

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian ini termasuk penelitian ekperimental. 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 dilakukan dalam dua tahap yaitu penelitian skala laboratorium dan penelitian skala pilot. Penelitian skala laboratorium terbagi menjadi dua yaitu tahap pendahuluan dan penelitian utama. Tahap pendahuluan meliputi tahap persiapan, pembuatan larutan H_2SO_4 , pembuatan kurva standar alkohol, pembuatan kurva standar glukosa, serta pengujian kadar gula pereduksi tertinggi hasil hidrolisis limbah baglog. Variasi konsentrasi H_2SO_4 yang digunakan adalah 1%, 2%, 3%, 5%, dan 10% (v/v) (Fanaei *et al.*, 2008). Kadar gula pereduksi dalam sampel diukur dengan metode Somogyi-Nelson (Sadasivam, 1996) untuk mengetahui konsentrasi yang optimum menghasilkan gula pereduksi tertinggi.

Tahap penelitian utama meliputi tahap persiapan, hidrolisis dan fermentasi. Tahap hidrolisis yaitu tahap perlakuan terhadap limbah baglog menggunakan larutan H_2SO_4 dengan konsentrasi hasil dari penelitian pendahuluan yang

menghasilkan kadar gula pereduksi tinggi. Setelah itu dilanjutkan ke tahap fermentasi yakni fermentasi hidrolisat gula limbah baglog jamur menggunakan variasi waktu inkubasi dan variasi konsentrasi ragi tape yang digunakan. Dan tahap penelitian skala pilot dilakukan untuk menggandakan proses produksi dengan skala yang lebih besar dengan menyesuaikan formulasi dari hasil penelitian skala laboratorium. Tahap penelitian skala pilot meliputi persiapan alat dan bahan, perlakuan, destilasi, dan uji GC-MS.

Rancangan dasar penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL), dengan faktor lingkungan yang dikondisikan homogen. Pada penelitian utama dilakukan dengan lima kombinasi perlakuan dengan lima replikasi (Gomez dan Gomez, 1995).

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

$$5R-5 \geq 20$$

$$5R \geq 25$$

$$R \geq 5$$

Variasi jumlah ragi tape yang digunakan adalah 0, 1%, 2%, 3%, 4% dan 5% (v/v) (Anggara, 2010). Lama waktu fermentasi ditentukan berdasarkan lama waktu fermentasi yang biasa dipakai pada proses pembuatan bioetanol dari limbah lignoselulosa sebelumnya yaitu enam hari (Budhiutami, 2010). Pengujian parameter pH, kadar glukosa, dan kadar alkohol dilakukan setiap hari. Gula awal yang digunakan adalah 5% berdasarkan hasil penelitian sebelumnya (Anggara,

2010). sedangkan pH awal dan suhu inkubasi yang digunakan adalah 5,0 dan 30°C.

Kadar etanol pada sampel ditentukan dengan cara titrasi asam basa. Untuk mengetahui kadar etanol pada sampel terlebih dahulu dibuat kurva standar alkohol yang menyatakan hubungan antara kebutuhan NaOH sebagai sumbu x dan kadar alkohol sebagai sumbu y. Prosedur titrasi yang dilakukan mengikuti Hidayat (1995: 44).

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah limbah baglog jamur yang dihasilkan oleh sentra pertanian jamur di kecamatan Parongpong, Bandung Barat, sedangkan 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 Mikrobiologi dan Genetika Universitas Pendidikan Indonesia Jl. Dr Setiabudhi No 229 selama empat bulan.

E. Alat dan Bahan Penelitian

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 destilasi	-	1 unit
2.	Alkoholmeter n cralles cemp b15		1 buah
3.	Autoclave	EYELA model HL36AE	1 unit
4.	Blender	Merk Nasional	1 unit
5.	Botol fermentasi	-	100 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	Gallenkamp Cooled Inkubator	1 buah
13.	Kain penyaring	-	5 buah
14.	Kamera digital	Casio	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	-	5 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	10 L
4.	Gula pasir	Gulaku	250 gram
5.	Ragi	Ragi tape	20 gram
6.	NaOH 1 M	p.a	3 liter

7.	pH Indikator	-	1 pak
8.	Phenolftalein	p.a	50 ml
9.	Reagent Somogyi-Nellson	p.a	2 liter
10.	Limbah Baglog jamur	-	10 kg

F. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi beberapa tahapan:

1. Penelitian Pendahuluan meliputi :

a. Tahap Persiapan

1). Analisis Komposisi Kimia Limbah Baglog

Analisis kandungan kimia limbah baglog jamur dilakukan di Laboratorium Pengujian Balai Besar Pulp dan Kertas (BBPK Bandung), Dayeuh Kolot Bandung.

