

BAB III

METODOLOGI PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen yaitu penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian untuk menyelidiki sebab akibat pada kelompok eksperimental (Nazir, 2005). Objek penelitian ini adalah gula hidrolisat serbuk jerami padi dengan perlakuan pemberian *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis* dan konsorsium keduanya pada tahap fermentasi gula hidrolisat serbuk jerami padi untuk menghasilkan etanol.

B. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan melalui tiga tahap yaitu tahap persiapan, tahap penelitian dan tahap pengukuran parameter. Tahap persiapan diawali dengan persiapan alat dan bahan, pengumpulan jerami padi, pembuatan medium pertumbuhan khamir, peremajaan khamir dan pembuatan reagen DNS. Pada tahap penelitian dilakukan pembuatan gula hidrolisat serbuk jerami padi dengan proses praperlakuan delignifikasi NaOH, hidrolisis asam dan hidrolisis enzimatis hemiselulase dan selulase. Selanjutnya, dilakukan pembuatan kurva tumbuh dan kurva baku dari khamir *P.stipitis* dan *K.marxianus* untuk digunakan pada proses pembuatan starter. Setelah itu, dilakukan fermentasi gula hidrolisat tersebut dengan menggunakan *K.marxianus*, *P.stipitis* dan konsorsium keduanya. Waktu fermentasi dilakukan selama empat hari dengan melakukan pengambilan sampel pada jam ke-0, jam ke-12, jam ke-48, jam ke-60, jam ke-72, jam ke-84 dan jam ke-96. Parameter yang diukur pada penelitian ini yaitu kadar etanol, kadar gula pereduksi, dan jumlah biomassa sel pada saat proses fermentasi.

Rancangan penelitian menggunakan Rancangan Acak Lengkap pola faktorial dengan $3 \times 9 = 27$ perlakuan dengan tiga kali pengulangan menjadi 81 percobaan. Faktor pertama yaitu kultur khamir yang digunakan yaitu *P.stipitis*, *K.marxianus* dan konsorsium keduanya (*P.stipitis-K.marxianus*). Faktor kedua yaitu waktu, pengambilan sampel pada jam ke 0, jam ke 12, jam ke 24, jam ke 36,

jam ke 48, jam ke 60, jam ke 72, jam ke 84, dan jam ke 96. Variabel terikat yaitu kadar etanol, kadar gula, dan biomassa sel. Berikut adalah rancangan matrik yang digunakan dalam penelitian ini.

Tabel 3.1 Rancangan matriks pengaruh waktu dan jenis mikroba pada fermentasi hidrolisat jerami padi terhadap kadar gula reduksi, kadar etanol, biomassa sel.

Jenis Mikroba	<i>P.stipitis</i>			<i>K.marxianus</i>			<i>P. stipitis-K.marxianus</i>		
Waktu (jam)	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0									
12									
24									
36									
48									
60									
72									
84									
96									

Keterangan: A: kadar gula reduksi (g/l)
B: kadar etanol (g/l)
C: biomassa sel (CFU/ml)

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah keseluruhan gula hidrolisat serbuk jerami padi hasil hidrolisis asam dan hidrolisis enzimatis serbuk jerami padi dan sampelnya adalah gula hidrolisat serbuk jerami padi yang diberi *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia stipitis* dan konsorsium keduanya pada saat proses fermentasi.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian mulai dilaksanakan dari bulan April hingga Oktober 2016. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Riset Bioteknologi (B-307), Departemen Pendidikan Biologi, Gedung FPMIPA B, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung.

E. Alat dan Bahan

Alat dan Bahan yang digunakan dalam penelitian ini merupakan yang tersedia di Laboratorium Riset Bioteknologi (B-307), Departemen Pendidikan

Agung Novianto, 2017

PRODUKSI ETANOL DARI GULA HIDROLISAT SERBUK JERAMI PADI

Universitas Pendidikan Indonesia | Respository.upi.edu | Perpustakaan

Biologi, Gedung FPMIPA B, Universitas Pendidikan Indonesia, Bandung. Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini tercantum dalam Lampiran 1.

