

BAB IV

METODE PENELITIAN

Pada penelitian ini bahan baku yang digunakan adalah *reject pulp* yang diperoleh dari PT.RAPP. Metode hidrolisis digunakan secara biologi yaitu dengan menggunakan enzim sebagai biokatalis. Fermentasi dilakukan menggunakan teknik hidrolisis dan fermentasi yang dilakukan secara serentak, melalui proses sakarifikasi dan ko-fermentasi serentak (SKFS). Metode penelitian ini dijelaskan dengan dua tahap tahun kegiatan yaitu kegiatan tahun pertama (2010) dan kegiatan tahun kedua (2011).

4.1 Kegiatan Tahun I (2010)

4.1.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium mikrobiologi Jurusan Biologi FMIPA dan Laboratorium Bioproses Teknik Kimia Fakultas Teknik Universitas Riau jl. Bina Widya Km.12,5 Panam.

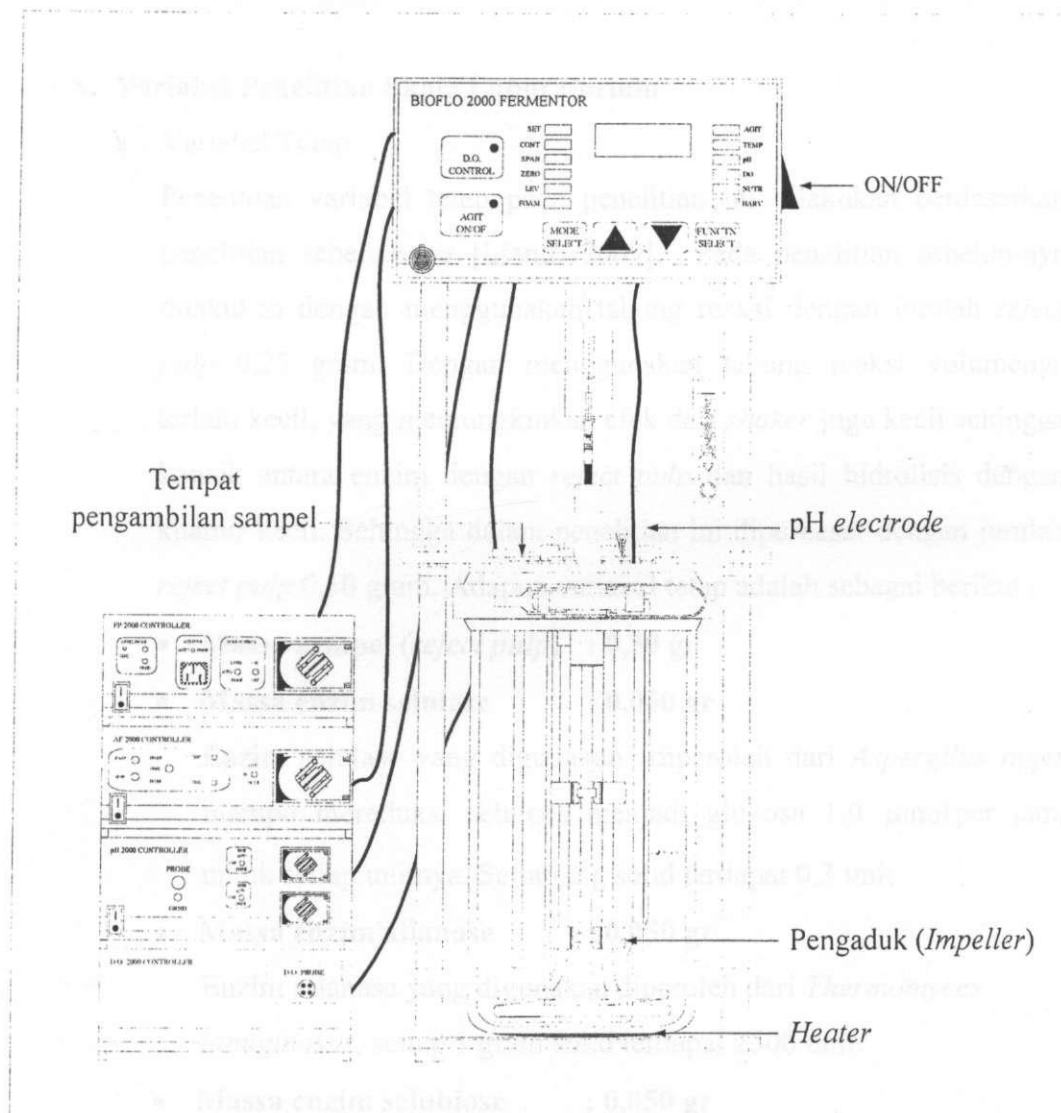
4.1.2 Bahan dan Alat

Bahan

Bahan baku utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah *reject pulp* yang merupakan hasil samping dari pengolahan industri *pulp* dan *paper*. Dua spesies *yeast* yang digunakan yaitu *Saccharomyces cerevisiae* dan *Pichia stipitis*. Kultur ini dipelihara pada media *Potato Dextro Agar* (PDA). Enzim komersial yang digunakan sebagai katalis pada proses hidrolisis yaitu enzim selulase, selobiose dan xilanase. Serta bahan-bahan kimia lain seperti KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$, Buffer Na-sitrat 0,1 M (pH 4; 4,5; 5; 5,5 dan 6 Glukosa dan Aquades, Buffer asetat pH 5, glukosa, dan *yeast extract*.

Alat

Proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak terjadi di dalam reaktor berupa BioFlo 2000 Fermentor, analisa etanol menggunakan *Gas Chromatografi* (GC), sterilisasi menggunakan *autoclave*, inkubator, *orbital shaker*, *syringe filter* 0,45 μm CA *membranes corning*, *beaker glass*, erlenmeyer, cawan petri, pemanas (*heater*), pipet volum, timbangan analitik, jarum ose, spatula, dan bunsen. Adapun skema peralatan penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.1 berikut.



Gambar 4.1 Skema Peralatan Penelitian

Bioreaktor ini terdiri dari vessel, heater, pengaduk, pH meter, *air flowmeter*, *dissolved oxygen*, serta controller dari masing-masing unit. Spesifikasi dari BioFlo 2000 Fermentor dapat dilihat pada Gambar 4.1.

4.1.3 Variabel Penelitian

Untuk mencapai tujuan penelitian, maka variabel proses yang digunakan dalam penelitian yaitu:

A. Variabel Penelitian Skala Laboratorium

a. Variabel Tetap

Penentuan variabel tetap pada penelitian ini dilakukan berdasarkan penelitian sebelumnya [Lianti, 2009]. Pada penelitian sebelumnya dilakukan dengan menggunakan tabung reaksi dengan jumlah *reject pulp* 0,25 gram. Dengan menggunakan tabung reaksi volumenya terlalu kecil, yang memungkinkan efek dari *shaker* juga kecil sehingga kontak antara enzim dengan *reject pulp* dan hasil hidrolisis dengan khamir kecil. Sehingga dalam penelitian ini diperbesar dengan jumlah *reject pulp* 0,50 gram. Adapun variabel tetap adalah sebagai berikut :

- **Massa sampel (*reject pulp*) : 0,50 gr**
- **Massa enzim selulase : 0,050 gr**

Enzim selulase yang digunakan diperoleh dari *Aspergillus niger* mampu mereduksi selulosa menjadi glukosa 1,0 μmol per jam, untuk setiap unitnya. Setiap mg solid terdapat 0,3 unit.

- **Massa enzim xilanase : 0,050 gr**

Enzim xilanase yang digunakan diperoleh dari *Thermomyces lanuginosus*, setiap 1 gram solid terdapat 2500 unit.

