

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini termasuk penelitian ekperimental. Penelitian ini termasuk dalam penelitian ekperimental karena terdapat sejumlah perlakuan dan kontrol. Kontrol berfungsi sebagai acuan pembandingan keadaan sebelum dan sesudah perlakuan. Pada penelitian ini juga terdapat replikasi dan randomisasi untuk menyakinkan hasil yang diperoleh (Nazir, 2003: 89).

B. Desain Penelitian

Penelitian skala laboratorium dilakukan dalam dua tahap yaitu tahap I (*pretreatment* kimiawi) dan tahap II (fermentasi). Tahap I meliputi tahap persiapan, pembuatan larutan H_2SO_4 , pembuatan kurva standar alkohol, pembuatan kurva standar glukosa, dan pengujian kadar gula pereduksi tertinggi hasil hidrolisis limbah baglog. Variasi konsentrasi H_2SO_4 yang digunakan pada *pretreatment* kimiawi adalah 1%, 2%, 3%, 5%, dan 10% (v/v) (Fanaei *et al.*, 2008). Kadar gula pereduksi dalam sampel diukur dengan metode Somogyi-Nelson untuk mengetahui konsentrasi yang optimum menghasilkan gula pereduksi tertinggi.

Penelitian laboratorium tahap II (tahap fermentasi) meliputi proses fermentasi hidrolisat hasil hidrolisis limbah baglog jamur menggunakan H_2SO_4 optimum dari penelitian tahap I (*pretreatment*). Fermentasi dilakukan dengan variasi konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* dan lama inkubasi. Variasi konsentrasi inokulum yang digunakan adalah 1%, 3%, 5% dan & 7% (Buckle, 2007)

sedangkan variasi lama inkubasi yang digunakan adalah satu, dua, tiga, empat, lima, dan enam hari (Budhiutami, 2010). Setelah diperoleh kondisi optimum fermentasi pada penelitian skala laboratorium, kemudian penelitian dilanjutkan ke tahap penelitian skala pilot dengan volume fermentor yang lebih tinggi yakni 1000 ml.

Parameter penelitian yang diukur meliputi pH larutan, kadar gula pereduksi, dan kadar alkohol dilakukan setiap hari. Gula awal yang digunakan adalah 5% (v/v) berdasarkan hasil penelitian sebelumnya (Anggara, 2010), sedangkan pH awal dan suhu inkubasi yang digunakan adalah 5 dan 30°C (Budhiutami, 2010).

Rancangan penelitian menggunakan rancangan acak lengkap (RAL), dengan faktor lingkungan yang terkontrol. Penempatan sampel dilakukan secara acak. Pada penelitian skala laboratorium dilakukan dengan lima kombinasi perlakuan dengan lima replikasi (Gomez and Gomes, 1995).

$$T(R-1) \geq 20$$

$$5R-5 \geq 20$$

$$5R \geq 25$$

$$R \geq 5$$

Kadar alkohol pada sampel ditentukan dengan cara titrasi asam basa. Kadar alkohol pada sampel ditentukan dengan 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).

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah limbah baglog jamur yang dihasilkan oleh sentra pertanian jamur di Kecamatan Parongpong, Bandung Barat. Sampel dari penelitian ini adalah limbah baglog jamur yang digunakan dalam fermentasi, diambil secara acak dari salah satu kubung jamur di Dusun Cibadak, Desa Cisarua, Kec. Parongpong, Kabupaten Bandung Barat.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Universitas Pendidikan Indonesia Jl. Dr. Setiabudhi No 229 selama empat bulan (Januari – April 2011).

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2.

