

### III METODELOGI PENELITIAN

#### A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Februari sampai Juni 2014 bertempat di Laboratorium Kimia Fisik, Laboratorium Biomassa, Universitas Lampung dan Laboratorium Afiliasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

#### B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan yaitu ultrasonikator Bandelin Sonorex Technic, *water batch* Precistern, neraca analitik Wiggens Houser, spektrofotometer UV-VIS Varian Cary 100, autoklaf Kleinfeld-Germany HV-L25, laminar air flow ESCO AVC4A1, Kromatografi gas GC-2010 AF Shimadzu, *blender* Philips, oven, mortar, sentrifius, indikator pH universal, botol film, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium. Bahan yang digunakan adalah umbi talas taro, yakni umbi primer dan umbi sekunder, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, glukosa, fenol, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, DNS, NaOH, akuades, larutan Fehling A dan B, NaOH, Na-K tartarat, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, *Saccharomyces cerevisiae*, serbuk kulit kayu raru, nira, buffer fosfat pH 5, NaCl 0,85%, KI, dan aluminium foil.

## **C. Prosedur Penelitian**

### **1. Preparasi tepung umbi talas**

Preparasi tepung umbi talas dalam penelitian ini dilakukan dengan cara penghalusan dan pengeringan. Penghalusan dilakukan dengan menggunakan mortar.

Pengeringan dilakukan dengan menggunakan oven selama 3 hari dan disimpan dalam wadah kedap udara agar tidak ditumbuhi mikroorganisme yang dapat merusak bubuk talas.

### **2. Penentuan kadar pati**

Kadar pati umbi talas taro yang diteliti ditentukan dengan metode spektrofotometer UV-Vis menggunakan pereaksi iodium, kemudian absorbansi sampel diukur pada panjang gelombang ( $\lambda$ ) 348 nm. Penentuan dengan metode spektrofotometer UV-Vis ini didasarkan pada perubahan warna sampel setelah direaksikan dengan iodium yang berwarna biru keunguan yang dapat mengendap dan dapat dipisahkan.

Penentuan kadar pati secara kuantitatif, dibuat kurva standar terlebih dahulu menggunakan pati murni. Pembuatan kurva standar dilakukan menggunakan larutan pati dengan konsentrasi 0,01;0,1;0,2;0,3; dan 0,4 gram. Absorbansi dari masing-masing larutan standar diukur pada panjang gelombang 348 nm. Kemudian nilai absorbansi tersebut diplot terhadap konsentrasi untuk mendapatkan kurva standar dan persamaan garis yang menunjukkan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi pati.

Untuk menentukan kadar pati dalam sampel, sebanyak 0,2 g sampel dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 15 mL akuades dan 1,5 mL larutan

iodium kemudian disaring sehingga diperoleh filtrat. Filtrat sampel lalu dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis untuk mendapatkan absorbansi pada panjang gelombang 348 nm. Kadar gula reduksi dalam sampel dihitung menggunakan persamaan garis yang didapatkan dari kurva standar, yaitu  $y = a + bx$ , dimana  $y$  adalah absorbansi sampel (nm),  $x$  konsentrasi sampel (mg/L),  $a$  merupakan intersep, dan  $b$  adalah *slope*. Kadar pati dalam % dapat dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Kadar pati (\%)} = \frac{\text{massa pati sampel}}{\text{massa pati standar}} \times 100 \%$$

### 3. Hidrolisis umbi talas taro

Dalam penelitian ini, serangkaian percobaan hidrolisis dilakukan untuk mempelajari pengaruh tiga variabel, yakni pH, suhu, dan waktu, dengan tujuan untuk mendapatkan nilai optimum dari masing-masing variabel untuk menentukan kondisi optimum hidrolisis yang dilakukan di bawah pengaruh ultrasonikasi. Kondisi optimum ditentukan berdasarkan kadar gula reduksi yang dihasilkan dari masing-masing percobaan. Untuk prosedur ultrasonikasi yaitu, 20 gram tepung umbi talas disuspensikan dalam 500 mL akuades ke dalam gelas beaker, kemudian hidrolisis sampel dilakukan di bawah pengaruh ultrasonikasi dengan frekuensi tetap sebesar 40 kHz pada waktu, pH, dan suhu yang berbeda.

