung} > F \text{ tabel}$ pada taraf 5%, apabila nilai pH dan rasio enzim *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* serta interaksinya

berpengaruh terhadap karakteristik glukosa, sehingga perlu dilakukan uji lanjut Duncan untuk melihat perbedaan antar perlakuan dari masing-masing perlakuan pada taraf 5%.

3.2.4. Rancangan Respon

Rancangan respon yang akan dilakukan pada penelitian ini adalah respon kimia, fisik dan organoleptik terhadap glukosa yang dihasilkan dari hidrolisis enzimatis jerami nangka. Respon kimia dari glukosa yang dilakukan meliputi kadar gula pereduksi, kadar air, kadar abu, dan tingkat kemanisan. Respon fisik yang dilakukan adalah perhitungan rendemen dan kestabilan. Sedangkan untuk respon organoleptik yang diujikan adalah uji hedonik terhadap warna dan aroma glukosa.

1.3. Prosedur Penelitian

1.3.1. Prosedur Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mempermudah proses hidrolisis enzimatis dan untuk mendapatkan cairan enzim dari mikroorganisme *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*. Penelitian pendahuluan meliputi proses *pretreatment* (kimia dan fisik), isolasi enzim, dan penentuan waktu hidrolisis. Deskripsi proses penelitian pendahuluan adalah sebagai berikut:

a. Perlakuan awal (*Pretreatment*)

1. Pencucian

Jerami nangka yang didapatkan dilakukan pencucian terlebih dahulu untuk menghilangkan kontaminan yang menempel pada jerami nangka.

2. Blansing

Blansing dilakukan untuk melunakkan jaringan bahan, menonaktifkan enzim dan menghilangkan kandungan getah dalam jerami nangka. Blansing dilakukan selama 10 menit dalam suhu 75⁰C.

3. Pengeringan

Jerami nangka yang telah dicuci kemudian dikeringkan menggunakan *cabinet dryer* untuk mengurangi kadar air jerami nangka

4. Pemotongan

Jerami nangka yang telah dikeringkan kemudian dilakukan pengecilan ukuran menggunakan gunting untuk memudahkan pada proses penggilingan

5. Penggilingan

Proses penggilingan dengan *chopper* dilakukan bertujuan untuk memperbesar luas permukaan jerami nangka sehingga lebih mudah diuraikan oleh enzim mikroorganismenya.

6. Pengayakan

Serbuk jerami nangka kemudian diayak menggunakan *vibratory screen* untuk mendapatkan ukuran serbuk jerami yang diinginkan yaitu 100 mesh, dengan ukuran tersebut akan mempercepat dekomposisi lignoselulosa dan penguraian oleh mikroorganismenya.

7. Pemanasan (refluks)

Serbuk jerami nangka yang sudah diayak dengan ukuran 100 mesh kemudian dipanaskan menggunakan refluks bersama dengan NaOH 2%

selama 6 jam dalam suhu 85⁰C untuk membantu proses penguraian lignoselulosa, membuka ikatan struktur selulosa, menghilangkan lignin dan getah dari jerami angka yang akan mempermudah enzim dalam menghidrolisis

8. Pencucian

Ampas serbuk jerami angka kemudian dicuci untuk menghilangkan sisa NaOH 2% dengan dibilas menggunakan air dan aquades

9. Tes pH

Tes pH dilakukan hingga didapat pH netral untuk memastikan kandungan NaOH tidak terkandung lagi dalam ampas serbuk jerami angka

10. Penyaringan

Ampas serbuk jerami angka disaring menggunakan kain saring untuk menghilangkan sebagian kandungan air sebelum dilakukan proses pengeringan kembali

11. Pengeringan

Ampas serbuk jerami angka di keringkan dengan *Cabinet dryer* pada suhu 105⁰C selama 8 jam untuk menguapkan seluruh kandungan air dari serbuk jerami angka dan mengkatalis dekomposisi hemiselulosa serta melepaskan selulosa

b. Pendahuluan (Isolasi Enzim)

1. Penimbangan

Serbuk jerami nangka hasil *pretreatment* ditimbang dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer

2. Pencampuran

Serbuk jerami nangka dalam Erlenmeyer ditambahkan dengan larutan nutrisi sebanyak 25 ml sebagai penunjang pertumbuhan dari kapang *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger*

3. Sterilisasi

Sterilisasi dilakukan untuk mensterilkan media dan membunuh mikroorganisme patogen yang dapat menghambat proses hidrolisis enzimatik, dimana sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf selama 121⁰C selama 15 menit dalam tekanan 2 atm.

