

III. BAHAN DAN METODE

A. Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Analisis Hasil Pertanian, Jurusan Teknologi Hasil Pertanian Fakultas Petanian Universitas Lampung dan Laboratorium SMK-SMTI Bandar Lampung pada bulan Juli sampai dengan Desember 2013.

B. Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan sebagai sampel berupa limbah agroindustri kulit kakao yang diperoleh dari Desa Jambu, Kecamatan Kedondong, Kabupaten Pesawaran dan bahan kimia yang terdiri dari enzim sellulase (Sqzyme CS P-acid cellulase), Natrium Hidroksida (NaOH), air suling, asam sulfat (H_2SO_4), ragi roti (merk: Fermipan), Natrium thiopospat, Natrium bikarbonat, natrium karbonat anhidrat, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, amonium molibdad $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ produksi PT. Merck diperoleh dari Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian Unila.

Alat-alat yang digunakan antara lain waterbath (Polyscience), mikropipet 1000 μ L (Thermo Scientific, Tipe: Finnpiette F3), oven (Philip Harris), timbangan 4 digit (Mettler M3000), ayakan (40 mesh), *hot plate* (Cimerec3), sentrifuge (Thermo Electron Corporation), autoklaf, spektrofotometer (Milton Ray Company), alat-alat gelas (merk pyrex) dan serangkaian alat kromatografi gas

GC 2010 Shimadzu dengan menggunakan detektor FID dan kolom semi polar yang berisi 5% diphenyl dan 95% dimethyl polysiloxane.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dalam 3 tahap, yaitu tahap perlakuan awal dengan NaOH, tahap hidrolisis enzimatis, dan tahap fermentasi, yang masing-masing diuraikan di bawah ini.

1. Tahap Perlakuan Awal Dengan NaOH

Penelitian dilakukan secara faktorial dalam Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan tiga kali ulangan. Faktor pertama yaitu waktu pemanasan yang terdiri atas 2 taraf yaitu 15 dan 30 menit. Faktor kedua yaitu konsentrasi NaOH yang terdiri atas 5 taraf, yaitu 0, 0,5, 1,0, 1,5, dan 2,0 M. Data komposisi lignoselulosa dianalisis dengan sidik ragam untuk mendapatkan penduga ragam galat dan ada tidaknya perbedaan antar perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis lebih lanjut dengan polinomial ortogonal.

2. Tahap Hidrolisis

Penelitian pada tahap ini terdiri atas 2 perlakuan yang disusun dalam Rancangan Acak Kelompok Lengkap (RAKL) dengan tiga kali ulangan. Faktor pertama yaitu konsentrasi substrat yang terdiri atas 4 taraf, yaitu 5%, 10%, 15% dan 20%. Faktor kedua yaitu konsentrasi enzim selulase yang terdiri dari 4 taraf yaitu, 0, 10, 20 dan 30 FPU. Data kadar gula reduksi dianalisis dengan sidik ragam untuk mendapatkan penduga ragam galat dan ada tidaknya perbedaan antar perlakuan. Data yang diperoleh dianalisis lanjut dengan polinomial ortogonal.

3. Tahap Fermentasi

Larutan gula reduksi hasil terbaik pada tahap hidrolisis difermentasi menggunakan *Saccharomyces cerevisiae* dengan konsentrasi 10% dan diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 72 jam yang dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Setelah fermentasi kadar etanolnya ditentukan dengan menggunakan kromatografi gas dan dibahas secara deskriptif.

