

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan bersifat eksperimen karena dalam penelitian ini terdapat kontrol sebagai acuan antara keadaan awal dengan sesudah diberi perlakuan, juga adanya replikasi dan randomisasi untuk meyakinkan hasil yang diperoleh (Nazir, 2003: 88)

B. Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor lingkungan relatif homogen. Penelitian ini menggunakan sari sampah sebagai medium fermentasi. Untuk perlakuan perbedaan konsentrasi inokulum pada pra-penelitian dan penelitian utama dilakukan dengan empat perlakuan kombinasi dengan lima replikasi (Gomez, 1995).

Penelitian dilakukan dalam dua tahap yaitu pra-penelitian dan penelitian utama. Tahap pra-penelitian dilakukan untuk mengetahui konsentrasi *T. viride* yang menghasilkan gula terbanyak. Variasi konsentrasi inokulum *T. viride* yang digunakan yaitu 0%, 5%, 10% dan 15% (v/v) (modifikasi Kamara *et al.*, 2007). Selanjutnya tahap penelitian utama yang meliputi tahap *pretreatment* yakni pemberian konsentrasi inokulum *T. viride* terbaik berdasarkan hasil pra-penelitian kemudian *treatment* yaitu fermentasi alkohol oleh *S. cerevisiae* menggunakan substrat dari hasil *pretraetment*.

Variasi konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* yang digunakan yaitu 0%, 3%, 5% dan 7% (v/v) (Casmini, 2004).

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah semua sampah sayur dan buah yang berasal dari pasar Ciroyom Bandung, sedangkan yang dijadikan sampel adalah sari sampah sayur dan buah yang digunakan dalam proses fermentasi.

D. Lokasi dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Riset Biologi Sementara dan Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Jurusan Pendidikan Biologi FPMIPA UPI Jalan Dr. Setiabudhi No.229 Bandung. Penelitian dilakukan dari bulan April sampai bulan Juni 2010.

E. Alat dan Bahan Penelitian

Tabel 3.1. Alat-alat Penelitian

| No | Alat-alat | Spesifikasi | Jumlah |
|-----|---------------------------------|------------------------------|-----------|
| 1. | Autoclave | EYELA model HL36AE | Satu unit |
| 2. | Destilator | Merk SIBATA | Satu unit |
| 3. | Inkubator | Gallenkamp Cooled Inkubator | Satu unit |
| 4. | Spectrofotometer | Milton Rey Spectronic 20 D | Satu unit |
| 5. | Lemari es | National | Satu unit |
| 7. | Timbangan analitik | AND HF-300 | Satu unit |
| 8. | Makropipet 2 ml | | Satu unit |
| 9. | Mikropipet 1000 μ l | | Satu unit |
| 10. | Magnetic stirrer with hot plate | Eyela magnetic stirrer RCH-3 | Satu unit |
| 11. | Shaker | EYELA model multi shaker MMS | Satu unit |

| No | Alat-alat | Spesifikasi | Jumlah |
|-----|---------------------------------------|--------------------------------|-------------|
| 12. | Buret dan Statif | - | Satu buah |
| 13. | pH indikator | | Secukupnya |
| 14. | Termometer | - | Satu buah |
| 15. | Transfer Box | - | Satu unit |
| 16. | Pipet tetes dan volume | - | Enam buah |
| 17. | Vortex mixer | SIBATA TTM-1 | Satu unit |
| 18. | Botol Fermentasi | - | 50 buah |
| 19. | Labu Erlenmeyer 100 ml, 250ml, 500 ml | Merek Pyrex | 20 buah |
| 20. | Gelas ukur | 25 ml, 100 ml, 500 ml, 1000 ml | @ Satu buah |
| 21. | Gelas kimia | 100 ml, 500 ml, 1000 ml | @ Satu buah |
| 20. | Tabung reaksi | Pyrex 16 ml | 60 buah |
| 21. | Cuvete | - | Dua buah |
| 22. | Panci, lap, pisau | - | @ Satu buah |
| 23. | Inkubator | 30°C | Satu unit |
| 24. | Ember | - | Lima buah |
| 25. | Kain penyaring | - | Lima buah |
| 27. | Kompor gas | - | Satu unit |
| 28. | Kelereng | - | 50 butir |
| 29. | Lampu spirtus | - | Dua buah |
| 30. | Jarum ose | - | Dua buah |

