

## **BAB III**

### **METODE PENELITIAN**

#### **3.1 Rancangan Penelitian**

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah rancangan acak lengkap (RAL) pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor. Faktor pertama adalah variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) (Fermipan) yang terdiri dari 3 taraf yaitu 1 gram, 2 gram, dan 3 gram. Faktor kedua adalah variasi lama fermentasi yang terdiri dari 3 taraf yaitu 4 hari, 6 hari, dan 8 hari. Masing-masing faktor dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali.

#### **3.2 Waktu dan Tempat**

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Februari-Juni 2014, di dua tempat yaitu proses persiapan dan proses fermentasi limbah bagas tebu di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang dan proses destilasi dan uji kadar etanol di Laboratorium Kimia Universitas Muhammadiyah Malang.

#### **3.3 Variabel Penelitian**

Variabel dalam penelitian ini terdiri dari 2 macam yaitu variabel bebas dan variabel terikat.

### 3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah perlakuan jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) (1 gram, 2 gram, dan 3 gram) dan perlakuan lama fermentasi (4 hari, 6 hari, dan 8 hari).

### 3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat adalah yang diukur berupa nilai kadar etanol.

## 3.4 Alat dan Bahan

### 3.4.1 Alat

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah: botol slai, tabung reaksi, rak tabung, mikropipet, pipet, erlenmeyer, gelas ukur, beaker glass, spatula, sentrifius, autoklaf, timbangan analitik, vortex, jarum ose, hot plate, bunsen, inkubator, pH meter, LAF (*Laminar Air Flow*), alat destilasi, dan spektrofotometer UV-Vis.

### 3.4.2 Bahan

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah kapang *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp, dan *Botrytis* sp yang didapatkan dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim Malang,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $K_2Cr_2O_7$ ,  $H_2SO_4$ ,  $K_2SO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ,  $FeSO_4$ ,  $MnSO_4$ , *Yeast extract*, PDA (*Potato Dextrose Agar*), bagas tebu, aquades, larutan 0,1% *tween* 80,

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , larutan NaOH 1%, HCl 0,1 M, Na-K Tartat, aluminium foil, alkohol 70 % dan ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) (Fermipan).

### **3.5 Prosedur penelitian**

#### **3.5.1 Persiapan**

##### **3.5.1.1 Pembuatan Media PDA**

Pembuatan media PDA dilakukan dengan cara mencampurkan PDA sebanyak 3,9 gram ke dalam 100 mL aquades. Selanjutnya campuran tersebut dipanaskan dan diaduk sampai homogen. Larutan PDA dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian disterilisasi dalam autoklaf selama 15 menit pada suhu  $121^\circ\text{C}$  dan tekanan 15 atm.

##### **3.5.1.2 Pengembangbiakan Kapang**

Pengembangbiakan kapang *Trichoderma* sp dilakukan pada media PDA miring dengan bantuan kawat ose dan api bunsen di dalam LAF. Biakan kapang *Trichoderma* sp diinkubasi pada suhu kamar selama 6 hari (Safaria dkk, 2013), sedangkan kapang *Gliocladium* sp dan *Botrytis* sp diinkubasi selama 7 hari (Sutarno dkk, 2013).

##### **3.5.1.3 Bahan Baku**

Bagas tebu yang akan digunakan sebelumnya dicuci kemudian dipotong kecil-kecil (dirajang) dan dikeringkan pada suhu  $105^\circ\text{C}$  selama 6 jam. Setelah kering bagas

tebu digiling dan diayak dengan ukuran 60 mesh (Sutarno dkk, 2013). Hasil ayakan digunakan sebagai bahan baku substrat pembuatan enzim dan pembuatan bioetanol.

#### **3.5.1.4 Delignifikasi Sampel**

Tahap ini dilakukan untuk menghasilkan selulosa bagas tebu dengan kadar lignin yang rendah. Proses delignifikasi dilakukan dengan cara merendam bubuk bagas tebu sebanyak 200 gram dalam larutan NaOH 6% dengan perbandingan 1 : 15 (serbuk bagas tebu : larutan NaOH) selama 12 jam pada suhu 121<sup>0</sup> C. Kemudian dilakukan penyaringan menggunakan kertas saring dengan dicuci menggunakan aquades sampai pH netral (7). Residu berupa bagas tebu dikeringkan pada suhu 105°C selama 6 jam (Gunam dkk, 2011).