- **Massa enzim selubiose : 0,050 gr**

b. Variabel Berubah Skala Laboratorium

Untuk mencapai tujuan penelitian diperlukan variabel berubah terhadap faktor yang berpengaruh, baik pada proses hidrolisis maupun



fermentasi. Pada penelitian ini variabel berubah yang digunakan yaitu pH dan waktu. Adapun variabel berubah sebagai berikut :

- Waktu pengambilan sampel SKFS : 6, 12, 24, 48, 72, dan 96 jam.
- pH larutan buffer Na-sitrat (0,1 M) : 4; 4,5; 5; 5,5; 6.
- Penggunaan enzim : a. Enzim selulase dan xilanase
b. Enzim selulase, selobiose dan xilanase

B. Variabel Penelitian Skala 5 Liter

a. Variabel tetap

Adapun yang menjadi variabel tetap pada penelitian ini yaitu:

- Massa reject pulp : 100 gr
- Enzim selulase : 1 gr
- Enzim selobiose dan xilanase : 0,25 gr
- pH : 5
- Temperatur : Temperatur kamar
- Kecepatan pengadukan : 170 rpm

b. Variabel berubah

Yang menjadi variabel berubah dalam penelitian ini adalah:

- Penggunaan enzim : a. Enzim selulase
b. Enzim selulase dan xilanase
c. Enzim selulase, selobiose dan xilanase
- Waktu pengambilan sampel : 6, 12, 24, 48, 72 dan 96 jam

4.1.4 Prosedur Penelitian

Pada penelitian ini menggunakan proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKFS) dengan kombinasi tiga jenis enzim komersial (selulase, selobiose dan xilanase) pada proses hidrolisis dan kombinasi yeast



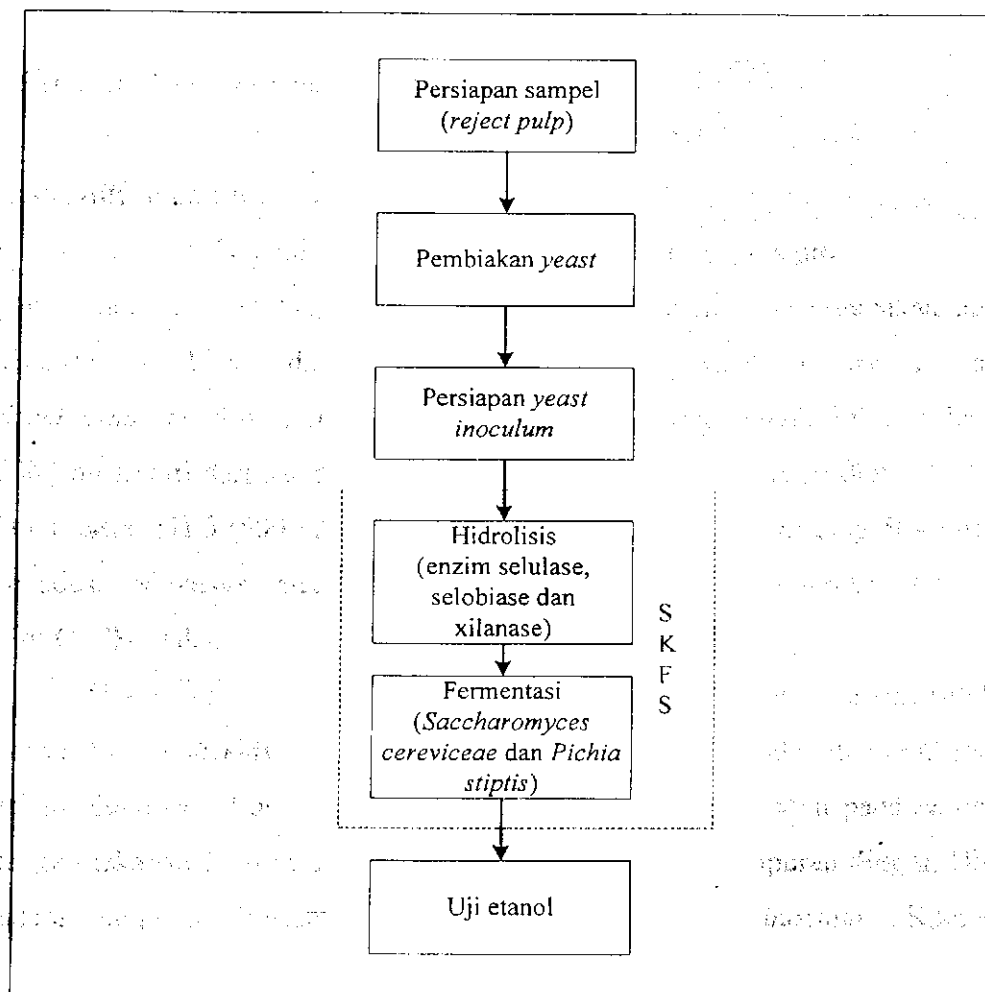
Saccharomyces cereviceae dan *Pichia stipitis* ketika terjadi proses fermentasi. Skema penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.2.

