

**Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Lignin Ampas
Tebu (*Saccarum officinarum*) dengan *Raoultella* sp.**

SKRIPSI

oleh :
SUCI PRAWIJANA SOESTYA
0810920016-92



JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012

**Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Lignin Ampas
Tebu (*Saccarum officinarum*) dengan *Raoultella* sp.**

SKRIPSI

**Sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia**

oleh :

**SUCI PRAWIJANA SOESTYA
0810920016-92**



**JURUSAN KIMIA
FAKULTAS MATEMATIKA DAN ILMU PENGETAHUAN ALAM
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2012**

LEMBAR PENGESAHAN SKRIPSI

**Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Lignin Ampas Tebu
(*Saccarum officinarum*) dengan *Raoultella* sp.**

oleh:

SUCI PRAWIJANA SOESTYA

0810920016-92

Setelah dipertahankan di depan Majelis Penguji
pada tanggal
dan dinyatakan memenuhi syarat untuk memperoleh gelar
Sarjana Sains dalam bidang Kimia

Pembimbing I

Pembimbing II

Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc
NIP.19580711 199203 2 002

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP.19639404 198701 1 001

Mengetahui,
Ketua Jurusan Kimia
Fakultas MIPA Universitas Brawijaya

Dr. Sasangka Prasetyawan, MS
NIP.19630404 198701 1 001

LEMBAR PERNYATAAN

Saya yang bertanda tangan di bawah ini :

Nama : Suci Prawijana Soestya

NIM : 0810920016-92

Jurusan : Kimia

Penulisan tugas akhir berjudul :

Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Lignin Ampas Tebu (*Saccarum officinarum*) dengan *Raoultella* sp.

Dengan ini menyatakan bahwa :

1. Isi dari tugas akhir yang saya buat adalah benar-benar karya sendiri dan tidak menjiplak karya orang lain, selain nama-nama yang termaktub di isi dan tertulis di daftar pustaka dalam tugas akhir ini.
2. Apabila di kemudian hari ternyata tugas akhir yang saya tulis terbukti hasil jiplakan, maka saya bersedia menanggung segala resiko yang akan saya terima.

Demikian pernyataan ini dibuat dengan segala kesadaran.

Malang, Januari 2012

(Suci Prawijana Soestya)
NIM.0810920016-92

Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Lignin Ampas Tebu (*Saccarum officinarum*) dengan *Raoultella* sp.

ABTRAK

Tujuan penelitian ini adalah untuk mempelajari kemampuan isolat bakteri lignolitik dalam mendegradasi lignin dan menentukan kondisi optimum fermentasi lignin meliputi waktu inkubasi, pH dan temperatur. Bakteri pendegradasi lignin yang digunakan berasal dari hasil isolasi jerami padi yaitu *Raoultella* sp. Degradasi lignin melalui fermentasi diamati menggunakan metode spektrofotometer dengan mengukur kadar vanilin sebagai produk fermentasi pada panjang gelombang 348 nm. Proses fermentasi dilakukan selama 6 hari, dimulai dengan menumbuhkan sel bakteri pada media pertumbuhan selama 3 hari atau saat mencapai fase log. Hasil menunjukkan bahwa fermentasi lignin dengan *Raoultella* sp mampu memecah struktur kompleks lignin. Hasil penelitian menunjukkan bahwa pada konsentrasi lignin 1 % kondisi optimum fermentasi dicapai pada waktu inkubasi selama 5 hari, pada pH 7 dan temperatur 40°C menghasilkan vanilin 17,3 mg/L.

Kata kunci : lignin, lignoselulosa, fermentasi, vanilin, Raoultella sp

Determination of Optimum Conditions Lignin Fermented Of Bagasse (*Saccharum officinarum*) Using *Raoultella* sp.

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the ability of lignolytic bacterial isolate to degrade lignin and determine the optimum condition of lignin fermentation including time, pH and temperature. In a previous study, species of lignin degrading bacteria were isolated from paddy straw namely *Raoultella* sp. Lignin degradation by fermentation was observed using spectrophotometric method by measuring the concentration of vanillin as a fermentation product on λ 348nm. The fermentation process carried out for 6 days, started by growing bacterial cells in growth medium for 3 days or when it reached the log phase. The results indicated that lignin fermentation with *Raoultella* sp caused breakdown the complex structure of lignin. The result showed that at lignin concentration 1 %, optimum condition was reached at incubation time for 5 days, pH 7 and temperature 40°C producing vanillin 17.3 mg/L.

Keywords : lignin, lignocellulose, fermentation, vanillin, *Raoultella* sp

KATA PENGANTAR

Puja dan puji syukur alhamdulillah penulis haturkan kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan hidayahNya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir yang berjudul “**Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Lignin Ampas Tebu (*Saccarum officinarum*) dengan *Raoultella sp.***” sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana Sains jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang.

Dapat terselesaikannya tugas akhir ini tidak terlepas dari bantuan berbagai pihak yang telah menyumbangkan tenaga, pikiran, dan waktunya. Oles sebab itu, penulis memberikan penghargaan dan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Dra. Anna Roosdiana, M.App.Sc., selaku dosen pembimbing I yang telah banyak meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan, arahan, dukungan serta nasehat dalam penyelesaian tugas akhir ini.
2. Dr. Sasangka Prasetyawan, MS., selaku dosen pembimbing II dan selaku Ketua Jurusan Kimia yang telah memberikan bimbingan, arahan, dukungan serta nasehat dalam penyelesaian tugas akhir ini.
3. Dr. Soebiantoro, Apt.M.Sc., selaku dosen penasehat akademik yang telah memberikan nasehat selama masa perkuliahan.
4. Dr. Diah Mardiana, MS., selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan saran dalam penyelesaian tugas akhir ini.
5. Ayah, ibu, adik, seluruh keluarga, Ajeng, Vindi, Enggar, Ayu, Rizki, teman-teman WG dan seluruh teman-teman Jurusan Kimia angkatan 2008 yang selalu mendoakan, memberikan semangat, dukungan, dan kasih sayang kepada penulis dalam mengerjakan tugas akhir ini.
6. Semua pihak yang telah banyak membantu hingga terselesaikannya tugas akhir ini.

Tugas akhir ini tentunya masih terdapat banyak kesalahan dan kekurangan, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran demi penyempurnaan tugas akhir ini.

Malang, Januari 2012

Penulis

DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
HALAMAN PERNYATAAN	iii
ABSTRAK	iv
ABSTRACT	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
BAB I PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Batasan Masalah	3
1.4 Tujuan Penelitian	3
1.5 Manfaat Penelitian	3
BAB II TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Ampas Tebu	4
2.2 Lignoselulosa	4
2.3 Lignin	5
2.4 Fermentasi	6
2.5 Bakteri Pendegradasi Lignin	7
2.6 Enzim	8
2.7 Hipotesis	10
BAB III METODE PENELITIAN	
3.1 Waktu dan Tempat Penelitian	11
3.2 Bahan dan Alat Penelitian	11
3.2.1 Bahan Kimia	11
3.2.2 Bahan Penelitian	11
3.2.3 Alat Penelitian	11
3.3 Tahapan Penelitian	12
3.4 Cara Kerja	12
3.4.1 Isolasi Lignin dari Ampas Tebu	12
3.4.2 Pembuatan Media Padat	12
3.4.3 Peremajaan Biakan Murni	13
3.4.4 Pembuatan Media Cair	13

3.4.5	Pembuatan Inokulum.....	13
3.4.6	Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Raoultella</i> sp	13
3.4.7	Pembuatan Kurva Standar Vanilin	14
3.4.8	Penentuan Waktu Inkubasi Optimum	14
3.4.9	Penentuan pH Optimum	14
3.4.10	Penentuan Temperatur Optimum	15
BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN		
4.1	Pembiakan <i>Raoultella</i> sp	16
4.2	Kemampuan Biodegradasi Lignin oleh <i>Raoultella</i> sp	17
4.3	Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Lignin oleh <i>Raoultella</i> sp	22
4.3.1	Penentuan Waktu Inkubasi Optimum	22
4.3.2	Penentuan pH optimum	23
4.3.3	Penentuan Temperatur Optimum	25
BAB V KESIMPULAN DAN SARAN		
5.1	Kesimpulan	27
5.2	Saran	27
DAFTAR PUSTAKA		28
LAMPIRAN		35

DAFTAR GAMBAR

Gambar 2.1	Struktur <i>building block</i> lignin	6
Gambar 4.1	Grafik hubungan antara waktu inkubasi terhadap densitas optik	17
Gambar 4.2	Situs aktif lakase	19
Gambar 4.3	Reaksi enzimatis lignin peroksidase	20
Gambar 4.4	Reaksi enzimatis mangan peroksidase dan lakase ...	20
Gambar 4.5	Siklus katalitik ligninolitik dalam menghasilkan vanilin	21
Gambar 4.6	Grafik hubungan antara waktu inkubasi fermentasi terhadap konsentrasi vanilin	22
Gambar 4.7	Grafik hubungan antara pH fermentasi terhadap konsentrasi vanilin.....	24
Gambar 4.8	Grafik hubungan antara temperatur terhadap konsentrasi vanilin.....	25
Gambar B.1	Spektra IR lignin ampas tebu	36
Gambar E.1	Kurva pertumbuhan <i>Raoultella</i> sp.....	43
Gambar F.1	Kurva baku vanilin	44

DAFTAR TABEL

Tabel B.1	Interpretasi gugus fungsi pada spektra FT-IR lignin	36
Tabel E.1	Densitas optik sel Raoultella sp pada interval 7 hari	42
Tabel F.1	Absorbansi larutan standar vanilin λ 348 nm	44
Tabel G.1	Konsentrasi vanilin pada penentuan Inkubasi optimum	45
Tabel G.2	Konsentrasi vanilin pada penentuan pH optimum	45
Tabel G.3	Konsentrasi vanilin pada penentuan temperatur optimum	46
Tabel H.1.1	Analisa pengaruh waktu inkubasi fermentasi terhadap konsentrasi vanilin	47
Tabel H.1.2	Data analisa varian satu arah	48
Tabel H.1.3	Data uji BNT 5% terhadap variasi waktu inkubasi	49
Tabel H.2.1	Analisa pengaruh PH fermentasi terhadap konsentrasi vanilin	50
Tabel H.2.2	Data analisa varian satu arah	51
Tabel H.2.3	Data uji BNT 5% terhadap variasi pH	52
Tabel H.3.1	Analisa pengaruh temperatu fermentasi terhadap konsentrasi vanilin	53
Tabel H.3.2	Data analisa varian satu arah.....	54
Tabel H.3.3	Data uji BNT 5% terhadap variasi temperature fermentasi	55

