

BAB III

METODE PENELITIAN

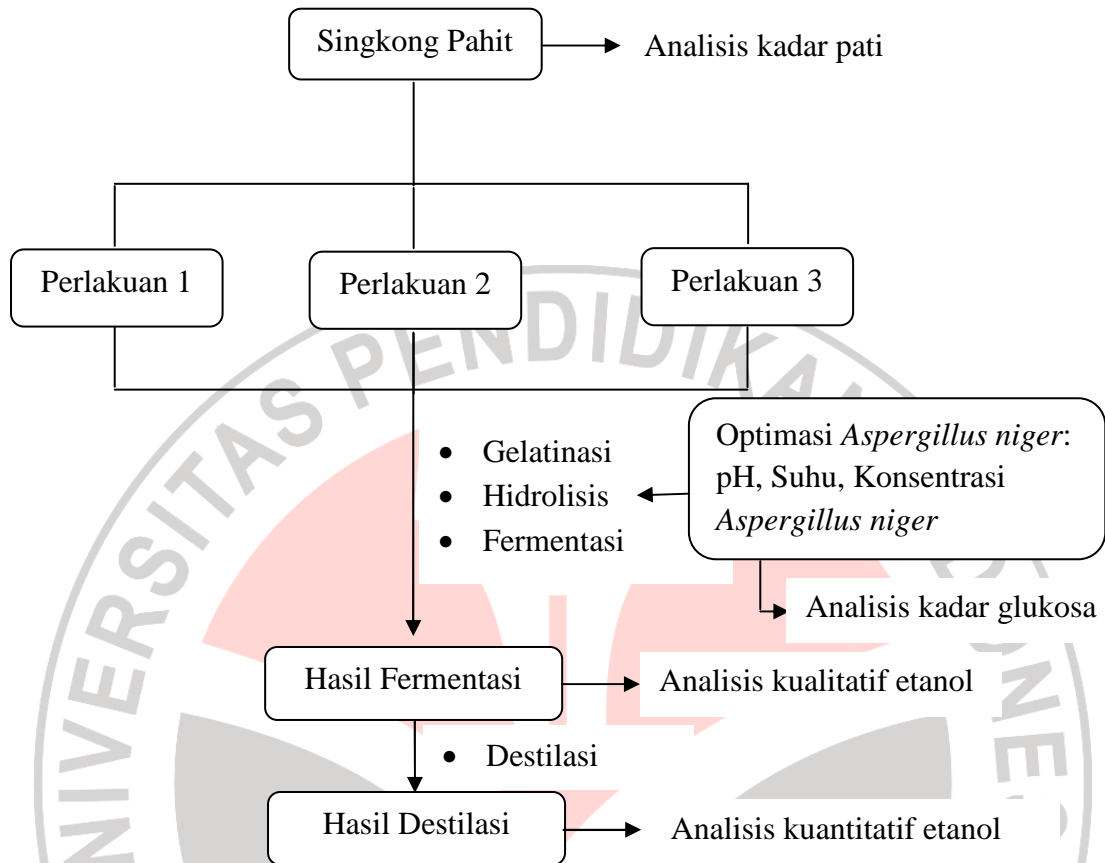
3.1 Lokasi Penelitian

Penelitian ini dimulai dari bulan April 2010 sampai dengan bulan Januari 2011. Penelitian ini sebagian besar dilakukan di Laboratorium Riset Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI, diantaranya untuk proses persiapan singkong, optimasi jamur *Aspergillus niger*, gelatinasi, hidrolisis, dan fermentasi. Pengujian kadar glukosa, kadar pati, dan pengujian kualitatif etanol dilakukan di Laboratorium Kimia Instrumen Jurusan Pendidikan Kimia FPMIPA UPI. Selain itu, untuk pengukuran kadar etanol secara kuantitatif dilakukan pengujian di Laboratorium Kimia LIPI.

3.2 Sistematika Penelitian

Penelitian ini dirancang untuk mengetahui strategi pengolahan awal bahan baku singkong pahit terhadap produksi etanol dan kondisi optimum *Aspergillus niger* yang ditambahkan untuk proses hidrolisis. Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahap, yaitu persiapan, pelaksanaan dan analisis. Tahap persiapan meliputi persiapan singkong dan optimasi *Aspergillus niger*, tahap pelaksanaan meliputi gelatinasi, hidrolisis, fermentasi dan destilasi, dan tahap analisis meliputi analisis kadar glukosa, pati dan etanol.

Adapun tahapan penelitian ini digambarkan dalam diagram alir berikut:



Gambar 3.1 Diagram alir penelitian

3.3 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini diantaranya: peralatan gelas, *ball pipet*, pisau, parut, kain penyaring, lumpang alu, botol semprot, *mantel heater*, set alat destilasi, *water bath shaker* EYELA NTS-1300, inkubator SHIMADZU BITEC 300, *spectrophotometer* CAMPSPEC M106, set alat GC (*Gas Chromatography*) SHIMADZU 17 A dan GCMS (*Gas Chromatography Mass Spectrum*) SHIMADZU QP 5050 A.