Persiapan Reject Pulp

Reject pulp yang digunakan di ambil dari PT. RAPP, Pangkalan Kerinci. Sebelum digunakan, *reject pulp* terlebih dahulu dicuci hingga bersih dan kemudian dikeringkan. Setelah itu, *reject pulp* dihaluskan hingga berukuran kurang lebih 40–60 mesh sehingga ukuran partikel lebih seragam. Lalu dikeringkan kembali dengan menggunakan oven pada suhu 60–70°C sehingga kadar air maksimal didalam *reject pulp* mencapai 10% dan disimpan di tempat kering. Perhitungan kadar Air sesuai dengan standar SNI 08–7070–2005.

Pembiakan Yeast

Saccharomyces cerevisiae dan *Pichia stipitis* di *preculture* pada media *Potato Dextrose Agar* (PDA) di dalam *petri dish* (kentang 200 gr/L, *dextrosa* 10 gr/L dan agar 15 gr/L). Sebelum digunakan media PDA disterilisasi menggunakan *autoclave* temperatur 121 °C selama 20 menit [Gozan, 2007]. Tujuan dari sterilisasi ini adalah untuk membunuh mikroorganisme lain yang tidak diinginkan selama proses pembiakan berlangsung. Biarkan PDA dingin selama lebih kurang 24 jam hingga uap yang ada di *petri dish* habis. Selanjutnya tanam *yeast* ke dalam PDA menggunakan jarum ose dengan kondisi steril. Proses inkubasi dillakukan selama 2-4 hari pada suhu 28-32°C, kemudian *yeast* dapat digunakan pada proses SKFS. Tujuan dari pembiakan ini adalah untuk mendapatkan jumlah *yeast* yang cukup untuk memulai proses fermentasi.



Gambar 4.2 Diagram Alir Tahapan Penelitian

Persiapan Yeast Inoculum

Saccharomyces cerevisiae dan *Pichia stipitis* fresh dari stock pembiakan di *preculture* pada 500 ml medium yang terdiri dari glukosa 10 g/L, *yeast extract* 1,0 g/L, KH_2PO_4 0,1 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g/L, dan $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g/L di dalam *erlenmeyer* 1000 ml [Gozan, 2007]. Sebelum di inokulasi, medium di sterilisasi menggunakan *autoclave* pada tekanan 15 psia dan temperatur 121°C selama 15 menit. Setelah medium dingin, kemudian kedalam masing-masing medium tersebut ditambahkan *yeast* sebanyak 7-8 ose lalu di *shaker* selama 24 jam dengan kecepatan putaran 150 rpm. Fungsi *shaker* adalah mempermudah difusi oksigen ke dalam medium dan campuran menjadi homogen. Adapun kegunaan dari

inokulum ini adalah mengadaptasikan sel terhadap media fermentasi, sehingga diharapkan fasa lag sebagai awal fermentasi dilewati.

Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak (SKFS)

Proses SKFS ini menggabungkan antara hidrolisis enzim dan fermentasi yang dilakukan serentak di dalam satu reaktor. Enzim yang digunakan adalah selulase, selobiose dan xilanase, serta yeast yang digunakan adalah *Saccharomyces Serevisiae* dan *Pichia Stipitis*. Medium untuk SKFS sebanyak 5000 ml terdiri dari sampel *reject pulp* (100 gram), *nutrients* medium (500 ml), bufer asetat pH 5 (500 ml), enzim, *yeast inoculum* (masing-masing 500 ml) dan aquades. *Nutrients* medium terdiri dari 1,0 gr/L $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$; 0,05 gr/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan 2 gr/L *yeast extract*.