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran A	Alur penelitian	35
Lampiran B	Karakterisasi Lignin Ampas Tebu	36
Lampiran C	Preparasi Larutan	37
C.1	Pembuatan Larutan NaOH 5%	37
C.2	Pembuatan Larutan HCl	37
C.3	Pembuatan Larutan Asam Sitrat 0.1	37
C.4	Pembuatan Larutan Dinatriu37 Hidrogen Fosfat 0.2 M	37
C.5	Pembuatan Larutan Buffer Sitrat-Fosfat pH 4, 5, 6, 7, 8	37
C.6	Larutan Stok Vanilin	37
C.7	Larutan Standar Vanilin	38
Lampiran D	Perhitungan Preparasi Larutan	38
D.1	Preparasi Larutan NaOH 5%.....	38
D.2	Preparasi Larutan HCl 6 M	38
D.3	Larutan Asam Sitrat ($C_6H_8O_7$) 0,1 M.....	39
D.4	Larutan Dinatrium Hidrogen Fosfat	40
D.5	Larutan buffer sitrat-fosfat pH 4	40
D.6	Larutan buffer sitrat-fosfat pH 5	41
D.7	Larutan buffer sitrat-fosfat pH 6	41
D.8	Larutan buffer sitrat-fosfat pH 7	41
D.9	Larutan buffer sitrat-fosfat pH 8	42
Lampiran E	Pembuatan Kurva Pertumbuhan <i>Raoultella</i> sp.....	42
Lampiran F	Pembuatan Kurva Baku Vanilin.....	44
Lampiran G	Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Lignin dengan <i>Raoultella</i> sp.	45
Lampiran H	Analisa Statistik	47
H.1	Penentuan Waktu Inkubasi Optimum	47
H.2	Penentuan pH Optimum	50
H.3	Penentuan Temperatur Optimum	53

BAB I

PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Bagasse atau ampas tebu termasuk biomass yang sangat potensial untuk dimanfaatkan menjadi sumber energi, makanan ternak atau produk yang berbasis lignoselulosa seperti kertas, biogas, bioetanol dan lain-lain. Potensi ampas tebu sebagai bahan baku (raw material) untuk dimanfaatkan menjadi produk yang mempunyai nilai tambah sangat tepat, karena keberadaannya yang sangat melimpah [1].

Ketersediaan bahan lignoselulosa sebagai limbah pertanian, perkebunan dan kehutanan menjadikan bahan ini berpotensi sebagai sumber energi [2]. Bahan lignoselulosa terdiri dari polisakarida yaitu selulosa dan hemiselulosa, lignin dan senyawa-senyawa yang larut dalam air. Polisakarida merupakan komponen terpenting dalam proses konversi menjadi produk berbasis lignoselulosa [3]. Konversi ini terhambat disebabkan oleh ikatan kompleks antara lignin, selulosa dan hemiselulosa [4]. Kandungan lignin sangat tinggi yaitu 19.7 % dengan kadar protein yang rendah [5]. Salah satu teknologi yang digunakan untuk mendegradasi lignin yaitu fermentasi. Aktivitas mikroba sangat menentukan keberhasilan fermentasi, dimana setiap mikroba memiliki syarat untuk hidup seperti pH tertentu, temperatur tertentu, konsentrasi inokulum, dan lamanya fermentasi [5,6]. Melalui fermentasi lignin dengan bantuan mikroorganisme menyebabkan terjadinya penurunan lignin, peningkatan pencernaan selulosa dan jumlah protein sehingga meningkatkan kualitas ampas tebu sebagai sumber energi, misalnya untuk pakan ternak.

Penelitian mengenai biodegradasi lignin telah banyak dilakukan dengan tujuan menghilangkan lignin. Selama ini perombakan lignin banyak dilakukan dengan jamur wood rot fungi, seperti yang dilakukan oleh Samsuri dkk., [1], Sun dkk., [7], Sen dkk., [8] dan Hossain dkk., [9] melakukan degradasi lignin menggunakan jamur pelapuk putih seperti *Pleurotus ostreatus*, *Phanerochate chryporium*, *Lentinus edodes*, dan *Ceriporiopsis subvermispora*. Penggunaan jamur pelapuk putih dikarenakan

kemampuannya dalam menghasilkan enzim oksidatif ekstraseluler yang dapat memecah kekuatan pada lignin yaitu meliputi lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP), dan lakase [8]. Menurut Prihartini [9], penggunaan jamur pelapuk putih dalam degradasi lignin hanya akan mengakibatkan perubahan struktur lignoselulosa pada dinding sel jerami untuk memudahkan penetrasi enzim oleh mikroba di dalam rumen disamping biaya yang dikeluarkan tinggi dan sulit untuk diimplementasikan. Menurut penelitian yang dilakukan Samsuri dkk [1], terjadi kehilangan berat lignin akibat degradasi dengan jamur pelapuk putih hanya berkisar 20-22% selama 8 minggu.

Selain jamur, terdapat beberapa bakteri yang menghasilkan jenis enzim untuk mendegradasi lignin. Berdasarkan hasil penelitian Ruttiman dkk., [11] bakteri memiliki kemampuan enzimatis untuk mencerna senyawa aromatic dan rantai samping pada lignin. Pemanfaatan mikroba *Bacillus* dan *Micrococcus* untuk mendegradasi lignin telah diteliti oleh Matani dkk., [12]. Dalam jangka waktu inkubasi selama 14 hari, bakteri ligninolitik tersebut dapat mendegradasi lignin sekitar 73-75% lignin. Prihartini, [10] melakukan isolasi mikroba dari substrat jerami padi yang bersifat ligninolitik yang mampu mendegradasi lignin, yaitu *Raoutella* sp dan *Ochrobactrum* sp. dengan kemampuan mendegradasi lignin sampai 100%.

Berdasarkan kemampuan isolat mikroba tersebut dimungkinkan dapat mendegradasi lignin yang berasal dari ampas tebu. Sehingga perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai kondisi optimal fermentasi lignin meliputi waktu fermentasi, temperatur, dan pH optimum sehingga pengurangan lignin dengan isolate *Raoutella* sp lebih optimal.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang yang telah diuraikan, maka dirumuskan suatu permasalahan, yaitu bagaimana proses degradasi lignin melalui fermentasi oleh bakteri dan bagaimana kondisi optimum meliputi pH, waktu inkubasi, dan temperatur pada fermentasi lignin dengan isolat *Raoutella* sp.

1.3 Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini diantaranya :

1. Sumber lignin yang digunakan berasal dari ampas tebu.
2. Mikroba *Raoultella* sp. merupakan isolat hasil isolasi jerami padi, koleksi Dr. Indah Prihartini dari Universitas Muhammadiyah Malang.
3. Mikroba *Raoultella* sp. menghasilkan enzim ligninolitik.
4. Waktu inkubasi fermentasi lignin selama 6 hari dengan pengukuran tiap 24 jam.
5. Variasi derajat keasaman atau pH adalah 4, 5, 6, 7, 8.
6. Variasi temperatur fermentasi adalah 30°C, 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C.

1.4 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah :

1. Mengetahui proses degradasi lignin melalui fermentasi oleh *Raoultella* sp.
2. Menentukan kondisi optimum fermentasi lignin ampas tebu dengan *Routella* sp.

1.5 Manfaat Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi mengenai kondisi optimum fermentasi lignin dengan menggunakan mikroba *Routella* sp. yang meliputi lama waktu fermentasi, pH, dan temperatur optimum sehingga konversi ampas tebu menjadi produk berbasis lignoselulosa dapat dilakukan secara optimal.

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Ampas Tebu

Tebu (*Sacharum officinarum*) merupakan tanaman bahan baku pembuatan gula yang hanya dapat ditanam di daerah beriklim tropis. Umur tanaman sejak ditanam sampai bisa dipanen mencapai kurang lebih satu tahun [13].

Klasifikasi botani tanaman tebu adalah sebagai berikut [14]:

Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Agiospermae
Kelas	: Monocotyledone
Famil	: Poaceae
Genus	: Saccharum
Spesies	: Saccharum officinarum

Bagasse merupakan hasil samping dari pembuatan gula tebu yang memiliki nilai ekonomi rendah dan akan menimbulkan permasalahan bagi pabrik apabila bagasse ditimbun dalam kurun waktu tertentu karena bahan tersebut mudah terbakar, mengotori lingkungan sekitar, dan untuk penyimpanannya menyita lahan yang cukup luas [15]. Sejauh ini bagasse belum dimanfaatkan menjadi produk yang memiliki nilai tambah sebagai residu padat dalam pengolahan tebu menjadi gula. Bagasse yang berbasis lignoselulosa dapat dimanfaatkan sebagai sumber energi, makanan ternak ataupun produk-produk yang berbasis lignoselulosa seperti kertas, bietanol, dan lain-lain [3]. Menurut Rachmania dkk., [16] serat yang terkandung dalam ampas tebut dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak, namun penggunaannya terkendala adanya lignin yang cukup tinggi (19,7%) dan kadar protein rendah (28%).

Ampas tebu sebagian besar mengandung lignoselulosa yang terdiri dari selulosa 40%, hemiselulosa 29%, lignin 13% dan silica, selain itu ampas tebu juga mengandung protein kasar 3,1%, lemak kasar 1,5%, abu 8,8%, BETN 51,7% dan serat kasar 34,9% [17].

2.2 Lignoselulosa

Lignoselulosa merupakan sumber utama bahan organik yang dapat diperbaharui dan merupakan komponen utama tanaman

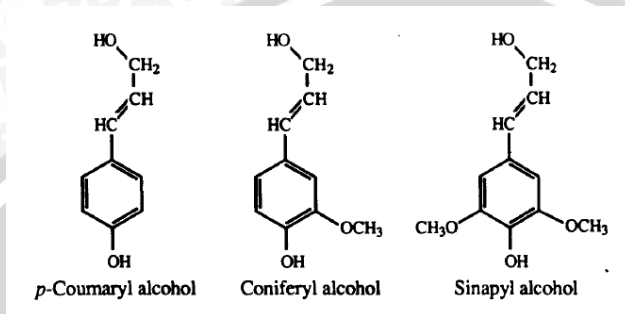
berkayu dan tanaman non-kayu seperti rumput [18]. Lignoselulosa bisa diperoleh dari bahan kayu, jerami, rumput-rumputan, limbah pertanian/hutan, limbah industri (kayu, kertas) dan bahan berserat lainnya [19]. Lignoselulosa mengandung tiga komponen yang merupakan komponen pembangun semua tanaman dan terdapat di sebagian besar wilayah di bumi yaitu lignin, hemiselulosa dan selulosa, ketiganya membentuk suatu ikatan kimia yang kompleks yang menjadi bahan dasar dinding sel tumbuhan [20].

Lignoselulosa adalah komponen dominan dalam tanaman berkayu dan materi tanaman yang telah mati, dan merupakan suatu bahan yang paling melimpah di bumi. Lignin adalah suatu tatanan heterogen dan tidak beraturan dari polimer fenilpropanoid yang sanggup menghambat degradasi enzimatik maupun kimia untuk melindungi selulosa. Berdasarkan pada pemikiran yang telah dikemukakan oleh beberapa pakar, degradasi lignin merupakan langkah pembatas laju dari siklus daur karbon [21]. Degradasi lignin dengan asam lemah apabila hidrolisis selulase rendah dan kondisi korosif yang ekstrim dengan temperatur dan pH tinggi dengan asam kuat. Proses enzimatik dengan mikroorganisme tertentu dan berbagai enzim yang terlibat merupakan mekanisme yang tepat untuk mendegradasi lignin [16].

