

- (2) menemukan penambahan proposrsi molasses terbaik pada media hidrolisat sekam padi untuk produksi etanol oleh ko-kultur *S.cerevisiae* dengan *C.tropicalis*
- (3) menemukan pH awal terbaik media hidrolisat sekam padi untuk produksi etanol oleh ko-kultur *S.cerevisiae* dengan *C.tropicalis*
- (4) menemukan waktu inkubasi terbaik untuk produksi etanol ko-kultur *S.cerevisiae* dengan *C. tropicalis* dari media hidrolisat sekam padi.

Hasil penelitian ini diduga dapat menghasilkan temuan baru dan diharapkan dapat diaplikasikan untuk produksi bioetanol secara komersial oleh pelaku industri dan masyarakat luas dengan tingkat efisiensi fermentasi yang tinggi.

BAB 4. METODE PENELITIAN

Penelitian tahun ketiga akan dilakukan secara eksperimental yang terdiri atas beberapa tahap yaitu:

a. Mikroorganisme dan kondisi biakan

Sebanyak 25 gr media Sabroad dektrose agar dilarutkan dalam 1 l aquadest, dihomogenkan dan disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit pada tekanan 1 atm. Media selanjutnya dituangkan dalam 50 buah cawan petri masing-masing 20 ml. Setelah dingin dan padat, khamir *Saccharomyces cerevisiae* dan *C. tropicalis* digoreaskan di atas lempengan agar dan diinkubasi pada suhu 28°C selama 7 hari. Peremajaan dan pemeliharaan masing-masing khamir dilakukan secara periodik setiap 3 bulan.

b. Perlakuan pendahuluan sekam padi

Sekam padi dikeringkan, digiling dan dikukus pada suhu 130°C selama 3 jam. Setelah dingin, sebanyak 600 g serbuk sekam padi dihidrolisis 250 ml H₂SO₄ pekat dalam wadah yang berisi 10 l aquadest. Campuran selanjutnya dipanaskan pada suhu 115°C selama 15 menit. Setelah dingin hidrolisat sekam padi disimpan dalam lemari pendingin sampai digunakan.

c. Efek penambahan sumber nitrogen dalam media

Penelitian efek kondisi nutrisi terhadap produksi bioetanol dan efisiensi fermentasi ko-kultur *S. cerevisiae* dengan *C. tropicalis* pada media cair sekam padi akan dikerjakan dengan penambahan nitrogen. Sumber nitrogen yang akan digunakan dalam

penelitian ini terdiri atas urea, NaNO_3 , dan NH_4NO_3 yang ditambahkan dalam media basal dengan komposisi berbeda, yaitu; 9 g/l urea, 9 g/l NaNO_3 , dan 9 g/l NH_4NO_3 . Komposisi media basal terdiri atas 60 g serbuk sekam padi, 1000 ml aquadest, 1 g/l KH_2PO_4 dan 0.7 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Sebanyak 1500 ml medium basal dibagi menjadi 3 bagian masing-masing 500 ml dan ke dalam masing-masing bagian ditambahkan 1) 9 g/l urea, 9 g/l NaNO_3 , dan 9 g/l NH_4NO_3 . Campuran dikocok secara sempurna dan masing-masing bagian dibagi lagi menjadi 5 bagian (100 ml) dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer (250 ml), Nilai pH media diatur dengan menambahkan 0,1% HCl 1 N atau NaOH sampai pH mencapai 5,5. Semua labu Erlenmeyer yang berisi media ditutup dengan kapas dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin diinokulasi dengan 10^6 /l spora *S. cerevisiae* dan 10^6 /l *C. tropicalis*. Semua media yang telah diinokulasi diinkubasi selama 7 hari pada suhu $28\text{-}30^\circ\text{C}$, kelembaban relatif 60-70% dalam keadaan gelap dengan agitasi 60 rpm. Media yang belum difermentasi dilakukan analisis karbon dan nitrogen. Media yang telah difermentasi dilakukan analisis karbon, nitrogen dan etanol.