Untuk run pertama menggunakan satu jenis enzim yaitu enzim selulase. *Reject pulp*, *nutrients medium*, bufer asetat pH 5 dan aquades di masukkan ke dalam bioreaktor. Campuran bahan disterilisasi selama 15 menit pada *autoclave* dengan tekanan 15 psia dan temperatur 121°C . Setelah campuran dingin, lalu ke dalam campuran dimasukkan enzim selulase dan *yeast inoculum*. Kemudian dilakukan proses SKFS dengan kecepatan 170 rpm dan suhu $\pm 30^\circ\text{C}$. Kultivasi diambil tiap 6, 12, 24, 48, 72 dan 96 jam dan disaring menggunakan *Syringe filter* $0,45 \mu\text{m}$ CA *membranes corning* dan dimasukkan ke dalam *test tube*. Setelah itu dilakukan pengujian konsentrasi etanol yang dihasilkan menggunakan *Gas Chromatografi* (GC).

Untuk run kedua menggunakan 2 jenis enzim yaitu enzim selulase (1 gram) dan xilanase (0,25 gram). Sedangkan untuk run ketiga menggunakan 3 jenis enzim yaitu enzim selulase (1 gram), selobiose (0,25 gram) dan xilanase (0,25 gram). Cara kerja yang digunakan sama dengan cara kerja pada run pertama.

Analisa

a. Analisa *Reject Pulp*

Reject pulp perlu dianalisa komposisi kimianya. Komponen kimia tersebut antara lain: selulosa, hemiselulosa, lignin dan ekstraktif. Analisa kadar



selulosa didalam reject pulp menggunakan standar TAPPI T 203 om-93, untuk menganalisa kadar hemiselulosa menggunakan standar SII 0528-81 sedangkan analisa kadar ekstraktif menggunakan standar TAPPI T-222 cm-98.

b. Analisa Konsentrasi Bioetanol

Konsentrasi bioetanol dapat dianalisa dengan *Gas Chromatography* (GC) jenis CARBOWAX/PEG-20M (3 m, 4,60 mm, FID) pada temperatur 55⁰C. Sebelum sampel diinjeksikan ke dalam GC, terlebih dahulu dilakukan pengukuran terhadap larutan standar yang akan digunakan sebagai dasar perhitungan konsentrasi etanol.



4.2 Kegiatan Tahun II (2011)

4.2.1 Bahan dan Alat

Bahan

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah:

Reject pulp, *Potato* Dekstro Agar (PDA), *Pichia Stipitis*, Enzim Selulase, Xilanase, Selobiase, *Yeast Extract*, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, *Buffer* Na-sitrat, Glukosa, Agar-agar, $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ dan *Aquades*. Berikut ini fungsi dari bahan-bahan kimia:

1. KH_2PO_4 sebagai sumber K^+ dan P. K^+ berfungsi sebagai kofaktor enzim dan P berguna untuk sintesis asam nukleat.
2. $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ sebagai sumber Mg yang merupakan kofaktor enzim.
3. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sebagai sumber nitrogen yang berguna bagi pembentukan asam nukleat.
4. *Yeast extract* berupa ragi pengembang roti yang berfungsi penyedia asam-asam amino dan vitamin.
5. *Buffer* Na-sitrat berfungsi untuk menjaga kondisi pH sesuai dengan besaran yang diinginkan.

Alat

Peralatan yang digunakan sebagai berikut :

Tabung reaksi dan rak, *autoclave*, inkubator, *shaker*, *beaker glass*, labu erlenmeyer, *gas chromatography*, pipet ukur, *petri dish*, jarum ose, pemanas (*heater*), timbangan analitik, spatula, bunsen, *sentrifuge tube*. Proses Sakarifikasi dan Ko-Fermentasi Serentak skala 10 L menggunakan Fermentor BioFlo 2000 (Gambar 4.1).