4. Pendinginan

Pendinginan di suhu ruang setelah proses sterilisasi dilakukan untuk menyesuaikan kembali suhu setelah sterilisasi sebelum dilakukan inokulasi kapang *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* karena proses hidrolisis enzimatik tidak dapat berlangsung pada suhu terlalu tinggi.

5. Inokulasi

Kapang *Trichoderma reesei* atau *Aspergillus niger* yang sebelumnya telah disuspensikan pada larutan Tween 80 1% sebanyak 100 ml, kemudian dimasukkan kedalam erlenmeyer yang telah didinginkan di suhu ruang

6. Inkubasi

Proses inkubasi dilakukan agar kapang *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* dapat menghidrolisis selulosa dari serbuk jerami nangka sehingga didapatkan enzim selulase yang diperlukan untuk proses penelitian utama. Inkubasi dilakukan di incubator secara aerob selama 8 hari pada suhu 30⁰C

7. Pengujian aktivitas enzim

Pengujian aktivitas enzim dilakukan setiap 24 jam selama masa inkubasi 8 hari.

8. Pemisahan

Proses pemisahan dilakukan menggunakan alat sentrifugator untuk memperoleh enzim hasil hidrolisis enzimatik oleh kapang *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* dengan penambahan larutan surfaktan Tween 80 1% sebanyak 100 ml dengan kecepatan 4000 rpm selama 30 menit.

c. Pendahuluan (Penentuan waktu hidrolisis)

1. Penimbangan

Serbuk jerami nangka hasil *pretreatment* ditimbang dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer dan dilakukan pengujian glukosa secara kualitatif dengan menggunakan uji Barfoed

2. Pengkondisian

Pengkondisian dilakukan dengan menambahkan larutan buffer hingga didapatkan pH 5 untuk mempercepat berlangsungnya proses hidrolisis.

3. Inokulasi

Media yang telah dikondisikan kemudian dicampurkan dengan enzim dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* dengan rasio volume sesuai perlakuan 1:1 untuk diketahui pengaruhnya terhadap karakteristik glukosa yang dihasilkan

4. Inkubasi

Proses inkubasi dilakukan menggunakan inkubator dan *shaker* dengan suhu 50⁰C selama 48 jam dengan kecepatan 75 rpm untuk menghasilkan glukosa dari hasil hidrolisis enzimatik terhadap jerami nangka

5. Pengecekan kadar gula pereduksi total

Pengecekan kadar gula pereduksi total dilakukan tiap jam selama masa inkubasi 12 jam untuk mengetahui waktu inkubasi yang tepat pada penelitian utama (hidrolisis enzimatik).

1.3.2. Prosedur Penelitian Utama

Penelitian utama dilakukan untuk mengetahui pengaruh nilai pH dan rasio enzim dari kapang *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* yang digunakan serta interaksinya terhadap karakteristik glukosa yang dihasilkan. Deskripsi proses penelitian utama adalah sebagai berikut:

1. Penimbangan

Serbuk jerami nangka hasil *pretreatment* ditimbang sebanyak 10 gram untuk tiap perlakuan ke dalam Erlenmeyer 250 ml untuk selanjutnya dilakukan proses hidrolisis enzimatik

2. Pengkondisian

Pengkondisian dilakukan dengan menambahkan larutan buffer hingga didapat beberapa nilai pH yang berbeda (pH 4, 5, dan 6) untuk mempercepat berlangsungnya proses hidrolisis dan mengetahui pengaruh perbedaan nilai pH terhadap karakteristik glukosa yang dihasilkan

3. Inokulasi

Media yang telah dikondisikan kemudian dicampurkan dengan enzim dari *Trichoderma reesei* dan *Aspergillus niger* dengan rasio volume sesuai perlakuan (1:2, 0:1 1:1, 1:0, 2:1) untuk diketahui pengaruhnya terhadap karakteristik glukosa yang dihasilkan