Tabel 3.1. Alat – Alat Penelitian

No	Alat-alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Alat distilasi	-	1 unit
2.	Alkoholmeter	-	1 buah
3.	Autoclave	EYELA model HL36AE	1 unit
4.	Blender	Merk Nasional	1 unit
5.	Botol fermentasi	-	80 buah
6.	Botol penampung bioetanol	Pyrex	4 unit
7.	Bunsen	-	3 buah
8.	Buret dan Statif	-	1 buah

9.	Ember	-	5 buah
10.	Gelas Beaker	Pyrex	5 buah
11.	Hotplate	Eyela magnetic stirrer RCH 3	1 unit
12.	Inkubator	-	1 buah
13.	Kain penyaring	-	5 buah
14.	Kamera digital	Kodak	1 unit
15.	Kompor gas	Rinai	1 unit
16.	Lemari es	National	1 buah
17.	Makropipet 2 ml	Eppendorf	1 unit
18.	Panci Penangas	-	2 buah
19.	Pipet tetes dan volum	-	6 buah
20.	Pisau	-	1 buah
21.	Shaker	EYELA model multi shaker MMS	1 unit
22.	Spektrofotometer	Milton Rey Spectronic 20 D	1 buah
23.	Termometer	-	2 buah
24.	Timbangan Analitik	AND HF-300	1 buah
25.	Water bath	Eyela Unithermo Shaker NTS-130	1 unit

Tabel 3.2. Bahan - Bahan Penelitian

No	Bahan – bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Alkohol absolut	p.a	100 ml
2.	Anhidrat asetat	p.a	200 ml
3.	Aquades.	Medilabs	10L
4.	Gula pasir	Gulaku	250 gram
5.	Inokulum <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Kultur murni	5 tabung reaksi
6.	Medium PDA	p.a	200ml
7.	Medium PDB	-	200ml
8.	NaOH 1 M	p.a	3 liter
9	pH Indikator	-	1 pak
10.	Phenolftalein	p.a	50 ml
11.	Reagent Somogyi-Nelson	p.a	2 liter
12.	Limbah baglog	-	10 kg

F. Prosedur Penelitian

1. Penelitian Skala Laboratorium

a. Penelitian Laboratorium Tahap I (*Pretreatment* Kimia)

1) Analisis Komposisi Kimia Limbah Baglog

Analisis kandungan kimia limbah baglog jamur dilakukan di Laboratorium Balai Besar Pulp dan Kertas, Jl. Raya Dayeuh Dayeuhkolot No. 132, Bandung. Analisis yang dilakukan meliputi penghitungan kandungan total selulosa, kandungan hemiselulosa, dan kadar lignin sebelum dan sesudah hidrolisis.

2) Persiapan Alat dan Bahan

Alat-alat berupa botol fermentasi, erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi dan lain-lain. Dibersihkan dengan cara merendam botol-botol tersebut dengan detergen dan bilas, lalu botol-botol tersebut direndam dengan larutan disinfektan selama 30 menit dan dibilas lagi dengan air mengalir selanjutnya dikeringkan.

3) Pembuatan Larutan H₂SO₄

Konsentrasi H₂SO₄ yang digunakan dalam hidrolisis adalah 1%, 2%, 3%, 5%, dan 10% (Fanaei *et al.*, 2008). Larutan H₂SO₄ 1% dibuat dengan melarutkan 10 ml H₂SO₄ pekat dalam akuades hingga volumenya mencapai 1 L, dan untuk pembuatan larutan H₂SO₄ 2%, sebanyak 20 ml H₂SO₄ pekat diencerkan dengan akuades sampai volume 1 L. Larutan H₂SO₄ 3% dibuat dengan melarutkan sebanyak 30 ml H₂SO₄ dalam akuades sampai volume 1 L. Larutan H₂SO₄ 5% dibuat dengan melarutkan sebanyak 50 ml H₂SO₄ pekat diencerkan dengan akuades sampai volume 1

L. Sedangkan larutan H_2SO_4 10% dibuat dengan melarutkan 100 ml H_2SO_4 pekat dalam akuades 1 L.

4) Pembuatan Kurva Standar Gula

Sebelum dilakukan analisis kadar gula pereduksi pada sampel, maka terlebih dahulu dibuat kurva baku glukosa. Kurva baku glukosa menyatakan hubungan antara konsentrasi glukosa dengan kerapatan optik pada panjang gelombang 520 nm dengan metode Somogyi-Nelson (Sadasiyam, 1996).

