

III. METODE PENELITIAN

3.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia dan Biokimia Hasil Pertanian, Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian, dan Laboratorium Instrumen Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung pada bulan Desember 2014 sampai dengan Mei 2015.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah jerami padi yang diperoleh dari persawahan di Kabupaten Pringsewu, enzim selulase (SQzyme CSP-B) yang diperoleh dari Suntaq International Limited di Shenzhen, China, kultur *Saccharomices cerevisiae* komersial, ekstrak khamir, peptone, dekstrose, sodium hidroksida (NaOH), air suling, asam sulfat (H₂SO₄), Nelson A, Nelson B dan arsenomolibdat yang didapatkan dari Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung.

Alat-alat yang digunakan antara lain mikropipet (Thermo Scientific, Finnpiquette F3), oven (Philip Harris Ltd), timbangan 4 digit (Mettler M3000 Swiszerlan), grinder, ayakan (40 mesh), *shaker waterbath* (Polyscience), inkubator (Memmert), kertas saring, jerigen, *glasswares*, alumunium foil, cawan

porselin, desikator, hot plate (Cimerec3), sentrifuge (Thermo Electron Corporation, Model IEC Centra CL2, made in China), autoklaf (WiseclaveTM), dan spektrofotometer (Milton Ray Company).

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan 3 tahap, yaitu tahap optimasi konsentrasi substrat, tahap optimasi konsentrasi enzim, dan tahap SSF. Tahap optimasi konsentrasi substrat dilakukan dengan perlakuan tunggal, yaitu konsentrasi 6; 8; 10 dan 12% (b/v). Setelah mendapatkan konsentrasi substrat optimal, selanjutnya dilakukan tahap optimasi konsentrasi enzim dengan perlakuan tunggal, yaitu konsentrasi 20; 25; 30 dan 35 FPU/g selulosa. Kedua tahapan perlakuan ini bertujuan untuk mengetahui konsentrasi substrat dan konsentrasi enzim yang optimal dalam menghasilkan kadar gula reduksi tertinggi untuk diaplikasikan pada tahap SSF. Selanjutnya, tahap SSF dilakukan dengan perlakuan tunggal, yaitu lama waktu prehidrolisis 0 jam (tanpa prehidrolisis), 12 jam, dan 24 jam sebelum SSF. Pada tahap SSF dilakukan pengamatan kadar gula reduksi awal sebelum SSF dan kadar etanol yang terbentuk. Semua tahap diulang sebanyak 3 kali. Kemudian data hasil pengamatan disajikan dalam bentuk tabel dan grafik serta dianalisis secara deskriptif.

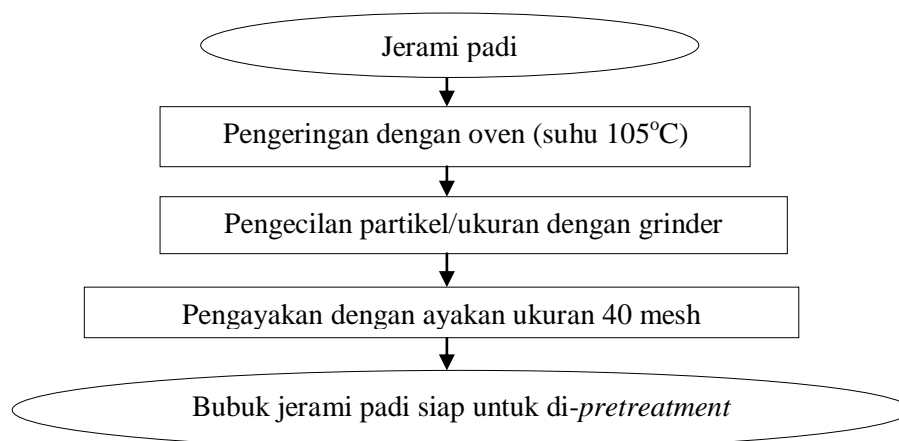
3.4 Pelaksanaan Penelitian

Sebelum melaksanakan penelitian di atas, jerami padi diperkecil ukuran hingga 40 mesh, kemudian jerami padi di-*pretreatment* untuk menghilangkan

lignin pada serat holoselulosa. Selanjutnya holoselulosa jerami padi hasil *pretreatment* tersebut akan dijadikan bahan baku pada tahap optimasi konsentrasi substrat, tahap optimasi konsentrasi enzim, dan tahap SSF. Tahapan-tahapan pada penelitian ini diuraikan pada subbab berikut.