2.3 Lignin

Lignin adalah material organik penyusun matrik dinding sel tanaman tingkat tinggi dan termasuk penyusun sebagian besar biomassa atau dikenal sebagai lignoselulosa [21]. Lignin sangat resistan terhadap biodegradasi secara alami karena struktur lignin terdiri dari cincin benzen yang mengikat tiga karbon dan memiliki banyak ikatan H [22]. Lignin merupakan polimer aromatis dengan substituent yang dihubungkan oleh eter dan karbon-karbon yang bertautan. Lignin mengandung tiga building block utama yaitu p-kumaril alkohol (p-hidroksifenil propanol), koniferil alkohol (guaiasil propanol) dan sinapil alkohol [23]. Lignin sangat sulit untuk didegradasi karena kompleksitas dari struktur lignin tersebut. Lignin dapat digunakan sebagai bahan baku untuk memproduksi vanilin dengan cara degradasi dan oksidasi [24].

Untuk mendegradasi lignin, tidak hanya membutuhkan satu jenis enzim saja, dibutuhkan enzim yang berbeda-beda untuk memecah tiap ikatannya [23].



Gambar 2.1 Struktur building block lignin

Pada kayu lunak, lignin banyak tersusun atas koniferil alkohol sebanyak 95 %. Sejumlah kecil p-komaril alkohol dan sinapil alkohol sebagai molekul runutan. Pada kayu lunak, lignin disebut sebagai guaiacil lignin, sedangkan pada kayu keras disebut sebagai guaiacil-siringil lignin yang terdiri atas koniferil alkohol dan sinapil alkohol dalam berbagai rasio. Pada lignin tipe ini, kandungan metoksi sebanyak 1,2 sampai 1,5 per unit fenil propanoid [25].

Sebagai polimer fenolik yang mempunyai bentuk tidak beraturan, bersifat asam (pK_a fenol=10) lignin mempunyai sifat termoplastik, mengalami sedikit perubahan pada temperatur yang beragam tergantung pada metode pengisolasian, air yang terserap dan pengaturan panas. Temperatur perubahan lignin terdapat pada 147 °C [25].

2.4 Fermentasi

Fermentasi adalah segala macam proses metabolik dengan bantuan enzim dari mikroba (jasad renik) untuk melakukan oksidasi, reduksi, hidrolisa, dan reaksi kimia lainnya sehingga terjadi perubahan kimia pada suatu substrat organik dengan menghasilkan produk tertentu dan menyebabkan terjadinya perubahan sifat bahan tersebut [26].

Keberhasilan proses fermentasi sangat ditentukan oleh aktivitas enzim yang dihasilkan mikroba. Aktivitas enzim

dipengaruhi oleh beberapa faktor diantaranya konsentrasi enzim, kandungan substrat, keasaman (pH) dan temperatur. Semakin tinggi konsentrasi enzim dalam media fermentasi maka aktivitas enzim juga akan semakin cepat sehingga hal tersebut menunjukkan aktivitas enzim dan konsentrasinya memiliki hubungan linier. Penambahan substrat tidak berpengaruh pada aktivitas enzim karena konsentrasi enzim yang terbatas menyebabkan jumlah substrat yang dikatalisis juga terbatas [27]. Selain itu, perubahan pH lingkungan juga akan mempengaruhi aktivitas enzim. Untuk mencapai keadaan optimum, setiap enzim mempunyai pH tertentu yang akan mendukung kerja enzim dalam melakukan katalisa dengan baik. Kerusakan protein dalam suatu enzim yang mengakibatkan berkurangnya fungsi dan aktivitas enzim bisa diakibatkan oleh temperatur dan pH yang tidak sesuai[28].

Fermentasi media cair terbagi menjadi sistem fermentasi tertutup atau *batch process*, fermentasi sistem kontinyu dan fermentasi *fed batch process*. Metode fermentasi tanpa melakukan penambahan komponen media ke dalam fermentor setelah inokulasi tergolong fermentasi sistem tertutup dimana jumlah sel atau berat biomasa sebagai ukuran pertumbuhan mikroorganisme. Metode fermentasi dengan penambahan media fermentasi baru dan pengeluaran media lama dengan volume yang sama tergolong fermentasi sistem kontinyu [29]. Sedangkan metode sistem tertutup dengan penambahan media baru secara teratur tanpa mengeluarkan cairan kultur yang ada di dalam fermentor disebut sistem *fed-batch* [30].

2.5 Bakteri Pendegradasi Lignin

Berbagai spesies jamur banyak diteliti dalam degradasi lignin, misalnya jamur pembusuk putih *Coriolus sp.*, *Phenerochaete chrysosporium* dan *P.sordida* serta jamur *Rhizopus oryzae* dan *Aspergillus awamori*. Bakteri dan aktinomisetes juga mampu mendegradasi lignin, misalnya *Aeromonas*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* dan *Streptomyces* [11].

Seperti yang telah disebutkan, enzim pendegradasi lignin berasal dari jamur dan bakteri. Ada beberapa bakteri yang menghasilkan jenis enzim untuk mendegradasi lignin. Misalnya,

Pseudomonas putida juga memproduksi Vanillate O-demethylase oxidoreductase. Sementara lignin peroksidase dan lakase masing-masing dihasilkan oleh *Streptomyces viridosporus* dan *Bacillus subtilis* [11].

Menurut Prihartini [3] terdapat isolat berasal dari substrat jerami padi yang bersifat ligninolitik yaitu *Raoultella* sp. Mikroba *Raoultella* sp merupakan sinonim dari genus *Klebsiella* yang keberadaannya sangat luas. Genus ini ditemukan pada permukaan air, limbah industri, tanah, tanaman dan beberapa terdapat pada permukaan mukosa manusia, kuda dan babi. *Raoultella* sp merupakan golongan family *Enterobacteriaceae*, gram negative, nonmotil, dan tersusun tunggal atau berpasangan dan dikelilingi oleh kapsul. Berdasarkan uji biokimia, *Raoultella* sp diinkubasi pada temperatur 30-40 °C. Hampir semua strain *Raoultella* tumbuh dalam medium minimal akan ion amonium atau nitrat sebagai sumber nitrogen dan sumber karbon tunggal, tanpa memperhatikan faktor-faktor pertumbuhan [31].

Terdapat empat tahapan pada kurva pertumbuhan normal bakteri yaitu fase lag, fase log (eksponensial), fase stasioner, dan fase kematian. Fase-fase ini menunjukkan ciri khas pertumbuhan suatu bakteri pada medium nutrisi tertentu yang ditandai dengan reaksi-reaksi biokimia yang berbeda dalam rangka sintesis komponen seluler yang dibutuhkan dalam pertumbuhan dan pembelahan sel. Memasuki fase lag, belum terjadi pertumbuhan bakteri. Selama fase log, sel bakteri membelah dengan cepat seiring meningkatnya waktu. Pada fase stasioner, jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati sehingga jumlah sel bakteri tetap. Aktivitas metabolik sel menurun, dikarenakan zat nutrisi sudah mulai habis. Fase kematian tercapai saat sel bakteri mengalami lisis akibat terakumulasinya inhibitor, energy didalam sel sudah habis dan perubahan pH [32].

2.6 Enzim

Suatu protein yang mengkatalisis reaksi biokimia disebut enzim. Enzim terdapat dalam konsentrasi rendah dan akan meningkatkan laju reaksi tanpa mengubah posisi kesetimbangan reaksi tersebut [33]. Enzim merupakan protein yang berfungsi sebagai biokatalis dalam sel hidup. Kelebihan enzim dibandingkan

katalis biasa adalah (1) dapat meningkatkan produk beribu kali lebih tinggi; (2) bekerja pada pH yang relatif netral dan temperatur yang relatif rendah; dan (3) bersifat spesifik dan selektif terhadap substrat tertentu [34].

Enzim merupakan molekul polimer yang beragam yang dihasilkan oleh sel hidup. Keragaman ini bukan hanya bentuk dan ukurannya tetapi juga peranannya dalam sel. Molekul ini disintesis dalam sel, dapat mempercepat suatu reaksi termodinamika, sehingga kecepatan reaksi dapat berjalan sesuai dengan reaksi biokimia yang dibutuhkan untuk mengatur kehidupan [35]. Pada dasarnya enzim hanya aktif pada selang pH terbatas, yaitu pada suatu pH optimum tertentu dimana pada pH optimum tersebut menyebabkan aktivitas enzim maksimal [36,37].

Lignin memiliki struktur yang kompleks, oleh karena itu tidak hanya melibatkan satu enzim khusus saja. Enzim yang berbeda dapat mendegradasi lignin dengan memecah bagian-bagian yang berbeda dari struktur lignin. Enzim kompleks yang dapat mendegradasi lignin terdiri dari lignin peroksidase (LiP), mangan oksidase (MnP), dan lakase [38].

Lignin peroksidase (LiP) adalah salah satu enzim yang digunakan untuk mendegradasi lignin. Hal ini pertama kali ditemukan pada tahun 1983. Lignin peroksidase dihasilkan oleh jamur sebagai kelompok isoenzim [39]. Penelitian terbaru juga menunjukkan bahwa enzim ini dapat diproduksi dari bakteri seperti *Streptomyces viridosporus* [40].

Menurut Loon, [40] substrat lignin peroksidase mencakup senyawa aromatik fenolik dan nonfenolik; substrat fenolik teroksidasi menghasilkan produk serupa dengan yang dihasilkan oleh peroksidase, sedangkan oksidasi metoksibenzen nonfenolik adalah karakteristik dari lignin peroksidase. Oksidasi substrat ini menghasilkan radikal kation aril melalui demetoksilasi, pembelahan C-C senyawa lignin, oksidasi alkohol benzik, dan hidroksilasi cincin aromatik dan rantai samping. Situs aktif lignin peroksidase sama dengan peroksidase lainnya yaitu residu-residu asam amino yaitu terdiri dari histidin dan arginine [41].

Enzim mangan peroksidase (MnP) membutuhkan H_2O_2 sebagai oksidan, sama halnya dengan LiP. MnP mengoksidasi Mn(II) menjadi Mn(III), selanjutnya oksidasi cincin fenolik menjadi

radikal-radikal fenoksil yang akan menyebabkan dekomposisi senyawa [42]. Situs aktif MnP terdiri dari histidin dan asam aspartat yang dihubungkan oleh ikatan H dan sisi peroksida mengikat suatu *pocket* yang terdiri dari histidin dan arginin [43]. MnP menggunakan mangan sebagai kofaktor redoks. Mn(II) berikatan pada satu heme propionat dan rantai samping tiga asam amino, yaitu Glu35, Glu39 dan Asp179 serta dua ligan pelarut. Perubahan ligan Mn-situs ikat berpengaruh pada ikatan dan oksidasi Mn. MnP dengan selektif mengikat Mn pada permukaan protein, mengoksidasinya dan menghasilkan Mn(III) membentuk kompleks. MnP dapat mengoksidasi gugus fenolik pada lignin tanpa keberadaan Mn(II) namun lajunya sangat lambat seperti guaiacol dan dimetoksifenol [44].