2). Persiapan Alat dan Bahan

Alat-alat berupa botol fermentasi, erlenmeyer, gelas ukur, tabung reaksi dll, dibersihkan dengan cara merendam botol-botol tersebut dengan detergen dan dibilas dengan air mengalir, ditiriskan.

3). Persiapan Substrat Limbah Baglog Jamur

Limbah baglog jamur diambil dan dibersihkan dari plastik-plastik bungkus media, kemudian limbah baglog dihancurkan menjadi serbuk dengan menggunakan alat berupa kayu atau alat lainnya. Limbah baglog jamur yang telah dihancurkan menjadi serbuk dimasukkan kedalam wadah penampung untuk proses perendaman.

b. 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 liter, dan untuk pembuatan larutan H₂SO₄ 2%, sebanyak 20 ml H₂SO₄ pekat dilarutkan dengan akuades sampai volume 1 liter. Larutan H₂SO₄ 3% dibuat dengan melarutkan sebanyak 30 ml H₂SO₄ dalam akuades sampai volume 1 liter. Larutan H₂SO₄ 5% dibuat dengan melarutkan sebanyak 50 ml H₂SO₄ pekat dilarutkan dengan akuades sampai volume 1 liter. Sedangkan larutan H₂SO₄ 10% dibuat dengan melarutkan 100 ml H₂SO₄ pekat dalam akuades 1 liter.

c. Hidrolisis Limbah Baglog menggunakan Larutan H₂SO₄ 1%, 2%, 3%, 5%, dan 10%.

Limbah baglog jamur dihancurkan hingga menjadi serbuk, kemudian sebanyak 50 g limbah direndam dalam 500 mL asam sulfat dengan berbagai konsentrasi 1%, 2%, 3%, 5%, dan 10% asam sulfat selama 24 jam, kemudian dididihkan selama 120 menit. Masing-masing perlakuan sebanyak empat kali pengulangan (Fanaei *et al.*, 2008). Kandungan gula pereduksi dari masing-masing perlakuan di ukur dengan metode Somogyi-Nelson (Sadasivam, 1996). Perlakuan yang menghasilkan gula pereduksi tertinggi akan digunakan dalam penelitian utama.

d. Pembuatan Kurva Baku Glukosa

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. Kurva ini dibuat untuk menentukan harga konsentrasi larutan glukosa dengan pengukuran transmisi cahaya menggunakan spektrofotometer dengan metode Somogyi-Nelson (Sadasivam, 1996).

Pembuatan kurva baku glukosa dibuat 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 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 larutan glukosa. Larutan tersebut homogenkan menggunakan vortex 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 CO_2 tidak keluar lagi. Masing-masing larutan dimasukkan kedalam cuvet dan 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.

e. Pembuatan Kurva Standar Alkohol

1). 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.

2). 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 dicari persamaan regresinya.

2. Penelitian Utama

a. Persiapan Bahan

Bahan utama yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah limbah baglog jamur yang diambil dari Sentra pertanian jamur di Kecamatan Parongpong. sebelum perlakuan terlebih dahulu limbah baglog dihaluskan dan dicampur hingga homogen.

b. Pembuatan Hidrolisat Gula

Pembuatan hidrolisat gula menggunakan perlakuan yang paling optimum untuk menghasilkan gula pereduksi tertinggi pada penelitian pendahuluan. Sebanyak 1 kg limbah baglog direndam dalam 5 liter larutan H_2SO_4 encer selama 24 jam kemudian dididihkan selama 120 menit.