Adapun bahan-bahan yang diperlukan pada penelitian ini diantaranya: singkong pahit, aquades, NaOH p.a., H₂SO₄ pekat p.a., HCl p.a., KI p.a., I₂ p.a., Natrium asetat, Asam asetat p.a., glukosa, pati (*soluble starch*), pereaksi Somogyi-Nelson, *Aspergillus niger* dalam medium aktivasi, dan ragi tape.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Tahap Persiapan

1) Penyiapan singkong

Singkong pahit yang digunakan diperoleh dari petani di daerah Cibatu, Garut. Umbi singkong kemudian dikupas dan dibersihkan.

2) Proses pengolahan singkong

a) Perlakuan 1

Singkong yang telah bersih kemudian dipotong-potong kecil dan dikeringkan di bawah sinar matahari.

b) Perlakuan 2

Singkong yang telah bersih kemudian diparut dan langsung dikeringkan di bawah sinar matahari.

c) Perlakuan 3

Singkong yang telah bersih kemudian dihaluskan. Hasilnya diperas sampai diperoleh cairan dengan menggunakan kain penyaring. Cairan hasil perasan kemudian didiamkan sampai terbentuk dua lapisan. Lapisan atas merupakan lapisan air dan lapisan bawah adalah pati. Proses ini bertujuan untuk mengambil pati yang terdapat dalam umbi singkong dan memisahkan dari

komponen lainnya. Setelah itu, cairan pati dipisahkan lalu dikeringkan di bawah sinar matahari sampai kering.

3) **Optimasi *Aspergillus niger***

Sebelum pengolahan singkong pahit menjadi etanol, hal pertama yang harus dilakukan terlebih dahulu adalah mengetahui kondisi optimum *Aspergillus niger* sehingga hasil yang diperoleh menjadi optimal. Optimasi yang dilakukan pada penelitian ini meliputi optimasi pH, suhu dan konsentrasi *Aspergillus niger*. Optimasi pH dilakukan pada pH 4, 5, 6, 7 dan 8; suhu 25 °C, 30 °C, 40 °C, 50 °C, dan 60 °C; dan konsentrasi *Aspergillus niger* 5%, 10%, 20%, dan 30% (v/v). Hasil yang diperoleh kemudian dianalisis dengan menggunakan metode Somogyi-Nelson untuk mengukur kadar glukosa yang dihasilkan (Nelson, 1944; Somogyi, 1951).

3.4.2 Tahap Pelaksanaan

1) **Gelatinasi**

Singkong yang telah mengalami pengolahan yang berbeda-beda kemudian dilanjutkan dengan proses gelatinasi. Proses gelatinasi berlangsung dengan pemanasan pada suhu 80 °C dan dimasak kurang lebih selama 30 menit dalam *water bath shaker*, pH dijaga pada pH optimum dari *Aspergillus niger*.

2) **Hidrolisis**

Ke dalam singkong yang telah digelatinasi, tambahkan *Aspergillus niger* dalam medium Mandels. Semua kondisi disesuaikan pada kondisi optimum *Aspergillus niger* yang telah diperoleh, yaitu kondisi pH dan konsentrasi

Aspergillus niger yang ditambahkan. Setelah itu diinkubasi selama 72 jam (Fungsin, *et al.*,) pada suhu optimum pertumbuhan *Aspergillus niger*. Proses hidrolisis berlangsung pada kondisi aerob.

3) Fermentasi

Proses fermentasi berlangsung pada kondisi anaerob. Setelah proses hidrolisis, tambahkan ragi tape dengan konsentrasi 3% (b/v) dan diinkubasi pada suhu 30 °C selama 7 hari.

4) Destilasi

Cairan yang dihasilkan pada proses fermentasi kemudian didestilasi. Destilasi yang digunakan adalah destilasi bertingkat dengan kolom fraksinasi. Tujuan destilasi adalah untuk mengurangi kadar air yang terdapat pada cairan hasil fermentasi sehingga dapat menghasilkan kadar etanol yang lebih besar.

3.4.3 Tahap Analisis

1) Pembuatan kurva standar pati

Hal pertama yang harus dilakukan sebelum menganalisis kadar pati adalah membuat kurva standar pati. Hal ini dilakukan karena pengukurannya menggunakan spektrofotometer, sehingga diperlukan kurva standar untuk menentukan kadar pati yang terdapat dalam sampel. Untuk membuat kurva standar, dibuat larutan pati dengan berbagai konsentrasi yang memungkinkan konsentrasi pati dalam sampel berada pada rentang ini, sehingga dibuat larutan pati dengan konsentrasi 0-2 g/L. Pati yang digunakan adalah pati yang mudah larut (*soluble starch*).

Adapun tahapan kerjanya adalah sebagai berikut: larutan pati yang mempunyai konsentrasi yang berbeda-beda diambil sebanyak 250 μL kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Setelah itu, ke dalam tabung reaksi ditambah 250 μL buffer asetat pH 5. Tabung reaksi kemudian diinkubasi pada suhu 50 °C dalam *water bath* selama 10 menit. Setelah inkubasi, ditambahkan larutan HCl 1N sebanyak 250 μL , pereaksi iodine (0,2 % I_2 dalam 2% KI) sebanyak 250 μL dan 4 mL buffer asetat pH 5. Campuran yang dihasilkan dikocok sampai homogen, kemudian diukur dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm.