Lakase merupakan enzim *multicopper* jenis oksidasi biru dan mengkatalisis reaksi oksidasi beberapa senyawa fenolik, diamin dan amina aromatis bersamaan dengan pengurangan oksigen dalam air. Beberapa senyawa yang mengandung hidroksil, asam atau amino dapat bertindak sebagai substrat. Lakase mengandung 4 atom tembaga yang dibedakan berdasarkan resonansi paramagnetic electron (EPR), yaitu tipe 1 atau biru, tipe 2 atau normal, tipe 3 atau sisi tembaga binuclear yang berpasangan. Tembaga tipe 1 berada di antara dua ligan histidin, metionin dan sulfur. Tembaga tipe 2 berada di tengah-tengah dua histidin dan air sebagai ligan, sedangkan tipe 3 berada di antara tiga histidin dan dihubungkan oleh hidroksida. Lakase mengoksidasi substrat dengan melepaskan satu elektron dan menghasilkan radikal bebas yang akan mengalami depolimerisasi [45]. Tindakan lakase pada lignin menyerupai kelat Mn(III), dimana fenolik teroksidasi menjadi radikal fenoksi, yang dapat menyebabkan degradasi dari beberapa struktur[40].

2.7 Hipotesis

Hipotesis penelitian ini adalah bahwa waktu inkubasi, pH dan temperatur optimum mempengaruhi proses fermentasi dengan tujuan untuk mendegradasi lignin pada ampas tebu.

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Biokimia dan ruang Instrumen Jurusan Kimia Fakultas MIPA Universitas Brawijaya Malang. Penelitian dilaksanakan pada bulan Oktober sampai Desember 2011.

3.2 Bahan dan Alat Penelitian

3.2.1 Bahan Kimia

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah toluen, etanol, metanol, NaOH 5%, HCl 6M, NaNO₃, NaCl, KCl, CaCl₂.2H₂O, KH₂PO₄, Na₂HPO₄.12H₂O, MgSO₄, FeSO₄.7H₂O, trace element, pepton, agar bacto, ekstrak yeast, vanilin standar, kapas, kertas saring, dan aquades.

3.2.2 Bahan Penelitian

Sampel penelitian adalah ampas tebu yang didapatkan dari Tulungagung dan mikroba *Raoultella sp* dengan kode bas-1 merupakan isolat hasil isolasi dari jerami padi koleksi Ir. Indah Prihartini, MP. Laboratorium Mikrobiologi Universitas Muhammadiyah Malang.

3.2.3 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain seperangkat alat gelas, seperangkat alat soxhlet, seperangkat alat penyaring vakum (corong buchner), magnetic stirer, autoclave elektris, jarum ose, inkubator (merk Heracus tipe B 50 Memmert), sentrifuse (Fischer Scientific Centrifuge), shaker (Edmund Buhler SM 25), pH-meter (schott-gerate tipe CG-820), oven (Memmert), neraca analitik(mettler Todelo AL 204), lemari pendingin, FT-IR 8400S SHIMADZU, dan Spektrofotometer UV-Vis Shimadzu 1601.

3.3 Tahapan Penelitian

Tahapan Penelitian yang digunakan adalah sebagai berikut :

1. Isolasi lignin
2. Pembuatan media padat
3. Peremajaan biakan murni
4. Pembuatan media cair
5. Pembuatan inokulum
6. Pembuatan kurva pertumbuhan *Raoultella* sp.
7. Pembuatan kurva baku vanilin
8. Penentuan waktu inkubasi fermentasi
9. Penentuan temperatur optimum
10. Penentuan pH optimum

3.4 Cara Kerja

3.4.1 Isolasi Lignin dari Ampas Tebu

Ampas tebu yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam ekstraktor soxhlet 500 mL dan diekstrak menggunakan pelarut campuran toluen:etanol (2:1) selama 6 jam. Ampas tebu hasil ekstraksi dikeringkan dalam oven selama 16 jam pada suhu 50°C. Ampas tebu direndam dalam 500 mL larutan NaOH 5% selama 6 jam pada suhu 50°C. Campuran disaring menggunakan corong buchner. Filtrat diturunkan pH-nya dengan larutan HCl 6 M hingga mencapai pH 5,5. Larutan dipekatkan hingga volume tersisa 20%. Larutan pekat ditambah etanol sebanyak tiga kali volume larutan. Campuran disaring menggunakan corong buchner. Filtrat dipekatkan dengan menggunakan alat distilasi fraksional. Larutan pekat diasamkan dengan larutan HCl 6M hingga pH 2. Campuran disaring dengan corong buchner. Filtrat isolat lignin ditampung dan endapan dikeringkan pada temperatur kamar hingga massa stabil sehingga didapatkan serbuk lignin. Massa endapan ditimbang.

3.4.2 Pembuatan Media Padat

Media yang digunakan mengandung komposisi sebagai berikut : NaNO_3 4 g, NaCl 1 g, KCl 1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3 g, MgSO_4 0,2 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,001 g, trace element 2 mL, lignin 0,025 g, dan 30 g agar bacto, dilarutkan dalam

aquades 1000 mL. Setelah itu larutan campuran dididihkan sampai larut. Campuran tersebut dipipet 5 mL, dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas, disterilkan dalam autoclave pada temperatur 121°C, 15 psi selama 15 menit. Disimpan dalam temperatur kamar dalam posisi miring hingga memadat.

3.4.3 Peremajaan Biakan Murni

Biakan *Raoultella* sp digoreskan pada media padat menggunakan jarum ose yaitu dengan mendekatkan mulut tabung reaksi pada nyala api sambil menggoreskan jarum ose, ditutup kembali dengan kapas steril, kemudian di inkubator pada temperatur 30°C selama 3 hari. Regenarasi *Raoultella* sp pada media padat dilakukan di dalam lemari Laminar Flow yang telah disinari UV selama 20 menit.

3.4.4 Pembuatan Media Cair

Media pertumbuhan *Raoultella* sp untuk menghasilkan enzim lignoselulase terdiri atas pepton 10 g, ekstrak yeast 5 g, NaCl 10 g, dan lignin 0,025 g dilarutkan dalam 1000 mL aquades. Kemudian 100 mL larutan dituang ke dalam erlenmeyer 250 mL, lalu disterilkan dengan autoclave pada temperatur 121 °C, 15 psi selama 15 menit. Media cair diinkubasi pada temperatur ruang selama 1 hari.

3.4.5 Pembuatan Inokulum

Bakteri dari media padat dipindahkan ke dalam media cair dengan menambahkan 10 mL media lignin ke dalam tabung reaksi dan dikocok hingga tampak bakteri larut dalam cairan lalu dimasukkan ke dalam media cair, inokulum diinkubasi selama 3 hari pada temperatur ruang.

3.4.6 Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Raoultella* sp.

Bakteri dari media padat ditambahkan media lignin 10 mL kemudian dikocok dan dipipet 5 mL ke dalam 100 mL media cair. Diinkubasi goyang dengan kecepatan 150 rpm pada temperatur ruang

selama 7 hari. Diukur densitas optiknya dengan spektrometri pada 620 nm. Dibuat kurva hubungan waktu inkubasi dengan densitas optik.

3.4.7 Pembuatan Kurva Baku Vanilin

Vanilin standar ditimbang sebanyak 0.01 g dilarutkan dengan 200 μ L metanol dalam gelas kimia. Lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL dan ditambahkan aquades hingga tanda batas, dikocok sampai homogen sehingga diperoleh larutan stok vanilin 100 mg/L. Dipipet masing-masing 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1 mL lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berbeda, kemudian ditambahkan 200 μ L NaOH 0,1 N. Ditambahkan aquades hingga tanda batas sehingga diperoleh larutan vanilin dengan konsentrasi berbeda yaitu 0, 2, 4, 6, 8, dan 10 mg/L. Masing-masing larutan vanilin dengan konsentrasi berbeda sebanyak 1 mL ditambahkan 4 mL. Tiap konsentrasi larutan diukur absorbansinya dengan menggunakan Spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 348 nm. Hasil pengukuran absorbansi larutan standar pada berbagai konsentrasi dibuat persamaan regresi linier sehingga dihasilkan kurva baku vanilin.

3.4.8 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Ke dalam 6 erlenmeyer yang berisi 50 mL media MSM yang mengandung 1% lignin diinokulasikan 5 mL inokulum, dikocok dengan rotary shaker pada temperatur ruang dengan kecepatan 200rpm. Waktu inkubasi divariasikan selama 24, 48, 72, 96, 120 dan 144 jam, selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan yang didapatkan diukur konsentrasi vanilinya dengan cara mengambil 1 mL sampel ditambahkan 4 mL metanol, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 348 nm.

3.4.9 Penentuan pH Optimum

Ke dalam 5 erlenmeyer yang berisi 50 mL media MSM yang mengandung lignin 1% dikondisikan derajat keasaman(pH)

menggunakan larutan buffer asam sitrat-fosfat pH 4, 5, 6, 7 dan 8. Kemudian ditambahkan 5 mL inokulum, dikocok dengan rotary shaker pada temperatur ruang dengan kecepatan 200 rpm selama waktu inkubasi optimum. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan yang didapatkan diukur konsentrasi vanilinya dengan cara mengambil 1 mL sampel ditambahkan 4 mL metanol, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer Uv-Vis pada panjang gelombang 348 nm.

3.4.10 Penentuan Temperatur Optimum

Ke dalam 5 erlenmeyer yang berisi 50 mL media MSM yang mengandung 1% lignin dan dikondisikan pada pH optimum, diinokulasikan 5 mL inokulum, kemudian disimpan pada temperatur 30°C, 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C. Selanjutnya disentrifugasi dengan kecepatan 2000 rpm. Supernatan yang didapatkan diukur konsentrasi vanilinya dengan cara mengambil 1 mL sampel ditambahkan 4 mL metanol, kemudian diukur absorbansinya dengan spektrofotometer UV-Vis pada panjang gelombang 348 nm.

BAB IV HASIL DAN PEMBAHASAN

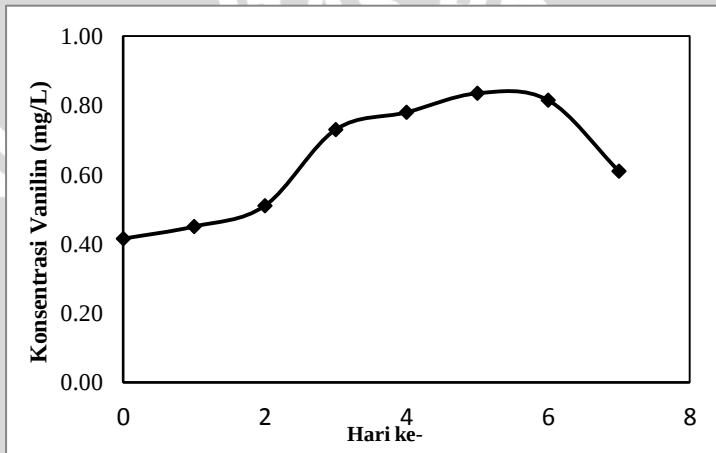
4.1 **Pembiakan *Raoultella* sp**

Sel *Raoultella* sp. yang digunakan dalam proses fermentasi lignin adalah pada saat fase lag. Sehingga diperlukan data untuk mengetahui fase pertumbuhan dari bakteri tersebut yaitu dengan pembuatan kurva pertumbuhan menggunakan metode turbidimetri. Biakan media padat bakteri diinokulasikan ke dalam media cair atau media lignin yang digunakan sebagai kultur awal yang bertujuan untuk menyeragamkan usia bakteri dari biakan padat.