Pembuatan kurva baku glukosa di buat dengan menimbang glukosa murni sebanyak 200 mg dan dilarutkan dalam 1000 ml akuades dan dikocok sampai homogen. 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 ditambahkan akuades 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 $\mu\text{g/ml}$ (Kusnadi, 2001).

Larutan Somogyi I sebanyak 1,6 ml dan Somogyi II sebanyak 0,4 ml ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah berisi satu ml 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 akuades, maka volume total adalah 10 ml. Tabung reaksi ditutup dengan ibu jari dan

dikocok dengan baik dan kuat, hingga gas CO₂ tidak keluar lagi. Masing-masing larutan diukur *optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Nilai absorbansi dari masing-masing kadar glukosa standar yang diukur, kemudian dibuat kurva baku dan dicari persamaan regresi yang menyatakan hubungan antara kadar glukosa dengan absorbansinya. Persamaan regresi inilah yang akan digunakan untuk meramalkan kadar gula pereduksi sampel berdasarkan nilai absorbansi pada masing-masing sampel.

5) Pembuatan Kurva Standar Alkohol

a) Pembuatan Larutan Blanko

Satu ml akuades 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.

b) Pengujian Larutan Alkohol Standar

Sebanyak 1 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. Jumlah NaOH yang digunakan

dalam titrasi dijadikan acuan pembuatan kurva baku alkohol dan di cari persamaan regresinya.

6) Pembuatan Hidrolisat Gula dari Limbah Baglog

Pada penelitian skala laboratorium tahap I (*pretreatment* kimia) limbah baglog jamur dihancurkan hingga menjadi serbuk hingga tidak terdapat gumpalan. Sebanyak 50 g limbah baglog direndam dalam 500 ml asam sulfat dengan konsentrasi (1%, 2%, 3%, 5%, dan 10%) selama 14 jam. Kemudian dididihkan selama 120 menit. Hasil hidrolisis kemudian disaring dan diambil hidrolisatnya untuk diukur kandungan gula pereduksinya. Perlakuan dilakukan masing-masing empat kali pengulangan (Fanaei *et al.*, 2008). Kandungan gula pereduksi dari masing-masing pelakuan di ukur dengan metode Somogyi-Nelson. Perlakuan yang menghasilkan gula pereduksi tertinggi akan digunakan dalam penelitian skala laboratorium tahap II (fermentasi).

7) Pembuatann Kurva Tumbuh *Saccharomyces cerevisiae*

Satu ose isolat *S. cerevisiae* diinokulasikan kedalam 10 ml PDB dan ikubasi pada sheker dengan kecepatan 120 rpm. Kemudian tambahkan 90 ml PDB hingga volume inokulum menjadi 100 ml. Ukur *Optical Density* inokulum meggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 625 nm setiap dua jam. Hitung jumlah sel *S. cerevisiae* tiap dua jam sekali selama 24 jam menggunakan metode penghitungan haemocytometer.

b. Penelitian Laboratorium Tahap II (Fermentasi)

1) Persiapan *Saccharomyces cerevisiae*

a). Pembuatan Media

Terdapat dua macam media yang digunakan untuk menumbuhkan dan memelihara *S. cerevisiae* yaitu medium aktivasi *Potatoes Dextrose Agar* (PDA) dan medium kultur *Potatoes Dextrose Borth* (PDB).