D. Pelaksanaan Penelitian

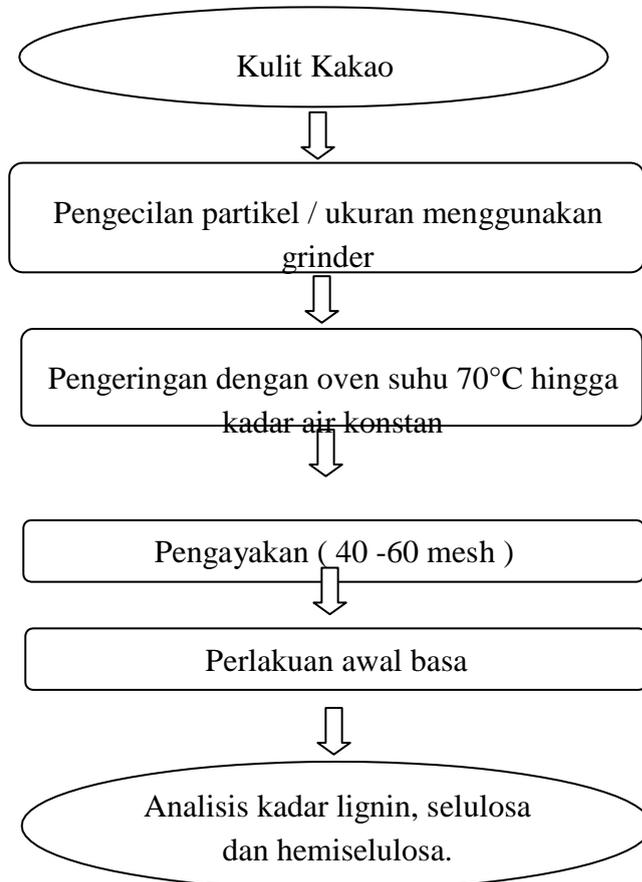
1. Persiapan Bahan Baku

Sampel kulit kakao yang digunakan adalah kulit kakao dari buah yang telah tua. Kulit kakao dikecilkan ukurannya dan dikeringkan menggunakan oven pada suhu 70⁰ C hingga kadar air konstan. Selanjutnya kulit kakao yang telah halus diayak menggunakan screen 40-60 mesh dan disimpan dalam kondisi kering pada suhu ruang sampai dengan akan digunakan pada proses perlakuan awal (Gambar 6). Kulit kakao sebelum diberi perlakuan awal terlebih dahulu dilakukan analisis kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin.

2. Perlakuan awal dengan NaOH

Kulit kakao ditimbang sebanyak 4 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer ukuran 100 ml, lalu diberi larutan NaOH dengan konsentrasi 0, 0,5, 1, 1,5 dan 2,0 M sebanyak 80 mL (1:20 b/v) (Septiyani, 2011). Larutan tersebut dihomogenisasi menggunakan shaker dengan kecepatan 100 rpm selama 3 menit dan dipanaskan dengan *autoclave* pada suhu 121⁰C selama 15 dan 30 menit. Setelah proses pemanasan, kulit kakao tersebut disaring dan dibilas menggunakan air suling sebanyak 800 mL (1 : 200 mL) (Septiyani, 2011). Kemudian residu

dikeringkan dalam oven pada suhu 60⁰C selama 24 jam (Gambar 7) dan dianalisa kadar selulosa, hemiselulosa dan lignin menggunakan metode chesson dalam Datta (1981).