Kurva pertumbuhan diperoleh dengan melihat jumlah bakteri melalui pengukuran densitas optik (DO) pada panjang gelombang 620 nm sebagai fungsi waktu dimana pengukuran dilakukan selama 7 hari dengan selang waktu 1 hari. Prinsip dasar metode turbidimetri adalah menghitung kekeruhan biakan pada interval waktu tertentu. Ketika sebuah cahaya di kenakan pada sel, maka cahaya yang mengenai sel akan dihamburkan dengan penyerapan, pemantulan, pembiasan dan cahaya yang tidak mengenai sel akan ditransmisi. Jumlah cahaya yang dihamburkan berbanding terbalik dengan transmitan atau berbanding lurus dengan absorbansi sedangkan jumlah cahaya yang ditransmisi berbanding lurus dengan transmitan.

Berdasarkan kurva pertumbuhan pada Gambar 4.1, menunjukkan bahwa *Raoultella* sp berada pada fase lag. Bakteri belum melakukan pembelahan secara keseluruhan. Pada fase ini, bakteri akan menyesuaikan diri dengan lingkungan baru karena bakteri baru diinokulasikan dan pembelahan sel masih berjalan lambat. Setelah sel menyesuaikan diri dengan lingkungan baru, maka bakteri akan memasuki fase log (eksponensial) dimana bakteri mengalami pertumbuhan yang sangat cepat. Pada fase ini bakteri membutuhkan energi paling banyak dibandingkan dengan fase lainnya. Oleh karena itu, bakteri banyak memproduksi zat-zat metabolit yang dibutuhkan dalam memenuhi kebutuhan nutrisinya. Pada penelitian ini, fase log bakteri terjadi pada hari ke-2 hingga hari ke-3 sehingga dilakukan inokulasi ke media MSM pada hari ke-3 karena jumlah populasi sel bakteri maksimum. Selanjutnya, pertumbuhan bakteri mulai terhambat dan kecepatan sel membelah

berkurang, pertumbuhan bakteri memasuki fase stasioner. Pada hari ke-3 hingga ke-6, bakteri berada pada fase stasioner, dimana terjadi keseimbangan antara jumlah bakteri yang mati dengan bakteri yang tumbuh, sehingga jumlah sel bakteri cenderung tetap. Pada hari ke-7 bakteri memasuki fase kematian. Kematian ini disebabkan karena berkurangnya nutrisi dalam medium untuk pembiakan dan pertumbuhan bakteri selanjutnya.



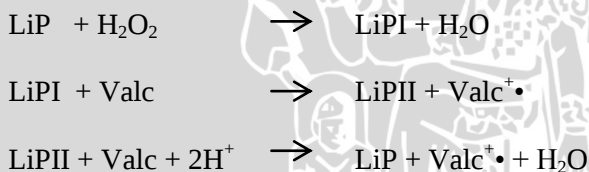
Gambar 4.1 Grafik hubungan antara waktu inkubasi terhadap konsentrasi vanilin.

4.2 Kemampuan Biodegradasi Lignin oleh *Raoultella* sp

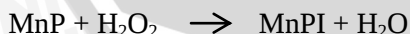
Kemampuan isolat *Raoultella* sp. dalam mendegradasi lignin melalui proses fermentasi ditentukan berdasarkan jumlah produk yang dihasilkan dari proses degradasi senyawa lignoselulosa pada lignin. Struktur kompleks lignin tidak hanya didegradasi oleh satu jenis enzim, melainkan dibutuhkan enzim-enzim yang berbeda untuk memecah setiap bagian struktur lignin tersebut. Selama proses fermentasi, bakteri *Raoultella* sp. diduga menghasilkan enzim-enzim pendegradasi lignin atau enzim ligninolitik yang terdiri dari lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP) dan lakase. Produksi enzim-enzim tersebut meningkat dengan penambahan lignin ampas

tebu sebagai suatu induser dimana lignin merupakan substrat yang dapat menyebabkan pembentukan enzim. Penambahan induser menurunkan tegangan permukaan sel, sehingga sel mampu mengeluarkan cairan metabolit yang ada didalamnya.

Degradasi lignin memerlukan hydrogen peroksida yang diproduksi oleh *Raoultella* untuk mengaktifkan enzim-enzim peroksidase (H_2O_2). Lignin peroksidase (LiP) mengkatalisis depolimerisasi lignin menjadi produk-produk yang lebih sederhana. Sisi aktif LiP yaitu residu-residu asam amino seperti histidin dan arginin yang akan membentuk ikatan ferric-LiP dengan Fe^3 Enzim ini memutus ikatan $C\alpha-C\beta$ antar karbon pada lignin. Oksidasi melepaskan satu elektron membentuk kation-kation radikal yang tidak stabil sehingga ikatan antar molekul mudah dilepaskan. Menurut Schoemaker dan Piontek., [47] enzim dioksidasi oleh H_2O_2 membentuk senyawa intermediet LiPI, senyawa LiPI akan mengoksidasi veratril alcohol (Valc) membentuk kation radikal $Valc^+\bullet$ yang tidak terikat pada situs aktif, kemudian molekul Valc kedua dioksidasi oleh LiPII membentuk radikal $Valc^+\bullet$ dan melepaskan enzim LiP kembali. Berikut skema interkasi lignin peroksidase pada oksidasi veratril alkohol [47] :

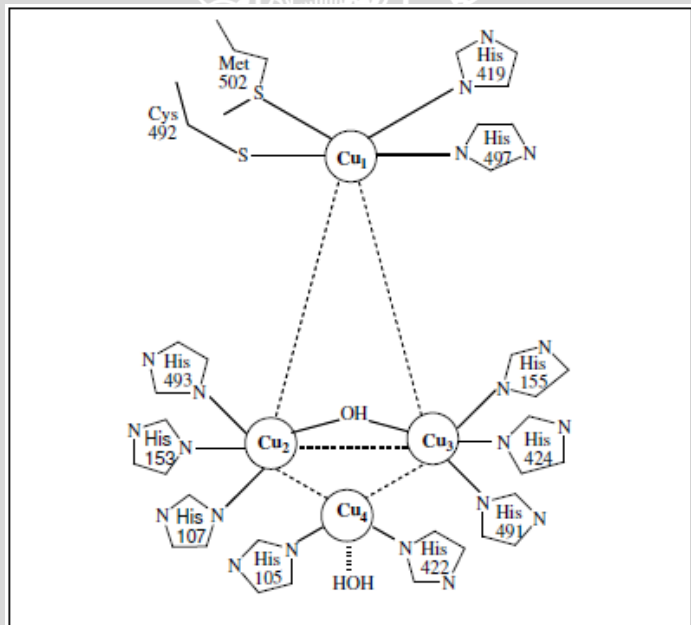


Sedangkan untuk MnP mengkatalisis proses oksidasi Mn (II) menjadi Mn(III) dilanjutkan dengan oksidasi cincin fenolik pada lignin menjadi radikal fenoksil. Sisi aktif MnP pada umumnya sama dengan peroksidase lainnya yaitu asam amino yang terdiri dari histidin dan asam aspartat yang diikat oleh Mn^{2+} sebagai kofaktor dan akan dioksidasi oleh MnP dan menghasilkan Mn^{3+} membentuk kompleks seperti oksalat dan malonat. Berikut skema interaksi mangan peroksidase pada oksidasi Mn^{2+} menjadi Mn^{3+} [44]:



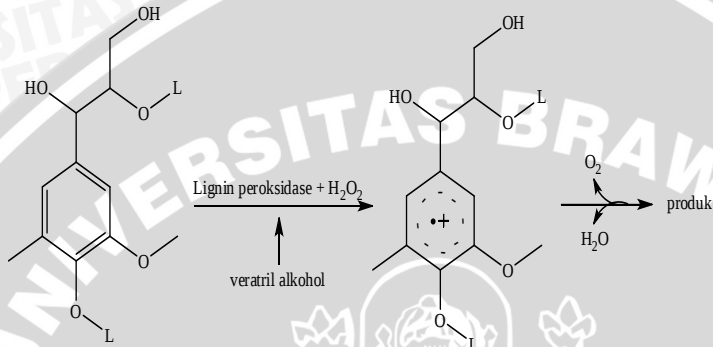


Lakase merupakan pengoksidasi yang mengandung Cu. Situs aktif lakase berupa atom tembaga yang terdiri dari tipe 1, tipe 2 dan tipe 3. Tembaga tipe 1 berada di antara dua ligan histidin, metionin dan cystein. Tembaga tipe 2 mengikat dua histidin dan air sebagai ligan, sedangkan tipe 3 berada di antara tiga histidin dan dihubungkan melalui jembatan –OH. Lakase mengkatalisis oksidasi senyawa fenolik dengan melepaskan satu elektron dan menghasilkan radikal fenoksi yang dapat menyebabkan degradasi dari beberapa struktur lignin. Beberapa senyawa organik dapat berperan sebagai substrat seperti senyawa-senyawa yang mengandung gugus hidroksil, asam, dan gugus amino.

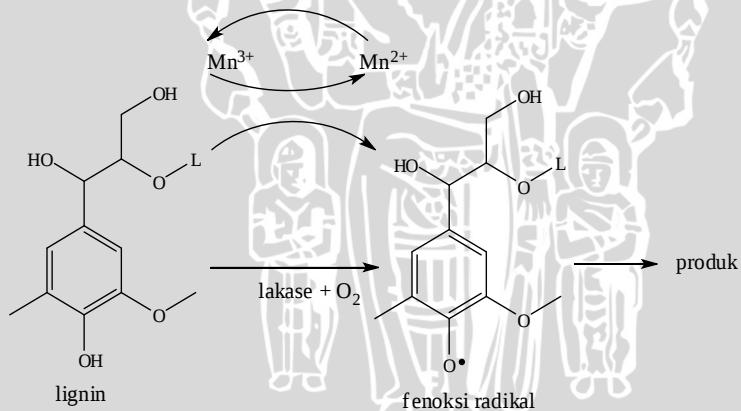


Gambar 4.2 Situs aktif lakase [48].

Reaksi enzimatik dari enzim lignin peroksidase (LiP), mangan peroksidase (MnP) dan lakase dapat dilihat pada Gambar 4.3 dan Gambar 4.4.