3.4.1 *Pretreatment* Menggunakan Basa

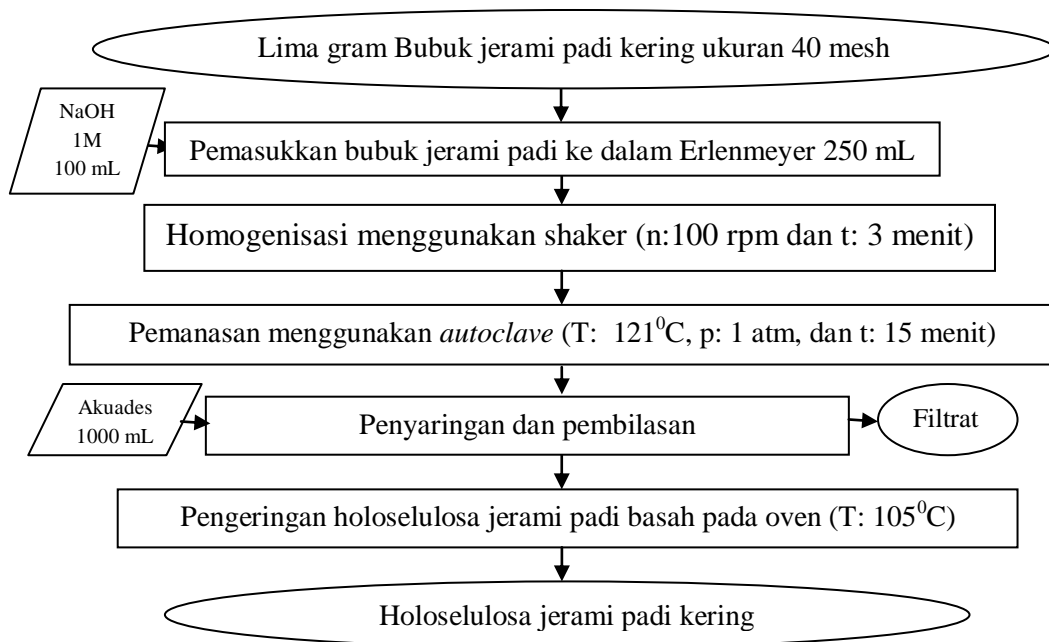
Proses persiapan jerami padi dilakukan menurut metode Samsuri *et al.* (2007) (Gambar 8).. Jerami padi dikeringkan hingga kadar air 0% (berat konstan) menggunakan oven pada suhu 105°C. Jerami kering kemudian dibuat menjadi bubuk menggunakan grinder dan diayak dengan ayakan ukuran 40 mesh. Bubuk jerami padi yang sudah kering dengan ukuran 40 mesh selanjutnya disimpan pada kondisi kering dan wadah tertutup sebelum digunakan untuk tahap selanjutnya.



Gambar 8. Diagram alir proses persiapan bahan baku (Samsuri *et al.*, 2007).

Pretreatment menggunakan basa dilakukan dengan menggunakan metode Sutikno *et al.* (2010) (Gambar 9). *Pretreatment* bertujuan untuk menghilangkan lignin pada struktur lignoselulosa sehingga selulosa mudah didegradasi oleh enzim selulase menjadi glukosa dan kemudian difermentasi oleh khamir menjadi etanol. Lima gram bubuk jerami kering dengan ukuran 40 mesh dimasukkan dalam

Erlenmayer ukuran 250 mL dan kemudian ditambah 100 mL larutan NaOH 1 M. Setelah itu, sampel dihomogenisasi menggunakan *shaker* dengan kecepatan 100 rpm selama 3 menit dan dipanaskan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah selesai dipanaskan, sampel disaring dan dibilas dengan 1000 mL akuades untuk menghilangkan lignin. Bagian padat holoselulosa jerami padi dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai berat konstan.



Gambar 9. Diagram alir proses *pretreatment* menggunakan basa (Sutikno *et al.*, 2010).

