

III. BAHAN DAN METODE

A. Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia/Biokimia Hasil Pertanian, Laboratorium Komponen Bioaktif Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Lampung dan Laboratorium Biokimia, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung pada bulan Juni sampai dengan September 2013.

B. Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan adalah biomasa limbah agroindustri berupa kulit pisang yang diperoleh dari sentra industri keripik pisang Gang PU Bandar Lampung. Kulit pisang yang digunakan memiliki indeks kematangan IV yaitu warna kuning lebih banyak dari pada warna hijau dan teksturnya sedang. Bahan lain yang digunakan adalah Natrium Hidroksida (NaOH), air suling, asam sulfat (H_2SO_4), ragi merk Fermipan yang mengandung *Sacharomyces ceriviceae* produksi PT. Sangra Ratu Boga dan bahan-bahan analisis seperti : etanol, n-propanol, natruim thiophospat, kalium Iodida, natrium karbonat anhidrat, cupper II sulfat pentahidrat dan kalium iodat, yang diperoleh dari PT. Merck.

Alat-alat yang digunakan antara lain labu ukur 50 mL, 100 mL (Pyrex), mikropipet 1000 μ L (Thermo Scientific, Finnpiette F3), oven (Philip Harris Ltd), timbangan 4 digit (Mettler M3000 Swiszerlan), ginder, ayakan (40 mesh), hot plate (Cimerec3), sentrifuge (Thermo Electron Corporation, Model IEC Centra CL2, made in China), autoklaf (WiseclaveTM Daihan scientific made in Korea), spektrofotometer (DRU/4000 Milton Ray Company made in Japan), kertas saring wheatman (2 μ m), jerigen, glasswares, alumunium foil, cawan porselin, desikator, seperangkat peralatan GC- SHIMAZHU 2010 (made in Japan) dilengkapi dengan detektor FID (detektor ionisasi nyala).

C. Metode Penelitian

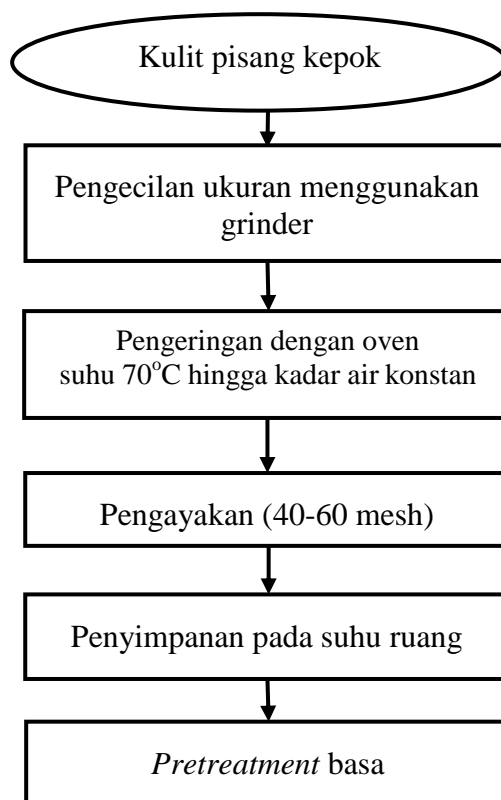
Penelitian ini terdiri dari dua tahap, yaitu tahap hidrolisis asam dan tahap fermentasi. Pada tahap hidrolisis asam, ada dua faktor. Faktor pertama yaitu konsentrasi H₂SO₄ yang terdiri dari lima taraf (0; 0,025; 0,05; 0,075 dan 0,1 M). Faktor kedua yaitu waktu hidrolisis yang terdiri dari dua taraf (15 dan 30 menit). Pada fermentasi hanya ada satu perlakuan; yaitu konsentrasi ragi yang terdiri dari empat taraf (0, 5, 10 dan 15 %) dengan waktu 72 jam suhu 30⁰C. Perlakuan disusun dalam RAKL dengan 3 kali ulangan.

Pengamatan dilakukan terhadap komponen lignin, selulosa dan hemiselulosa kulit pisang, kadar gula reduksi menggunakan Metode Nelson – Somogyi dan hasil etanol terbaik dianalisis menggunakan *Gas Chromatography* (GC). Data yang didapat disajikan dalam bentuk tabel dan grafik kemudian dianalisis secara deskriptif.