#### 3.1. Penentuan pH optimum

Untuk tujuan ini, serangkaian percobaan hidrolisis dilakukan pada suhu 50 °C selama 30 menit, dengan pH yang berbeda, yakni 2, 3, 4, dan 5. Setelah percobaan, sampel lalu disaring dan kadar gula reduksi yang terkandung dalam filtrat ditentukan

dengan metode Fehling untuk analisis kualitatif, dan metode DNS untuk analisis kuantitatif. Dari percobaan ini didapatkan pH optimum yang selanjutnya digunakan untuk penentuan suhu dan waktu optimum.

### **3.2. Penentuan waktu optimum**

Untuk menentukan waktu optimum, percobaan hidrolisis dilakukan pada pH optimum yang didapatkan dari percobaan sebelumnya dan suhu 50 °C, dengan waktu hidrolisis yang berbeda, yakni 30, 60, 90, dan 120 menit, lalu kadar gula reduksi yang dihasilkan dianalisis seperti pada percobaan sebelumnya (percobaan 3.1).

### **3.3. Penentuan suhu optimum**

Untuk menentukan suhu optimum, sampel disiapkan seperti dalam percobaan sebelumnya dan pH sampel diatur menjadi pH optimum, kemudian dihidrolisis selama waktu optimum pada suhu yang berbeda, yakni 50, 60, 70, dan 80 °C. Kadar gula reduksi dari masing-masing perlakuan kemudian ditentukan untuk mendapatkan suhu optimum.

### **3.4. Hidrolisis pada kondisi optimum**

Percobaan ini dilakukan dengan memadukan pH, waktu, dan suhu optimum yang didapatkan sebelumnya. Percobaan ini dimaksudkan untuk melihat apakah ketiga variabel pada nilai optimum masing-masing bekerja secara sinergis untuk menghasilkan gula reduksi. Percobaan dan analisis gula reduksi akan dilakukan dengan cara yang sama dengan percobaan sebelumnya.

#### **4. Analisis kadar gula pereduksi**

Dalam penelitian ini, gula reduksi dianalisis secara kualitatif dan kuantitatif.

##### **4.1. Analisis kualitatif**

Analisis kualitatif dilakukan dengan metode Fehling. Untuk tujuan ini ke dalam sebuah tabung reaksi dimasukkan larutan Fehling A dan Fehling B masing-masing sebanyak 1 mL. Ke dalam tabung kemudian ditambahkan 2 mL sampel dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 10 menit. Adanya gula reduksi ditunjukkan dengan terbentuknya endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  berwarna merah bata.

##### **4.2. Analisis kuantitatif**

###### **4.2.1. Pembuatan reagen DNS**

Sebanyak 1 gram asam 3,5-dinitrosalisilat dilarutkan dalam 20 mL akuades, dimasukkan dalam labu ukur 100 mL, lalu dihomogenkan dan ke dalam labu ukur ditambahkan 1 gram NaOH; 0,2 gram fenol; 0,05 gram  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , dan 1 mL Na-K tartarat 40%, kemudian ditambahkan akuades sampai batas miniskus dan dihomogenkan.

###### **4.2.2. Pembuatan kurva standar**

Pembuatan kurva standar dilakukan menggunakan larutan glukosa dengan konsentrasi 200; 400; dan 600 mg/L dari larutan stok 1000 mg/L. Absorbansi dari masing-masing larutan standar diukur pada panjang gelombang 510 nm.

Kemudian nilai absorbansi tersebut diplot terhadap konsentrasi untuk mendapatkan kurva standar dan persamaan garis yang menunjukkan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi glukosa.

#### **4.2.3. Penentuan gula reduksi dalam sampel**

Untuk menentukan kadar gula reduksi dalam sampel, sebanyak 0,5 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,5 mL akuades dan 2 mL reagen DNS. Tabung reaksi ditutup dengan aluminium *foil* dan dipanaskan dalam *waterbath* selama 10 menit pada suhu 100 °C. Sampel kemudian didinginkan hingga suhu kamar, lalu ditambahkan akuades sebanyak 12 mL dan dihomogenkan. Sampel lalu dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis untuk mendapatkan absorbansi pada panjang gelombang 510 nm. Kadar gula reduksi dalam sampel dihitung menggunakan persamaan garis yang didapatkan dari kurva standar, yaitu  $y = a + bx$ , dimana  $y$  adalah absorbansi sampel (nm),  $x$  konsentrasi sampel (g/L),  $a$  merupakan intersep, dan  $b$  adalah slope.