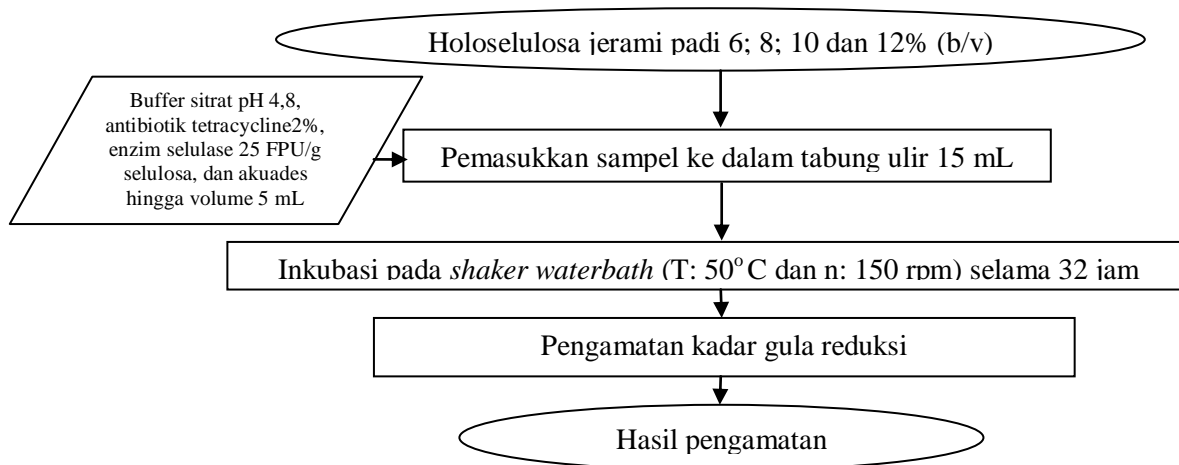
3.4.2 Tahap Optimasi Hidrolisis

Tahap optimasi hidrolisis terdiri atas 2 tahap dengan perlakuan tunggal yaitu: optimasi konsentrasi substrat (6; 8; 10 dan 12% (b/v)) dan optimasi konsentrasi enzim (20; 25; 30 dan 35 FPU/g selulosa). Tahap optimasi hidrolisis dilakukan menurut metode SSF Dowe dan McMillan (2008), namun pada metode ini dilakukan tanpa penggunaan media nutrisi dan ragi karena hanya akan dilakukan proses hidrolisis. Selain itu, metode ini dimodifikasi menggunakan

volume 5 mL untuk efisiensi bahan baku. Tahapan-tahapan tersebut masing-masing diuraikan sebagai berikut.