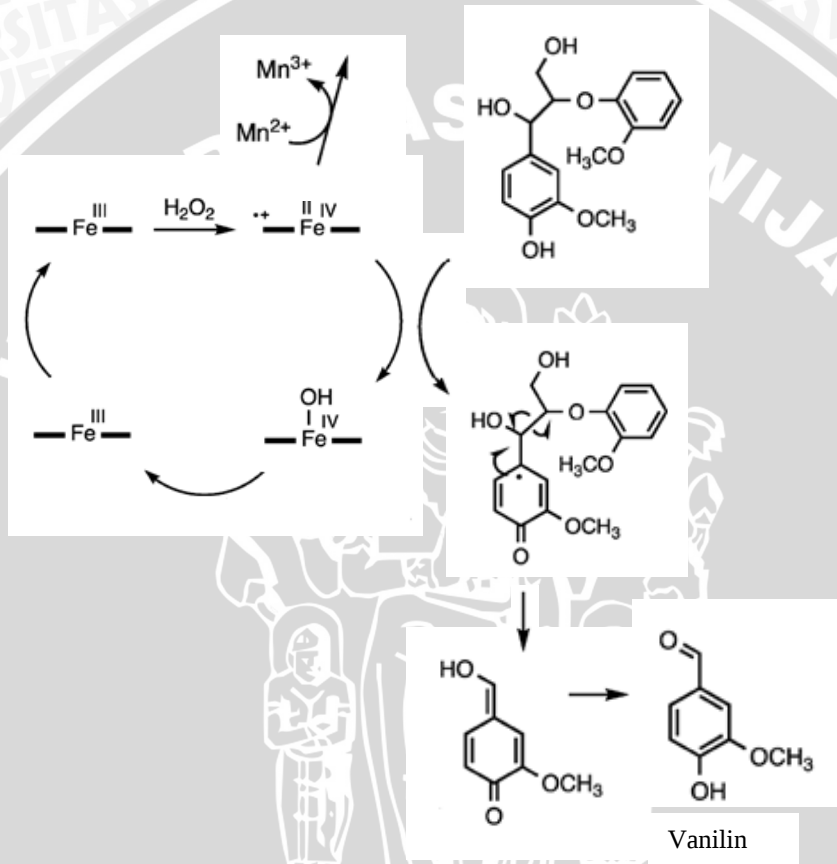
Gambar 4.3 Reaksi enzimatik lignin peroksidase [42].



Gambar 4.4 Reaksi enzimatik mangan peroksidase dan lakase[42].

Aktivitas enzim ligninolitik ditunjukkan dengan pembentukan vanilin. Lignin merupakan bahan baku untuk memproduksi vanilin

melalui biodegradasi dan oksidasi. Semakin tinggi konsentrasi vanilin yang diproduksi dari dekomposisi lignin, maka aktivitas enzim ligninolitik semakin baik. Reaksi enzimatik secara keseluruhan hingga terbentuk vanilin dapat dilihat pada Gambar 4.5 berikut :

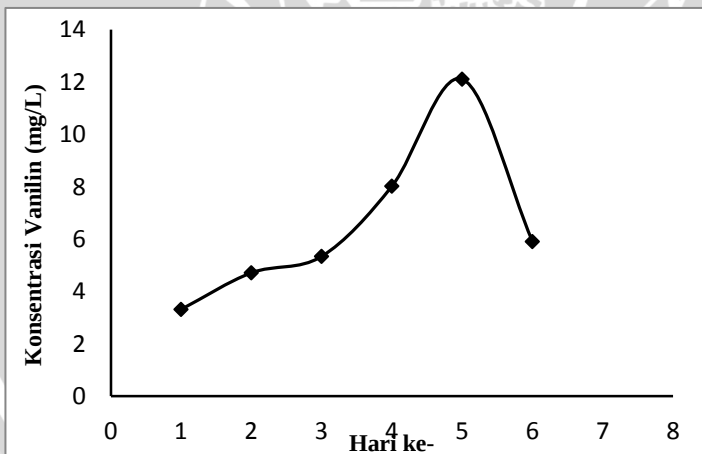


Gambar 4.5 Siklus katalitik enzim ligninolitik dalam menghasilkan vanilin [49].

4.3 Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Lignin Oleh *Raoultella* sp

4.3.1 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Waktu inkubasi merupakan salah satu faktor penting untuk pertumbuhan suatu mikroorganisme yang harus ditentukan sebelum penentuan pH dan temperatur optimum. Waktu inkubasi adalah waktu yang dibutuhkan oleh enzim yang dihasilkan oleh bakteri berikatan dengan substrat tertentu untuk menghasilkan produk. Aktivitas enzim akan meningkat seiring dengan bertambahnya waktu fermentasi dan menurun pada waktu tertentu mengikuti pola pertumbuhan bakteri yang mengalami beberapa fase pertumbuhan. Penentuan waktu inkubasi optimum pada penelitian ini ditentukan dengan menggunakan metode spektrofotometri. Penelitian waktu inkubasi optimum dalam fermentasi lignin untuk menghasilkan vanilin sebagai produk hasil degradasi lignin dengan variasi waktu inkubasi meliputi hari ke-1 hingga hari ke-6 dengan pengukuran tiap 1 hari dan konsentrasi lignin 1%. Fermentasi dilakukan pada pH netral karena pada umumnya bakteri tumbuh optimal pada pH tersebut dan diinkubasi pada temperatur ruang. Pengaruh waktu inkubasi pada proses fermentasi lignin dapat dilihat pada Gambar 4.6.



Gambar 4.6 Grafik hubungan antara waktu inkubasi fermentasi terhadap konsentrasi vanilin

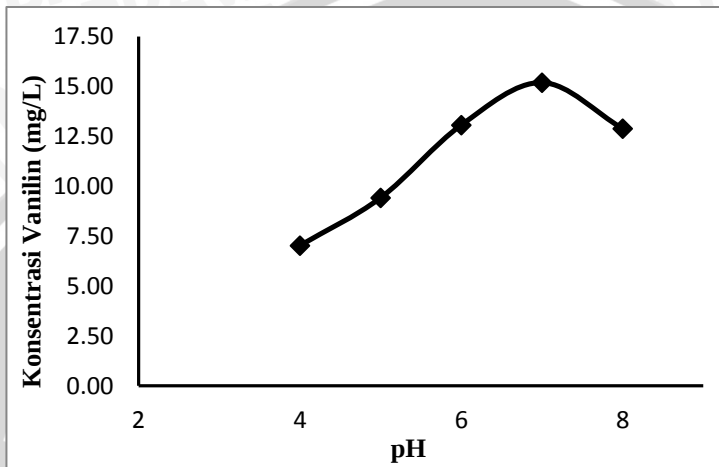
Berdasarkan Gambar 4.6 dapat diketahui bahwa konsentrasi vanilin hasil fermentasi lignin semakin meningkat dengan bertambahnya waktu inkubasi. Hal ini disebabkan karena semakin banyak enzim ligninolitik yang berikatan dengan substrat untuk menghasilkan vanilin. Waktu inkubasi tidak lagi mempengaruhi jumlah vanilin yang dihasilkan saat substrat telah habis berikatan dengan enzim sehingga menyebabkan penurunan aktivitas bakteri. Waktu inkubasi pada hari ke-5 dipilih sebagai waktu inkubasi optimum karena pada waktu tersebut, aktivitas bakteri *Raoultella* sp optimal dalam mendegradasi lignin dengan diperoleh konsentrasi vanilin sebesar 12,1 mg/L. Konsentrasi vanilin mengalami penurunan pada hari ke-6, dikarenakan vanilin telah teroksidasi menjadi senyawa-senyawa organik lainnya oleh enzim-enzim oksidase. Selain itu, diduga pula produk fermentasi dapat menghambat enzim ligninolitik dan dijadikan sebagai sumber karbon oleh bakteri.

Berdasarkan uji statistik (Lampiran I) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh waktu inkubasi terhadap konsentrasi vanilin hasil fermentasi. Hal ini dibuktikan dengan nilai F_{hitung} (61.80) > F_{tabel} (5.98). Uji BNT dengan tingkat kesalahan 5% menunjukkan hasil berbeda nyata untuk hari ke-5 dengan hari ke-1, hari ke-2, hari ke-3, hari ke-4, dan hari ke-6.

4.3.2 Penentuan pH Optimum

Kondisi optimum diperlukan bakteri untuk menghasilkan metabolit yang maksimal. Salah satunya yaitu pH medium. Enzim yang dihasilkan bakteri mempunyai pH tertentu yang menyebabkan aktifitas enzim mempunyai stabilitas tinggi dan mencapai keadaan optimum. Penentuan pH optimum dilakukan dengan mengatur pH awal fermentasi lignin menjadi 4,5,6,7 dan 8 dan dilakukan proses fermentasi selama 5 hari sebagai waktu inkubasi optimum pada temperatur ruang dengan konsentrasi lignin 1 %. Pengaruh pH pada proses fermentasi lignin dapat dilihat pada Gambar 4.7. Konsentrasi vanilin mengalami peningkatan antara pH 4-7 dan mengalami penurunan pada pH 8. Kondisi optimum fermentasi lignin terjadi pada pH 7 dengan konsentrasi vanilin sebesar 15,2 mg/L. Pada pH 7

diduga enzim ligninolitik mempunyai stabilitas tinggi, aktif dan mempunyai aktivitas yang maksimal dalam mendegradasi lignin.



Gambar 4.7 Grafik hubungan antara pH fermentasi terhadap konsentrasi vanilin

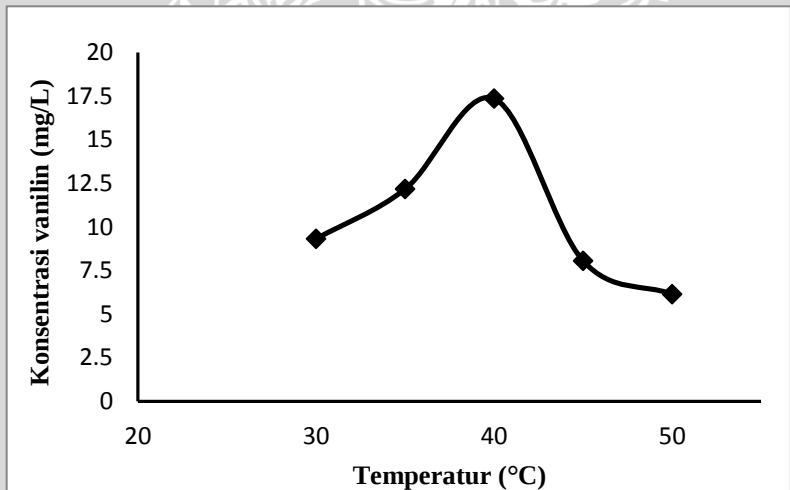
Apabila pH diatas pH optimum menyebabkan terjadinya denaturasi parsial protein enzim sehingga aktivitas enzim menurun. Kelebihan atau kekurangan ion hidrogen berpengaruh pada struktur enzim dimana terjadi perubahan konformasi sisi aktif enzim sehingga substrat tidak dapat berikatan dengan enzim yang berakibat pada pembentukan produk. Perubahan pH berpengaruh dalam pembentukan kompleks antara enzim dan substrat dikarenakan kondisi pH yang tidak sesuai yaitu pH terlalu asam ataupun basa sehingga terjadi perubahan struktur dari enzim tersebut.

Berdasarkan uji statistik (Lampiran I) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh pH fermentasi terhadap konsentrasi vanilin hasil fermentasi lignin. Hal ini dibuktikan dengan nilai $F_{hitung} (45.6999) > F_{tabel} (4.46)$. Uji BNT dengan tingkat kesalahan 5% menunjukan bahwa perlakuan pH 7 berbeda nyata dengan perlakuan pH 4,5,6.