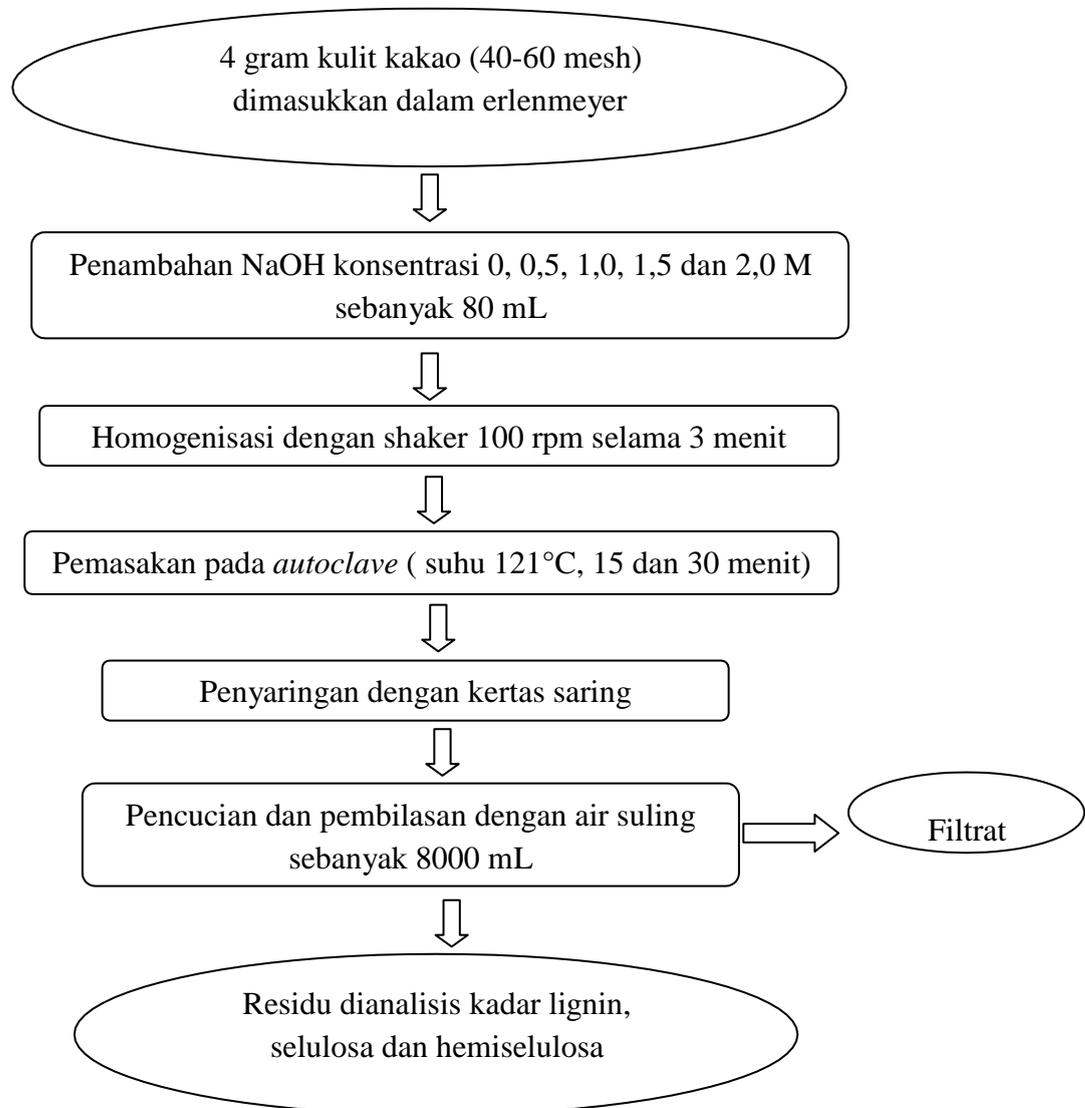


Gambar 6. Persiapan bahan baku (Samsuri *et al.*, 2007, yang dimodifikasi)

3. Hidrolisis Enzimatis Kulit Kakao

Sebanyak 2, 4, 6, dan 8 gram residu kulit kakao hasil perlakuan awal dengan NaOH yang terbaik dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 mL dan ditambahkan buffer citrat 33,6 mL pH 4,8 dan ditambahkan enzim selulase sebanyak 6,4 mL dengan masing-masing konsentrasi 0,10,20 dan 30 FPU. Sampel tersebut diinkubasi dalam waterbath pada suhu 50⁰C selama 18 jam

(Gambar 8). Filtrat kulit kakao yang telah dihidrolisis tersebut dianalisis kadar gula reduksi menggunakan Metode Nelson-Somogyi dalam Sudarmadji, 1984.



Gambar 7. Perlakuan awal basa (Septiyani, 2011, yang dimodifikasi)

4. Fermentasi Hidrolisat Kulit Kakao

a. Persiapan Kultur Antara

Sebanyak 7.0 gram media YPD dilarutkan dalam 100 mL air suling dan dihomogenkan menggunakan magnetic stirrer hingga larutan menjadi bening.

Larutan tersebut di sterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit. Larutan yang telah disterilisasi sebanyak 10 mL dituang ke dalam tabung reaksi ukuran 20 mL lalu didinginkan dalam keadaan miring hingga memadat dalam kondisi steril (Suh et al., 2007).