2) Analisis kadar pati (Fuwa, 1954)

Analisis ini bertujuan untuk mengetahui kadar pati yang terdapat dalam singkong pahit yang digunakan. Kadar pati yang terdapat dalam singkong berkisar antara 30-40%. Kandungan pati ini dapat lebih rendah atau lebih tinggi tergantung pada jenis singkong, umur tanaman, nutrisi yang terdapat dalam tanah dan juga musim. Singkong yang digunakan pada penelitian ini merupakan jenis singkong pahit yang berumur 1 tahun sehingga umbi singkong yang dihasilkan berukuran besar dan kemungkinan kadar pati yang terkandung di dalamnya juga tinggi.

Pada analisis kadar pati, digunakan metode Fuwa dengan menggunakan pereaksi iodin, dan pengukurannya menggunakan spektrofotometer. Sampel yang diukur adalah pati dari singkong pahit yang digunakan. Untuk pengukuran, dibuat larutan pati dengan konsentrasi 1 g/L. Setelah itu, tahapan kerjanya sama dengan pada penentuan kurva standar pati. Pada analisis kadar pati dilakukan pengulangan sebanyak 2 kali. Hasil yang diperoleh dari pengukuran dengan

menggunakan spektrofotometer kemudian dirata-ratakan dan dihitung untuk mengetahui kadar pati yang terdapat dalam sampel.

3) Pembuatan kurva standar glukosa

Seperti halnya pada penentuan kadar pati, hal pertama yang harus dilakukan pada analisis kadar glukosa adalah penentuan kurva standar glukosa. Larutan glukosa dianalisis dengan konsentrasi yang berbeda-beda dan pengulangan sebanyak 2 kali. Konsentrasi glukosa yang dianalisis berkisar antara 20-200 mg/L.

Adapun tahapan kerjanya, yaitu: sebanyak 1 mL larutan glukosa dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,8 mL larutan Somogyi I dan 0,2 mL larutan Somogyi II. Tabung reaksi dikocok sampai larutannya homogen. Tabung kemudian dimasukkan ke dalam penangas yang berisi air mendidih selama 10 menit, setelah itu didinginkan dalam penangas es. Ke dalam larutan yang telah dingin ditambahkan 1 mL larutan Nelson dan 2 mL aquades sehingga volume larutan 5 mL dan dikocok kembali sehingga homogen. Larutan yang dihasilkan kemudian diukur absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Hasil pengukuran dirata-ratakan dan dibuat dalam bentuk grafik sehingga diperoleh persamaan regresinya.

4) Analisis kadar glukosa dengan metode Somogyi-Nelson (Nelson, 1944; Somogyi, 1951)

Prinsip kerja dari metode Somogyi Nelson adalah jumlah pengurangan substrat yang terbentuk pada bagian aktivitas amilase ditentukan dengan kombinasi reagen Somogyi dan reagen Nelson arsenmolibdat (Fuwa, 1954). Pada analisis kadar glukosa dilakukan dengan 2 kali pengulangan. Adapun tahapan

kerjanya sama dengan pada penentuan kurva standar, hanya saja 1 mL larutan glukosa diganti dengan 1 mL larutan sampel. Hasil pengukuran dengan spektrofotometer kemudian dirata-ratakan dan dikonversi ke dalam grafik yang telah diperoleh sebelumnya.

5) Analisis kualitatif dan kuantitatif etanol

Untuk mengetahui komponen yang dihasilkan dari proses fermentasi dilakukan pengujian (analisis kualitatif) dengan menggunakan alat GCMS (*Gas Chromatography Mass Spectrum*). Untuk pengujian secara kuantitatif kadar etanol yang dihasilkan setelah proses destilasi dilakukan pengujian dengan alat GC (*Gas Chromatography*) yang dilaksanakan di Laboratorium Kimia LIPI.

Pada analisis kuantitatif, dilakukan *pretreatment* untuk menghilangkan air yang masih terkandung dalam cairan hasil destilasi. Pada *pretreatment* ini digunakan metode ekstraksi dengan menggunakan pelarut toluen. Etanol akan larut dalam toluen karena sama dalam hal kepolaran, sedangkan air yang merupakan senyawa polar akan terpisah sehingga terbentuk 2 fasa. Fasa atas merupakan fasa organik yang terdiri dari etanol dalam toluen dan fasa bawah merupakan air.

Etanol dalam toluen kemudian diuji kadarnya dengan menggunakan alat GC dengan membandingkan luas area sampel dengan standar. Standar yang digunakan merupakan etanol dengan konsentrasi 400 ppm. Luas area yang dihasilkan sampel kemudian dibandingkan dengan luas area standar sehingga diperoleh kadar etanol dalam pelarut toluen. Kemudian, dengan perhitungan dapat diperoleh kadar etanol yang terdapat dalam sampel.