

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode penelitian kuantitatif karena meneliti suatu fenomena yang konkrit dan terukur. Metode ini digunakan untuk meneliti suatu populasi atau sampel tertentu dengan analisis data yang bersifat kuantitatif (Sugiyono, 2013).

Jenis penelitian ini merupakan penelitian eksperimen karena digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap suatu hal dalam kondisi yang dikendalikan (Sugiyono, 2013). Adapun objek dalam penelitian ini adalah gula hidrolisat jerami padi. Pengamatan dilakukan terhadap produksi etanol hasil fermentasi dari gula hidrolisat serbuk jerami padi oleh *Zymomonas mobilis* dan *Pichia stipitisserta* konsorsiumnya (kultur campuran *Z. mobilis*-*P. stipitis*) setiap 12 jam selama 72 jam.

B. Desain Penelitian

Menguji kemampuan mikroba uji pada fermentasi gula hidrolisat jerami padi. Serbuk jerami padi berukuran 100 mesh diberi praperlakuan berupa delignifikasi menggunakan larutan NaOH, kemudian dihidrolisis menggunakan H₂SO₄, enzim selulase dan hemiselulase komersial untuk mendapatkan gula monomer yang dapat difermentasi. Gula hidrolisat yang diperoleh kemudian digunakan sebagai substrat fermentasi.

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) pola faktorial 3x8=24 perlakuan dengan tiga kali pengulangan. Faktor pertama adalah kultur mikroba fermenter yang digunakan, yaitu kultur tunggal *Z. mobilis* dan *P. stipitis* serta kultur campuran *Z. mobilis*-*P. stipitis*. Faktor kedua adalah waktu, yaitu 0 jam, 12 jam, 24 jam, 36 jam, 48 jam, 60 jam, dan 72 jam. Variabel terikatnya yaitu kadar etanol, kadar gula, dan biomassa sel. Rancangan matriks penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 3.1.

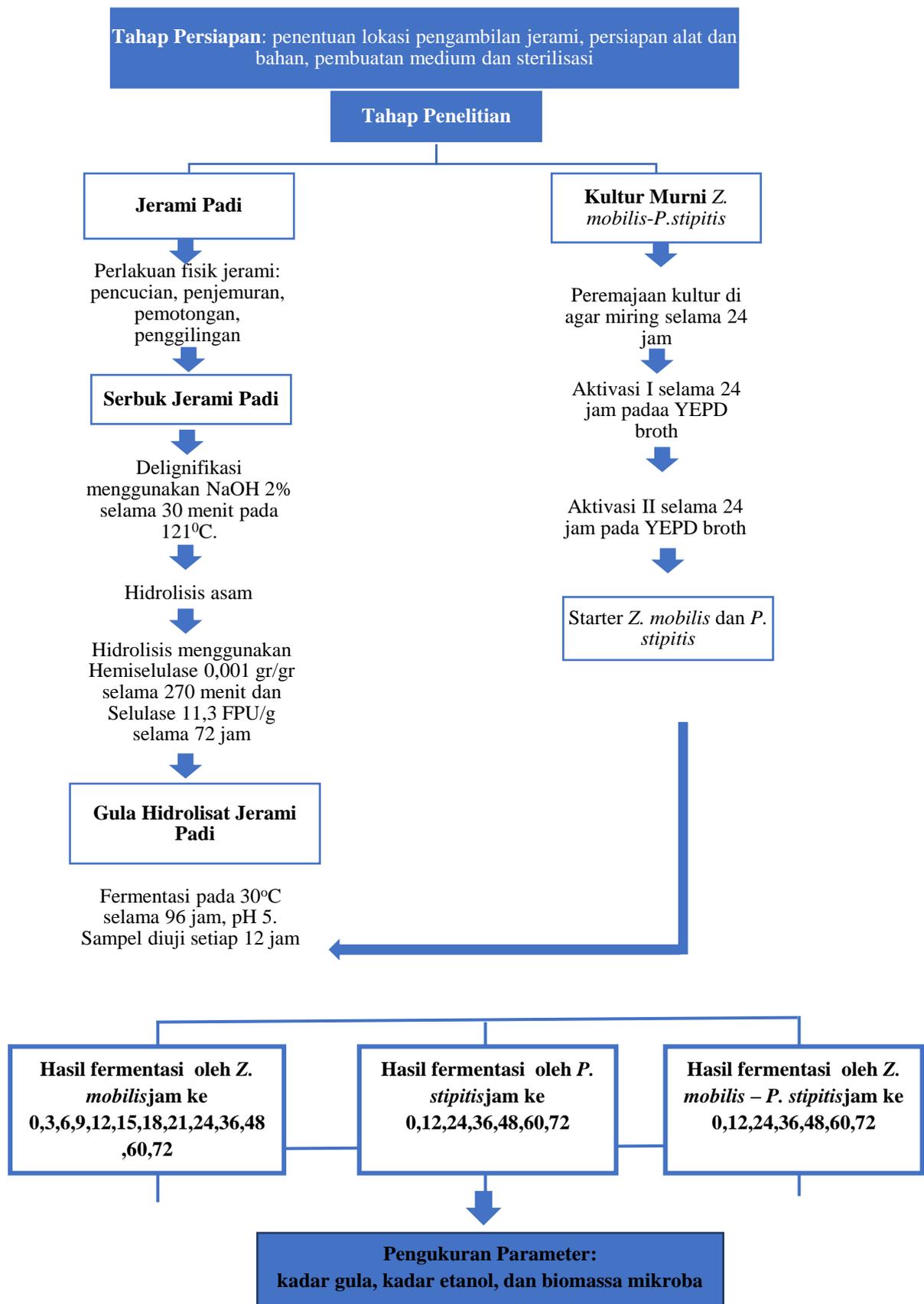
Tabel 3.1. Rancangan matriks pengaruh waktu dan jenis mikroba pada fermentasi hidrolisat jerami padi terhadap kadar gula reduksi, kadar etanol, biomassa sel dan pH medium.