### **3.5.2 Pembuatan Enzim Kasar**

#### **3.5.2.1 Persiapan Media Pertumbuhan**

Media pertumbuhan merupakan larutan nutrisi yang berfungsi untuk menyediakan unsur-unsur yang diperlukan untuk pertumbuhan mikroba agar dapat meningkatkan produksi enzim. Komponen media pertumbuhan disajikan pada tabel 1. Semua komponen media pertumbuhan diaduk menggunakan *magnetic stirrer* hingga homogen (Astutik dkk, 2010).

### 3.5.2.2 Pembuatan Media Inokulum

Bagas tebu yang sudah terdeliknifikasi (substrat) yang telah digiling halus ditimbang sebanyak 20 gram, kemudian ditambahkan 100 mL larutan nutrisi. Campuran tersebut kemudian dihomogenkan dan disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121<sup>0</sup> C selama 15 menit kemudian didinginkan (Wahyuningtyas dkk, 2013).

**Tabel 3.1** komponen media pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*.

Komponen	g/L aquades
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5
CaCl.2H <sub>2</sub> O	0,2
FeSO <sub>4</sub>	0,2
MnSO <sub>4</sub>	0,2
<i>Yeast extract</i>	2

### 3.5.2.3 Produksi Enzim Selulase

Masing-masing spora biakan murni *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp, dan *Botrytis* sp dari media agar miring disuspensikan dalam 10 mL larutan 0,1% *tween* 80, dilakukan pelepasan spora menggunakan jarum inokulasi. Kemudian tabung divortex untuk memisahkan gumpalan spora dan untuk mendapatkan suspensi yang homogen. Suspensi dari kapang *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp, dan *Botrytis* sp masing-masing diambil sebanyak 10 mL dan diinokulasikan ke dalam medium inokulum yang telah disterilkan secara terpisah, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 6 hari untuk *Trichoderma* sp, (Safaria dkk, 2013), sedangkan kapang *Gliocladium* sp dan *Botrytis* sp diinkubasi selama 7 hari (Sutarno dkk, 2013).

#### **3.5.2.4 Ekstraksi Enzim Selulase**

Enzim yang dihasilkan dari fermentasi dipanen dengan cara menambahkan 100 mL larutan 0,1% *tween* 80, di *shaker* pada 150 rpm selama 120 menit pada suhu ruang, kemudian disentrifugasi pada 4.000 rpm selama 10 menit pada suhu 4°C. Supernatan yang terbentuk merupakan ekstrak enzim kasar (Wahyuningtyas dkk, 2013). Supernatan hasil sentrifugasi disimpan dalam kulkas pada suhu 4°C (Anggrawati, 2012).

#### **3.5.3 Pembuatan Bioetanol**

##### **3.5.3.1 Hidrolisis Bagas Tebu Menggunakan Enzim Kasar menjadi Glukosa**

Serbuk bagas tebu terdelignifikasi ditimbang sebanyak 2 gram dan ditambahkan supernatan enzim selulase kasar sebanyak 10 mL, kemudian ditambah akuades sampai volumenya menjadi 100 mL (Rahmawati, 2011) dan segera diinkubasikan pada *waterbath shaker* selama 120 jam (Gunam dkk, 2011) dengan pH 6 dan suhu 50°C (Rizkiyah, 2014).

##### **3.5.3.2 Fermentasi Glukosa Hasil Hidrolisis Selulosa Bagas Tebu Menjadi Bioetanol**

Larutan glukosa 100 mL hasil hidrolisis bagas tebu dimasukkan ke dalam gelas Erlenmeyer yang ditambahkan 0,1 gr  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1 gr  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  dan 0,1 gr  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , kemudian disterilisasi dengan menggunakan alat autoklaf pada suhu 121°C selama 1 jam lalu didinginkan (Susanto dkk, 2012). Ragi roti (*Saccharomyces*

*cerevisiae*) ditambahkan sesuai perlakuan yaitu 1 gram, 2 gram, dan 3 gram dan difermentasi selama 4 hari, 6 hari, dan 8 hari.