➤ **Medium Kultur PDA (*Potatoes Dextrose Agar*)**

Saccharomyces cerevisiae yang akan digunakan dalam penelitian ditumbuhkan dalam medium agar miring. Medium agar miring yang digunakan adalah medium PDA (*Potatoes Dextrose Agar*) yang dibuat dengan cara sebagai berikut: sebanyak 3,9 gram PDA instan dilarutkan dalam 100 ml akuades dan didihkan. Lalu masukan ke dalam tabung reaksi masing-masing 5-7 ml kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 lbs, suhu 121 °C selama 15 menit dan dinginkan dalam keadaan miring.

➤ **Medium Aktifasi PDB (*Potatoes Dextrose Borth*)**

Sebelum dimasukkan ke dalam medium fermentasi, inokulum *S. cerevisiae* diaktivasi terlebih dahulu. Medium aktivasi yang digunakan adalah medium PDB (*Potatoes Dextrose Broth*). Medium PDB dibuat dengan cara sebagai berikut: 200 gram kentang dididihkan dalam akuades 1 L hingga volumenya tinggal 1/2 atau 2/3 nya, lalu disaring dengan menggunakan kertas saring. Setelah disaring ditambahkan dextrosa sebanyak 2 gram. Masukan kedalam tabung

Erlenmeyer kemudian ditutup dengan sumbat. Sterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 lbs, suhu 121°C selama 15 menit.

b). Aktivasi *Saccharomyces cerevisiae*

➤ **Aktivasi I *Saccharomyces cerevisiae***

Semua bahan disimpan di dalam laminar dan dipaparkan sinar UV selama 15 menit. Sebanyak 1 ose kultur murni *S. cerevisiae* diinokulasikan ke dalam medium PDB 10 ml, medium yang telah diinokulasikan ditutup rapat dengan sumbat dan plastik wrap kemudian diinkubasi pada *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam.

➤ **Aktivasi II *Saccharomyces cerevisiae***

Setelah diinkubasi selama 24 jam (aktivasi I) medium PDB yang berisi *S. cerevisiae* dipindahkan ke dalam medium aktivasi ke-II (PDB 90 ml), Setelah dipindahkan ke medium aktivasi ke-II, medium tersebut di shaker kembali selama 6 jam.

2) Proses Fermentasi

Pada penelitian jumlah inokulasi optimum, masukan masing-masing sebanyak 1 ml, 3 ml, 5ml, dan 7 ml isolat yeast *S. cerevisiae* ke dalam hidrolisat glukosa berturut-turut 94 ml, 92 ml, 90 ml, dan 88 ml. Sedangkan gula starter yang digunakan untuk semua perlakuan adalah sebanyak 5 ml (Anggara, 2010). Seluruh perlakuan menggunakan pH 5 dan suhu 30 °C (Budhiutami, 2010).

3) Pengukuran Kadar Glukosa (Somogyi-Nelson)

Pada hari ke 0, 1, 2, 3, 4, 5 dan 6, diambil 2 ml sampel ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 1,6 ml larutan Somogyi I dan 0,4 ml larutan Somogyi II kemudian homogenkan dengan menggunakan vorteks tabung ditutup dengan menggunakan kelereng lalu panaskan dalam penangas selama 10 menit. Setelah 10 menit pindahkan tabung ke dalam es kemudian tambahkan 2 ml larutan Nelson dan 4 ml Akuades, dan dihomogenkan larutan. Larutan dimasukkan ke dalam cuvet kemudian ukur absorbansinya pada panjang gelombang 520 nm. Jika larutan terlalu pekat dan tidak terbaca pada spektrofotometer dilakukan pengenceran, ambil 1 ml larutan kemudian encerkan dengan menambahkan 9 ml akuades.

4) Pengukuran Kadar Alkohol (Titrasi alkohol)

Pada hari ke 0, 1, 2, 3, 4, 5 dan 6, diambil 1 ml larutan hasil fermentasi dan masukan ke dalam labu erlenmeyer 100 ml, tambahkan 1 ml anhidrat asetat dan 2 tetes phenolftalein kemudian titrasi dengan NaOH 1 M dengan buret sampai terlihat perubahan warna menjadi warna merah muda. Catat kedudukan skala pada buret. Kadar alkohol pada sampel ditentukan dengan cara memasukkan jumlah NaOH yang digunakan dalam titrasi sampel ke dalam persamaan regresi kurva baku alkohol.