d. Efek penambahan molasses

Penelitian efek kondisi nutrisi terhadap produksi bioetanol dan efisiensi fermentasi ko-kultur *S. cerevisiae* dengan *C. tropicalis* pada media cair sekam padi akan dikerjakan dengan penambahan sumber karbon. Sumber karbon yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah molasses dengan konsentrasi berbeda yang ditambahkan dalam media basal dengan yaitu 0, 5, 10, 15, dan 20 ml/l. Komposisi media basal terdiri atas 60 g serbuk sekam padi, 1000 ml aquadest, 3 g/l urea, 3 g/l NaNO_3 , 3 g/l NH_4NO_3 , 1 g/l KH_2PO_4 dan 0.7 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Sebanyak 2500 ml medium basal dibagi menjadi 5 bagian masing-masing 500 ml dan ke dalam masing-masing bagian ditambahkan 0, 5, 10, 15, dan 20 ml/l molasses. Campuran dikocok secara sempurna dan masing-masing bagian dibagi lagi menjadi 5 bagian (100 ml) dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer (250 ml), Nilai pH media diatur dengan menambahkan 0,1% HCl 1 N atau NaOH sampai pH mencapai 5,5. Semua labu Erlenmeyer yang berisi media ditutup dengan kapas dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin diinokulasi dengan 10^6 /l spora *S. cerevisiae* dan 10^6 /l *C. tropicalis*. Semua media yang telah diinokulasi diinkubasi selama 7 hari pada suhu $28\text{-}30^\circ\text{C}$, kelembaban relatif 60-

70% dalam keadaan gelap dengan agitasi 60 rpm. Media yang belum difermentasi dilakukan analisis karbon dan nitrogen. Media yang telah difermentasi dilakukan analisis karbon, nitrogen dan etanol.

e. Optimasi penambahan sumber nitrogen dalam media

Optimasi penambahan sumber nitrogen yang akan digunakan dalam penelitian ini terdiri atas urea, NaNO_3 , dan NH_4NO_3 yang ditambahkan dalam media basal dengan komposisi berbeda, yaitu; 1) 4 g/l urea, 3 g/l NaNO_3 , 3 g/l NH_4NO_3 , 2) 8 g/l urea, 6 g/l NaNO_3 , 6 g/l NH_4NO_3 , 3) 12 g/l urea, 9 g/l NaNO_3 , 9 g/l NH_4NO_3 , dan 4) 16 g/l urea, 12 g/l NaNO_3 , 12 g/l NH_4NO_3 . Komposisi media basal terdiri atas 60 g serbuk sekam padi, 1000 ml hidrolisat sekam padi, 20 ml/l molasses, 1 g/l KH_2PO_4 dan 0.7 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Sebanyak 2000 ml medium basal dibagi menjadi 4 bagian masing-masing 500 ml dan ke dalam masing-masing bagian ditambahkan 1) 4 g/l urea, 3 g/l NaNO_3 , 3 g/l NH_4NO_3 , 2) 8 g/l urea, 6 g/l NaNO_3 , 6 g/l NH_4NO_3 , 3) 12 g/l urea, 9 g/l NaNO_3 , 9 g/l NH_4NO_3 , dan 4) 16 g/l urea, 12 g/l NaNO_3 , 12 g/l NH_4NO_3 . Campuran dikocok secara sempurna dan masing-masing bagian dibagi lagi menjadi 5 bagian (100 ml) dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer (250 ml), Nilai pH media diatur dengan menambahkan 0,1% HCl 1 N atau NaOH sampai pH mencapai 5,5. Semua labu Erlenmeyer yang berisi media ditutup dengan kapas dan disterilisasi dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin diinokulasi dengan 10^6 /l spora *S. cerevisiae* dan 10^6 /l *C. tropicalis*. Semua media yang telah diinokulasi diinkubasi selama 7 hari pada suhu $28-30^\circ\text{C}$, kelembaban relatif 60-70% dalam keadaan gelap dengan agitasi 60 rpm. Media yang belum difermentasi dilakukan analisis karbon dan nitrogen. Media yang telah difermentasi dilakukan analisis karbon, nitrogen dan etanol.

f. Efek pH awal media

Sebanyak 4000 ml media hidrolisat sekam padi yang mengandung 20 ml/l molasses, 12 g/l urea, 9 g/l NaNO_3 , 9 g/l NH_4NO_3 , 1 g/l KH_2PO_4 dan 0.7 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dibagi menjadi 8 bagian masing-masing 250 ml dan masing-masing bagian ditambahkan 0,1% HCl 1 N atau NaOH untuk memperoleh pH awal media 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,5, 7,0. Selanjutnya masing-masing bagian dibagi lagi menjadi 5 bagian (100 ml) dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer (250 ml). Semua labu Erlenmeyer yang berisi media ditutup dengan kapas dan disterilisasi dalam autoklaf

pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah dingin diinokulasi dengan $10^6/l$ spora $10^6/l$ *S. cerevisiae* $10^6/l$ *C. tropicalis* dan diinkubasi selama 7 hari pada suhu 28-30°C, kelembaban relatif 60-70% dalam keadaan gelap dengan agitasi 60 rpm. Media yang telah difermentasi dilakukan analisis karbon dan nitrogen dan bioetanol.