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap persiapan

a. Pengumpulan jerami padi

Jerami padi yang digunakan adalah jerami padi yang sudah kering dan diperoleh dari area persawahan di Soreang, Kabupaten Bandung.

b. Persiapan alat dan bahan

Seluruh alat dan bahan yang akan digunakan dicuci dan dibersihkan. Alat dan bahan yang digunakan disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C dan tekanan 1.5 atm, selama 15 – 20 menit.

c. Pembuatan medium pertumbuhan khamir.

Medium pertumbuhan *Kluyveromyces marxianus* dan *Pichia stipitis* adalah YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*). Medium yang digunakan adalah YEPD *agar* dan YEPD *broth*. Komposisi medium YEPD adalah 1% *Yeast Extract*, 2 % *Peptone*, 2% *Dextrose* dan 1.5 % *agar* untuk YEPD *agar*. Bahan bahan tersebut dilarutkan dengan akuades, kemudian dipanaskan dan diaduk hingga mendidih pada *Magnetic stirrer with hot plate*. Medium diatur pH menggunakan H_2SO_4 1 M hingga pH 5. Setelah itu dimasukan ke dalam tebung reaksi sebanyak 15 ml untuk *agar* diri, 5 ml untuk *agar* miring dan sisanya ke dalam Erlenmeyer 250 ml untuk dijadikan stock, kemudian ditutup dengan sumbat, dan dimasukan ke dalam plastik tahan panas lalu disterilisasi dengan *autoclave* pada suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah itu, ditiriskan dan dimasukan ke dalam lemari pendingin untuk mencegah kontaminasi.

d. Peremajaan biakan mikroorganisme uji

Peremajaan khamir dilakukan pada *Laminar air flow* dengan alat dan bahan yang sudah disterilkan. Biakan murni (*K.marxianus* dan *P.stipitis*)

diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan pada medium agar miring (YEPD agar) dengan cara digesek pada permukaan medium, kemudian diinkubasi pada inkubator suhu 25°C selama 24 – 48 jam. Setelah dilihat adanya pertumbuhan khamir, khamir dimasukan ke dalam lemari pendingin untuk diawetkan.

e. Pembuatan Reagen DNS

Reagen DNS dibuat dengan cara menimbang 5 g NaOH, 91 g Kalium Natrium Tartrat, 5 g Na₂SO₃ dan 5 g Dinitro salisic acid. Bahan bahan tersebut kemudian dilarutkan ke dalam 500 ml akuades lalu di campurkan dan di homogenkan dengan menggunakan *magnetic stirrer*. Larutan yang sudah jadi disimpan dalam botol gelap dan suhu rendah. (Anam, 2010).

2. Tahap Penelitian

a. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Larutan standar glukosa dibuat dengan berbagai konsentrasi bertingkat glukosa dimulai dari 50 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml, 200 µg/ml, 250 µg/ml, 300 µg/ml, 350 µg/ml, 400 µg/ml, 450 µg/ml, dan 500 µg/ml. Larutan stok dibuat dengan 250 mg glukosa / 500 ml akuades. Setiap konsentrasi glukosa diambil 1 ml dan ditambahkan larutan DNS sebanyak 1.5 ml lalu di vorteks dan dididihkan selama 5 menit. Setelah itu, didinginkan selama 15 menit, apabila larutan terlalu pekat lakukan pengenceran dengan 10 ml akuades, setelah itu vorteks dan ukur pada spektrofotometer dengan absorbansi 540 nm. Setiap pengukuran kemudian dibuat garis regresi yang menunjukkan hubungan linier antara absorbansi dengan kadar glukosa. (Heryanto, 2012).

