

### **III. METODOLOGI PENELITIAN**

#### **A. Waktu dan Tempat Penelitian**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Januari 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 digunakan adalah water bath Precistern, neraca analitik Wiggen 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, alat sentrifuge, pH meter, cawan petri, jarum ose, dan alat-alat yang umum digunakan di laboratorium. Bahan yang digunakan adalah umbi talas taro, yakni umbi primer dan umbi sekunder,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, glukosa, fenol,  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  0,05M, DNS, NaOH, akuades, pati, larutan Fehling A dan B, NaOH, Na-K tartarat, larutan iodum 0,01N, pati murni,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , *Saccharomyces cerevisiae*, air kelapa, serbuk kulit kayu raru, nira, buffer phospat pH 5, NaCl 0,85%, kertas saring, dan alumunium foil.

## **C. Prosedur Penelitian**

### **1. Preparasi Tepung Umbi Talas**

Sampel umbi talas yang digunakan dalam penelitian ini adalah tepung, yang dihasilkan dari umbi yang sudah dipreparasi. Preparasi umbi talas dilakukan dengan mengupas kulit talas dan dicuci, lalu umbi yang sudah bersih dihaluskan hingga menjadi bubur, dan dikeringkan dalam oven pada suhu 100 °C selama 24 jam. Sampel dihaluskan kembali dengan cara ditumbuk dalam mortar, kemudian disimpan dalam wadah kedap udara agar tidak ditumbuhi mikroorganisme.

### **2. Penentuan Kadar Pati**

Kadar pati umbi talas taro ditentukan dengan metode spektrofotometer UV-Vis menggunakan pereaksi iodium. Kurva standar dibuat terlebih dahulu dengan menggunakan pati standar. Pembuatan kurva standar dilakukan dengan mensuspensikan pati dengan massa yang berbeda, yakni 0,01; 0,1; 0,2; dan 0,3 gram pati standar dalam 15 mL akuades. Ke dalam campuran kemudian ditambahkan larutan iodium 0,01 N sebanyak 1,5 mL, lalu diaduk hingga terjadi perubahan warna menjadi biru keunguan. Sampel kemudian disentrifuge dan filtratnya dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis, dengan mencatat absorbansi pada  $\lambda = 348$  nm dan absorbansi yang terukur yakni absorbansi  $I_3$  sisa. Selain itu, dilakukan juga pengukuran absorbansi iodium yang tidak direaksikan dengan pati standar. Iodium yang bereaksi didapat dari pengurangan absorbansi iodium yang tidak direaksikan dengan absorbansi  $I_3$  sisa. Dari pengukuran ini dibuat kurva standar, dengan mengalurkan konsentrasi pati standar terhadap

absorbansi iodium yang bereaksi untuk mendapatkan persamaan garis linier yang menghubungkan kadar pati dan absorbansi.

Untuk menentukan kadar pati dalam sampel, sebanyak 0,2 g sampel disuspensikan dalam 15 mL akuades dan diperlakukan sama dengan pati standar. Filtrat sampel lalu dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis dengan cara yang sama seperti standar, kadar pati dalam sampel dihitung menggunakan persamaan garis yang didapatkan dari kurva standar, yaitu  $y = a + bx$ , dimana  $y$  adalah absorbansi sampel dan  $x$  adalah kadar pati. Kadar pati dalam % dapat dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$\text{Kadar pati} = \frac{\text{kadar pati}}{\text{kadar sampel}} \times 100\%$$

### **3. Hidrolisis Umbi Talas Taro**

Dalam penelitian ini, serangkaian percobaan hidrolisis dilakukan untuk mempelajari pengaruh tiga variabel, yakni pH, waktu, dan suhu dengan tujuan untuk mendapatkan kondisi optimum berdasarkan nilai optimum dari masing-masing variabel dan berdasarkan kadar gula reduksi yang dihasilkan dari masing-masing percobaan.

#### **3.1. Penentuan pH Optimum**

Untuk tujuan ini, percobaan hidrolisis dilakukan pada pH yang berbeda, yakni 2, 3, 4, dan 5. Untuk pelaksanaan percobaan, sebanyak 20 gram tepung umbi talas disuspensikan dalam 250 mL akuades, yang pH nya sudah diatur terlebih dahulu sesuai dengan yang ditentukan. Sampel lalu dihidrolisis pada suhu tetap, yakni

70 °C selama 3 jam. 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. Sebagai kontrol, sebanyak 20 gram tepung umbi talas disuspensikan dalam 250 mL akuades diaduk kemudian disaring, dan gula reduksi dianalisis dengan cara yang sama.

### **3.2. Penentuan Waktu Optimum**

Untuk menentukan waktu optimum, percobaan hidrolisis dilakukan pada pH optimum yang didapatkan dari percobaan sebelumnya dan suhu 70°C, dengan waktu hidrolisis yang berbeda, yakni 1, 3, 5, dan 7 jam. Percobaan dilakukan dengan tahapan seperti pada percobaan 3.1 di atas. Dari percobaan ini didapatkan waktu optimum yang selanjutnya digunakan dalam percobaan untuk penentuan suhu optimum.