4. Inkubasi

Proses inkubasi dilakukan menggunakan inkubator dan *shaker* dengan suhu terpilih selama 48 jam dengan kecepatan 75 rpm untuk menghasilkan glukosa dari hasil hidrolisis enzimatik terhadap jerami nangka

5. Pemisahan

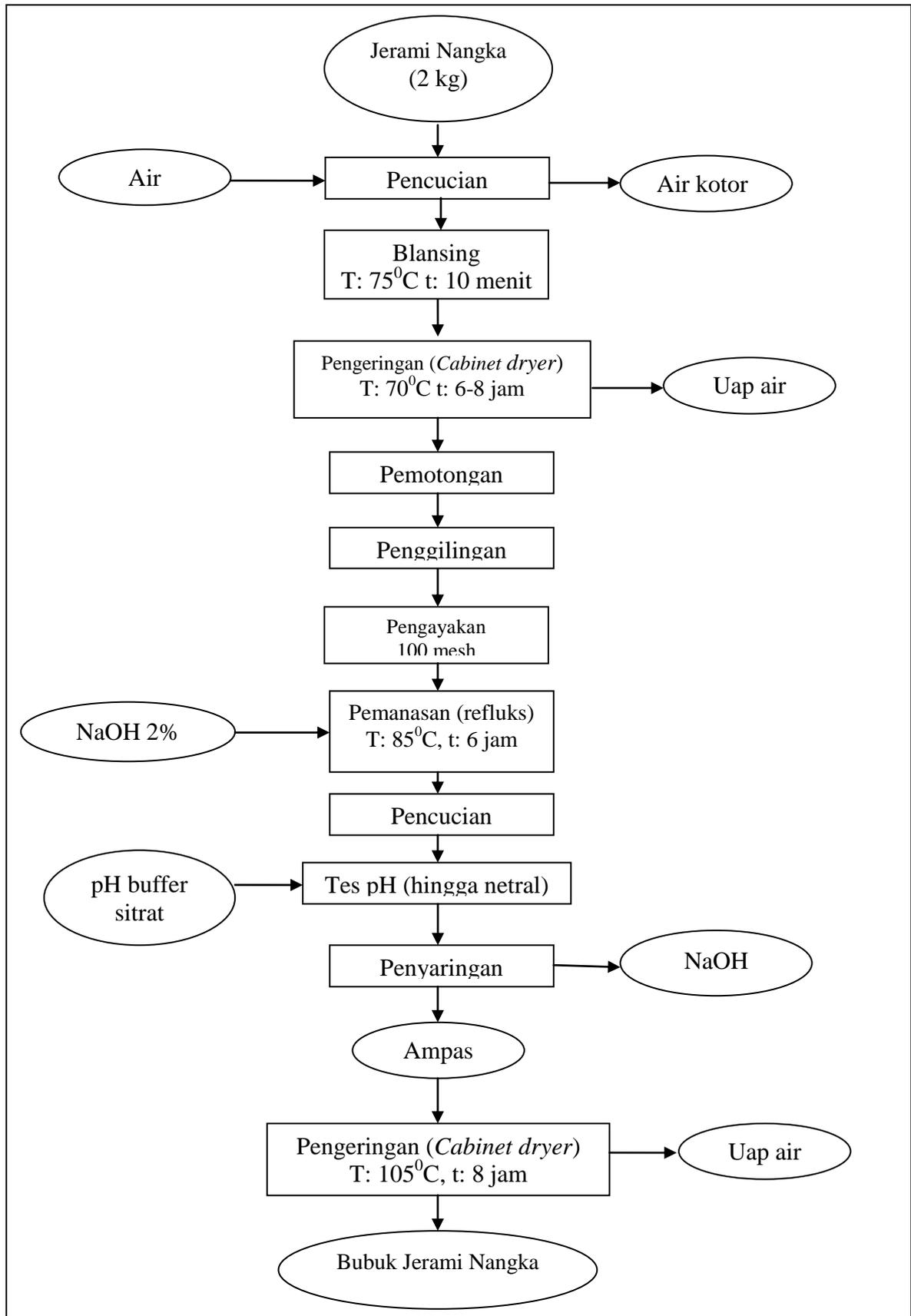
Pemisahan dilakukan untuk memisahkan larutan glukosa dengan endapannya sehingga didapatkan larutan glukosa yang lebih murni.