2. Penelitian Skala Pilot

Penelitian skala pilot berdasarkan pada perlakuan penelitian skala laboratorium yang menghasilkan kadar alkohol yang paling tinggi. Penelitian skala pilot bertujuan untuk produksi bioetanol. Oleh karena itu, penelitian pada

tahap ini menggunakan volume fermentasi yang lebih besar yakni sebesar 1000 ml. Langkah-langkah penelitian skala pilot terdiri dari :

a. Fermentasi Hidrolisat Limbah Baglog dengan *S. cerevisiae*

Sebanyak 4 kg limbah baglog jamur dicuci dihancurkan hingga homogen. Kemudian di hidrolisis menggunakan H_2SO_4 dengan konsentrasi yang paling optimum pada penelitian tahap *pretreatment* dan tahap fermentasi. Kemudian hidrolisat hasil fermentasi ditambahkan dengan inokulum *S. cerevisiae* optimum dari penelitian sebelumnya dan gula 5% starter hingga volumenya 1000 ml. Masukkan ke dalam labu Erlenmeyer. Selanjutnya simpan pada inkubator dengan suhu $30\text{ }^\circ\text{C}$ selama waktu optimum dari penelitian skala laboratorium (hari).

b. Distilasi

Alkohol yang terbentuk dari hasil fermentasi dari penelitian skala pilot kemudian didistilasi dengan menggunakan destilator. Hal ini dilakukan untuk memisahkan alkohol dari larutan hidrolisat berdasarkan perbedaan titik uapnya.

c. Uji Gas Chromatograph-Mass Spectrometry (GC-MS)

Sampel hasil distilasi dibawa ke laboratorium riset kimia Akademi Kimia Analisis (AKA), Bogor untuk mengetahui komposisi kimia penyusun alkohol tersebut.