Jenis Mikroba \ Waktu (Jam)	<i>P. stipitis</i>			<i>Z. mobilis</i>			<i>Z. mobilis – P. stipitis</i>		
	A	B	C	A	B	C	A	B	C
0									
12									
24									
36									
48									
60									
72									

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

Penelitian ini dilakukan melalui tiga tahapan diantaranya tahap persiapan, tahap penelitian dan tahap pengukuran parameter. Tahap persiapan terdiri dari penentuan lokasi pengambilan jerami, persiapan alat dan bahan, pembuatan medium pertumbuhan mikroba serta sterilisasi alat dan bahan. Tahap penelitian meliputi pembuatan kurva tumbuh dan kurva baku *Z. mobilis* dan *P. stipitis*, pembuatan kurva standar glukosa, pembuatan gula hidrolisat jerami padi, dan fermentasi. Gula hidrolisat dari jerami padi kemudian digunakan sebagai substrat untuk menghasilkan etanol. Parameter penelitian yang diukur meliputi kadar gula, kandungan alkohol secara kualitatif dan kuantitatif, serta biomassa sel mikroba.

Diagram alir tahapan penelitian disajikan pada Gambar 3.1.



Gambar 3.1. Diagram Alir Penelitian

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah seluruh gula hidrolisat yang dihasilkan dari hidrolisis enzimatis serbuk jerami padi. Sampel penelitian ini adalah gula hidrolisat yang digunakan dalam fermentasi, diambil secara acak dari seluruh gula hidrolisat yang dihasilkan. Teknik sampling yang digunakan yaitu *simple random sampling* karena populasi dianggap homogen.

D. Waktu dan Lokasi Penelitian

Penelitian dilaksanakan selama sembilan bulan dari bulan April 2016 hingga Januari 2017, bertempat di Laboratorium Riset (B-307) gedung FPMIPA B, Universitas Pendidikan Indonesia, Jalan Dr. Setiabudhi No. 229, Bandung.

E. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Penentuan lokasi pengambilan jerami.

Penentuan lokasi ini melihat pada keadaan lingkungan yang merupakan areal persawahan yang dapat diambil jeraminya yaitu di daerah Soreang, Kabupaten Bandung.

b. Persiapan alat dan bahan

Disiapkan seluruh alat dan bahan yang dibutuhkan kemudian diperiksa ketersediaan dan keberfungsian.

c. Pembuatan medium pertumbuhan khamir.