6. Pemurnian

Pemurnian menggunakan resin penukar ion dilakukan bertujuan untuk menghilangkan kandungan buffer sitrat dalam glukosa

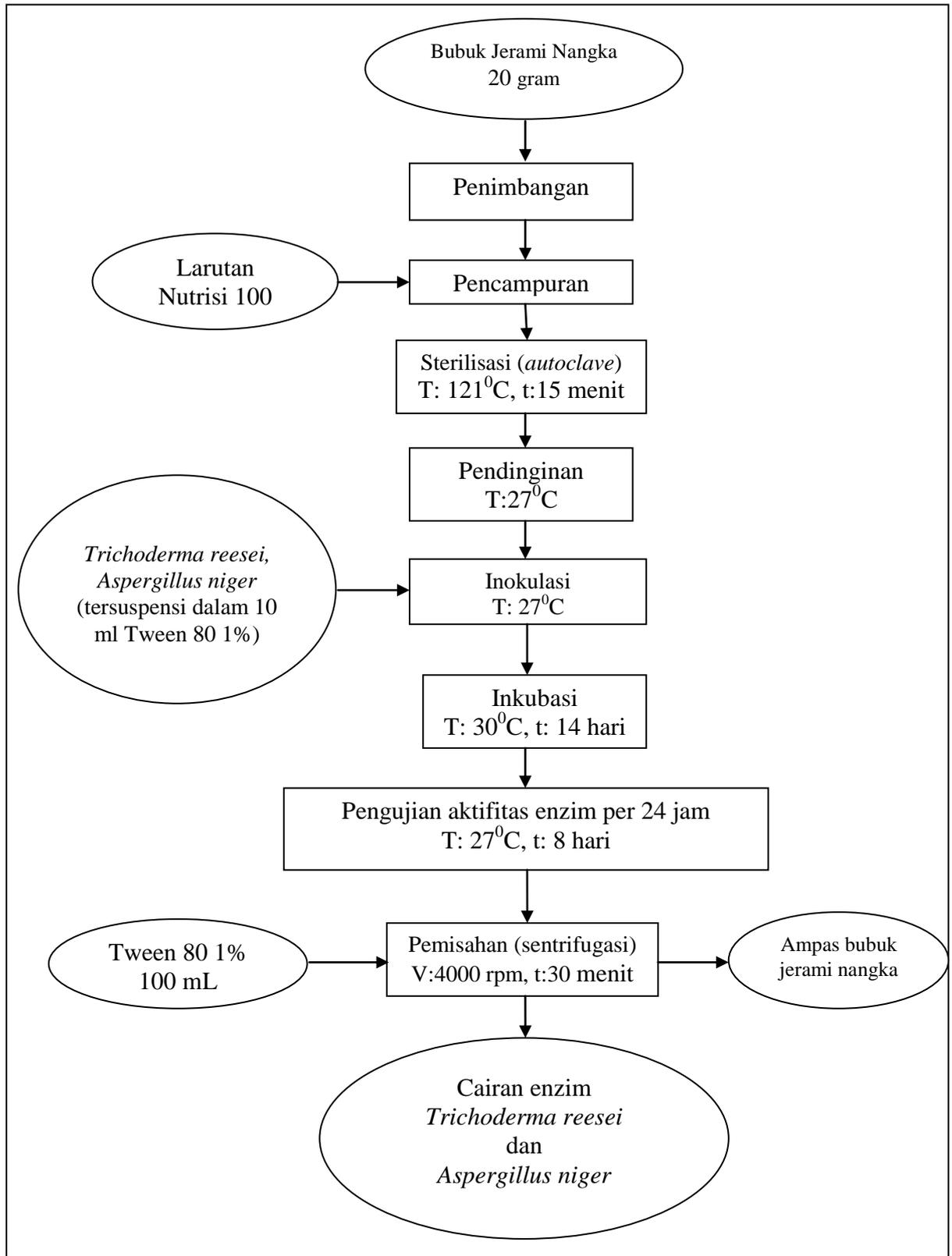
7. Pemekatan

Pemekatan dilakukan menggunakan evaporator hingga didapatkan kekentalan glukosa yang diinginkan selama 10 menit pada suhu 80°C.