b. Pembuatan Kurva Tumbuh *P. stipitis* dan *K. marxianus*

Pembuatan kurva tumbuh bakteri ini dilakukan dengan metode turbidimetri dengan cara mengukur turbiditas atau kekeruhan menggunakan nilai *Optical Density* (OD). Pengukuran OD dilakukan menggunakan alat spektrofotometer. Satu ose *P.stipitis* dan *K.marxianus* dari agar miring diinokulasikan masing masing ke dalam 10 ml YEPD broth, kemudian di

shaker 120 rpm selama 24 jam pada suhu 30°C untuk diaktivasi. Setelah 24 jam, dipindahkan ke dalam 90 ml YEPD broth yang telah steril. Selanjutnya diukur pada spektrofotometer sebagai jam ke 0 dengan panjang gelombang 600nm. Selanjutnya diinkubasi kembali pada suhu 30°C dan dishaker dengan kecepatan 120 rpm. Pengukuran selanjutnya dilakukan setiap 2 jam hingga fase stationer. Pengamatan ini dilakukan dengan pengulangan 3 kali. (Heryanto, 2012)

c. Pembuatan Kurva Baku *P.stipitis* dan *K.marianus*

Pembuatan kurva baku yang dilakukan dengan menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC) dengan teknik *pour plate*. 1 ose masing masing kultur diinokulasi ke 10 ml YEPD broth, kultur dikocok pada *waterbath shaker* pada 150 rpm dengan suhu 30 °C selama 24 jam. Selanjutnya biakan dipindahkan pada labu erlenmeyer berisi 90 ml YEPD broth lalu dikocok dengan kecepatan 150 rpm dengan suhu 30°C selama waktu yang diinginkan. selanjutnya dilakukan pengenceran bertingkat 10^{-1} hingga 10^{-7} dengan memasukan ke dalam tabung reaksi pertama kemudian kocok maka konsentrasi larutan menjadi 10^{-1} kemudian pipet 1 ml larutan dari tabung pertama masukan ke tabung kedua dan kocok sampai homogen, konsentrasi larutan menjadi 10^{-2} demikian seterusnya hingga tabung ke tujuh. Ambil larutan dari tabung ke 5, ke 6 dan ke 7 masing masing 1 ml dengan menggunakan pipet steril dan memasukan ke dalam cawan petri steril, masukkan 9 ml YEPD agar ke dalam cawan petri yang berisi larutan sampel lalu goyangkan hingga homogen dengan cara memutar cawan petri searah jarum jam dan berlawanan jarum jam. Setelah itu di inkubasi pada suhu 26°C selama waktu 24-48 jam. Apabila sudah selesai di inkubasi maka selanjutnya di hitung jumlah koloni menggunakan colony counter (Anugrahini, 2011).

d. Praperlakuan Jerami Padi

Jerami padi yang telah diperoleh dicuci bersih lalu dijemur hingga kering. Selanjutnya, dipotong hingga ukuran kecil ± 1 cm kemudian digiling dengan blender. Hasil blender kemudian diayak dengan menggunakan ayakan

50 Mesh dilanjutkan dengan 100 Mesh. Hasil dari ayakan 100 Mesh berupa serbuk yang nantinya akan digunakan untuk proses selanjutnya yaitu delignifikasi dan hidrolisis asam dan enzimatik.

e. Delignifikasi serbuk jerami padi

Serbuk jerami padi yang telah didapatkan dari proses penggilingan dimasukan ke dalam larutan 2% NaOH dengan rasio cairan dan substrat sebesar 10 : 1. Seratus gram serbuk jerami padi dimasukan ke Erlenmeyer 2 L lalu ditambahkan 1 L NaOH 2%. Setelah itu, Erlenmeyer ditutup dengan sumbat dan *aluminium foil*, kemudian di *autoclaving* dengan suhu 121 °C, 1 atm selama 20 menit. Setelah selesai proses *autoclaving*, substrat serbuk jerami padi dicuci dengan air mengalir hingga substrat memiliki pH normal 6 – 7. Setelah mencapai pH normal, substrat dikeringkan dalam oven dengan suhu 60 °C selama 24 jam. Apabila substrat sudah kering masukan ke dalam *freezer* agar tidak terjadi kontaminasi (Remli *et al.*, 2014).