Medium pertumbuhan khamir menggunakan YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose), cara membuatnya yaitu dengan mencampurkan 1% yeast extract, 2% pepton, 2% dextrose, 1,5% agar (untuk medium agar) atau 1% yeast extract, 2% pepton, 2% dextrose (untuk medium broth) yang kemudian dilarutkan dalam aquades (Stanley *et al.*, 2010; Yadav *et al.*, 2011). Setelah itu, medium kemudian diaduk dan dipanaskan di atas hot plate lalu pH medium dicek dan diatur sampai pH 5 menggunakan larutan H₂SO₄ 1M atau NaOH 1M. Medium kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml untuk agar miring, dan dimasukkan sebanyak 100 ml ke dalam erlenmeyer untuk medium broth. Tabung

reaksi dan erlenmeyer tersebut ditutup dengan sumbat dan dimasukkan kedalam plastik tahan panas untuk kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 120°C, tekanan 15 psi selama 15 menit. Setelah tahap sterilisasi selesai, medium diturunkan suhunya pada suhu ruangan kemudian dimasukkan kedalam lemari pendingin untuk menghindari kontaminasi.

d. Sterilisasi alat dan bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan dibungkus menggunakan plastik tahan panas, untuk kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C, tekanan 15 psi selama 15 menit.

e. Peremajaan biakan mikroorganisme uji

Biakan murni *Z. mobilis* dan *P. stipitis* diambil sebanyak 1 ose dan diinokulasikan pada medium YEPD agar miring yang baru dan steril, kemudian diinkubasi pada suhu 25-30°C selama 24-48 jam. Kultur murni yang telah diremajakan disimpan ke dalam lemari pendingin untuk menghentikan sementara pertumbuhannya.

2. Tahap Penelitian

a. Pembuatan kurva standar glukosa

Membuat kurva standar glukosa dilakukan dengan mengukur kadar glukosa pada blanko dan larutan glukosa bertingkat dengan konsentrasi 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, 500 µg/ml. Blanko yang digunakan yaitu akuades. Pertama, diambil 0,5 ml larutan yang akan diuji, kemudian ditambahkan 0,75 ml larutan *Dinitrosalicylic Acid* (DNS), diaduk pada vortex. Setelah itu, larutan dididihkan selama 5 menit dan didinginkan. Setiap larutan kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 540 nm menggunakan spektrofotometer. Nilai absorbansi yang didapat dan konsentrasi glukosanya dimasukkan ke dalam kurva dengan konsentrasi gula sebagai sumbu y dan nilai absorbansi sebagai sumbu x sehingga didapatkan persamaan regresinya (Miller dalam Juara, 2011). Persamaan regresi yang diperoleh dapat digunakan untuk menentukan kadar gula pada sampel hasil hidrolisis dan fermentasi.

b. Pembuatan kurva tumbuh mikroorganisme uji

Mikroorganisme yang telah diinkubasi 24 jam di agar miring YEPD dibuat suspensi dengan cara menginokulasikan mikroorganisme tersebut ke dalam larutan NaCl 0,85% steril sampai kekeruhannya menyamai kekeruhan pada larutan standar McFarland 0,5 (setara dengan $1,5 \times 10^8$ CFU/ml) (Prolab, 2012). Lalu sebanyak 5% (v/v) suspensi dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi medium YEPD *broth* dengan pH 5 (Peristiwati, 2011). Selanjutnya kultur tersebut diinkubasi pada suhu 30°C , sekaligus dikocok 120 rpm selama 24 jam. Tahap ini merupakan aktivasi I Kemudian dilakukan aktivasi II dengan cara diambil 10% (v/v) kultur dari aktivasi I dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi medium YEPD *broth* dengan pH 5. Sampel diambil setiap interval dua jam sebanyak 2 ml lalu dimasukkan ke dalam kuvet. Sampel diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Selanjutnya dibuat kurva tumbuhnya yang didasarkan pada hubungan nilai absorbansi (Sumbu Y) dengan waktu (sumbu X). Umur kultur saat mencapai fase logaritmik (eksponensial) dapat diketahui berdasarkan kurva tumbuh tersebut (Cappuccino dan Sherman, 1987; Yadav *et al.*, 2011).

c. Pembuatan kurva baku mikroorganisme uji

Pembuatan kurva baku mikroorganisme uji dilakukan dengan metode TPC (*Total Plate Count*). Seluruh tahapan dilakukan dengan kondisi aseptik guna menghindari kontaminasi. Pembuatan kurva baku didasarkan pada kurva tumbuh, yaitu pada saat pertumbuhan mikroba mengalami fase logaritmik. Sampel pada saat fase logaritmik diambil 1 ml, kemudian dimasukkan ke dalam 9 ml akuades steril dan dihomogenkan, campuran ini merupakan pengenceran 10^{-1} . Selanjutnya dari pengenceran 10^{-1} diambil 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml akuades steril lainnya kemudian dihomogenkan kembali. Campuran ini merupakan pengenceran 10^{-2} . Begitu seterusnya hingga didapatkan pengenceran 10^{-7} . Diambil dari pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} dan 10^{-7} masing-masing sebanyak 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri steril.