### **3.5.3.3 Destilasi Larutan Fermentasi Glukosa Hasil Hidrolisis Selulosa Bagas Tebu**

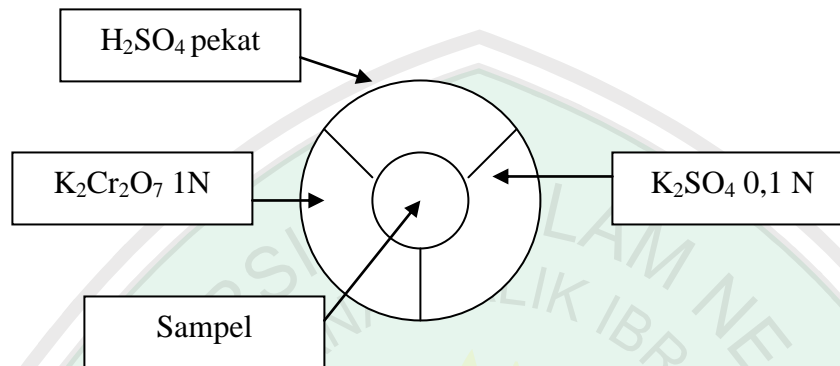
Larutan fermentasi glukosa hasil hidrolisis selulosa bagas tebu dimasukkan ke dalam alat destilasi alkohol. Proses destilasi dilakukan pada suhu  $79^{\circ}\text{C}$ , karena titik didih alkohol  $78\text{-}80^{\circ}\text{C}$  dan titik didih air  $100^{\circ}\text{C}$ . Pengembunan uap hasil destilasi tersebut ditampung ke dalam gelas penampung (Erlenmeyer) sampai uap tidak menetes lagi yang ditutup dengan plastik dan diikat karet (Kurniawati, 2009).

### **3.5.3.4 Analisa Kadar Bioetanol Dengan Metode Dikromat Oksidasi**

#### **3.5.3.4.1 Penentuan Sampel**

Cawan Conway diisi 1 mL  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  1N, 1 mL  $\text{H}_2\text{SO}_4$  pekat, 1 mL  $\text{K}_2\text{SO}_4$  0,1 N, dan 2 mL sampel pada bagian tengah cawan. Cawan ditutup, kemudian cawan digoyang sampai larutan bercampur pada sampel. Biarkan selama 2 jam. Jika terdapat etanol, maka akan terbentuk warna hijau. Hasil larutan diambil 1 mL, kemudian ditambahkan dengan aquades sampai volume 25 mL. Metode ini pengukuran absorbansi dilakukan menggunakan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 460 nm. Penentuan kadar etanol dapat dilakukan dengan membandingkannya dengan persamaan standar. Sebagai standar digunakan etanol (*pro analys*).

Keterangan pada cawan conway:



$$\text{Etanol (\%)} = \frac{\text{Absorbansi sampel} + 0,0124}{0,02837 \times \text{mL sampel} \times 1000} \times 100 \times f_{\text{pengencer}}$$

Keterangan:  $f_{\text{Pengencer}} = \left( \frac{25}{1} \right)$

#### 3.5.3.4.2 Penentuan Kurva Standar

Buat series standar dalam konsentrasi mulai dari 0, 1, 2, 3, 4, dan 5 (mg/25 mL). Masing-masing konsentrasi 1 mL, lalu ditambahkan 1 mL reagen, kemudian dihomogenkan. Selanjutnya campuran tersebut ditambah sampai 25 mL aquades kemudian diukur absorbansinya pada panjang gelombang 460 nm.

### 3.6 Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh variasi jumlah ragi roti dan lama fermentasi terhadap kadar etanol, digunakan rancangan penelitian berupa rancangan acak



lengkap (RAL) pola faktorial. Data pengaruh variasi jumlah ragi roti (*Saccharomyces cerevisiae*) dan lama fermentasi terhadap kadar etanol dianalisis dengan menggunakan Analysis Of Variance (ANOVA). Apabila perlakuan berpengaruh nyata terhadap parameter maka dilanjutkan dengan *Uji Duncan Multiple Test* (DMRT).