G. Pengolahan Data

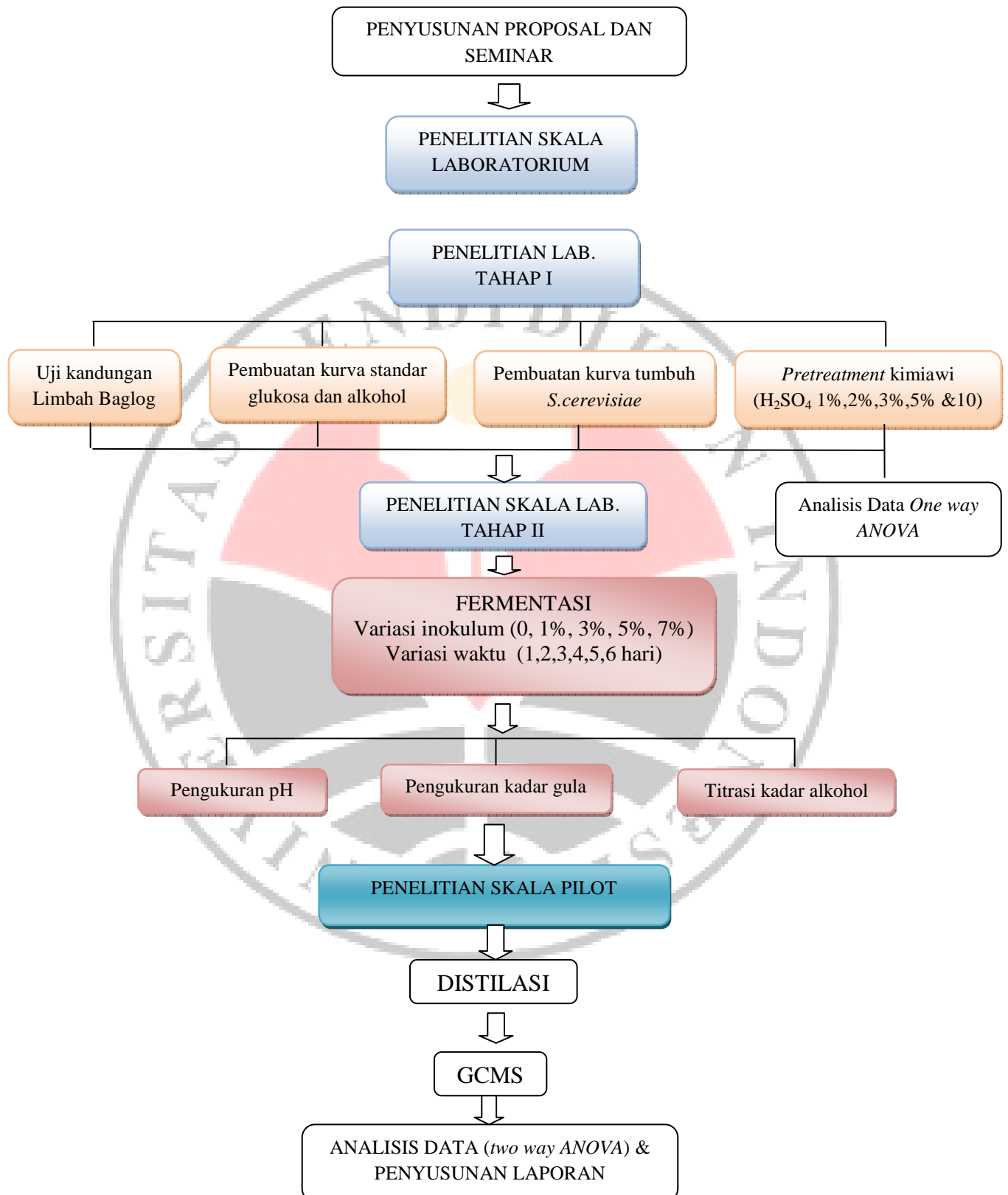
Pengolahan data dilakukan untuk mengetahui *pretreatment* asam (H_2SO_4) terbaik yang menghasilkan kadar gula pereduksi paling tinggi dan perlakuan yang

menghasilkan kadar alkohol paling besar pada fermentasi hidrolisat limbah baglog dengan *pretreatment* kimiawi. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan *software SPSS 16.0 for windows*.

Data *pretreatment* (penelitian lab. Tahap I) dari satu faktor, yaitu kadar H_2SO_4 yang digunakan. Data penelitian pada tahap fermentasi (penelitian lab. Tahap II) terdiri dari beberapa faktor, yaitu hari dan konsentrasi inokulum *S. cerevisiae*. Tahap analisis statistik yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Uji Normalitas dan Homogenitas.
2. Uji Anova satu jalur (*One Way ANOVA*), untuk menentukan bahwa terdapat perbedaan jumlah gula pereduksi yang dihasilkan pada hidrolisis limbah baglog jamur dengan berbagai konsentrasi H_2SO_4 .
3. Uji Anova dua jalur (*Two way ANOVA*), untuk menentukan bahwa terdapat perbedaan kadar alkohol yang diperoleh dari faktor-faktor kombinasi perlakuan konsentrasi inokulum dan lama fermentasi.
4. Uji lanjutan dengan menggunakan Uji *Tukey*, untuk menentukan faktor-faktor dari *treatment* mana saja yang menghasilkan kadar gula pereduksi dan kadar alkohol paling banyak.
5. Analisis Korelasi, untuk melihat tingkat signifikansi pengaruh antara kadar gula dengan kadar alkohol, dan pH dengan kadar alkohol.

H. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Diagram Alur Penelitian