Media agar YEPD sebanyak 10 ml dituangkan ke dalam cawan petri tersebut dan segera ditutup, kemudian diputar membentuk angka delapan sebanyak tiga kali agar medium agar dan pengenceran kultur tercampur merata. Setelah medium membeku, cawan petri dilapisi plastik wrap kemudian diinkubasi pada 30⁰C selama 24 jam dan dihitung jumlah koloni yang tumbuh pada medium.

Jumlah sel mikroba yang terdapat dalam sampel dihitung dengan cara mengalikan jumlah koloni dengan faktor pengenceran dari cawan petri tersebut (Kurnia, 2011; Sanjaya, 2013). Kurva baku dibuat berdasarkan hubungan nilai absorbansi (sumbu x) dan data log jumlah sel (sumbu y) sehingga didapatkan garis linier dan persamaan regresinya. Melalui kurva baku tersebut, dapat diketahui waktu pada saat kultur mengalami laju pertumbuhan tertinggi yang akan dijadikan sebagai waktu pencuplikan untuk starter fermentasi.

d. Pembuatan gula hidrolisat jerami padi

1) Perlakuan fisik

Jerami padi dikeringkan dengan menggunakan oven hingga teksturnya rapuh kemudian dipotong-potong sampai berukuran 3-5 cm. Kemudian jerami diblender dalam keadaan kering hingga menjadi serbuk. Serbuk jerami kemudian disaring menggunakan sieve berukuran 50 dan 100 mesh sampai didapat serbuk yang berukuran 100 mesh.

2) Delignifikasi

Serbuk jerami yang telah disaring hingga berukuran 100 mesh dicampurkan dengan larutan NaOH 2% dengan perbandingan substrat dan pelarut 12,5% (b/v) selama 30 menit pada suhu 121⁰C dan tekanan 15 psi. Air hasil delignifikasi dibuang dan jeraminya dibilas dengan air mengalir hingga pH 7, kemudian dibilas kembali menggunakan aquades. Serbuk tersebut kemudian dikeringkan menggunakan oven pada suhu 65⁰C, selama 12 jam (Kim dan Lee, 2007; Sun dan Tao, 2013; McIntosh dan Vancov, 2011).

3) Hidrolisis Asam

Substrat serbuk jerami padi yang telah didelignifikasi selanjutnya dilakukan tahap hidrolisis asam. Serbuk jerami padi (5%) dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer 250 ml dan dicampur dengan 100 ml 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 enzimatis (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.

4) Hidrolisis enzimatis

Substrat hasil delignifikasi dicampur dengan larutan buffer asetat 50 mM pH 5,5 sampai konsentrasi substrat menjadi 5%(b/v), kemudian ditambahkan Tween 80 0,1% (b/v). Campuran ini diukur kembali pH nya dan diatur sampai 5,5. Hidrolisis dilakukan pada incubator shaker dengan suhu 50⁰C, 100 rpm. Pertama, menggunakan enzim hemiselulase H2125 *Aspergillus niger* Sygma-Aldrich 0,001 gr/gr selama 270 menit, kemudian menggunakan enzim selulase Celluclast 1.5L Novozyme 11,3 FPU/g selama 72 jam. Setelah itu, dilakukan inaktivasi enzim dengan memanaskan hasil hidrolisis pada suhu 100⁰C, selama 20 menit. Hasil hidrolisis kemudian disentrifugasi pada 8000g selama 5 menit dan diambil supernatannya untuk diuji kadar gula menggunakan larutan DNS, kemudian disimpan dalam lemari pendingin untuk menghindari kontaminasi (Nakagame *et al.*, 2011; Lan *et al.*, 2013).