Tabel 3.2. Bahan-bahan Penelitian

| No | Bahan – bahan | Spesifikasi | Jumlah |
|-----|----------------------------------------------|--------------|------------|
| 1. | Sampah organik | - | 20 kg |
| 2. | Kultur murni <i>Trichoderma viride</i> | Isolat murni | 1 tabung |
| 3. | Kultur murni <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | Isolat murni | 1 tabung |
| 4. | Urea | - | 5 gram |
| 5. | Petis udang | - | Secukupnya |
| 6. | Aquades | Medilabs | 5 liter |
| 7. | Gula pasir | - | 200 gram |
| 8. | NaOH 1 M | PA | 18 liter |
| 9. | Alkohol 96% | PA | 100 ml |
| 10. | Phenolftalein 1% | PA | 200 ml |
| 11. | Anhidrat asetat | PA | 4 liter |
| 12. | Reagen Somogyi I | PA | 4 liter |
| 13. | Reagen Somogyi II | PA | 4 liter |
| 14. | Reagen Nelson | PA | 4 liter |

| No | Bahan – bahan | Spesifikasi | Jumlah |
|-----|--------------------|-------------|--------------|
| 15. | Medium Mandels | - | 4 liter |
| 16. | Spirtus | - | 500 ml |
| 17. | Aluminium foil | - | Secukupnya |
| 18. | Plastik anti panas | Diamond | Satu pak |
| 19. | Tissue gulung | Multi | 8 buah |
| 20. | Kain kassa | - | Satu gulung |
| 21. | Karet | - | Satu bungkus |

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap persiapan

a. Pembuatan Media

Media yang digunakan untuk menumbuhkan dan memelihara *Trichoderma viride* dan *Saccharomyces cerevisiae* adalah medium PDA (*Potato Dextrose Agar*). Terdapat dua macam media yaitu medium padat (PDA) dan media cair (Mandels dan YEPDB).

1) Medium Agar Miring

Trichoderma viride dan *Saccharomyces cerevisiae* yang akan digunakan dalam penelitian ditumbuhkan dalam medium agar miring. Medium agar miring yang digunakan adalah medium PDA (*Potato Dextrose Agar*) yang dibuat dengan cara sebagai berikut: 100 ml aquades dipanaskan hingga mendidih. Kemudian ditambahkan 3,9 gram PDA instan sedikit demi sedikit dan aduk hingga larut. Dalam keadaan panas, sebanyak 5 ml dituang ke dalam masing-masing tabung reaksi, kemudian

ditutup dengan sumbat kapas lalu disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 lbs, suhu 121° C selama 15 menit.

2) Medium Aktivasi

Sebelum dimasukkan ke dalam medium fermentasi, inokulum *T. viride* dan *S. cerevisiae* diaktivasi terlebih dahulu. Medium aktivasi yang digunakan untuk aktivasi *T. viride* adalah Medium Mandels, sedangkan medium aktiasi untuk aktivasi *S. cerevisiae* adalah medium PDB. Medium Mandels biasa digunakan untuk produksi enzim selulase. Tabel 3.3 adalah tabel komposisi medium Mandels hasil modifikasi berdasarkan penelitian menggunakan *T. viride* untuk produksi enzim selulase (Linda, 2007).