4.3.3 Penentuan Temperatur Optimum

Temperatur optimum adalah temperatur dimana lignin dapat didegradasi menjadi vanilin dengan konsentrasi paling tinggi. Temperatur merupakan salah satu faktor penting yang mempengaruhi laju reaksi enzimatik selain nilai pH. Temperatur yang tidak sesuai, terlalu tinggi ataupun rendah akan menurunkan aktivitas enzim yang dihasilkan oleh mikroba. Apabila temperatur mengalami kenaikan maka proses reaksi berlangsung lebih cepat karena enzim akan semakin aktif namun temperatur masih dalam batas tertentu. Temperatur yang terlalu tinggi mengakibatkan kerusakan enzim akibat denaturasi protein sehingga mengnonaktifkan reaksi enzimatik.

Pada penentuan temperatur optimum fermentasi lignin dengan *Raoultella* sp., dilakukan variasi temperatur 30°C, 35°C, 40°C, 45°C dan 50°C dengan konsentrasi lignin 1 % dan media dikondisikan pada pH dan waktu inkubasi optimum yaitu pada pH 7 selama 5 hari. Pengaruh temperatur dalam fermentasi lignin untuk menghasilkan vanilin dapat dilihat pada Gambar 4.8.



Gambar 4.8 Grafik hubungan antara temperatur terhadap konsentrasi vanilin

Dari Gambar 4.8 menunjukkan bahwa konsentrasi vanilin mengalami peningkatan antara temperatur 30°C, 35°C, 40°C hal ini disebabkan terjadi peningkatan energi kinetik dimana tumbukan antar molekul enzim dan substrat semakin cepat dan reaksi enzimatik berjalan optimal sehingga produk yang dihasilkan optimal pula. Konsentrasi vanilin paling tinggi dihasilkan pada temperatur 40°C yaitu sebesar 17,3 mg/L, artinya konsentrasi vanilin dihasilkan optimal pada temperatur tersebut. Konsentrasi vanilin mengalami penurunan pada temperatur 45°C dan 50°C, hal ini disebabkan terjadi denaturasi protein karena temperatur melebihi keadaan optimalnya, akibatnya enzim mengalami kerusakan dan menjadi tidak aktif serta kemampuan mendegradasi lignin untuk menghasilkan juga semakin menurun. Pada temperatur optimum, enzim yang dihasilkan oleh *Raoultella* sp. paling maksimal, banyaknya enzim ligninolitik yang dihasilkan sangat berpengaruh pada degradasi lignin, semakin banyak enzim ligninolitik yang dihasilkan maka semakin banyak lignin yang didegradasi dan diubah menjadi vanilin, sehingga pada temperatur optimum tersebut vanilin yang dihasilkan paling banyak.

Berdasarkan uji statistik (Lampiran I) menunjukkan bahwa terdapat pengaruh temperatur terhadap konsentrasi vanilin hasil fermentasi lignin. Hal ini dibuktikan dengan nilai $F_{hitung} (77.2835) > F_{tabel} (4.46)$. Uji BNT dengan tingkat kesalahan 5% menunjukkan hasil berbeda nyata untuk temperatur 40°C dengan temperatur 30°C, 35°C, 45°C, dan 50°C.

BAB V KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Kesimpulan yang dapat ditarik dari penelitian yang dilakukan adalah sebagai berikut :

1. Proses degradasi lignin melalui fermentasi dikarenakan adanya enzim ligninolitik yang dihasilkan oleh bakteri *Raoultella* sp. yang memecah struktur kompleks lignin menjadi senyawa yang lebih sederhana yaitu vanilin.
2. Kondisi Optimum *Raoultella* sp. dalam fermentasi lignin dicapai pada waktu fermentasi 5 hari, pH 7 dan temperatur 40°C dengan konsentrasi lignin 1% menghasilkan vanilin sebesar 17.3 mg/L.

5.2 Saran

Perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh konsentrasi lignin terhadap fermentasi dengan tujuan untuk mendegradasi lignin.

DAFTAR PUSTAKA

- [1] Samsuri M, B. Prasetya dan M. Gozan. 2007. **Lignin Biodegradasi Pada Bagasse Oleh Jamur Pelapuk Putih (White Rot Fungi) Dan Potensial Pemanfaatannya Menjadi Senyawa Berbasis Lignoselulosa.** *Jurnal Perancangan Produk* ISSN 1410-9891.
- [2] Hermiati, E. Mangunwidjaja, D., Sunarti, TC., Suparno, O dan Prasetya, B. 2010. **Pemanfaatan Biomassa Lignoselulosa Ampas Tebu Untuk Produksi Bioetanol.** *Jurnal litbang Pertanian* 29(4).
- [3] Samsuri, M., M.Gozan, R.Mardias, M. Baiquni, H. Hermansyah, A. Wijanarko, B. Prasetya, dan M. Nasikin. 2007. **Pemanfaatan Selulosa Bagas Untuk Produksi Ethanol Melalui Sakarifikasi dan Fermentasi Serentak Dengan Enzim Xylanase.** *Jurnal teknologi.* 11 (1) : 17-24
- [4] Prihartini I, Soebarinoto, S Chuzaemi dan M Winugroho. 2007. **Karakteristik Nutrisi dan Degradasi Jerami Padi Fermentasi oleh Inokulum Ligninolitik TLiD dan BOPR.** *Animal Production Journal.* 11(1) 1-7.
- [5] Kusuma, K. 2009. **Pengaruh Tingkat Penggunaan Ampas Tebu (Bagasse) Fermentasi Dalam Ransum Terhadap Kecernaan Bahan Kering Dan Bahan Organik Pada Domba Lokal Jantan.** *Skripsi.* Fakultas Pertanian, Universitas Sebelas Maret. Surakarta.
- [6] Yurnaliza. 2007. **Pengaruh Variasi pH dan Konsentrasi Inokulum pada Produksi Minyak Kelapa Secara**

Fermentasi. *Jurnal Biologi Sumatera* Januari 2007
hlm:4-6.

- [7] Sun, Y and Cheng, J. 2002. **Hydrolysis of Lignocellulosic Materials For Etanol Production.** *Technol.* 83 :1-11.
- [8] Sen, S., P.P. Singh, V.S. Rathore and Ben.M.J.P. 2004. **Sugarcane Bagasse Improves The Activity of Ligninolytic Enzymes And Decolourization of Dyes by The White-Rot Fungus *Pleurotus ostreatus*.** *Journal of Scientific & Industrial Research.* 63: 739-746.
- [9] Hossain, S.M and N. Anantharaman. 2006. **Activity Enhancement of Ligninolytic Enzymes of *Trametes versicolor* With Bagasse Powder.** *African Journal of Biotechnology* . 5(1): 189-194.
- [10] Prihartini I. 2007. **Studi Potensi Bakteri Ligninolitik Dalam Mendegradasi Lignin Dan Organochlorin Pada Peningkatan Nilai Nutrisi Jerami Padi Sebagai Pakan Ternak Ruminansia.** *Disertasi.* Pascasarjana Universitas Brawijaya. Malang.
- [11] Ruttiman, C., R. Vicuna, M.D Mozuch and T.K Kirk. 1991. **Limited Bacteria Mineralization of Fungal Degradation Intermediate From Synthetic Lignin.** *Applied and Enviromental Microbiology.* P 3652-3655.
- [12] Martani E, Haedar N dan Margino S. 2003. **Dekolorisasi Lindi Hitam Dan Degradasi Lignin Oleh Bakteri *Micrococcus Sp. Sph-9* Serta *Bacillus Sp. Sph-10*.** *Jurnal Biologi.*3:81-93.

- [13] Supriyadi, A. 1992. **Rendemen Tebu :Liku-Liku Permasalahan**. Kanisiun. Yogyakarta.
- [14] Slamet, 2004, **Tebu (*Saccharum officinarum*)**, <http://warintek.progressio.or.id/tebu/perkebunan/warintek/merintisbisnis/progressio> [4 Agustus 2011].
- [15] Lavarack, B.P., Griffin, G.J., Rodman, D., 2002. **The Acid Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Hemicellulose to Produce Xylose, Arabinose, Glucose and Other Products**. *Biomass Bioenergy*. 23: 367-380.
- [16] Rachmania O, Krishananta A, and Ricardo D. **Acid Hydrolysis Pretreatment Of Bagasse Lignocellulosic Material For Bioethanol Production**.
- [17] Hartadi, H., S. Reksohadiprojo dan A.D. Tilman. 1990. **Tabel Komposisi Pakan Untuk Indonesia**. Fakultas Peternakan Universitas Gajah Mada. Yogyakarta.
- [18] Howard, RL., Abotsi, E., Jansen van Rensburg, EL., danHoward, S. 2003. **Lignocellulose Biotechnology: Issues Of Bioconversion And Enzyme Production**. *African Journal of Biotechnology*. 2:602-619.
- [19] Anindyawati, T. 2009. Prospek Enzim dan Limbah Lignoselulosa Untuk Produksi Bioetanol. Pusat Penelitian Bioteknologi LIPI. BS. 44 (1): 49-56.
- [20] Zanida, Noor. 2008. **Screening Of Lignin Degradar from Soil**. *Thesis*. Faculty of Chemical and Natural Resources Engineering University Malaysia Pahang.

- [21] Ohkuma M, Maeda Y, Johjima T, and Kudo T. 2001. **Lignin Degradation And Roles Of White Rot Fungi: Study On An Efficient Symbiotic System In Fungus-Growing Termites And Its Application To Bioremediation.** RIKEN Review 42: Focused on Ecomolecular Science research
- [22] McCrady, E. 1991. **The Nature of Lignin.** *Alkaline Paper Advocate.* 4 (4).
- [23] Jefferies, TW. 1994. **Biodegradation Of Lignin And Hemicelluloses.** *Biochemistry of Microbial Degradation :* 223-227
- [24] Araujo, J.D.P. 2008. **Production Of Vanillin From Lignin Present In The Kraft Black Liquor Of The Pulp And Paper Industry.** *Dissertation.* Faculty of Engineering. University Porto. Porto.
- [25] Lin, S.Y. dan Carlton, W, 1992, **Metodh in Lignin Chemistry,** Springer-Verlag Berlin Heidelberg, USA.
- [26] Winarno, F.G. 1980. **Pengantar Teknologi Pangan.** PT.Gramedia. Jakarta.
- [27] Purnomo, B. 2004. **Bahan Kuliah Dasar-Dasar Mikrobiologi.**
- [28] Budiman, A. dan Setyawan, S. 2006. **Pengaruh Konsentrasi Substrat, Lama Inkubasi Dan pH Dalam Proses Isolasi Enzim Xylanase Dengan Menggunakan Media Jerami Padi.**

- [29] Dahlia, L. 2003. **Fermentasi *Pseudomonas pyocyanea* Penghasil Antibiotika**. Skripsi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- [30] Satiawihardja, B., B. Wibisono., dan U. Murdiyatmo. 1999. **Fermentasi Fed-Batch untuk Produksi Dekstranase dengan *Streptococcus* sp. B7**. *Jurnal Mikrobiologi Indonesia*. 4(2): 64-68
- [31] Breener, D.J., Noel R.K, and James, T.S. 2005. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second edition, Vol 2, Part B**. Springer. USA
- [32] Al-Qadiri.H.M, Al-Alami, N.I., Lin, M., Al-Holy, M., Cavinato, A.G dan Rasco, B.A. 2007. **Studying Of The Bacterial Growth Phases Using Fourier Transform Infrared Spectroscopy And Multivariate Analysis**. *Journal of rapid Methods & Automation in Microbiology*. 16: 73-89.
- [33] Ngili, Y. 2010. **Biokimia Dasar**. Rekayasa Sains Book. Bandung.
- [34] Kosim, M. dan S.R.Putra. 2010. **Pengaruh Suhu pada Protease dari *Bacillus subtilis***. *Prosiding Skripsi Semester Genap 2009-2010*. Surabaya.
- [35] Girindra, A. 1990. **Biokimia 1**. Jakarta. Gramedia.
- [36] Wong, D.W. 1995. **Food Enzyme**. Chapman & Hall. New York.