e. Pembuatan starter fermentasi

Dilakukan aktivasi I dengancara membuat suspensi mikroorganisme ke dalam larutan NaCl steril 0,85% sampai kekeruhannya menyamai kekeruhan pada larutan standar McFarland 0,5 (setara dengan 1,5x10⁸CFU/ml) (Prolab, 2012). Lalu sebanyak 5% (v/v) suspensi dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang telah berisi medium YEPD *broth* dengan pH 5 (Peristiwa, 2011). Selanjutnya diinkubasi

pada suhu 30⁰C sekaligus diaduk 120 rpm selama 24 jam. Kemudian dilakukan aktivasi II dengan memasukkan 10% (v/v) kultur ke dalam erlenmeyer yang telah berisi medium YEPD *broth* dengan pH 5 dan diinkubasi kembali. Lama inkubasi tergantung dari kurva baku mikroba yang telah dibuat yaitu pada jam mikroba mengalami laju pertumbuhan tertinggi. Dibuat tiga macam kultur, yaitu *Z. mobilis*, *P. stipitis*, dan konsorsium *Z. mobilis-P. stipitis*.

f. Pembuatan Medium Fermentasi

Sebelum melakukan fermentasi yang pertama dilakukan adalah dengan membuat medium fermentasi yaitu dengan mencampurkan 0,1% yeast extract, pepton, NH₄Cl, KH₂PO₄, serta 0,05% MgSO₄.7H₂O, MnSO₄.5H₂O, CaCl₂.2H₂O, FeCl₃.2H₂O dan ZnSO₄.7H₂O, kemudian dilarutkan dalam gula hidrolisat. Setelah disterilisasi, media fermentasi dimasukkan masing-masing 10% starter *Z. mobilis*, *P. stipitis* dan konsorsium *Z. mobilis* dan *P. stipitis* yang sedang dalam keadaan laju pertumbuhan tertinggi.

g. Fermentasi

Medium fermentasi yang telah diberi inokulum mikroba kemudian diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 96 jam, pH 5. Sampel diambil setiap 3 jam dari jam ke-0 hingga jam ke 24 untuk *Z. mobilis* sedangkan untuk sampel dari mikroba lainnya diambil setiap 12 jam selama masa inkubasi. Sampel yang diambil nantinya akan digunakan untuk diuji kadar gula dan alkoholnya.

3. Pengukuran parameter

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

HPLC merupakan salah satu metode kromatografi cair yang menggunakan fasa diam yang ditempatkan dalam suatu kolom tertutup dan juga fasa geraknya berupa pelarut yang dialirkan dengan cepat ke dalam kolom dengan bantuan pompa/tekanan (Anshori, 2007). Dengan menggunakan HPLC, akan didapatkan konsentrasi alkohol dalam larutan.

Dari data yang diperoleh, dihitung rendemen dan efisiensi fermentasi. Rendemen merupakan perbandingan antara volume etanol

yang diperoleh dengan bobot substrat. Sedangkan efisiensi fermentasi merupakan presentase perbandingan antara konsentrasi etanol yang diperoleh dengan konsentrasi etanol secara teoritis (Arnata, 2009).

$$\text{Rendemen } \left(\frac{b}{b} \right) = \frac{\text{volume etanol yang diperoleh}}{\text{bobot substrat jerami padi}}$$

$$\text{Efisiensi fermentasi (\%)} = \frac{\text{konsentrasi etanol yang diperoleh}}{\text{konsentrasi etanol secara teoritis}} \times 100\%$$

b. Pengukuran kadar glukosa

Mengukur kadar glukosa dilakukan melalui tahapan yang sama pada pembuatan kurva standar glukosa. Namun, sampel yang diukur merupakan sampel yang dicuplik dari medium fermentasi setiap 12 jam. Nilai absorbansi yang didapat dimasukkan pada persamaan regresi kurva standar glukosa sehingga didapatkan konsentrasinya.

c. Pengukuran biomassa sel mikroorganisme.

Penghitungan biomassa sel mikroorganisme uji dilakukan dengan metode TPC (Total Plate Count). Sampel yang dicuplik setiap 12 jam dihitung biomassa selnya. Metode yang dilakukan sama dengan metode pembuatan kurva baku namun sampel merupakan hasil proses fermentasi dari gula hidrolisat jerami padi setiap 12 jam sampai 72 jam oleh *Z. mobilis*, *P. stipitis* serta konsorsiumnya, sehingga dapat diketahui jumlah sel mikroba pada setiap interval waktu fermentasi.