f. Hidrolisis asam dan enzimatik

Substrat serbuk jerami padi yang telah didelignifikasi selanjutnya dilakukan uji pendahuluan hidrolisis menggunakan asam kuat H₂SO₄ dengan konsentrasi bermacam macam, yaitu H₂SO₄ 1 M, H₂SO₄ 2M, dan H₂SO₄ 3M Hal ini dilakukan untuk mengetahui hidrolisis terbaik dari ketiga konsentrasi tersebut. Serbuk jerami padi (5%) masing masing dimasukan ke dalam labu Erlenmeyer 250 ml dan dicampur masing masing dengan 100 ml H₂SO₄ 1 M, H₂SO₄ 2M, dan H₂SO₄ 3M. Selanjutnya, setiap labu dilakukan *autoclaving* dengan suhu 121 °C, 1 atm dan waktu selama 60 menit. Setelah itu, dilakukan *adjust* pH dengan menggunakan 6 M NaOH hingga pH 5.5 yang nantinya akan digunakan dalam proses hidrolisis enzimatik (Shi *et al.*, 2012). Tahap selanjutnya adalah mengukur gula yang dihasilkan dengan metode DNS. Hasil hidrolisis terbaik dilakukan dengan proses yang sama namun substrat yang digunakan sebesar 50 gram.

Proses selanjutnya yaitu hidrolisis enzimatik menggunakan enzim hemiselulase H2125 *Aspergillus niger* Sygma Aldrich dan enzim selulase

Novozyme Cellusoft L . Hasil hidrolisis asam yang telah di *adjust* pH dicampur dengan buffer asetat 50 mM pH 5 hingga konsentrasi substrat sebesar 5 % (b/v) kemudian ditambahkan Tween 80 0.1% (b/v). Hidrolisis dilakukan dalam *water bath shaker* dengan suhu 50 °C dengan 100 rpm. Hidrolisis diawali dengan enzim hemiselulase H215 *Aspergillus niger* *Syigma Aldrich* 0,001 gr/gr selama 270 menit kemudian dilanjutkan dengan hidrolisis enzim selulase *Novozyme Cellusoft L* sebanyak 0,12 mL/ gram substrat selama 72 jam. Selanjutnya dilakukan inaktivasi enzim pada suhu 100 °C selama 20 menit. Gula hasil hidrolisis enzim hemiselulase dan enzim selulase diukur masing masing dengan menggunakan metode DNS. (Inggrid *et al.*, 2012 ; Nakagame *et al.*, 2011 ; Chen *et al.*, 2014)

- g. Fermentasi gula hidrolisat jerami padi menggunakan kultur tunggal dan kultur campuran *Kluyveromyces marxianus* dan *Pichia stipitis*.

1) Pembuatan starter fermentasi

Biakan murni (*K. marxianus* dan *P. stipitis*) diambil sebanyak 1 ose diinokulasi masing masing ke dalam Erlenmeyer 150 yang berisikan medium YEPD broth sebanyak 50 ml dengan pH 5.5, lalu di inkubasikan pada suhu 30°C selama 24 jam (Aktivasi I). Sebanyak 10 ml dari aktivasi (10%) dipipet dan diinokulasi kembali ke dalam 90 ml YEPD broth lalu di inkubasi lagi pada suhu 30°C dan di shaker 100 rpm selama 24 jam (Aktivasi II). Sebanyak 10 ml dari aktivasi II (10%) dipipet dan diinokulasi kembali ke medium fermentasi yang telah diberi nutrisi dan gula hidrolisat serbuk jerami padi sebanyak 90 ml lalu diinkubasi hingga waktu fase log pertumbuhan tertinggi *K.marxianus* dan *P.stipitis* (sesuai dengan kurva tumbuh) (Aktivasi III). (Kusumaningati *et al*, 2013)