Tabel 3.3 Komposisi medium aktivasi Mandels

| Komposisi | Berat (g/L) |
|-------------------------------------------------|-------------|
| CaCl ₂ .2H ₂ O | 0,4 |
| KH ₂ PO ₄ | 2,0 |
| MgSO ₄ | 0,6 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 4,0 |
| Urea | 0,3 |
| Petis udang losari | 5,0 |
| Trace Element (1 ml/liter) | |
| CaCl ₂ | 20 |
| FeSO ₄ .7H ₂ O | 5,0 |
| MnSO ₄ | 1,6 |
| ZnSO ₄ | 1,4 |

Medium aktivasi yang digunakan untuk aktivasi *S. cerevisiae* adalah YEPDB (*Yeast Extract Pepton Dextrose Broth*). Medium YEPDB dibuat dengan cara sebagai berikut: 0,5 gram ekstrak ragi, 1 gram pepton

dilarutkan dalam 100 ml aquades, kemudian dipanaskan hingga mendidih dan aduk hingga larut. Setelah mendidih, ditambahkan 2 gram glukosa dan aduk hingga larut lalu masukkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditutup dengan sumbat kapas. Selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 lbs, suhu 121° C selama 15 menit.

3) Medium Fermentasi

Medium fermentasi yang digunakan pada proses fermentasi merupakan medium yang terbuat dari sari sampah organik berupa kol, sawi dan wortel serta tomat dengan perbandingan 1:1:1:1 yang telah dipanaskan yang didapat dari hasil *pretreatment*.

b. Pembuatan Kurva Baku Glukosa

Sebelum dilakukan analisis kadar gula pereduksi pada sampel, terlebih dahulu dibuat kurva baku glukosa. Kurva baku glukosa menyatakan hubungan antara konsentrasi glukosa dengan kerapatan optik (panjang gelombang 520 nm). Kurva ini dibuat untuk menentukan harga konsentrasi larutan glukosa dengan pengukuran transmisi cahaya menggunakan spektrofotometer dengan metode Somogyi-Nelson (Kusnadi, 2001: 40).

Pembuatan kurva baku glukosa dimulai dengan menimbang glukosa murni sebanyak 200 mg dan dilarutkan dalam 1000 ml aquades dan dikocok sampai homogen. Dengan mikropipet larutan tersebut diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml; 0,8 ml; 1,0 ml; 1,2 ml; 1,4 ml; 1,6 ml; 1,8 ml dan 2,0 ml. Selanjutnya

ke dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan aquades masing-masing sebanyak 1,8 ml; 1,6 ml; 1,4 ml; 1,2 ml; 1,0 ml; 0,8 ml; 0,6 ml; 0,4 ml; 0,2 ml; dan 0 ml sehingga volume masing-masing tabung 2 ml. Maka pada masing-masing tabung diperoleh konsentrasi glukosa 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 mg/ml.

Ditambahkan larutan Somogyi I sebanyak 1,6 ml dan Somogyi II sebanyak 0,4 ml ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah berisi larutan glukosa. Larutan tersebut dikocok dan ditutup dengan kelereng. Kemudian dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 10 menit, lalu diangkat dan didinginkan dalam penangas es sampai mencapai suhu $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Kemudian ditambahkan 2 ml larutan Nelson dan 4 ml aquades, maka volume total adalah 10 ml. Tabung reaksi ditutup dengan ibu jari dan dikocok dengan baik dan kuat, hingga gas CO_2 tidak keluar lagi. Masing-masing larutan diukur *optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Nilai absorbansi dari kadar glukosa standar dibuat dengan grafik linier, kemudian kurva baku glukosa dapat dibuat dan diperoleh persamaan yang akan digunakan dalam penentuan kadar gula pereduksi dari sampel.

c. Pembuatan Titrasi Alkohol Standar

Kadar alkohol pada sampel ditentukan dengan cara titrasi asam basa. Untuk mengetahui kadar alkohol pada sampel terlebih dahulu dibuat kurva standar alkohol yang menyatakan hubungan antara kebutuhan NaOH sebagai

sebagai sumbu x dan kadar alkohol sebagai sumbu y. Prosedur titrasi yang dilakukan mengikuti Hidayat (1995: 44) yang dimodifikasi sebagai berikut:

1) Pembuatan Larutan Blanko

Satu ml aquades dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dimasukkan 1 ml asam anhidrida asetat dan 2 tetes phenolftalein. Selanjutnya NaOH 1 M dari buret diteteskan secara hati-hati ke dalam erlenmeyer tersebut sambil digoyang-goyangkan sampai warnanya berubah (dari tidak berwarna menjadi warna merah muda). Kemudian dicatat kedudukan skala pada buret.