D. Pelaksanaan Penelitian

1. Persiapan bahan baku

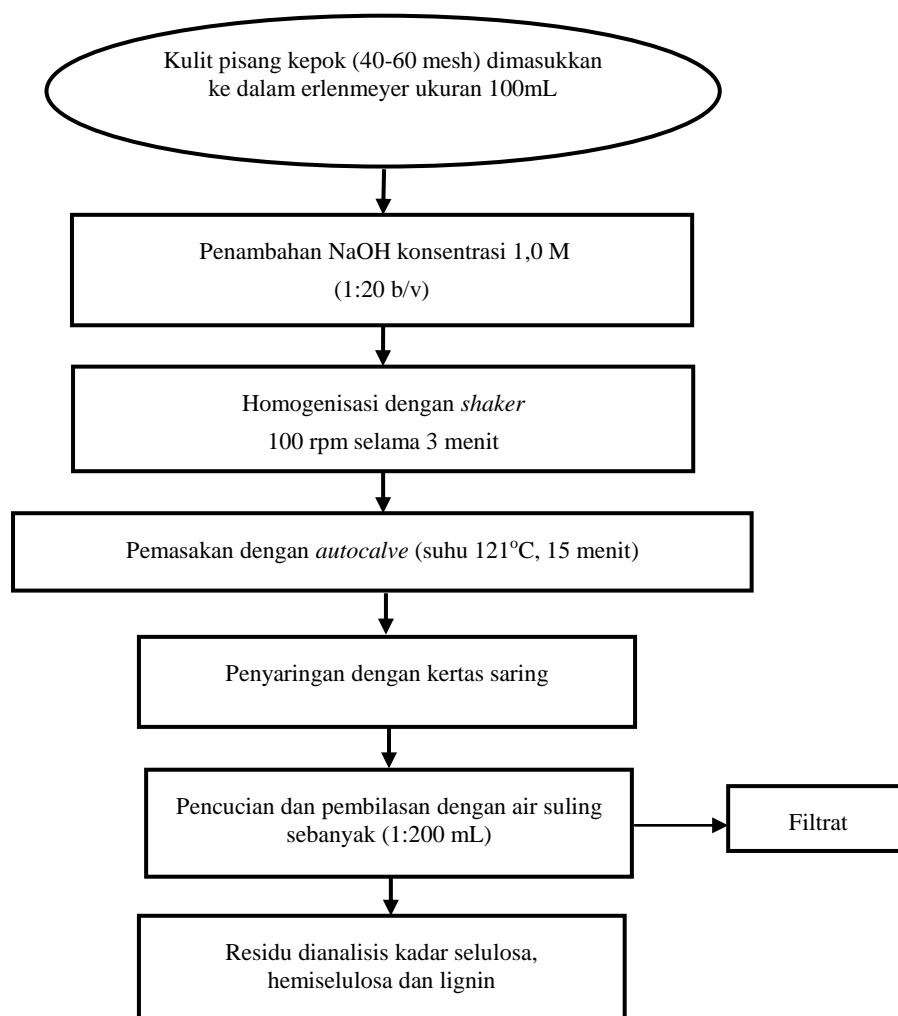
Persiapan bahan baku bertujuan untuk mempersiapkan bahan sebelum dilakukan penelitian. Kulit pisang kepok dikecilkan ukurannya menggunakan grinder dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 70°C sampai kadar air konstan. Kulit pisang yang telah dioven dikecilkan ukurannya, kemudian diayak menggunakan saringan 40-60 mesh dan disimpan dalam kondisi kering pada suhu ruang (Gambar 9). Sebelum dilakukan *pretreatment* basa, dilakukan analisis kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin awal pada kulit pisang.



Gambar 9 . Persiapan bahan baku (Samsuri *et al.*, 2007 dalam Septiyani, 2011)

2. Pretreatment basa kulit pisang

Perlakuan basa dilakukan menurut prosedur yang digunakan oleh Septiyani (2011) (Gambar 10). Kulit pisang kepok kering (40-60 mesh) ditimbang, kemudian dimasukkan ke dalam Erlenmeyer ukuran 100 mL, kemudian ditambahkan 1,0 M (1:20 b/v) larutan NaOH (Septiyani, 2011). Larutan tersebut dihomogenisasi menggunakan shaker dengan kecepatan 100 rpm selama 3 menit dan dipanaskan dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah itu, kulit pisang kepok dicuci dan dibilas menggunakan air suling (1:200 mL).