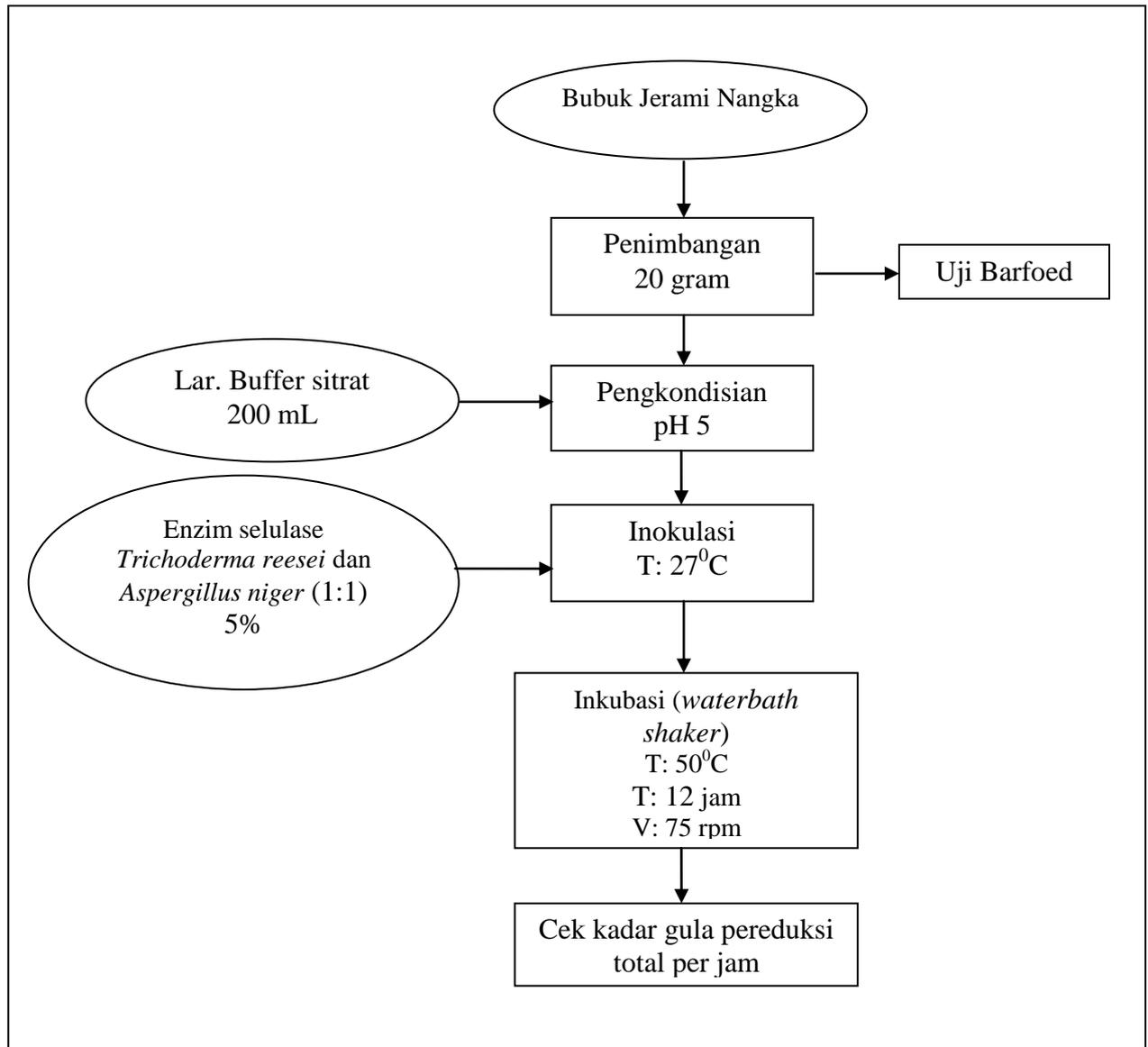
Gambar 1. Diagram Alir Penelitian Pendahuluan (*Preatreatment*)

(Sumber: Modifikasi dari Anwar N., dkk., 2010)