2) Pengujian Larutan Alkohol Standar

Satu ml larutan alkohol standar (1-10%) dimasukkan ke dalam erlenmeyer kemudian ditambahkan 1 ml asam anhidrida asetat dan 2 tetes phenolftalein. Sambil digoyang-goyangkan, ke dalam erlenmeyer tersebut ditambahkan NaOH 1 M sampai terjadi perubahan warna (dari tidak berwarna menjadi warna merah muda). Kemudian dicatat kedudukan skala pada buret.

2. Tahap Penelitian

a. Pembuatan Inokulum

Inokulum *T.viride* yang diinokulasikan ke dalam medium bubuk sampah adalah inokulum hasil aktivasi pada jam ke-48 berdasarkan hasil kurva tumbuh dengan jumlah sel/ml-nya adalah 0,0049 mg/mL (Linda, 2007), sedangkan inokulum *S.cerevisiae* yang diinokulasikan ke dalam

medium fermentasi sari sampah adalah inokulum hasil aktivasi kedua pada jam ke-6 berdasarkan hasil kurva tumbuh dengan jumlah sel/ml-nya adalah $8,1 \times 10^7$ sel/ml (Hendrawati, 2009).

b. Pra-penelitian

1) Aktivasi *Trichoderma viride*

Langkah kerja yang pertama dilakukan adalah menyiapkan tabung isolat murni *T. viride* yang telah ditumbuhkan dalam PDA miring selama lima hari. Sebanyak 5 ml medium aktivasi kemudian dimasukkan ke dalam tabung isolat *T. viride* lalu dikocok menggunakan *vortek mixer* selama satu menit agar spora terlepas. Kemudian dimasukkan ke dalam tabung erlenmeyer berisi 25 ml medium aktivasi untuk membuat kultur inokulum. Kultur inokulum ini selanjutnya dikultivasi pada *rotary shaker* dengan kecepatan 120 rpm dan lamanya waktu kultivasi ditentukan berdasarkan data optimasi umur optimum (Linda, 2007:31)

2) Degradasi enzimatik oleh *T. viride*

Merupakan tahap perlakuan pemberian berbagai konsentrasi *T. viride* pada bubur sampah organik. Pada tahap ini digunakan masing-masing 20 ml sampah sayuran dan buah-buahan yang telah dihancurkan sebelumnya untuk tiap perlakuan. Bubur sampah tersebut dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer kecil ukuran 50 ml yang telah berisi larutan fermentasi Mandels. Setelah diberikan

medium fermentasi kemudian dimasukan inokulum *T.viride* sebanyak 0%, 5%, 10%, dan 15% (v/v) yang telah diaktivasi sebelumnya kedalam erlenmeyer tersebut (Kamara *et al.*, 2007). Optimasi suhu dilakukan pada inkubator 30°C. Pengambilan sampel dilakukan setiap hari selama 9 hari. Analisis yang dilakukan adalah pengukuran kadar gula pereduksi.

c. *Pretreatment* Biologis

Langkah pertama yang dilakukan pada proses ini adalah pengumpulan sampah organik yang selanjutnya dihancurkan sampai menjadi bubur. Bubur sampah yang didapat kemudian ditambahkan konsentrasi inokulum *T. viride* sebanyak 10% (v/v) dan disimpan selama 4 hari, berdasarkan hasil pra-penelitian yang dilakukan. Setelah tahap tersebut dilakukan, bubur sampah yang telah diberi perlakuan dipanaskan selama 30 menit. Kemudian bubur sampah disaring sebanyak dua kali sehingga dihasilkan sari sampah yang telah diberi *pretreatment*. Sari sampah kemudian dipanaskan untuk mensterilkannya dari mikroorganisme yang tidak diharapkan dalam proses fermentasi.