2) Fermentasi

Medium fermentasi berisi gula hidrolisat serbuk jerami padi dan nutrisi (mineral) sebanyak 90 ml pada masing masing botol fermentasi. Nutrisi yang ditambahkan pada medium fermentasi yaitu 0.1 % yeast extract, peptone, KH_2PO_4 dan 0,05 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Setelah

itu disterilisasi selama 20 menit lalu fermentasi dilakukan setelah starter mencapai aktivasi III yang telah mencapai pertumbuhan tertinggi pada kurva tumbuh dengan 10% starter inokulum aktivasi II. Starter yang dimasukan yaitu *P.stipitis*, *K.marxianus* dan konsorsium *P.stipitis-K.marxianus*. Setelah itu diinkubasi pada suhu 30°C dari jam ke 0 hingga 96 dengan pencuplikan sampel setiap 12 jam dengan mengukur kadar gula, kadar etanol, dan jumlah sel. (Peristiwati, 2011)

3. Pengukuran Parameter

a. Uji gula pereduksi

Uji gula pereduksi dilakukan dengan menggunakan reagen DNS. Proses yang dilakukan ini sama dengan proses pembuatan kurva standar glukosa, namun 1 ml gula baku diganti dengan 1 ml sampel. Pengukuran hasil absorbansi dimasukan ke dalam rumus kurva baku, sehingga didapatkan kadar gula hidrolisat dari masing masing perlakuan hidrolisis asam dan hidrolisis enzimatik. Pengujian gula pereduksi dilakukan setiap 12 jam sama dengan proses pengambilan sampel yang lainnya.

b. Pengukuran biomassa sel

Pengukuran biomassa sel menggunakan teknik *Total Plate Count*. Pertama, dibuat pengenceran sampel dari sampel yang akan diperiksa mulai dari pengenceran 10^{-1} , hingga 10^{-7} dengan memasukan sampel ke dalam tabung reaksi pertama kemudian homogenkan maka konsentrasi larutan menjadi 10^{-1} kemudian pipet 1 ml larutan dari tabung pertama masukan ke tabung kedua dan kocok sampai homogen, konsentrasi larutan menjadi 10^{-2} demikian selanjutnya hingga tabung ke tujuh. Larutan dari tabung ke 5, ke 6 dan ke 7 diambil masing masing 1 ml dengan menggunakan pipet steril dan memasukan ke dalam cawan petri steril, masukkan 9 ml YEPD agar ke dalam cawan petri yang berisi larutan sampel lalu goyangkan hingga homogen dengan cara memutar cawan petri searah jarum jam dan berlawanan jarum jam. Setelah itu di inkubasi pada suhu 26°C selama waktu 24-48 jam. Apabila sudah selesai di inkubasi maka selanjutnya di hitung jumlah koloni menggunakan *colony counter*.

c. Uji HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*)