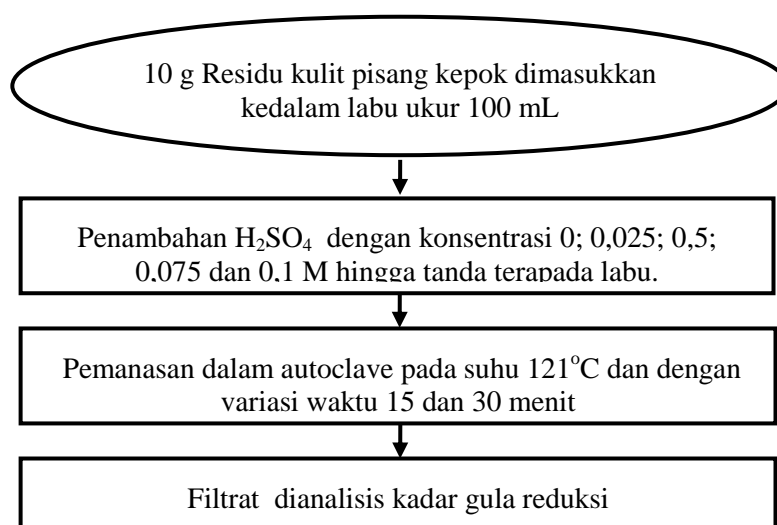


Gambar 10. *Pretreatment* basa (Septiyani, 2011)

Residu dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C selama 24 jam (Gambar 10). Residu kulit pisang kepok dianalisis kadar selulosa, hemiselulosa dan ligninnya menggunakan metode Chesson dalam Datta (1981). Substrat hasil *pretreatment* basa tersebut dilanjutkan ketahap hidrolisis enzim. Pada penelitian ini tahap hidrolisis enzim tidak dilakukan karena tidak tersedianya enzim sehingga proses hidrolisis dilakukan menggunakan asam.

3. Hidrolisis asam kulit pisang kepok

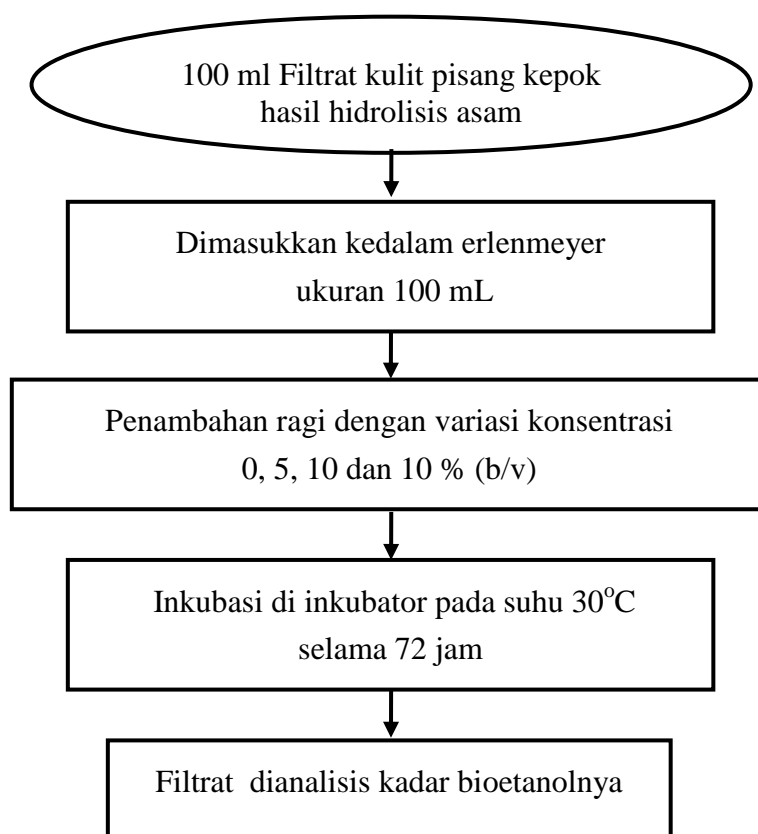
Sebanyak 10 gram residu kulit pisang kepok yang telah diberi pretreatment NaOH, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan H₂SO₄ hingga tanda tera dengan perlakuan konsentrasi 0; 0,025; 0,5; 0,075 dan 0,1 M. Sampel tersebut dipanaskan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 dan 30 menit. Filtrat dianalisis kadar gula reduksi menggunakan Metode (Nelson-Somogyi dalam Sudarmadji,1984) (Gambar 11). Sampel dengan kadar gula reduksi yang tertinggi hasil hidrolisis asam digunakan sebagai bahan baku pada proses fermentasi.