Ragi *Saccharomyces cerevisiae* sebanyak 1 gram dilarutkan dalam 10 mL air suling dan dihomogenkan menggunakan vortex. Sebanyak 1 mL larutan ragi diinokulasikan pada media agar miring lalu diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 48 jam. Sebanyak 3 loop ragi dari media agar miring diinokulasikan pada larutan media YPD 5% steril kemudian diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 48 jam. Larutan tersebut disebut kultur antara dan akan diinokulasikan pada kultur kerja yang berisi filtrat hasil hidrolisis kulit kakao.

b. Fermentasi Kulit Kakao

Sebanyak 100 mL filtrat hasil hidrolisis kulit kakao terbaik ditambahkan 0,15 gram pupuk NPK dan 0,04 gram pupuk ZA, kemudian dipasteurisasi di dalam oven pada suhu 80⁰C selama 10 menit lalu didinginkan hingga suhu ruang. Sebanyak 10 mL kultur antara (media YPD 5%) diinokulasikan ke dalam larutan filtrat tersebut lalu ditutup dengan sumbat kapas dan aluminium foil kemudian diinkubasi pada suhu 30⁰C selama 72 jam. Hidrolisat 10 mL yang telah difermentasi dicentrifuse 1000 rpm selama 10 menit, lalu dianalisis kadar etanolnya menggunakan alat *Gas Chromatography* (Gambar 9).

D. Pengamatan

1. Komponen lignin, selulosa dan hemiselulosa (Datta, 1981)

Sampel yang dianalisis adalah kulit kakao sebelum perlakuan awal dan

yang telah diberi perlakuan awal NaOH. Kulit kakao dikeringkan dalam oven pada suhu 70°C sampai kadar airnya maksimal 5%. Kulit kakao sebanyak 1 g dimasukan dalam Erlenmeyer 250 ml dan diberi penambahan air suling sebanyak 150 ml lalu dipanaskan dengan menggunakan *hot plate* suhu 100°C selama 2 jam. Setelah itu, sampel disaring dengan kertas saring dan residu dicuci dengan air suling dengan penambahan air suling sampai dengan volume filtrat 300 ml lalu keringkan residu dengan oven pada suhu 105°C sampai dengan berat konstan (berat a). Residu (a) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml lalu ditambahkan H₂SO₄ 1 N sebanyak 150 ml. Residu dipanaskan dengan *hot plate* suhu 100°C selama 1 jam, kemudian disaring dan residu dicuci dengan air suling sampai dengan volume filtrat 300 ml dan dikeringkan dengan suhu 105°C sampai berat konstan (berat b).