## **5. Fermentasi alkohol**

### **5.1. Fermentasi alkohol dengan *Saccharomyces cerevisiae***

Prosedur fermentasi dengan bantuan *Saccharomyces cerevisiae* ini tahap awal yang dilakukan adalah semua bahan dan alat yang digunakan disterilisasi menggunakan autoklav pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 2 jam, kecuali *Saccharomyces cerevisiae* dan larutan NaOH, kemudian didinginkan dan disinari dengan sinar uv di dalam *laminar air flow* hingga suhu ruang. percobaan ini sebanyak 0,1 gram

*Saccharomyces cerevisiae* dimasukkan ke dalam 10 mL larutan NaCl 0,85 %, lalu campuran diinkubasi terlebih dahulu selama 1 jam.

Tahap selanjutnya adalah fermentasi gula reduksi menjadi bioetanol. Sebanyak 100 mL substrat hidrolisat dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, lalu pH larutan substrat tersebut diatur menjadi 5 dengan menambahkan NaOH, agar larutan substrat tetap dalam kondisi pH tersebut, maka digunakan buffer fosfat pH 5 sebanyak 5 mL. Kemudian ke dalam larutan dimasukkan *Saccharomyces cerevisiae*.

Mulut Erlenmeyer lalu ditutup dengan sumbat kapas, lalu Erlenmeyer dibungkus dengan aluminium foil supaya sistem menjadi anaerob, kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama 72 jam. Selanjutnya kadar bioetanol ditentukan dengan spektroskopi UV-VIS dan kromatografi gas.

## **5.2 Fermentasi alkohol dengan serbuk kulit kayu raru**

Semua bahan dan alat yang digunakan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 2 jam, kecuali serbuk kulit kayu raru dan larutan NaOH, kemudian didinginkan di dalam *laminar air flow* hingga suhu ruang. Setelah itu, sebanyak 100 mL hidrolisat dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 mL, lalu ditambahkan nira 5 mL. pH campuran kemudian diatur menjadi 5, lalu setelah pH tercapai, ke dalam sampel ditambahkan buffer fosfat pH 5 sebanyak 5 mL. Ke dalam campuran kemudian ditambahkan serbuk kulit kayu raru sebanyak 5 gram. Mulut Erlenmeyer lalu ditutup dengan disumbat kapas, lalu erlenmeyer dibungkus dengan aluminium foil supaya sistem menjadi anaerob, kemudian dibiarkan pada

suhu ruang selama 72 jam. Selanjutnya kadar bioetanol ditentukan dengan spektroskopi UV-Vis dan kromatografi gas.

## **6. Analisis kadar bioetanol**

Analisis kadar bioetanol dilakukan dengan metode kromatografi gas dan oksidasi dengan  $K_2Cr_2O_7$ .

### **6.1. Analisis kadar bioetanol dengan kromatografi gas**

Analisis kadar bioetanol dilakukan dengan metode kromatografi gas merujuk pada penelitian Najafpour *et al.* (2004). Analisis ini dilakukan untuk memastikan bahwa alkohol yang terdapat dalam hasil fermentasi sampel adalah bioetanol. Sebagai standar, digunakan etanol murni dan bioetanol hasil fermentasi diambil sebanyak 1  $\mu$ L diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi gas. Kromatogram yang didapatkan dibandingkan dengan standar berdasarkan waktu retensi.

### **6.2 Analisis kadar bioetanol dengan oksidasi $K_2Cr_2O_7$**

Analisis kadar etanol dilakukan dengan membuat kurva standar hasil oksidasi etanol dengan menggunakan  $K_2Cr_2O_7$ , berdasarkan pada larutan standar etanol dengan konsentrasi 5, 10, 20, 30, 40, 50, dan 60%. Sebanyak 1 mL masing-masing larutan standar ditambahkan dengan 1 mL larutan  $K_2Cr_2O_7$  dalam suasana asam yang dibuat dengan mencampurkan larutan  $K_2Cr_2O_7$  0,1 N dengan perbandingan 1:1. Masing-masing campuran dipanaskan selama 10 menit dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 414 nm, selanjutnya digunakan kurva standar ini untuk mengukur kadar etanol dari larutan sampel.



Analisis kadar etanol dalam sampel dilakukan dengan cara mengambil 1 mL sampel dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi dengan menggunakan pipet volum, kemudian ditambahkan 1 mL  $K_2Cr_2O_7$  0,1 N dalam suasana asam warna lutan jingga dan dididihkan selama 10 menit, warna larutan sampel yang mengandung etanol akan berubah menjadi hijau dan berbau aldehida. Hasil oksidasi ini, kemudian diukur absorbansi pada panjang gelombang 414 nm dengan menggunakan spektrofotometer UV-Vis.