Gambar 11. Hidrolisis asam kulit pisang (Septiyani, 2011)

4. Fermentasi kulit pisang kepok

Sebanyak 100 mL hasil hidrolisis asam kulit pisang kepok dan diketahui kadar gula reduksinya dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 100 mL, kemudian ditambahkan ragi *Saccaromyces* dalam bentuk tepung dengan variasi konsentrasi 0, 5, 10 dan 15 % (w/v) dan ditutup menggunakan sumpal kapas dan dilapisi dengan aluminium foil kemudian diinkubasi pada suhu 30°C selama 72 jam. Hasil dari proses fermentasi dianalisis kadar bioetanolnya menggunakan metode titrasi (Hidayat, 1995) dan hasil terbaik dianalisis menggunakan *Gas Chromatography*.



Gambar 12. Fermentasi kulit pisang kepok (Metode Adnan, 2011)

E. Pengamatan

1. Komponen lignin, selulosa dan hemiselulosa

Analisis komponen lignoselulosa menggunakan metode Chesson dalam Datta (1981). Sampel yang akan dianalisis adalah kulit pisang kepek sebelum pretreatment dan kulit pisang kepek yang telah dihidrolisis dengan NaOH. Pertama sampel kulit pisang kepek dikeringkan dengan oven pada suhu 70°C sampai berat konstan. Kemudian kulit pisang kepek sebanyak 1 g dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL dan ditambahkan air suling sebanyak 150 mL, kemudian dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* pada suhu 100°C selama 2 jam. Sampel disaring dengan kertas saring kemudian ditambahkan air suling sampai dengan volume filtrat 300 mL. Residu dioven pada suhu 105°C hingga berat konstan (a). Residu (a) dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL kemudian ditambahkan H₂SO₄ 1 N sebanyak 150 mL. Panaskan residu dengan *hot plate* pada suhu 100°C selama 1 jam. Residu disaring kemudian dicuci dengan air suling sampai dengan volume filtrat 300 mL. Keringkan residu dengan suhu 105°C sampai berat konstan (b).

Residu (b) dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL ditambahkan 10 mL H₂SO₄ 72%, kemudian residu direndam dan biarkan selama 4 jam pada suhu ruang. Residu (b) diberi penambahan H₂SO₄ 1 N sebanyak 150 mL dan dipanaskan dengan suhu 100°C selama 2 jam. Sampel disaring dengan penambahan air suling sampai volume filtrat 400 mL. Sampel dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai berat konstan (c). Masukkan sampel ke dalam furnace suhu 600°C selama 4 jam kemudian ditimbang (d).

Kadar Hemiselulosa dapat dihitung dengan rumus :

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

Kadar Selulosa dapat dihitung dengan rumus:

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

Kadar Lignin dapat dihitung dengan rumus:

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

2. Analisis gula reduksi

Analisis gula reduksi dilakukan menurut metode Nelson-Somogi dalam Sudarmadji (1984): metode ini ada 2 tahap, yaitu penyiapan kurva standar dan penentuan kadar gula reduksi.

Penyiapan kurva standar

Larutan glukosa standar dibuat dengan melarutkan 10 mg glukose 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 di atas. Satu tabung diisi 1 mL air suling sebagai blanko. Dalam masing-masing tabung tersebut di atas ditambahkan 1 mL reagensia Nelson, kemudian dipanaskan pada penangas air mendidih selama 20 menit. Setelah itu, semua tabung diambil dan segera didinginkan dalam gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C. Setelah dingin 1 mL reagensia

Arsenomolybdat ditambahkan dan digojog sampai semua endapan CuSO_4 yang ada larut kembali. Setelah semua endapan CuSO_4 larut sempurna, 7 mL air suling ditambahkan kedalam tabung tersebut dan digojog sampai homogen. Absorbansi masing-masing larutan tersebut ditera pada panjang gelombang 540 nm. Kemudian kurva standar dibuat untuk menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan absorbansi (Sudarmadji *et al*, 1984).

