

III. METODELOGI PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Mei sampai Agustus 2013 di Laboratorium Kimia Fisik, Laboratorium Biomassa, Laboratorium Biokimia, dan Laboratorium Instrumentasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Lampung, Laboratorium Afiliasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia.

B. Alat dan Bahan

Alat-alat yang digunakan yaitu ultrasonikator Bandelin Sonorex Technic, spektrofotometer UV-Vis Varian Cary 100, autoklaf Kleinfeld–Germany HV-L25, *laminar air flow* ESCO AVC4A1, kromatografi gas GC-2010 AF Shimadzu, *blender* Philips, *hotplate-stirrer* Stuart CB-162, *water bath* Precistern, neraca analitik Wiggens Houser, mikropipet Eppendorf, indikator pH universal/ pH-meter, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium. Bahan-bahan yang digunakan adalah onggok, akuades, H₂SO₄ pekat, glukosa, Fehling A dan Fehling B, dinitrosalisilat (DNS), NaOH, Na-K-tartarat, Na₂SO₃, fenol, *Saccharomyces cerevisiae* dalam ragi roti fermipan, serbuk kulit kayu raru, nira, buffer fosfat pH 5, NaCl 0,85%, kertas saring, dan aluminium foil.

C. Prosedur Kerja

1. Preparasi Onggok

Persiapan onggok dilakukan dalam dua tahap, yaitu pengeringan dan penghalusan onggok. Pengeringan onggok dilakukan di bawah sinar matahari selama tiga hari. Onggok yang telah kering dihaluskan menggunakan *blender* dan disimpan di dalam wadah kedap udara agar tidak ditumbuhi mikroorganisme yang dapat merusak onggok.

2. Ultrasonikasi Onggok

Onggok halus ditimbang sebanyak 100 gram dimasukkan ke dalam 5 buah gelas piala 1L masing- masing sebanyak 20 gram. Ditambahkan akuades sampai tanda batas 500 mL. Kemudian larutan onggok diultrasonikasi pada suhu 30°C dan frekuensi 40 kHz, dengan waktu yang berbeda, yakni 1,2, 3, 4, 5, 6, dan 7 jam. Setelah perlakuan, sebanyak 10 mL filtrat diambil ke dalam botol sampel untuk analisis gula reduksi, dan sisa sampel digunakan untuk percobaan hidrolisis.

3. Hidrolisis Onggok

Sampel onggok hasil perlakuan ultrasonikasi masing-masing ditambahkan asam sulfat dan pH diatur sampai 2, kemudian sampel dihidrolisis pada suhu 90°C. Untuk mempelajari pengaruh waktu hidrolisis, sampel hasil ultrasonikasi optimum dihidrolisis selama 1, 2, 3, 4, 5, 6, dan 7 jam, sambil diaduk dengan pengaduk magnetik. Selanjutnya hidrolisat onggok yang dihasilkan dianalisis kadar gula reduksi.

4. Analisis Kadar Gula Reduksi

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 1 mL sampel dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 2-3 menit. Sebagai kontrol negatif digunakan akuades dan kontrol positif digunakan larutan glukosa 10 %. Adanya gula reduksi ditunjukkan dengan terbentuknya endapan Cu_2O 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 gram NaOH; 0,2 gram fenol; 0,05 gram Na_2SO_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 0; 2; 4; 6; dan 8 mg/mL dari larutan stok 10 mg/mL. Absorbansi dari masing-masing larutan standar diukur pada panjang gelombang 550 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 0,25 mL sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan 0,25 mL akuades dan 1 mL reagen DNS. Tabung reaksi ditutup dengan aluminium *foil* dan dipanaskan dalam *water-batch* selama 10 menit pada suhu 100 °C. Sampel kemudian didinginkan hingga suhu kamar. Sampel lalu dianalisis dengan spektrofotometer UV-*vis* untuk mendapatkan absorbansi pada panjang gelombang 550 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/mL), a merupakan intersep, dan b adalah slop.

5. Fermentasi Hidrolisat Onggok

5.1. Fermentasi dengan serbuk kulit kayu raru

Semua bahan dan alat yang digunakan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit kecuali serbuk kulit kayu raru, kemudian didinginkan di dalam *laminar air flow* hingga suhu ruang. Untuk percobaan fermentasi, sebanyak 100 mL hidrolisat dimasukkan ke dalam erlenmeyer 250 mL, lalu ditambahkan nira 5 mL. pH campuran kemudian diatur menjadi 5 dengan menambahkan larutan NaOH 0,1 M, 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, lalu dibiarkan pada suhu ruang selama 72 jam. Selanjutnya kadar bioetanol ditentukan dengan kromatografi gas.

5.2. Fermentasi dengan *Saccharomyces cerevisiae*

Percobaan dengan *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan dengan cara yang sama seperti fermentasi hidrolisat onggok dengan serbuk kulit kayu raru kecuali dalam percobaan ini sebanyak 0,1 gram *Saccharomyces cerevisiae* dilarutkan ke dalam 10 mL larutan NaCl 0,85 %, lalu campuran diinkubasi terlebih dahulu selama 1 jam.

6. Analisis Kadar Bioetanol dengan Kromatografi Gas

Analisis kadar bioetanol dilakukan dengan metode kromatografi gas yang ada di Laboratorium Afiliasi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Indonesia, menggunakan kromatografi gas GC-2010 AF Shimadzu dengan rincian kondisi analisis seperti dalam Tabel 1.

Tabel 1. Parameter instrumen dan kondisi analisis kromatografi gas.

Kromatografi Gas	
tipe	GC-2010 AF Shimadzu
Injektor Kromatografi Gas	
Tipe injeksi	Split
Suhu injeksi	200 °C
Gas pembawa	Nitrogen (N ₂)
Tekanan gas pembawa	200 kPa
Laju alir total	67,9 mL/menit
Laju alir di dalam kolom	0,91 mL/menit
Split ratio	70
Kolom Kromatografi Gas	
Tipe	HP-20M
Film	Carbowax
Panjang	50 meter
	0,20 mm

Diameter dalam Tebal film Temperatur maksimum Total waktu penahanan	0,10 μm 320 $^{\circ}\text{C}$ 10 menit
Detektor kromatografi gas Tipe Suhu Laju sampling	Flame Ionization Detector 220 $^{\circ}\text{C}$ 40 mdetik

Sebelum dilakukan analisis kadar bioetanol, terlebih dahulu dibuat larutan standar menggunakan etanol dengan konsentrasi sebesar 0,001; 0,003; 0,005; 0,008; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; dan 0,8 %. Larutan standar tersebut diinjeksikan sebanyak 1 μL pada kolom kromatografi gas. Selanjutnya luas puncak etanol yang dihasilkan pada kromatogram dicatat lalu dibuat kurva standar etanol. Persamaan yang diperoleh dari kurva standar digunakan untuk menghitung kadar bioetanol yang dihasilkan dari proses fermentasi.

Bioetanol hasil fermentasi dianalisis dengan cara yang sama seperti kurva standar. Untuk mengetahui kadar bioetanol, luas puncak etanol yang dicatat sebagai kromatogram disubstitusi ke dalam persamaan yang dihasilkan dari kurva standar bioetanol, yang secara umum dinyatakan dengan persamaan:

$$y = ax + b$$

dimana y adalah luas puncak atau *peak* (intensitas) dan x adalah kadar etanol (%).