3.4.2.1 Optimasi Konsentrasi Substrat

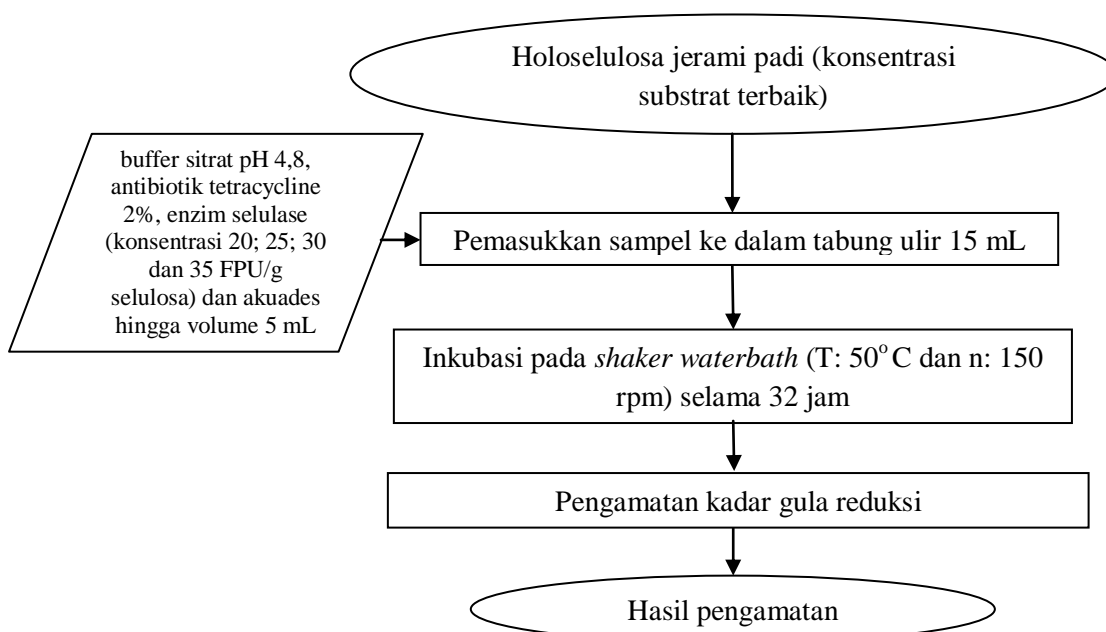
Optimasi konsentrasi substrat dilakukan menurut metode SSF Dowe dan McMillan (2008) yang telah dimodifikasi (Gambar 10). Holoselulosa jerami padi kering hasil *pretreatment* disiapkan dengan berbagai konsentrasi substrat (6; 8; 10 dan 12% (b/v)). Sampel dimasukkan ke dalam tabung ulir dengan ukuran 15 mL, ditambahkan 0,25 mL buffer sitrat pH 4,8, 0,20 mL antibiotik tetracycline 2%, 0,128 mL; 0,169 mL; 0,209 mL; dan 0,250 mL enzim selulase dengan konsentrasi 25 FPU/g selulosa (perhitungan penggunaan enzim dapat dilihat pada Lampiran 2), dan akuades hingga total volume menjadi 5 mL. Setelah itu, sampel diinkubasi pada suhu 50°C dan kecepatan shaker 150 rpm selama 32 jam. Pada waktu inkubasi 8, 16, 24 dan 32 jam, filtrat diambil dan dianalisis gula reduksinya. Hasil pengamatan kadar gula reduksi tersebut dianalisis secara deskriptif untuk menentukan konsentrasi terbaik yang menghasilkan gula reduksi terbanyak.



Gambar 10. Diagram alir tahap optimasi konsentrasi substrat (Dowe dan McMillan, 2008 yang telah dimodifikasi).

3.4.2.2 Optimasi Konsentrasi Enzim

Optimasi konsentrasi enzim dilakukan menurut metode SSF Dowe dan McMillan (2008) yang telah dimodifikasi (Gambar 11). Holoselulosa jerami padi kering hasil *pretreatment* disiapkan pada konsentrasi substrat optimal yang telah diketahui pada pengujian sebelumnya. Kemudian holoselulosa jerami padi dimasukkan ke dalam tabung ulir dengan ukuran 15 mL dan ditambahkan enzim dengan konsentrasi 20; 25; 30; dan 35 FPU/g selulosa, 0,25 mL buffer sitrat pH 4,8, 0,20 mL antibiotik tetracycline 2%, dan akuades hingga total volume menjadi 5 mL. Setelah itu sampel diinkubasi pada suhu 50° C dan kecepatan shaker 150 rpm selama 32 jam. Pada waktu inkubasi 8, 16, 24 dan 32 jam, filtrat diambil dan dianalisis gula reduksinya. Hasil pengamatan kadar gula reduksi tersebut dianalisis secara deskriptif untuk menentukan konsentrasi terbaik yang menghasilkan gula reduksi terbanyak.



Gambar 11. Diagram alir tahap perlakuan konsentrasi enzim (Dowe dan McMillan, 2008 yang telah dimodifikasi).