Penentuan kadar gula reduksi pada contoh

Larutan contoh yang mempunyai kadar gula reduksi sekitar 2-8 mg/100mL disiapkan. Perlu diperhatikan bahwa larutan pada contoh ini harus jernih, karena itu bila dijumpai larutan contoh yang keruh atau berwarna maka perlu dilakukan penjernihan terlebih dahulu dengan menggunakan Pb-asetat atau bubuk Alumunium hidroksida. Kemudian larutan contoh yang jernih tersebut diambil sebanyak 1 mL dan dimasukkan kedalam tabung reaksi yang bersih. Reagensia Nelson sebanyak 1 mL ditambahkan kedalam tabung tersebut dan selanjutnya diperlakukan seperti pada penyiapan kurva standar di atas. Jumlah gula reduksi dapat ditentukan berdasarkan OD larutan contoh dan kurva standar larutan glukosa.

Cara pembuatan reagensia

a. Reagensia Nelson A

Sebanyak 12,5 g Natrium karbonat anhidrat, 12,5 g garam Rochelle, 10 g Natrium bikarbonat dan 100 g Natrium sulfat anhidrat dilarutkan dalam 350 mL air suling kemudian diencerkan sampai 500 mL.

b. Reagensia Nelson B

Sejumlah 7,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ dilarutkan dalam 50 mL air suling dan ditambahkan 1 tetes asam sulfat pekat.

c. Reagen Nelson A + B

Reagensia Nelson dibuat dengan cara mencampur 25 bagian Reagensia Nelson A dan 1 bagian Reagensia Nelson B. Pencampuran dikerjakan pada setiap hari dan segera sebelum digunakan digunakan.

d. Reagensia Arsenomolybdat

Sebanyak 25 g Ammonium molybdat dilarutkan dalam 450 mL air suling dan ditambahkan 25 mL asam sulfat pekat. Larutkan pada tempat yang lain 3 g $\text{Na}_2\text{HASO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dalam 25 mL air suling. Kemudian larutan ini dituang kedalam larutan yang pertama. Simpan dalam botol berwarna coklat dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Reagensia ini baru dapat digunakan setelah masa inkubasi tersebut; reagensia ini berwarna kuning.

3. Kadar etanol dengan metode titrasi

Kadar etanol dilakukan menurut metode Hidayat (2011): metode ini ada 2 tahap, yaitu penyiapan kurva standar dan pengukuran kadar etanol sampel.

Pembuatan kurva standar

Masing-masing 1 mL etanol dengan konsentrasi 0,5 %, 1,0%, 1,5%, 2,0% dan 2,5% dimasukkan kedalam erlenmeyer ukuran 100 mL. Satu mili Liter asetat anhidrate dimasukkan kedalam erlenmeyer tersebut lalu dititrasi menggunakan

NaOH 1 M hingga warna larutan menjadi merah muda. Jumlah NaOH yang dipakai dihitung. Sumbu X adalah jumlah NaOH dan sumbu Y adalah konsentrasi etanol, sehingga didapat persamaan linear yang kemudian digunakan sebagai kurva standar pengukuran etanol sampel.

Pengukuran kadar etanol sampel

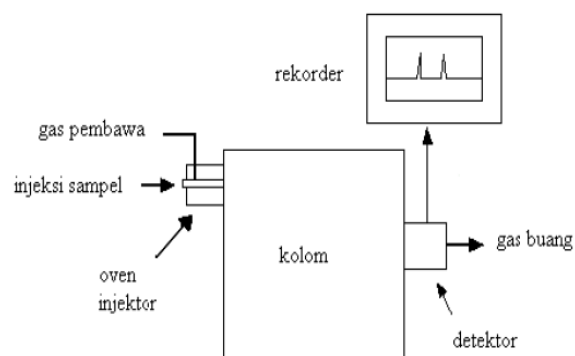
Satu mili Liter sampel hasil fermentasi kulit pisang dimasukkan kedalam Erlenmeyer ukuran 100 ml. Sebanyak 1 mL asetat anhidrate dimasukkan kedalam Erlenmeyer kemudian dititrasikan menggunakan NaOH 1 M hingga warna larutan menjadi merah muda. Jumlah NaOH yang dipakai dalam titrasi dihitung kemudian kurva standar etanol digunakan untuk menentukan konsentrasi etanol pada sampel tersebut.