c. Aktivasi Ragi tape

Kedalam 125 ml air hangat ($\pm 40^0 C$) di tambahkan 6,25 gram gula putih. Kemudian ragi tape sebanyak 12,5 gram dimasukkan kedalam larutan glukosa tersebut. larutan tersebut dimasukkan kedalam erlenmeyer dalam kondisi anaerob, biakan ragi disimpan selama 24 jam. Setelah itu ragi dapat digunakan untuk fermentasi glukosa limbah baglog.

d. Proses Fermentasi

Pada penelitian jumlah inokulasi optimum, masukan masing -masing sebanyak 1% , 2%, 3%, 4% dan 5% inokulum ragi tape ke dalam hidrosilat

glukosa masing-masing hingga mencapai 100 ml . Sedangkan gula starter yang digunakan untuk semua perlakuan adalah sebanyak 5 ml. Seluruh perlakuan menggunakan pH 5 dan suhu 30 °C (Budhiutami, 2010).

e. Pengukuran Kadar Glukosa (Somogyi-Nelson)

Ambil 2 ml sampel ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 1,6 ml larutan Somogyi I dan 0,4 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, setelah itu homogenkan larutan, masukan larutan dalam cuvet kemudian ukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm. Jika larutan terlalu pekat dan tidak terbaca pada spektrofotometer dilakukan pengenceran, ambil 1 ml larutan kemudian menambahkan 9 ml akuades.

f. Pengukuran Kadar Etanol (Titration 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.

g. Pengukuran pH medium

Pengukuran pH pada medium fermentasi substrat limbah baglog jamur menggunakan pH indikator.

3. Penelitian Skala Pilot

a. Persiapan Alat dan Bahan

Alat-alat berupa tabung erlenmeyer besar (2 liter), gelas ukur, tabung reaksi dll, dibersihkan dengan cara merendam alat-alat tersebut dengan detergen selama satu malam, lalu dibersihkan bagian dalam dan luarnya, setelah dibilas, botol-botol tersebut direndam dengan larutan disinfektan selama 30 menit lalu bilas lagi dengan akuades steril dan ditiriskan.

b. Perlakuan

Sebanyak 4 kg limbah baglog jamur dicuci dihancurkan hingga homogen. Kemudian tambahkan H_2SO_4 dengan konsentrasi yang optimum pada penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Tambahkan gula starter ke dalam larutan, homogenkan. Masukkan ke dalam labu erlenmeyer, setelah dingin ragi tape dimasukkan dengan konsentrasi optimum lalu simpan pada inkubator dengan suhu dan waktu fermentasi optimum dari penelitian utama (hari).

c. Destilasi

Etanol yang terbentuk dari hasil fermentasi dari pilot plan kemudian didestilasi dengan menggunakan destilator.

d. Uji *Gas Chromatograph-Mass Spectrometry* (GC-MS)

Sampel hasil destilasi dibawa ke Laboratorium Riset Kimia Akademi Kimia Analisis (AKA) Bogor untuk diukur kandungan etanolnya.

G. Pengolahan Data

Pengolahan data dilakukan untuk mengetahui perlakuan awal mana yang menghasilkan kadar gula pereduksi tinggi dari konsentrasi asam (H_2SO_4) yang berbeda pada penelitian pendahuluan dan perlakuan mana yang menghasilkan kadar alkohol terbanyak dari hasil fermentasi substrat limbah baglog pada penelitian utama. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan *software SPSS 16.0 for windows*.

Untuk olah data uji pendahuluan terdiri dari satu faktor yaitu kadar H_2SO_4 yang digunakan. Olah data penelitian utama juga terdiri dari dua faktor yaitu konsentrasi inokulum ragi tape dan lama fermentasi. Untuk itu dilakukan tahap pengujian seperti berikut:

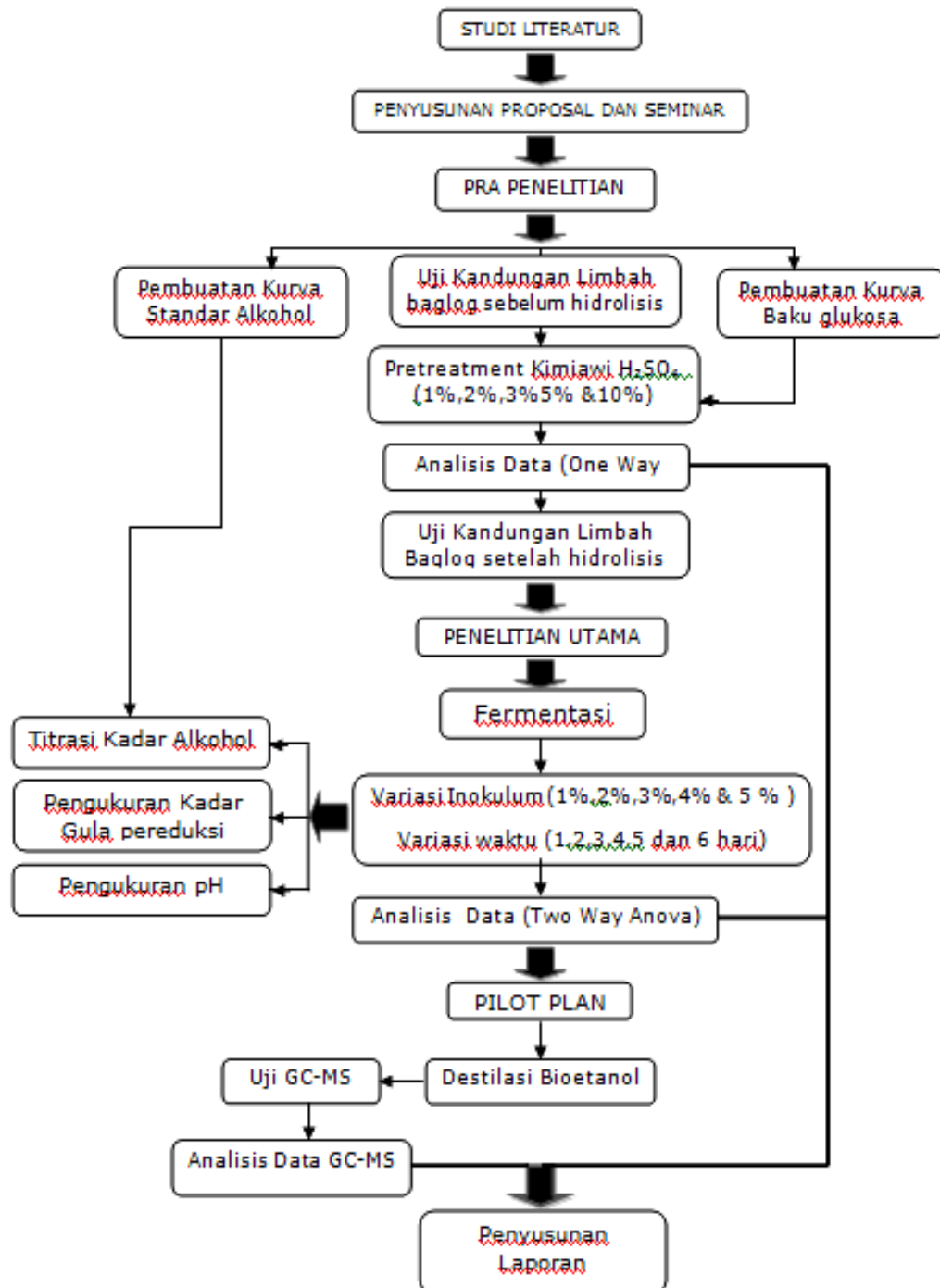
1. Uji Normalitas dan Homogenitas.
2. Uji Anova dua jalur (*Two way ANOVA*), untuk menentukan perbedaan banyaknya kadar gula pereduksi dan kadar alkohol yang diperoleh dari faktor-faktor dari setiap perlakuan yang diberikan.
3. Uji lanjutan dengan menggunakan Uji *Tukey*, untuk menentukan faktor-faktor dari perlakuan mana saja yang menghasilkan kadar gula pereduksi dan kadar alkohol paling banyak.

4. Analisis Korelasi, untuk melihat tingkat signifikansi pengaruh antara kadar gula dengan kadar alkohol, kadar pH dengan kadar alkohol, dan kadar pH dengan kadar gula.



H. Alur Penelitian

Alur penelitian akan disajikan pada Gambar 3.1 di bawah ini.



Gambar 3.1 Alur penelitian