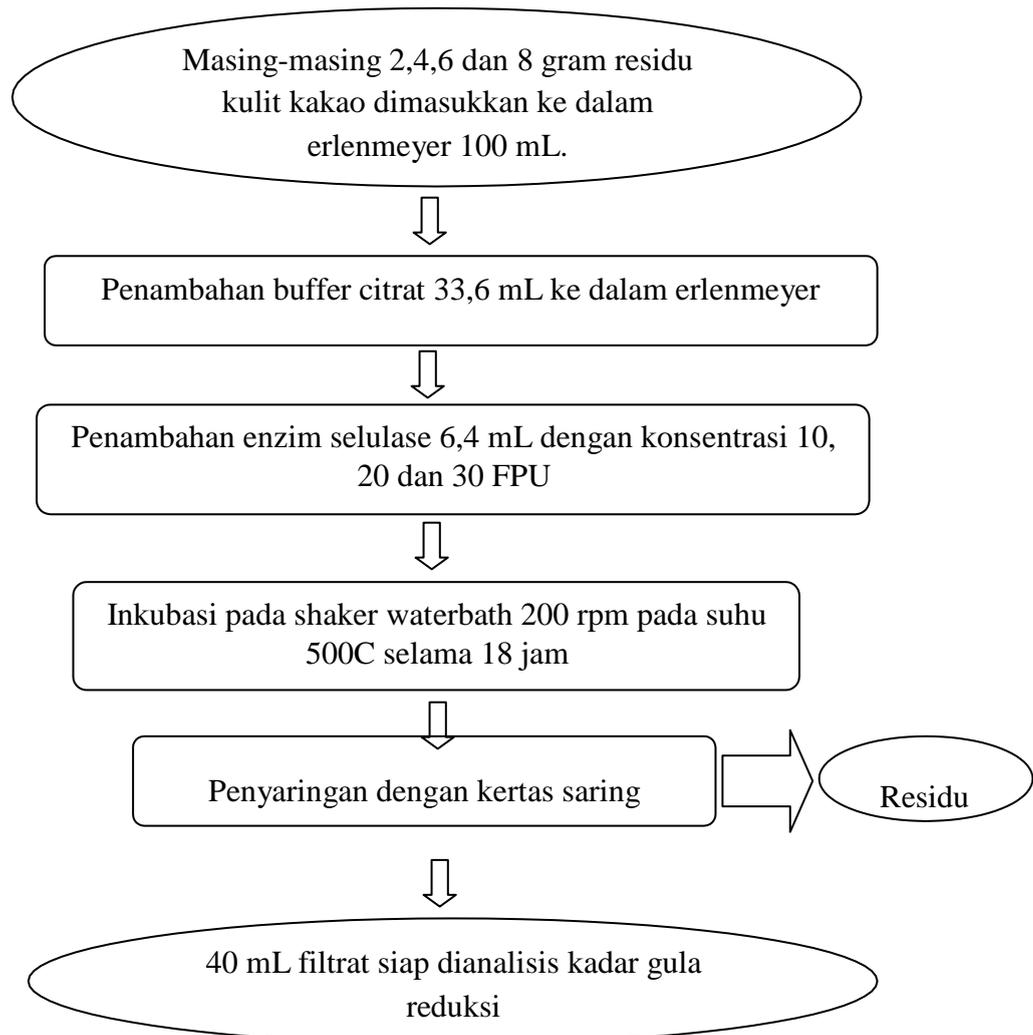
Residu (b) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 250 ml dengan penambahan H₂SO₄ 72% sebanyak 10 ml lalu residu (b) direndam dan biarkan selama 4 jam pada suhu ruang, kemudian residu (b) diberi penambahan H₂SO₄ 1 N sebanyak 150 ml dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 jam. Lalu sampel tersebut disaring dengan penambahan air suling sampai dengan volume filtrat 400 ml dan dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C sampai berat konstan (berat c). Setelah didapat berat c, maka dilakukan pengukuran kadar abu dengan memasukkan residu (c) ke dalam furnace suhu 600°C selama 4 jam lalu ditimbang untuk mendapatkan berat d.

Kadar hemiselulosa, selulosa dan lignin dapat dihitung dengan rumus berikut :

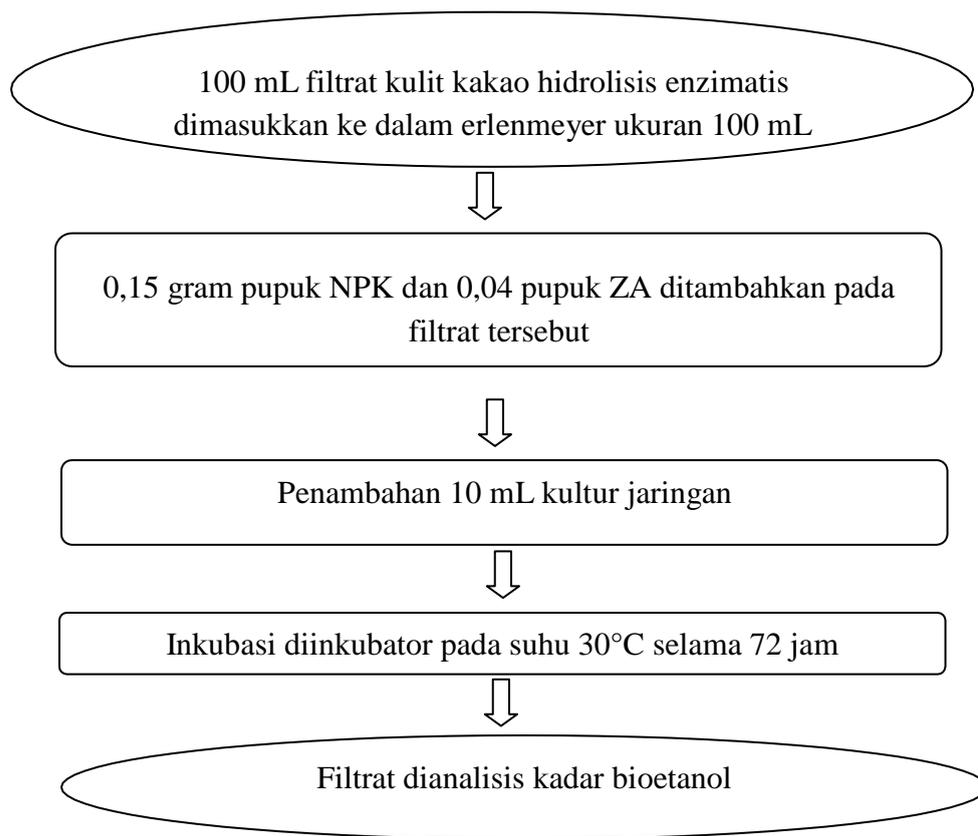
$$\text{Hemiselulosa (\%)} = \frac{a - b}{\text{Berat Sampel}} \times 100$$