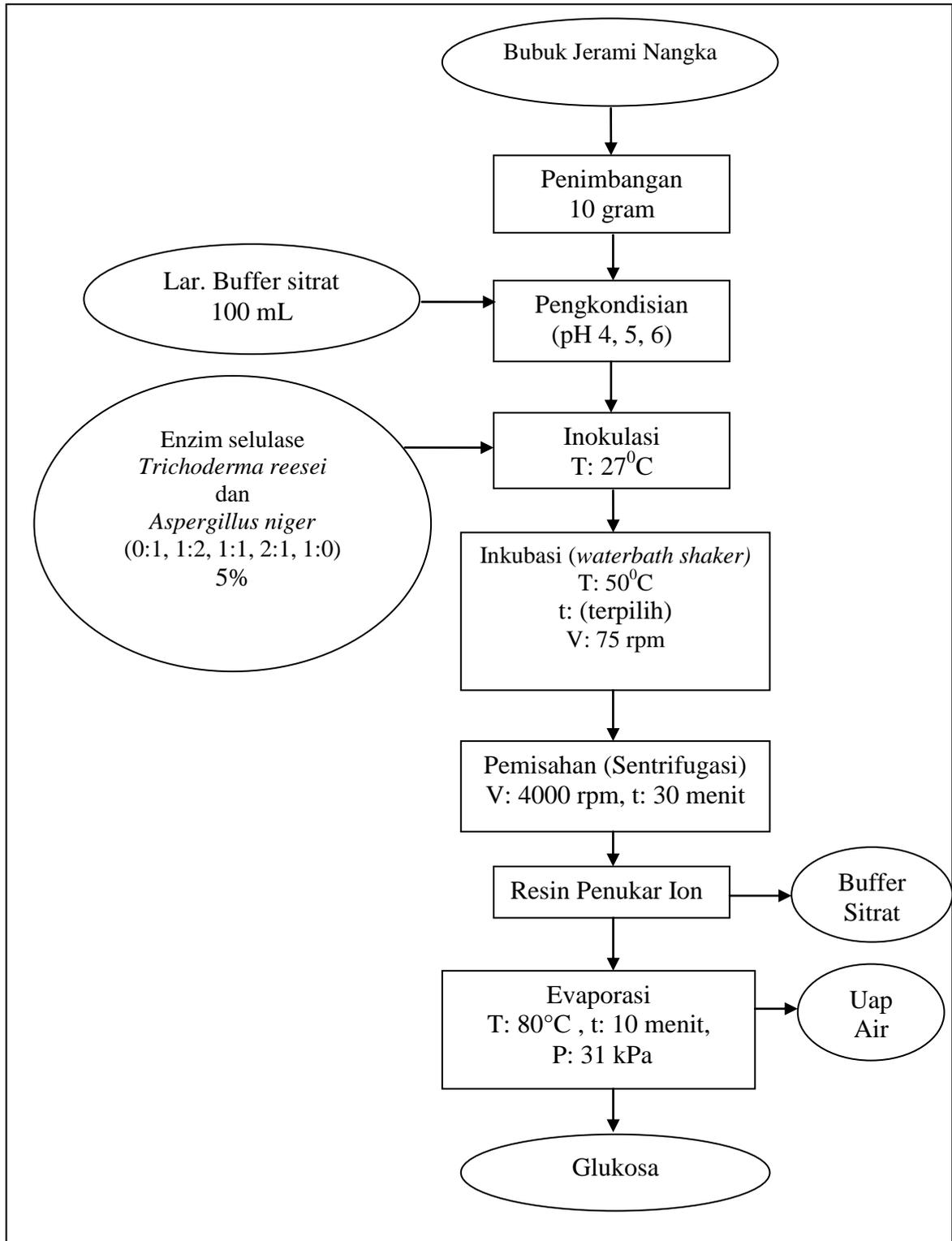
Gambar 2. Diagram Alir Penelitian Pendahuluan (Isolasi Enzim)

(Sumber: Modifikasi dari Oktavia, F. I., dkk., 2014)



Gambar 3. Diagram Alir Penelitian Pendahuluan (Penetapan Waktu Hidrolisis)

(Sumber: Modifikasi dari Oktavia, F. I., dkk., 2014)



Gambar 4. Diagram alir penelitian utama (Hidrolisis Enzimatik)

(Sumber: Modifikasi dari Oktavia, F. I., dkk., 2014)

