

### 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, serta di 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, *water bath* Precistern, neraca analitik Wigen Houser, mikropipet Eppendorf, *hot plate stirrer* Stuart CB 162, indikator pH universal, dan alat-alat gelas yang umum digunakan di laboratorium. Bahan-bahan yang digunakan adalah onggok, akuades, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pekat, glukosa, Fehling A dan Fehling B, dinitrosalisilat (DNS), NaOH, Na-K-tartarat, Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>, fenol, serbuk kulit kayu raru, *Saccharomyces cerevisiae* dalam ragi roti Fermipan, NaCl 0,85%, nira, buffer fosfat pH 5, serta kertas saring dan alumunium *foil*.

## C. Prosedur Penelitian

### 1. Preparasi Onggok

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

### 2. Hidrolisis Onggok

Hidrolisis onggok dilakukan di bawah pengaruh ultrasonikasi dengan frekuensi tetap sebesar 40 kHz dengan pH, waktu, dan suhu yang berbeda sebagai dasar penentuan kondisi optimum.

#### 2.1. Pengaruh pH

Onggok halus ditimbang sebanyak 80 gram dimasukkan ke dalam 4 buah gelas piala 1 L yang telah diberi label pH 2, 3, 4, dan 5. Ke dalam masing-masing gelas piala dimasukkan sebanyak 20 gram onggok, kemudian ditambahkan akuades sampai tanda batas 500 mL, dan pH campuran diatur menggunakan larutan  $H_2SO_4$  pekat. Sampel selanjutnya dihidrolisis di bawah pengaruh ultrasonikasi pada suhu  $50\text{ }^{\circ}C$  selama 30 menit. Setelah itu, masing-masing sampel tersebut disaring. Hidrolisatnya diambil sebanyak 10 mL untuk analisis gula reduksi dan sisanya disimpan di dalam botol gelap. Hasil analisis gula reduksi digunakan untuk menentukan pH optimum, yang akan digunakan dalam percobaan selanjutnya.

## **2.2. Pengaruh waktu**

Untuk mempelajari pengaruh waktu, sampel disiapkan seperti dalam percobaan sebelumnya dan pH sampel diatur menjadi pH optimum, kemudian dihidrolisis pada suhu 50 °C selama 30 hingga 300 menit dengan interval waktu 30 menit. Kadar gula reduksi dari masing-masing perlakuan kemudian ditentukan untuk mendapatkan waktu optimum.

## **2.3. Pengaruh suhu**

Untuk mempelajari pengaruh suhu, 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. Analisis Gula Reduksi**

Dalam penelitian ini, analisis gula reduksi akan dilakukan secara kualitatif dan kuantitatif.

### **3.1. 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, lalu ditambahkan 2 mL sampel dan dipanaskan dalam penangas air mendidih selama 10 menit. Uji positif adanya gula reduksi ditandai dengan terbentuknya endapan  $\text{Cu}_2\text{O}$  yang berwarna merah bata, yang sekaligus mengindikasikan kadar gula reduksi dalam sampel.

### **3.2. Analisis kuantitatif**

#### **3.2.1. Pembuatan reagen DNS**

Sebanyak 1 gram asam 3,5-dinitrosalisilat dilarutkan dalam 20 mL akuades, kemudian dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan dihomogenkan.

Selanjutnya ke dalam labu ukur tersebut ditambahkan 1 gram NaOH; 0,2 gram fenol; 0,05 gram Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>; dan 1 mL Na-K-tartarat 40%, kemudian ditambahkan akuades hingga batas miniskus, lalu dihomogenkan.

#### **3.2.2. Pembuatan kurva standar**

Pembuatan kurva standar dilakukan menggunakan larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200, 400, 600, 800, dan 1000 mg/L. Masing-masing larutan glukosa sebanyak 0,5 mL dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan dengan 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. Larutan glukosa kemudian didinginkan hingga suhu kamar. Setelah itu dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 550 nm. Absorbansi dari masing-masing larutan glukosa diukur, kemudian nilai absorbansi yang diperoleh diplot terhadap konsentrasi untuk mendapatkan kurva standar dan persamaan garis yang menunjukkan hubungan antara absorbansi dengan konsentrasi glukosa.

#### **3.2.3. Penentuan kadar gula reduksi dalam sampel**

Untuk menentukan kadar gula reduksi dalam sampel, sampel disiapkan seperti dalam percobaan sebelumnya. Sampel juga dianalisis dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 550 nm untuk mendapatkan absorbansi. Kadar

gula reduksi dalam sampel dihitung menggunakan persamaan garis yang didapatkan dari kurva standar.

#### **4. Fermentasi Hidrolisat Onggok**

##### **4.1. 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. Setelah itu, 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, kemudian dibiarkan pada suhu ruang selama 72 jam. Selanjutnya kadar bioetanol ditentukan dengan kromatografi gas.

##### **4.2. Fermentasi dengan *Saccharomyces cerevisiae***

Percobaan dengan *Saccharomyces cerevisiae* dilakukan dengan cara yang sama seperti pada percobaan fermentasi dengan serbuk kulit kayu raru, kecuali dalam 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.

## 5. 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 Suhu injeksi Gas pembawa Tekanan gas pembawa Laju alir total Laju alir di dalam kolom Split ratio	Split 200 °C Nitrogen (N <sub>2</sub> ) 200 kPa 67,9 mL/menit 0,91 mL/menit 70
Kolom kromatografi gas Tipe Film Panjang Diameter dalam Tebal film Temperatur maksimum Total waktu penahanan	HP-20M Carbowax 50 meter 0,20 mm 0,10 µm 320 °C 10 menit
Detektor kromatografi gas Tipe Suhu Laju sampling	Flame Ionization Detector 220 °C 40 mdetik

Sebelum dilakukan analisis kadar bioetanol, terlebih dahulu dibuat larutan standar 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 masing-masing diambil sebanyak 1 µL dan diinjeksikan pada kolom kromatografi gas. Selanjutnya luas puncak yang dihasilkan pada kromatogram dicatat, lalu dibuat kurva standar etanol. Persamaan

yang diperoleh dari kurva standar digunakan untuk menghitung kadar bioetanol sampel yang dihasilkan dari proses fermentasi.

Bioetanol hasil fermentasi sampel 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 (%).