d. Fermentasi Alkohol

1) Penambahan gula awal

Setelah disiapkan masing-masing 100 ml medium fermentasi sari sampah pada 20 botol fermentor, selanjutnya ditambahkan gula awal sebagai prekursor pertumbuhan *S. cerevisiae*. Berdasarkan uji

pendahuluan yang dilakukan, konsentrasi gula awal yang ditambahkan ke dalam medium fermentasi adalah sebanyak 5% (Anggara, 2010). Penambahan gula awal sebelum proses fermentasi bertujuan untuk menghasilkan biomassa sel yang optimum dalam mengubah substrat pada awal fermentasi dan untuk mempersingkat masa adaptasi mikroorganisme dalam medium kompleks karena mikroba belum dapat mendapatkan energi langsung dari substrat baru (Away, 1989: 22). Selain itu sebelum proses fermentasi dimulai, terlebih dahulu dilakukan penyesuaian pH awal. pH awal yang digunakan untuk fermentasi ini adalah 5. pH awal ini disesuaikan agar proses fermentasi dapat terjadi lebih optimum, hal ini berdasarkan pertimbangan mikroba yang terlibat pada kultur yang digunakan, membutuhkan pH optimum 5 untuk pertumbuhannya.

2) Penambahan inokulum *S. cerevisiae*

Penambahan konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* sebanyak 0%, 3%, 5 %, dan 7 % (Casmimi, 2004: 33) dengan lima kali pengulangan untuk tiap konsentrasi. Optimasi suhu dilakukan pada inkubator 30°C. Pengambilan sampel pada hari ke 0, 2, 4, dan 6. Dilakukan pengukuran kadar alkohol, glukosa, dan pH.

e. Fermentasi Skala Pilot

Setelah didapatkan hasil konsentrasi inokulum dan lamanya waktu fermentasi yang menghasilkan kadar alkohol tertinggi, dilakukan

fermentasi lanjutan yang dibuat dalam skala pilot. Berdasarkan hasil penelitian utama, alkohol paling tinggi dihasilkan oleh penambahan inokulum *S. cerevisiae* sebanyak 3% dengan waktu fermentasi selama dua hari. Substrat dengan penambahan inokulum *S. cerevisiae* 3% dibuat masing-masing 1 liter dengan pengulangan sebanyak dua kali (duplo) dan difermentasi selama dua hari pada suhu 30°C.

f. Analisis Sampel

1) Analisis Kadar Gula

Kadar gula pereduksi dalam sampel diukur dengan metode Somogyi-Nelson. Sebanyak 2 ml sampel diambil kemudian ditambahkan reagen Somogyi-Nelson (pengerjaan sesuai dengan pembuatan kurva baku glukosa). Pengukuran dilakukan menggunakan spektrofotometer. Nilai absorbansi sampel dikonversikan ke dalam persamaan pada kurva baku glukosa sehingga didapatkan kadar gula pereduksi dari sampel.

2) Analisis pH

Analisis pH pada hasil fermentasi alkohol dari sari sampah organik menggunakan pH indikator.

3) Analisis Kadar Alkohol

Pengambilan sampel dilakukan pada hari ke-0,2,4, dan 6. Sebanyak 1 ml sampel diambil dan dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer. Ditambahkan 1 ml anhidrat asetat dan 2 tetes

phenolftalein. Selanjutnya NaOH 1 M dari buret diteteskan secara hati-hati ke dalam labu erlenmeyer tersebut sambil digoyang-goyangkan sampai warnanya berubah (dari tidak berwarna menjadi warna merah muda). Kemudian kedudukan skala pada buret dicatat. Kadar alkohol pada sampel ditentukan dengan cara membandingkan NaOH yang dibutuhkan pada titrasi sampel dengan NaOH yang dibutuhkan pada alkohol standar. Prosedur titrasi yang dilakukan mengikuti Hidayat (1995: 44).