### **3.3. Penentuan Suhu Optimum**

Untuk menentukan suhu optimum, percobaan hidrolisis dilakukan pada pH dan waktu optimum yang didapatkan dari percobaan sebelumnya, dengan suhu hidrolisis yang berbeda, yakni 70, 80, dan 90 °C. Percobaan dilakukan seperti pada percobaan 3.1. di atas. Dari percobaan ini didapatkan suhu optimum yang selanjutnya digunakan untuk analisis kadar gula reduksi.

## **4. Analisis Kadar Gula Pereduksi**

### **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. Ke dalam labu ukur ditambahkan 1 gam NaOH; 0,2 gam fenol; 0,05 gam  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , dan 1 mL NaK 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, 600 dan 1.000 mg/L dari larutan stok 10.000 mg/L. Untuk pembuatan kurva standar, sebanyak 0,5 mL larutan glukosa standar 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, dan absorbansi sampel pada panjang gelombang 510 nm dicatat. Dari pengukuran semua larutan standar, dibuat kurva dengan cara mengalurkan konsentrasi terhadap absorbansi, untuk mendapatkan persamaan garis linier yang menghubungkan konsentrasi dan absorbansi.

#### **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 (mg/L),  $a$  merupakan intersep, dan  $b$  adalah *slope*.

### **5. Fermentasi Alkohol**

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

Tahap awal sebelum fermentasi dilakukan sterilisasi semua bahan dan alat menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 2 jam, kecuali *Saccharomyces cerevisiae*, kemudian didinginkan di dalam *laminar air flow*

hingga suhu ruang. Untuk fermentasi, sebanyak 100 mL hidrolisat dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, lalu ditambahkan nutrient yaitu 5 mL air kelapa. pH campuran kemudian diatur menjadi 5, lalu ditambahkan buffer fosfat pH 5 sebanyak 5 mL, dan 0,1 gram *Saccharomyces cerevisiae* dilarutkan ke dalam 10 mL larutan NaCl 0,85%, lalu campuran diinkubasi terlebih dahulu selama 1 jam. Mulut erlenmeyer lalu disumbat dengan kapas yang digulung dalam kain kasa, lalu dibungkus dengan aluminium foil supaya sistem menjadi anaerob, kemudian dibiarkan pada suhu 30 °C selama 72 jam.

Untuk analisis bioetanol, cairan pada sampel di bagian atas dipipet, kemudian kadar bioetanol dianalisis dengan metode spektrofotometer UV-Vis. Analisis sampel juga dilakukan dengan kromatografi gas, menggunakan sampel hasil fermentasi.

## **5.2. Fermentasi 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, 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 ditambahkan buffer fosfat pH 5 sebanyak 5 mL. Ke dalam campuran kemudian ditambahkan serbuk kulit kayu raru sebanyak 5 gram. Sebelum digunakan, kulit kayu raru terlebih dahulu disiapkan dengan cara dihaluskan. Tahapan fermentasi dan analisis bioetanol selanjutnya dilakukan dengan cara yang sama seperti yang dilakukan dengan *Saccharomyces cerevisiae*.

## **6. Analisis Bioetanol**

### **6.1. Penentuan Kadar dengan Metode Spektrofotometer UV-Vis.**

Analisis ini didasarkan pada reaksi antara etanol dengan  $K_2Cr_2O_7$ , dimana etanol akan teroksidasi menjadi aldehid, dan ion  $Cr^{6+}$  akan tereduksi menjadi ion  $Cr^{3+}$  yang berwarna hijau dan memiliki panjang gelombang maksimum 414 nm. Untuk analisis kadar bioetanol dilakukan dengan membuat kurva standar hasil oksidasi etanol dengan menggunakan  $K_2Cr_2O_7$  0,05M, konsentrasi larutan etanol yang digunakan adalah 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 dengan mencampurkannya dengan  $H_2SO_4$  pekat dalam perbandingan 1:1. Masing-masing campuran dipanaskan selama 10 menit, kemudian didinginkan dan diukur absorbansi pada panjang gelombang 414 nm, kemudian dibuat kurva standar dengan cara mengalurkan konsentrasi terhadap absorbansi, untuk mendapatkan persamaan garis linier yang menghubungkan konsentrasi dan absorbansi. Analisis kadar bioetanol dalam sampel umbi talas hasil fermentasi dilakukan dengan tahapan yang sama seperti pada percobaan larutan standar. Untuk perhitungan kadar bioetanol, absorbansi sampel disubstitusi ke dalam persamaan garis yang diperoleh dari kurva standar.

### **6.2. Analisis 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  $\mu\text{L}$  diinjeksikan ke dalam kolom kromatografi gas. Kromatogram yang didapatkan dibandingkan dengan standar berdasarkan waktu retensi.