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

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



Gambar 8. Hidrolisis enzimatis (Septiyani, 2011, yang dimodifikasi)



Gambar 9. Fermentasi hasil hidrolisis kulit kakao

2. Analisis Gula Reduksi (Metode Nelson – Somogyi dalam Sudarmadji, 1984)

a. Penyiapan Kurva Standar

Larutan standar glukosa 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. Ke dalam tabung reaksi dimasukkan masing-masing 1 ml larutan glukosa standar dan ditambahkan 1 ml reagensia Nelson. Larutan standar glukosa tersebut dipanaskan pada penangas air selama 20 menit dan didinginkan bersama-sama 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 CuSO₄ yang ada larut kembali. Setelah semua endapan CuSO₄ 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 dengan menggunakan alat spektrofotometer. Kemudian kurva standar dibuat untuk menunjukkan hubungan antara konsentrasi glukosa dan Absorbansi (Sudarmadji dkk, 1984).

b. Penentuan Kadar Gula Reduksi Pada Contoh

Filtrat hasil hidrolisis kulit kakao yang terbaik diambil sebanyak 1 ml dan dimasukkan kedalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan reagensia Nelson sebanyak 1 ml dan selanjutnya diperlakukan seperti pada penyiapan kurva standar di atas. Jumlah gula reduksi ditentukan dengan mengukur absorbansi sampel pada spektrofotometer. Data absorbansi tersebut dikonversi ke konsentrasi gula reduksi dengan memasukkan data absorbansi ke persamaan kurva standar ($Y=a+bx$) dengan Y adalah absorbansi sampel dan x adalah kadar gula reduksinya.

c. Cara Pembuatan Reagensia

Reagensia Nelson :

Reagensia Nelson A: 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. Reagensia Nelson B: 7,5 g CuSO₄ · 5H₂O dilarutkan dalam 50 ml air suling dan ditambahkan 1 tetes asam sulfat pekat. Reagensia Nelson dibuat dengan cara mencampur 25 bagian

Reagensia Nelson A dan 1 bagian Reagensia Nelson B.

Reagensia Arsenomolybdat :

Sebanyak 25 g ammonium molybdat dilarutkan dalam 450 ml air suling dan ditambahkan 25 ml asam sulfat pekat. Larutkan pada gelas piala 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.

3. Kadar Bioetanol

Kadar bioetanol ditentukan menurut metode Masykuri (2001). Kolom yang digunakan adalah Carbowax Chromosorb W.HP 80/100 mesh dengan kondisi operasi suhu mula-mula 55°C kemudian dinaikkan 4°C per menit selama 3 menit. Selanjutnya suhu dinaikkan lagi 32°C per menit sehingga suhu kolom menjadi 120°C . Tekanan gas pembawa (N_2) $1,7 \text{ kg/cm}^2$, tekanan gas pembawa (H_2) 16 kg/cm^2 dan tekanan udara $0,19 \text{ kg/cm}^2$. Injektor Hawlett Packard syringe 10 ml dengan volume injeksi 1 ml. Untuk menghitung kadar etanol dibuat larutan standar etanol 0,02, 0,03, 0,05 dan 0,10 % yang masing-masing diinjeksi secara duplo (Masykuri,2001).