4.2.2 Variabel Penelitian

Untuk mencapai tujuan penelitian, maka variabel proses yang digunakan dalam penelitian yaitu:

Yang menjadi variabel berubah dalam penelitian ini adalah:



A. Variabel Penelitian Skala Laboratorium

Variabel Tetap

- pH larutan *buffer* Na-sitrat : 5
- Massa enzim selulase : 0,05 gr
- Massa enzim xilanase : 0,05 gr
- Massa enzim selobiase : 0,05 gr

Pemilihan massa enzim mengacu pada karakteristik jumlah enzim yang mampu menghidrolisis substrat. Rifai dan Mulyono (2011) melakukan proses SFS dengan enzim selulase, xilanase, dan selobiase menggunakan perbandingan enzim - substrat sebesar 1 : 10 (0,05 gr enzim : 0,5 gr *reject pulp*).

Variabel Berubah

- Massa sampel (*reject pulp*) : 0,5; 0,75; dan 1 gr
- Waktu pengambilan sampel SFS : 6, 12, 24, 48, 72, dan 96 jam
- Penggunaan enzim : a. Enzim selulase
b. Enzim selulase dan xilanase
c. Enzim selulase, selobiose dan xilanase

B. Variabel Penelitian Skala 10 Liter

Percobaan skala 10 L menggunakan proses SKFS seperti tata cara skala fermentor 5 L yang dilakukan pada kegiatan tahun I (2010).

Variabel tetap

Adapun yang menjadi variabel tetap pada penelitian ini yaitu:

- Massa *reject pulp* : 200 gr
- Enzim selulase : 2 gr
- Enzim selobiase dan xilanase : 0,5 gr
- pH : 5
- Temperatur : Temperatur kamar
- Kecepatan pengadukan : 170 rpm

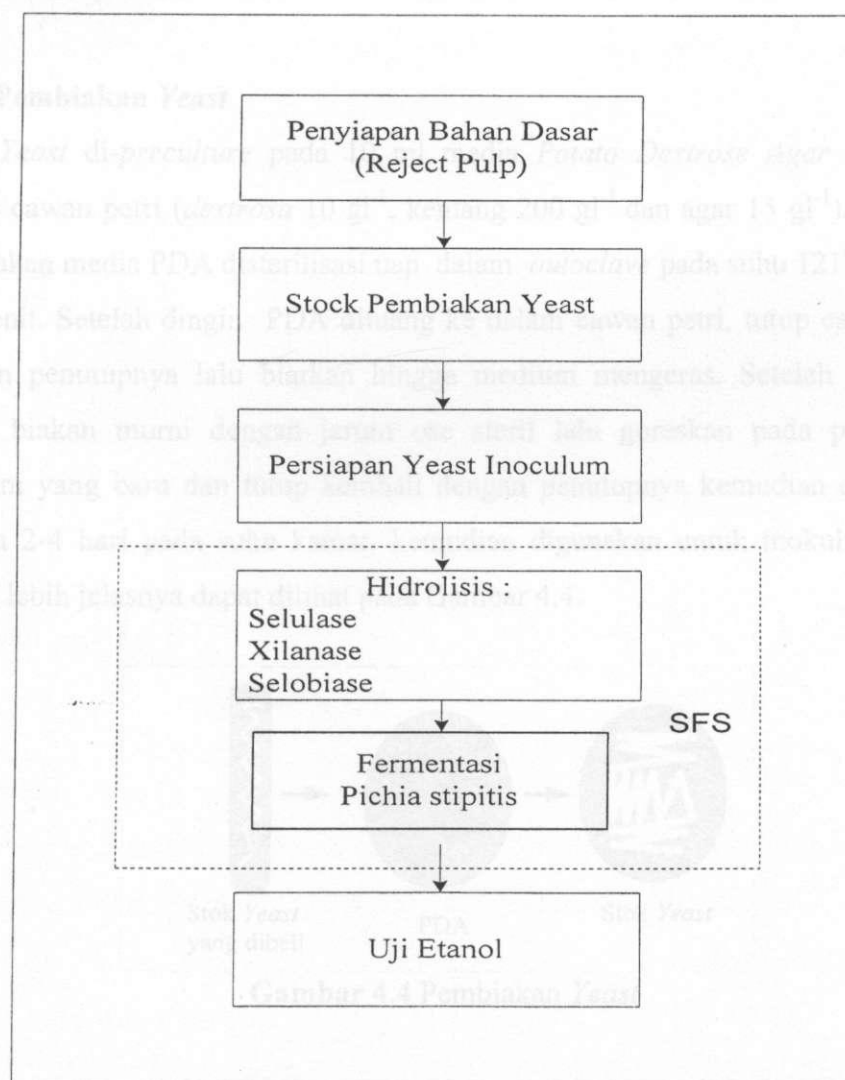
Variabel berubah

Yang menjadi variabel berubah dalam penelitian ini adalah:

- Penggunaan enzim : a. Enzim selulase
b. Enzim selulase dan xilanase
c. Enzim selulase, selobiose dan xilanase
- Waktu pengambilan sampel : 6, 12, 24, 48, 72 dan 96 jam

4.2.3 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian mengacu pada prosedur Sabki (2009) yang juga melakukan proses SFS dengan enzim selulase, xilanase, dan selobiase serta yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Beberapa prosedur yang harus dilalui dapat dilihat pada Gambar 3.3.



Gambar 4.3 Diagram Alir Tahapan Penelitian

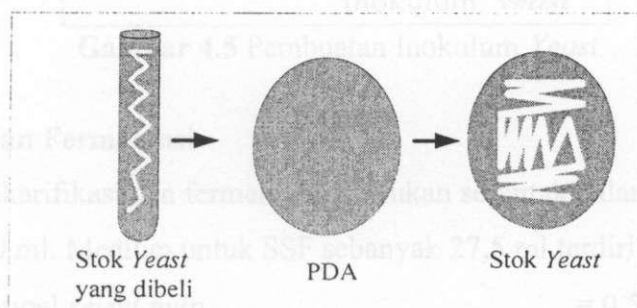
Tahapan prosedur pengerjaan tersebut sebagai berikut :

Penyiapan Bahan Dasar

Reject Pulp diambil dari PT.RAPP Pangkalan Kerinci. *Reject pulp* dicuci dengan air pada suhu kamar, kemudian dikeringkan dan dihaluskan (diblender) dengan ukuran 60-80 *mesh*. Komponen kimia tersebut antara lain: selulosa, hemiselulosa, lignin dan ekstraktif. Analisa kadar selulosa didalam *reject pulp* menggunakan standar TAPPI T 203 om-93, untuk menganalisa kadar hemiselulosa menggunakan standar SII 0528-81 sedangkan analisa kadar ekstraktif menggunakan standar TAPPI T-222 cm-98.

Stok Pemiakan Yeast

Yeast di-*preculture* pada 10 ml media *Potato Dextrose Agar* (PDA) di dalam cawan petri (*dextrosa* 10 gl^{-1} , kentang 200 gl^{-1} dan agar 15 gl^{-1}). Sebelum digunakan media PDA disterilisasi uap dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin PDA dituang ke dalam cawan petri, tutup cawan petri dengan penutupnya lalu biarkan hingga medium mengeras. Setelah mengeras ambil biakan murni dengan jarum ose steril lalu goreskan pada permukaan medium yang baru dan tutup kembali dengan penutupnya kemudian diinkubasi selama 2-4 hari pada suhu kamar, kemudian digunakan untuk inokulum *yeast*. Untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada Gambar 4.4.

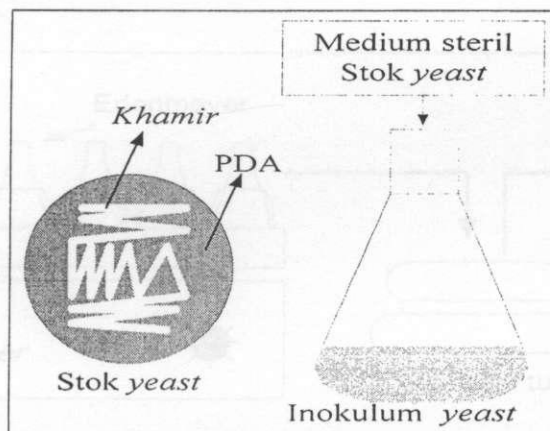


Gambar 4.4 Pemiakan Yeast

Persiapan Inokulum Yeast

Pembuatan inokulum *yeast* bertujuan untuk mengadaptasikan sel *yeast* terhadap media fermentasi. Dengan adanya adaptasi diharapkan fase lambat sebagai tahap awal fermentasi dilewati. Tahapan persiapan inokulum *yeast* dapat dilihat pada Gambar 4.5.