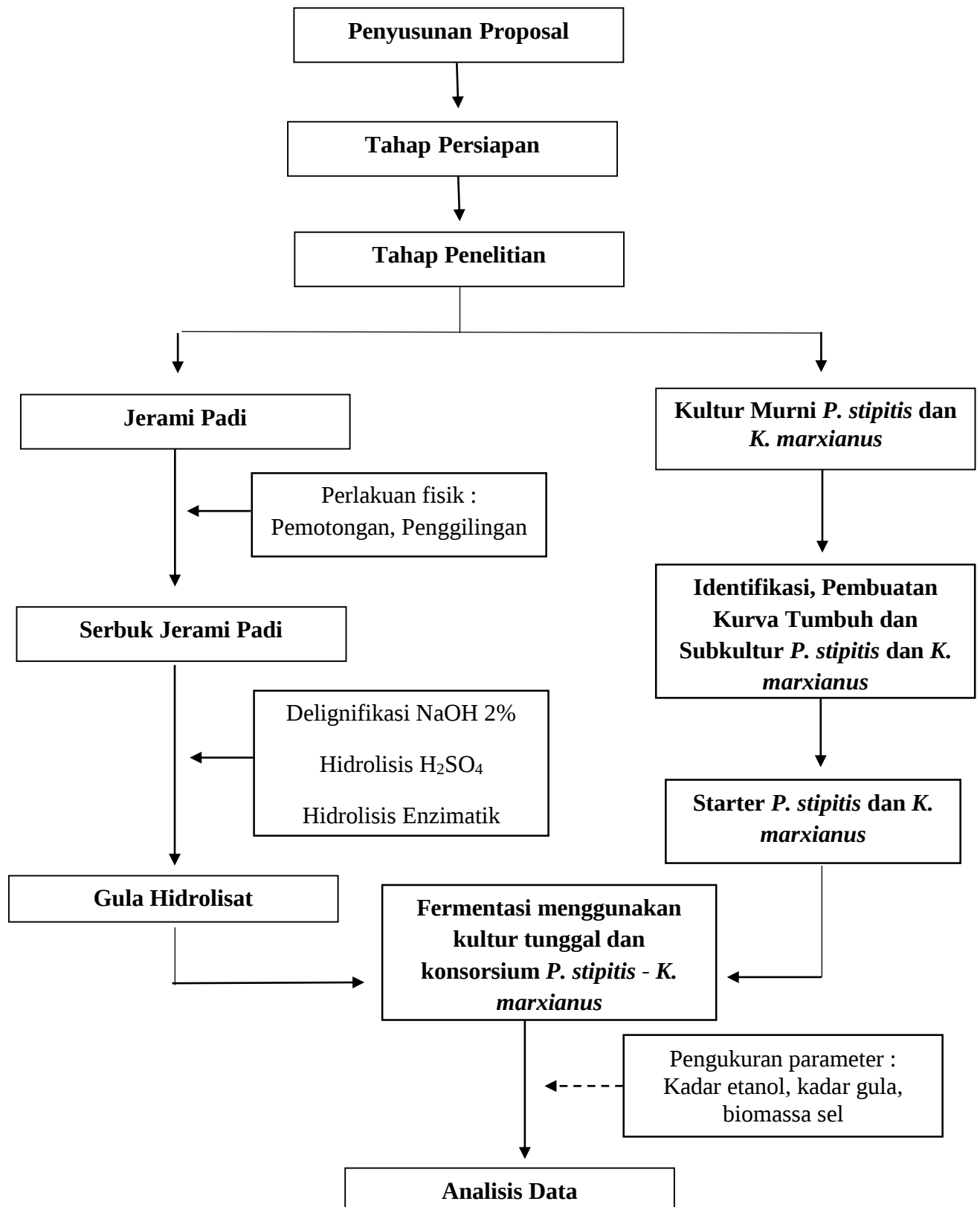
Uji HPLC digunakan untuk mengetahui kadar alkohol yang ada pada sampel fermentasi. Kondisi HPLC yang digunakan yaitu :

Kolom	: Animex HPX-87H Ion Exclusion Column
Detektor	: Refractive Index
Fase Gerak	: H ₂ SO ₄ 0,008 N
Laju Alir	: 1 ml/min
Volume Injek	: 10µl
Suhu Kolom	: 35°C
Suhu Detektor	: 35°C

G. Analisis Statistika

Untuk menganalisis data digunakan program SPSS 16 *for Windows*. Analisis data yang dilakukan yaitu hasil penurunan kadar gula dan hasil kadar etanol selama proses fermentasi. Pengolahan data di desain dengan perhitungan Rancangan acak lengkap faktorial, yang dimulai dengan uji anova untuk menganalisis interaksi antar faktor, kemudian dilanjutkan dengan uji post hoc Duncan untuk menganalisis pengaruh setiap faktor terhadap hasil.

H. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian.

Agung Novianto, 2017

PRODUKSI ETANOL DARI GULA HIDROLISAT SERBUK JERAMI PADI

Universitas Pendidikan Indonesia | Respository.upi.edu | Perpustakaan