g. Efek waktu inkubasi

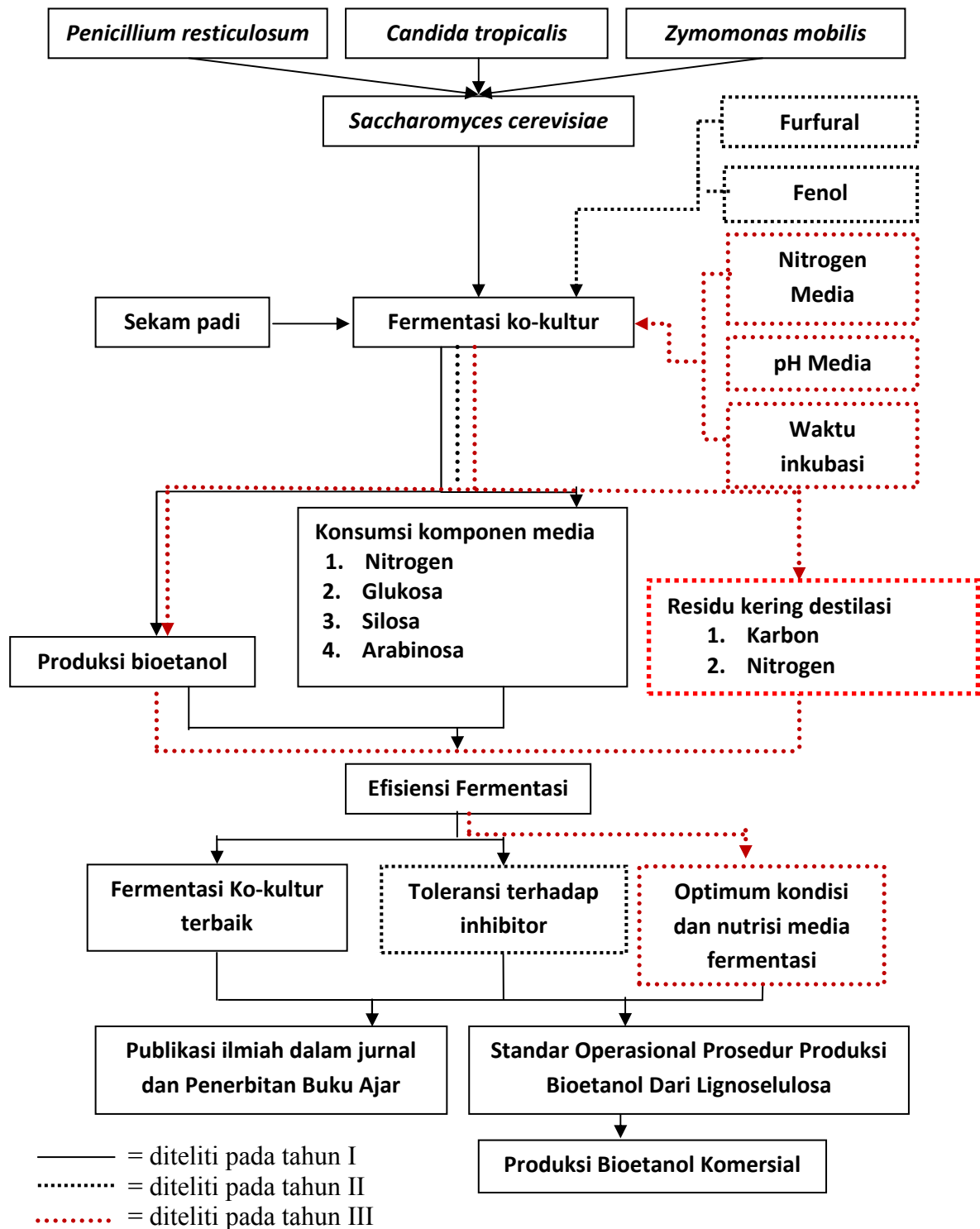
Sebanyak 5000 ml media hidrolisat sekam padi yang mengandung 12 g/l urea, 9 g/l NaNO₃, 9 g/l NH₄NO₃, 1 g/l KH₂PO₄ dan 0.7 g/l MgSO₄·7H₂O. Campuran dikocok secara sempurna dan masing-masing bagian dibagi lagi menjadi 10 bagian (100 ml) dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer (250 ml), Nilai pH media diatur dengan menambahkan 0,1% HCl 1 N atau NaOH sampai pH mencapai 5,5. Setelah dingin diinokulasi dengan $10^6/l$ spora $10^6/l$ *S. cerevisiae* $10^6/l$ *C. tropicalis* dan diinkubasi dengan waktu yang berbeda pada suhu 28-30°C, kelembaban relatif 60-70% dalam keadaan gelap dengan agitasi 60 rpm. Waktu inkubasi yang digunakan terdiri atas 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 dan 9 hari. Media yang telah difermentasi dilakukan analisis karbon dan nitrogen dan bioetanol.