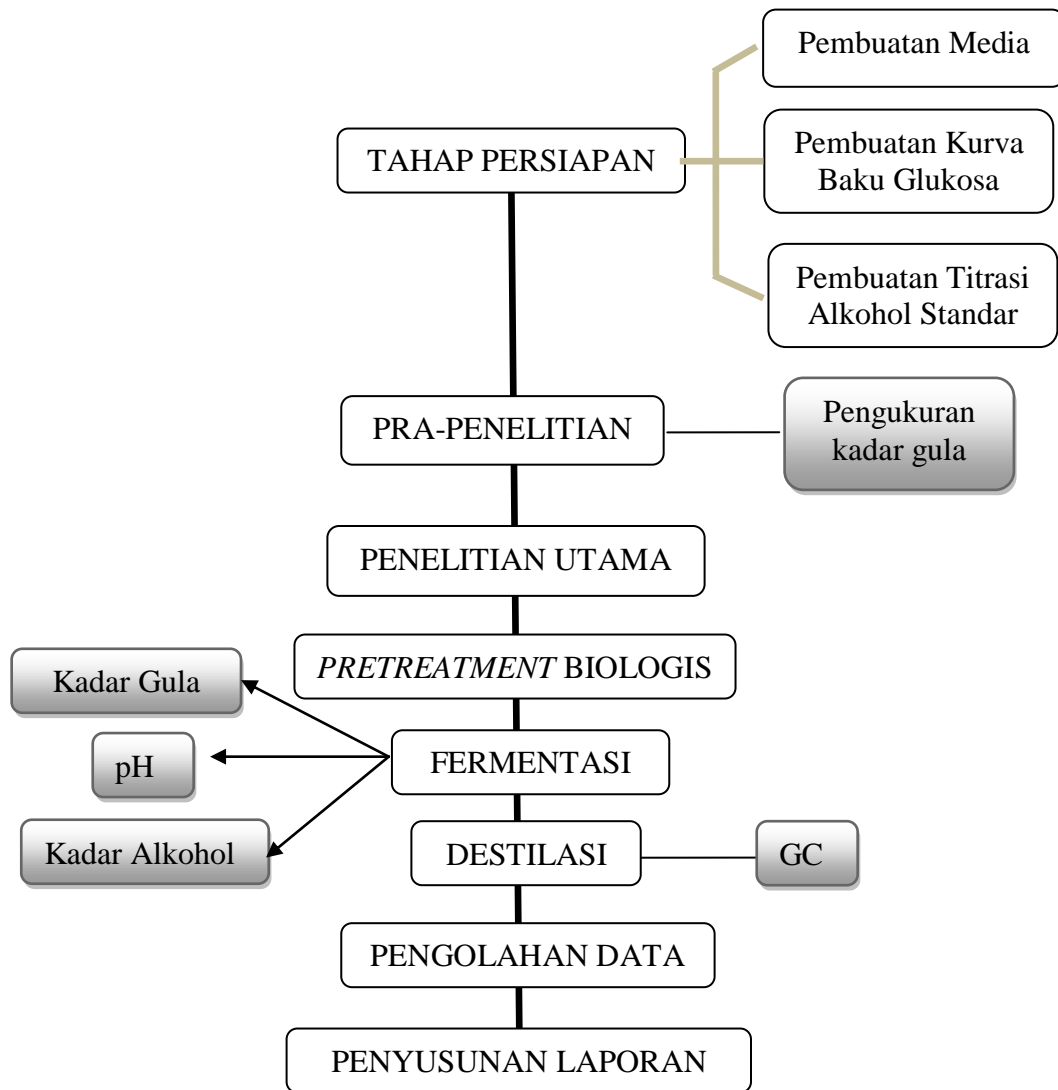
4) Analisis Kadar Etanol

Sampel yang digunakan dalam pengujian kadar etanol diperoleh dari hasil fermentasi lanjutan. Setelah dilakukan proses fermentasi, sampel hasil tersebut didestilasi dengan menggunakan destilator bertingkat. Sampel hasil destilasi diukur dengan GC-MS di Laboratorium Kimia Instrumen FPMIPA UPI untuk meyakinkan ada tidaknya kadar etanol yang dihasilkan.

g. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan *software SPSS 16.0 for windows*. Pengolahan data yang dilakukan pada proses *pretreatment* dan *treatment* menggunakan Two Way Anova.

G. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Alur penelitian