3.4.3 Produksi Etanol dengan Metode SSF

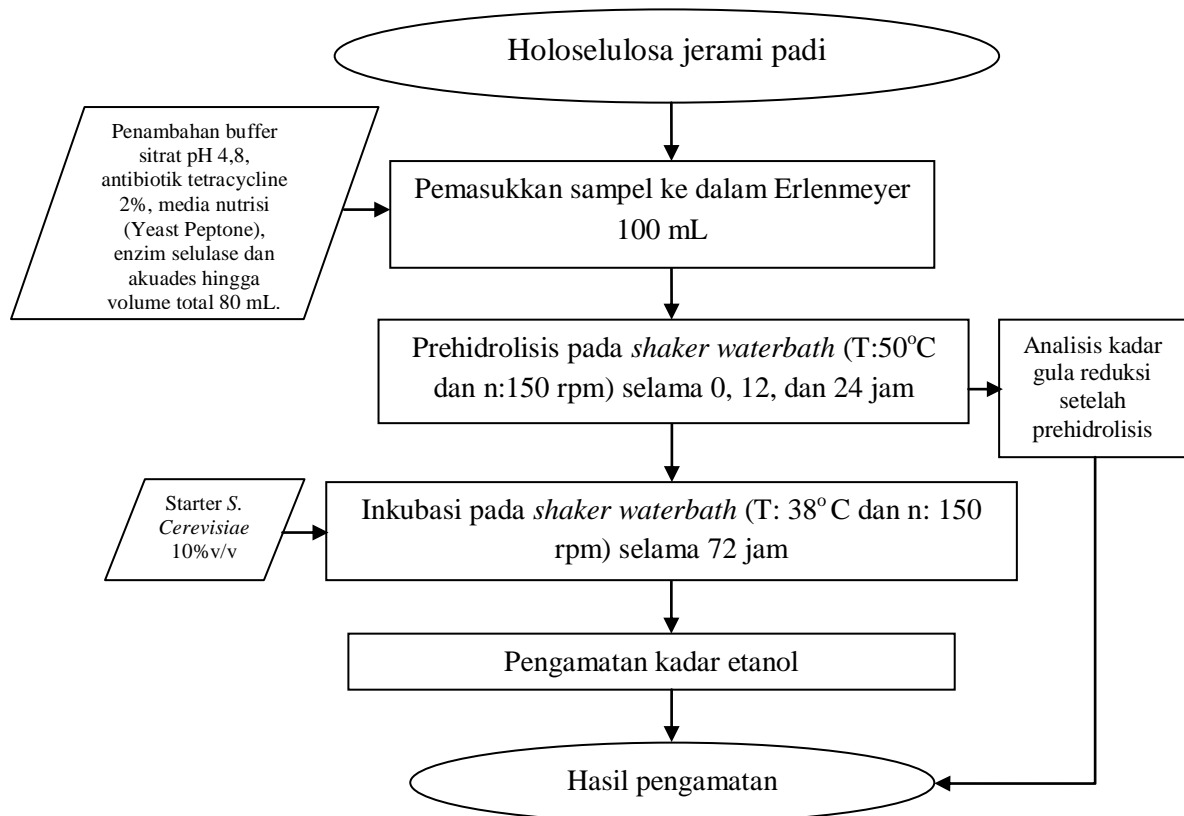
3.4.3.1 Persiapan Inokulum *Saccharomyces cerevisiae*

Persiapan inokulum *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan menurut metode yang diuraikan oleh Dowe and McMillan (2008) yang telah dimodifikasi. Satu gram tepung *Saccharomices cerevisiae* komersial ditumbuhkan pada 100 mL media nutrisi YPD (Yeast 1% b/v, Pepton 2% b/v dan Dekstrosa 5% b/v) dalam Erlenmeyer secara aseptik. Kemudian sampel diinkubasi selama 10 jam pada suhu 38°C dengan kecepatan *shaker* 130 rpm. Setelah inkubasi selesai, inokulum dianalisis *Optical Density* (OD) pada panjang gelombang 600 nm. Inokulum yang akan digunakan pada tahap SSF perlu diencerkan untuk mendapatkan OD sebesar 0,5. Setelah itu, 10 mL inokulum dengan OD 0,5 disentrifius pada kecepatan 3800 rpm selama 5 menit untuk memisahkan filtrat dan residu. Filtrat dibuang, kemudian residu diresuspensi dengan aquades hingga volume 10 mL. Selanjutnya inokulum siap untuk digunakan untuk SSF etanol.

3.4.3.2 Tahap *Simultaneous Saccharification and Fermentation*

Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) etanol dilakukan berdasarkan Metode Dowe and McMillan (2008) yang telah dimodifikasi (Gambar 12). Holoselulosa jerami padi dengan konsentrasi substrat optimal (hasil penelitian pada tahap sebelumnya) dimasukkan ke dalam tabung Erlemeyer 100 mL, kemudian ditambahkan 4 mL 50 mM buffer sitrat pH 4,8, 3,2 mL antibiotik tetracycline 2%, 8 mL media nutrisi (yeast ekstrak 10% (b/v) dan peptone 20% (b/v)), enzim selulase dengan konsentrasi optimal (hasil penelitian pada tahap