4. Kadar etanol menggunakan metode kromatografi gas

Analisis kadar etanol dilakukan menurut metode Fitriana (2010) modifikasi.

Kondisi Alat

Seperangkat alat kromatografi gas dengan detektor ionisasi nyala (FID), disajikan pada Gambar 13.



Gambar 13. Alat Kromatografi Gas

Penetapan secara Kromatografi Gas dengan kondisi sebagai berikut:

Kolom	: RIX-5 (crossbond 5% diphenyl/95% dimethyl polixiloxane, panjang 30 meter, 0,25 mmID, 0,25 um df)
Detektor	: Ionisasi Nyala FID (chi)
Suhu	: Injektor 200°C, detektor 220°C
Teknik analisis	: Program suhu
Gas pembawa	: Helium
<i>Make-Up Gas</i>	: Nitrogen
Gas pembakar	: hidrogen, udara
Volume penyuntikan	: 1µL
Flow Control Mode	: Linear velocity
Injection Mode	: Split
Split Rasio	: 50
Laju alir Kolom	: 1,0 mL/menit
Linear Velocity	: 29,1 cm/detik

Pembuatan kurva standar

Larutan standar etanol dengan konsentrasi 0,1 %, 0,05%, dan 0,025% dibuat dengan pengenceran. Untuk membuat larutan standar etanol 1% dilakukan dengan mengambil larutan etanol p.a 99% sebanyak 1 mL kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan tambahkan aquades hingga tanda tera. Untuk membuat larutan etanol standar 0,1 % dilakukan dengan mengambil sebanyak 10 mL larutan etanol 1% hasil pengenceran kemudian dimasukkan dalam labu ukur ukuran 100 mL dan tambahkan aquades sampai tanda tera. Larutan standar etanol

0,025% dibuat dengan mengambil sebanyak 2,5 mL larutan etanol 1% kemudian dimasukkan dalam labu ukur ukuran 100 mL dan tambahkan aquades sampai tanda tera. Pengambilan larutan etanol dilakukan dengan mikropipet Merk efendrof. Pembuatan larutan standar etanol ditunjukkan pada Tabel 2.

Tabel 2. Pembuatan Larutan Standar Etanol

No	Etanol 1% (mL)	Konsentrasi akhir etanol (% v/v)
1	10	0,1
2	5	0,05
3	2,5	0,025

Larutan etanol 1% (mL) dengan jumlah yang tertulis pada diatas masing-masing dimasukkan kedalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda tera, sehingga diperoleh konsentrasi akhir etanol (% v/v) (tabel 2). Sebanyak 1 mL larutan standar etanol diambil dari masing-masing konsentrasi, kemudian ditambahkan larutan 0,5 mL n-propanol standar 20% dan dimasukkan ke dalam labu takar 50 mL dan ditambahkan aquades sampai tanda tera. Larutan campuran ini masing-masing diambil 1 μ L dan disuntikkan ke dalam kolom.

Kromatogram yang diperoleh dari masing-masing larutan standar digunakan untuk menentukan waktu retensi dan luas area dari masing-masing *peak* etanol dan n-propanol. Setelah luas puncak etanol dan n-propanol dari kromatogram didapat langkah selanjutnya menghitung rasio luas puncak etanol/n-propanol. Kurva baku dibuat dengan memplotkan rasio luas puncak etanol/n-propanol sebagai Y dan kadar etanol (% v/v) sebagai X . Persamaan kurva baku dicari dengan regresi linear.

Pengukuran kadar etanol sampel

Sampel etanol hasil fermentasi sebelum dianalisis menggunakan GC dinetralkan pH nya terlebih dahulu dengan menggunakan NaOH kemudian disaring dengan penyaring *whatman* 0,2 μm . Sebanyak 1 mL sampel diambil menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam labu ukur 50 mL, kemudian ditambahkan 0,5 n-propanol 20% dan diencerkan dengan akuades sampai 50 mL. Larutan ini masing-masing diambil 0,1 μL dan disuntikkan ke dalam kolom melalui tempat injeksi. Analisis kuantitatif kadar etanol dengan menggunakan persamaan regresi linear dari kurva standar.