h. Analisis bioetanol

Media cair sebelum dan setelah difermentasi dipanen dan dimasukkan ke dalam labu Erlenmeyer melalui kertas saring Whatman No. 1. Analisis bioetanol dilakukan dengan kromatografi gas menggunakan detektor ionisasi nyala dengan nitrogen sebagai gas pembawa, kemasan kolom baja Porapack Q dengan panjang 100 cm, ukuran mesh 80-100, suhu injektor dan detektor 200°C dan suhu kolom 180°C. Isopropanol digunakan sebagai standar internal.

i. Analisis karbon

Kadar karbon organik ditentukan dengan menggunakan metode oksidasi basah Walkey and Black (1965). Sebanyak 50 ml kultur cair dievaporasi pada 100°C selama 2 jam dan dikeringkan pada suhu 60°C sampai berat konstan untuk memperoleh serbuk kering. Sampel sebanyak 0.5 g digunakan untuk determinasi TOC yang diukur pada panjang gelombang 651 nm. Sebanyak 0,50 g serbuk kering residu destilasi ukuran mesh < 0,5 mm, dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml, ditambahkan 5 ml K₂Cr₂O₇ 1 N dan dikocok. Setelah tercampur ditambahkan 7,5 ml H₂SO₄ pekat, dikocok lalu diamkan selama 30 menit. Diencerkan dengan air bebas ion, biarkan dingin dan



Gambar 4.1. Bagan alir pencapaian tujuan akhir penelitian

diimpitkan selama 12 jam. Absorbansi larutan jernih diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 561 nm. Sebagai pembanding dibuat standar karbon dengan konsentrasi 0 dan 250 ppm, dengan memipet 0 dan 5 ml larutan standar 5.000 ppm ke dalam labu ukur 100 ml dengan perlakuan yang sama dengan pengerjaan sampel serbuk destilasi kering.

j. Analisis nitrogen

Konsentrasi ($\text{NH}_4\text{-N}$) ditentukan menggunakan metoda the American Society of Agronomy and Soil Science Society of America (1982). Sebanyak 10 ml kultur media dievaporasi pada suhu 100°C selama 2 jam untuk memperoleh serbuk kering. Sampel (0.5 g) ditambahkan ke dalam tabung digesti dan ditambahkan 1 g campuran selenium (1.55 g Kristal CuSO_4 , 96.9 g Na_2SO_4 dan 1.55 g selenium) serta ditambahkan 3 ml 97% H_2SO_4 , dicampur dan didigesti pada suhu 350°C selama 4 jam untuk memperoleh ekstrak tak berwarna, dinginkan pada suhu ruang, diencerkan dengan 50 ml air distilat, kocok dan diamkan satu malam. Dua ml ekstrak dipindahkan ke dalam tabung gelas borosilikat baru tambahkan secara berurutan 4 ml tartrate buffer (50 g NaOH dan 50 g $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ /l) dan larutan sodium phenate (100 g NaOH dan 125 g phenol/l), kocok dan biarkan selama 10 min. Sebanyak 4 ml, 5% NaOCl ditambahkan, kocok dan biarkan selama 10 min. Selanjutnya absorbansi diukur pada panjang gelombang 636 nm. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ digunakan sebagai standar nitrogen.

j. Efisiensi fermentasi

Efisiensi fermentasi ko-kultur *S. cerevisiae* dan *C. tropicalis* untuk produksi etanol kedua media sekam padi dan tongkol jagung menggunakan formula efisiensi fermentasi yang diuraikan pada tahun pertama.

k. Analisis statistika

Data hasil pengamatan akan dianalisis menggunakan analisis sidik ragam (ANOVA) taraf 0,05 dan jika terdapat pengaruh yang signifikan ($P < 0,05$) untuk mengetahui letak perbedaan dilakukan uji lanjut dengan uji beda nyata jujur pada taraf kepercayaan 0,05.