sebelumnya) dan akuades sampai volume suspensi mencapai 80 mL. Selanjutnya sampel dihidrolisis pendahuluan (prehidrolisis) pada suhu 50°C, pH 4,8, dan kecepatan goyangan 150 rpm selama waktu 0 (tanpa prehidrolisis), 12, dan 24 jam. Setelah prehidrolisis selama 12 dan 24 jam, masing-masing sampel dikeluarkan dari alat *shaker water bath* dan kondisi suhu pada *shaker water bath* diturunkan hingga suhu 38°C. Kemudian sampel dengan prehidrolisis selama 12 dan 24 jam tersebut didinginkan hingga beberapa menit, lalu ditambahkan 10 % (v/v) starter *Saccharomyces cerevisiae* bersuhu 30 °C. Sampel tanpa prehidrolisis (suhu 30°C) juga ditambahkan dengan 10 % (v/v) starter *Saccharomyces cerevisiae* bersuhu 30°C. Setelah inkubasi selama 72 jam, sampel diukur kadar etanolnya.



Gambar 12. Diagram alir tahap SSF (Dowe dan McMillan, 2008 yang telah dimodifikasi).

3.5 Pengamatan

Pengamatan yang dilakukan dalam penelitian ini terdiri atas pengamatan komposisi lignoselulosa sebelum dan setelah *pretreatment*, pengamatan kadar gula reduksi pada tahap optimasi hidrolisis, pengamatan kadar gula reduksi awal (hasil prehidrolisis) dan pengamatan kadar etanol yang terbentuk setelah SSF. Analisis kadar gula reduksi dilakukan di Laboratorium Biokimia Jurusan Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung. Analisis kadar etanol dilakukan di Laboratorium Terpadu, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Islam Indonesia, Yogyakarta.

3.5.1 Analisis Lignin, Selulosa dan Hemiselulosa Jerami Padi

Analisis komposisi lignoselulosa dalam jerami padi dilakukan menurut Metode Chesson dalam Datta (1981). Sampel yang dianalisis ialah jerami padi sebelum dan setelah *pretreatment*. Tahap pertama sampel dikeringkan dengan oven hingga berat konstan. Kemudian satu gram sampel dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan diberi penambahan 150 mL air suling. Lalu sampel dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 jam. Selanjutnya, sampel disaring menggunakan kertas saring dan dibilas dengan 300 mL air suling. Setelah itu, residu dikeringkan dengan oven pada suhu 105°C sampai dengan berat konstan. Setelah residu memiliki berat konstan, maka berat a didapatkan.

Residu (a) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL lalu ditambahkan 150 mL H₂SO₄ 1 N. Kemudian sampel dipanaskan pada suhu 100°C selama 1 jam. Selanjutnya, residu (a) disaring menggunakan kertas saring dan dibilas

dengan 300 mL air suling. Setelah itu, residu dikeringkan dengan suhu 105°C sampai berat konstan. Setelah residu memiliki berat konstan, maka berat b didapatkan.

Residu (b) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dengan penambahan 10 mL H₂SO₄ 72%. Lalu residu (b) direndam dan biarkan selama 4 jam pada suhu ruang, kemudian residu (b) diberi penambahan 150 mL H₂SO₄ 1 N dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 jam. Lalu sampel disaring menggunakan kertas saring dan dibilas dengan 400 mL air suling. Setelah itu, residu dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai berat konstan. Setelah residu memiliki berat konstan, maka berat c didapatkan.

Setelah berat c didapatkan, sampel dilakukan pengukuran kadar abu dengan memasukkan residu (c) ke dalam *furnace* pada 600°C selama 4 jam lalu ditimbang untuk mendapatkan berat d.

Kadar Hemiselulosa dihitung dengan rumus :

$$\text{Hemiselulosa (\%)} = \frac{a - b}{\text{Berat Sampel}} \times 100$$

Kadar Selulosa dihitung dengan rumus:

$$\text{Selulosa (\%)} = \frac{b - c}{\text{Berat Sampel}} \times 100$$

Kadar Lignin dihitung dengan rumus:

$$\text{Lignin (\%)} = \frac{c - d}{\text{Berat Sampel}} \times 100$$

3.5.2 Analisis Kadar Gula Reduksi

3.5.2.1 Penyiapan Kurva Standar

Analisis kadar gula reduksi dilakukan berdasarkan Metode Nelson–Somogyi dalam Sudarmadji (1984). Larutan glukosa standar dibuat dengan