Pichia stipitis segar dari stok pembiakan diinokulasi dalam 150 ml medium (glukosa 1,5 gr; *yeast extract* 0,15 gr; KH_2PO_4 0,015 gr; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,015 gr; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,015 gr; dan *aquades*) dalam 250 ml erlenmeyer. Sebelum diinokulasi, medium disterilisasi uap dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan. Setelah dingin *yeast* dimasukan ke dalam medium lalu di *shaker* selama 24 jam. Fungsi *shaker* adalah mempermudah difusi oksigen ke dalam medium dan campuran menjadi homogen. Kegunaan inokulasi ini adalah mengadaptasikan sel terhadap media fermentasi, sehingga diharapkan *lag phase* sebagai awal fermentasi dilewati.



Gambar 4.5 Pembuatan Inokulum Yeast

Sakarifikasi dan Fermentasi

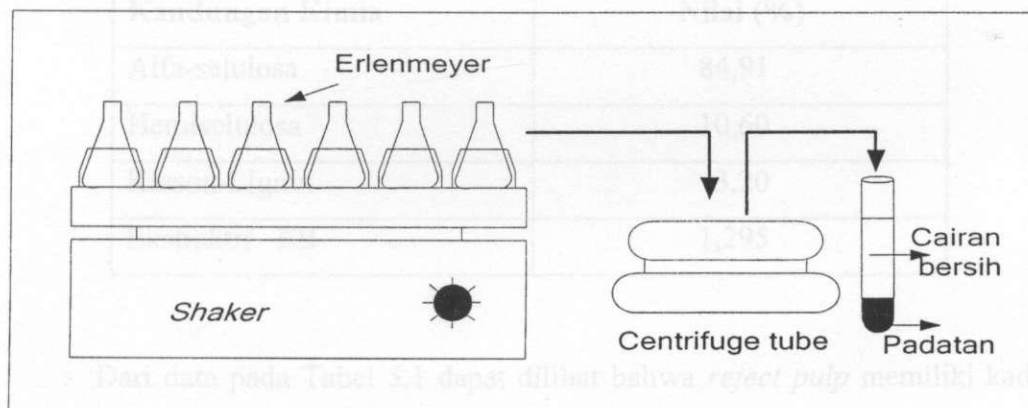
Proses sakarifikasi dan fermentasi dilakukan serentak dalam satu labu erlenmeyer 100 ml. Medium untuk SSF sebanyak 27,5 ml terdiri dari :

- Sampel *reject pulp* = 0,50; 0,75; dan 1 gr
- Nutrien medium = 7,5 ml

Nutrien medium terdiri dari $(1 \text{ gl}^{-1} (\text{NH}_4)_2\text{PO}_4; 0,05 \text{ gl}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dan $2 \text{ gl}^{-1} \text{yeast extract})$

- Buffer Na-sitrat (pH 5) = 1,5 ml
- Enzim selulase = 0,05 gr
- Enzim xilanase = 0,05 gr
- Enzim selobiase = 0,05 gr
- Inokulum yeast *Pichia stipitis* = 15 ml
- Aquades = 3,5 ml

Semua bahan, kecuali enzim dan inokulum disterilisasi selama 15 menit pada 121°C menggunakan *autoclave*. Enzim dan inokulum ditambahkan setelah media steril dingin. Kemudian *dishaker* dengan kecepatan 150 rpm selama 6 jam dan dilakukan juga untuk 12, 24, 48, 72 dan 96 jam. Kultivasi diambil dan dimasukkan dalam *micro sentrifuge tube*. Pisahkan cairan bersih dan endapan dalam tabung *sentrifuge*, kemudian analisa konsentrasi etanol yang dihasilkan dengan menggunakan *gas chromatography*. Skema peralatan penelitian dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Skematik Peralatan Penelitian