melarutkan 10 mg glukosa anhidrat dalam 100 mL air suling, dan dilakukan 6 pengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/100 mL. Lima tabung reaksi disiapkan, masing-masing diisi dengan 1 mL larutan glukosa standar tersebut. Satu tabung diisi 1 mL air suling sebagai blanko. Kemudian masing-masing tabung ditambahkan 1 mL reagen Nelson. Selanjutnya tabung dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit. Setelah itu, tabung didinginkan secara bersama-sama dalam gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai ruang. Setelah dingin, 1 mL reagen Arsenomolybdat ditambahkan dan dihomogenisasi sampai semua endapan CuSO_4 yang ada larut kembali. Setelah semua endapan CuSO_4 larut sempurna, 7 mL air suling ditambahkan ke dalam tabung tersebut dan dihomogenkan kembali. Absorbansi masing-masing larutan tersebut diukur pada panjang gelombang 540 nm. Kemudian kurva standar dibuat untuk menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan absorbansi (Sudarmadji *et al.*, 1984).

3.5.2.2 Penentuan Kadar Gula Reduksi pada Sampel

Larutan sampel dilakukan pengenceran hingga 20 kali pengenceran. Larutan tersebut diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang bersih. Reagen Nelson sebanyak 1 mL ditambahkan ke dalam tabung tersebut dan selanjutnya diperlakukan seperti pada penyiapan kurva standar di atas. Jumlah gula reduksi dapat ditentukan berdasarkan OD larutan contoh yang diplotkan ke dalam kurva standar larutan glukosa.

3.5.2.3 Pembuatan Reagen

1. Reagen Nelson

Reagen Nelson dibuat dengan cara mencampurkan 25 bagian Reagen Nelson A dan 1 bagian Reagen Nelson B. Reagen Nelson A dibuat dengan melarutkan 12,5 g Natrium karbonat anhidrat, 12,5 g garam Rochelle, 10 g Natrium bikarbonat dan 100 g Natrium sulfat anhidrat ke dalam 350 mL air suling kemudian diencerkan sampai 500 mL. Sedangkan reagen Nelson B dibuat dengan melarutkan 7,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ke dalam 50 mL air suling dan ditambahkan 1 tetes asam sulfat pekat.

2. Reagen Arsenomolibdat

Reagen arsenomolibdat dibuat dengan cara mencampurkan dua larutan kimia. Larutan pertama dibuat dengan melarutkan 25 g Ammonium molybdat ke dalam 450 mL air suling pada Erlenmeyer 500 mL serta menambahkan 25 mL asam sulfat pekat. Selanjutnya larutan kedua dibuat dengan melarutkan 3 g $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ke dalam 25 mL air suling pada Erlenmeyer yang berbeda, kemudian. Kemudian larutan kedua tersebut dituang ke dalam larutan yang pertama, lalu campuran kedua larutan tersebut dihomogenisasi. Reagen arsenomolibdat tersebut selanjutnya disimpan pada botol yang berwarna coklat untuk menghindari paparan cahaya di luar lingkungan yang dapat merusak larutan, kemudian reagen juga perlu dinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam sebelum digunakan untuk analisis kadar gula reduksi.

3.5.3 Analisis Kadar Etanol dengan *Gas Chromatography*

Analisis kadar etanol dilakukan dengan menggunakan alat *Gas Chromatography*. Kolom yang digunakan pada alat ini ialah Carbowax Chromosorb W.HP 80/100 mesh dengan kondisi operasi suhu mula-mula 55°C kemudian dinaikan 4°C per menit selama 3 menit. Selanjutnya suhu dinaikan lagi 32°C per menit sehingga suhu kolom menjadi 120 °C. Tekanan gas pembawa (N₂) 1,7 kg/cm², tekanan gas pembawa (H₂) 16 kg/cm² dan tekanan udara 0,19 kg/cm². Injektor Hewlett Packard syringe 10 ml dengan volume injeksi 1 ml. Analisis kadar etanol membutuhkan larutan standar etanol pada konsentrasi 0,02, 0,03, 0,05 dan 0,10 % yang masing-masing diinjeksi secara duplo (Masykuri, 2001).