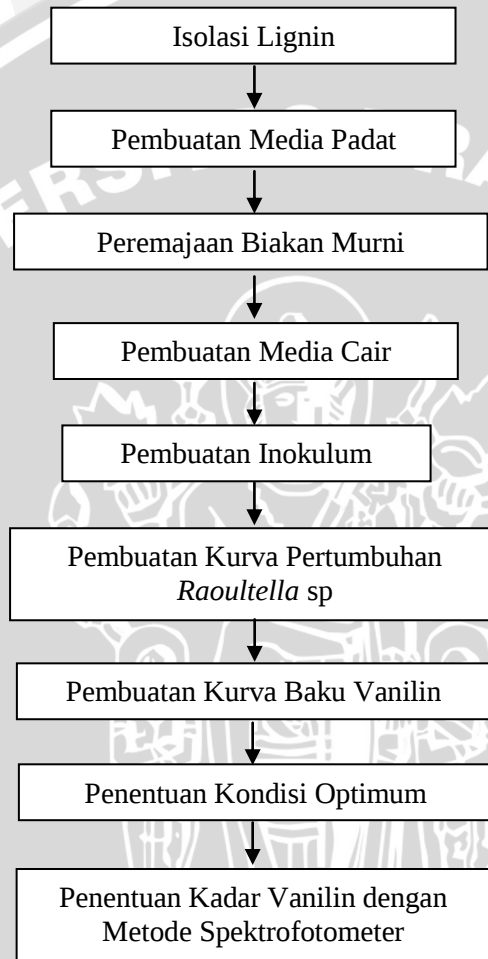
- [37] Lehninger, A.L. 1992. **Dasar-Dasar Biokimia**. Jilid 1. Alih Bahasa: Thenawidjaya, M. Erlangga. Jakarta.
- [38] Samsuri M, B. Prasetya dan M. Gozan. 2007. **Lignin Biodegradasi Pada Bagasse Oleh Jamur Pelapuk Putih (White Rot Fungi) Dan Potensial Pemanfaatannya Menjadi Senyawa Berbasis Lignoselulosa**. *Jurnal Perancangan Produk* ISSN 1410-9891.
- [39] Kirk, T.K and Farrell, R.L. 1987. **Enzymatic Combustion: The Microbial Degradation of Lignin**. *Annual Review of Microbiology*. 41: 465-505.
- [40] Loon, Y.T. 2006. **Screening of Lignin Degradar From Soil**. Thesis. Faculty Of Chemical Engineering And Natural Resources University College Of Engineering and Technology Malaysia.
- [41] Cai, D dan M. Tien. 1991. **Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium***. *The Journal of biological chemistry*. 266 (22) : 14464-14469.
- [42] Hatakka A. 2000. **Biodegradation of Lignin**. University of Helsinki, Viikki Biocenter, Department of Applied Chemistry dan Microbiology. Helsinki.
- [43] Sundaramoorthy, M., K. Kishi., M.H.Gold, dan T.L.Poulos. 1994. **The Crystal Structure of Manganese Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* at 2.06-Å Resolution**. *The journal of biological of chemistry*. 269 (52): 32759-32767.
- [44] Sundaramoorthy, M., H.L.Youngs., M.H.Gold., dan T.L.Poulos. 2005. **High-Resolution Crystal Structure**

of Manganese Peroxidase: Substrate and Inhibitor Complexes. *Journal of biochemistry.* 44 (17): 6463-6470.

- [45] Octavio, L.C., et al. 2006. **Laccases.** *Enzyme Biotechnology.* 37/661 (2) : 323-340.
- [46] Murdianto, Bambang. 2005. **Rancangan Percobaan.** <http://www.ikanlaut.tripod.com/xdesign.pdf>. Diakses tanggal 8 Desember 2011.
- [47] Schoemaker, H.E dan K.Piontek. 1996. **On the interaction of lignin peroxidase with lignin.** *Pure & Application Chemistry.* 68 (11) : 2089-2096.
- [48] Kunamneni, A., J.P.Fransisco dan A.Miguel. 2011. **Laccases and Their Application: a Patent Review.** Departement of Biocatalysis. Insituto de catalysis y Petroleoquimica. Madrid
- [49] Ahmad, M. J.N. Roberts, E.M.Hardiman, R.Singh, L.D.Eltis, dan T.D.H.Bugg. 2011. **Identification of DypB from Rhodococcus jostii RHA1 as a Lignin Peroxidase.** *Biochemistry.* 50 : 50966-5107

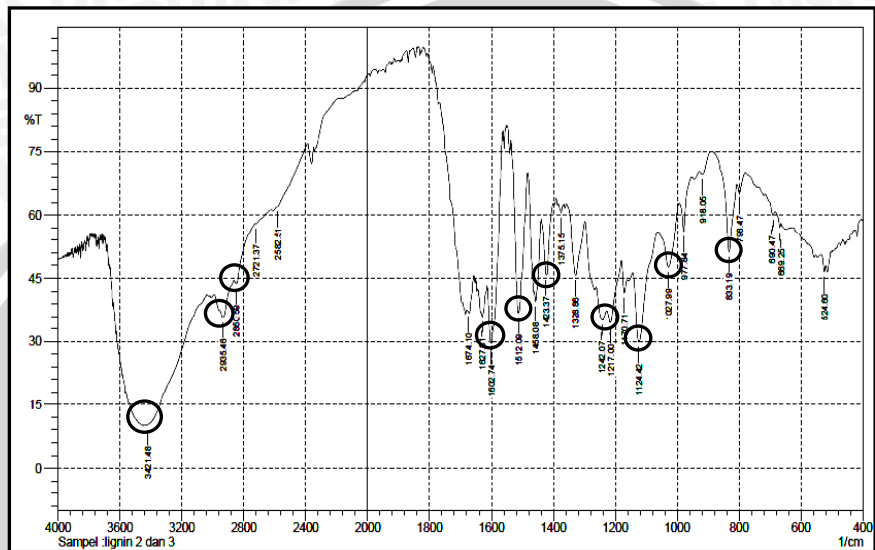
LAMPIRAN

Lampiran A. Alur Penelitian



Lampiran B. Karakterisasi Lignin Ampas Tebu

B.1 Spektra IR Lignin Ampas Tebu



Gambar B.1 Spektra IR lignin ampas tebu

Tabel B.1 Interpretasi gugus fungsi pada spektra FT-IR lignin

Gugus Fungsi	Bilangan gelombang (cm^{-1})	Bilangan gelombang (literatur) (cm^{-1})
O-H ulur	3421.48	3413
C-H ulur sp^3	2935.46	2940
O- CH_3 aromatik	2850.59	2850
C=C ulur	1602.74	1605
CH_3 aromatik	1512.00	1517
CH_3 ulur	1458.08	1461
	1423.37	1420
C-O ulur	1217.00	1219

Lampiran C. Preparasi Larutan

C.1 Pembuatan Larutan NaOH 5 %

Ditimbang 50 gram padatan NaOH, kemudian dilarutkan dalam 200 mL aquades dalam beaker glass 250 mL, kemudian dipindahkan ke dalam labu ukur 1 L dan diencerkan hingga tanda batas dengan aquades.

C.2 Pembuatan Larutan HCL 6 M

Sebanyak 50 mL larutan HCl 37% dimasukkan ke dalam labu ukur 100 mL, ditandabatkan dengan aquades dan dikocok hingga homogen.

C.3 Pembuatan Larutan Asam Sitrat 0,1

Ditimbang 1,92 g asam sitrat kemudian dilarutkan dengan 50 mL aquades dalam gelas kimia 100 mL, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

C.4 Pembuatan Larutan Dinatrium Hidrogen Fosfat 0,2 M

Ditimbang 2,84 g Na_2HPO_4 kemudian dilarutkan dengan 50 mL aquades dalam gelas kimia 100 mL, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

C.5 Pembuatan Larutan Buffer Sitrat-Fosfat pH 4, 5, 6, 7, 8

Sebanyak 50 mL larutan dinatrium hydrogen fosfat 0,2 M dimasukkan dalam gelas kimia, lalu ke dalamnya dimasukkan pengaduk magnetic. Elektroda dipasangkan dan dicelupkan dalam larutan. Dilakukan penambahan asam sitrat sedikit demi sedikit ke dalam larutan hingga mencapai pH 4. Begitupun untuk pembuatan larutan buffer sitrat-fosfat pH 4, 5, 6, 7, 8.

C.6 Larutan Stok Vanilin

Ditimbang sebanyak 0,01 g vanilin, kemudian dilarutkan dengan 200 μL metanol dalam gelas kimia dan ditambahkan 50 mL aquades, kemudian dipindahkan dalam labu ukur 100 mL dan diencerkan sampai tanda batas.

C.7 Larutan Standar Vanilin

Larutan stok vanilin 100 mg/L dipipet masing-masing 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0 lalu dimasukkan ke dalam labu ukur 10 mL yang berbeda dan ditambahkan 200 μ L 0,1 N NaOH kemudian diencerkan hingga tanda batas dengan aquades, sehingga diperoleh larutan vanilin dengan konsentrasi 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, dan 10 mg/L.

Lampiran D. Perhitungan Preparasi Larutan

D.1 Preparasi Larutan NaOH 5%

Massa NaOH = 50 gram

$\rho_{H_2O} = 1 \text{ kg/L}$

Volume Total = 1L

$$\%NaOH = \frac{\text{massa NaOH}}{\text{Vol.Total} \times \rho_{H_2O}} \times 100 \%$$

$$\%NaOH = \frac{50g}{1L \times 1 \frac{kg}{L}} \times 100 \%$$

$$\%NaOH = 5\%$$

D.2 Preparasi Larutan HCl 6M

% HCl = 37%

Volume HCl = 50 mL

$\rho_{HCl} = 1,19 \text{ g/mL}$

Volume Total = 100 mL

Mr HCl = 36,5 g/mol

$$\begin{aligned}
 \text{massa total} &= \text{Vol. HCl} \times \rho \text{ HCl} \\
 &= 50\text{mL} \times 1,19 \text{ g/mL} \\
 &= 59,5\text{g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{massa HCl} &= \text{massa total} \times \% \text{HCl} \\
 &= 59,5\text{g} \times 37\% \\
 &= 22,015\text{g}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{mol HCl} &= \frac{\text{massa HCl}}{\text{Mr HCl}} \\
 &= \frac{22,015\text{g}}{36,5 \text{ g/mol}} \\
 &= 0,603\text{mol}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 [\text{HCl}] &= \frac{\text{mol HCl}}{\text{Vol. Total}} \\
 &= \frac{0,603\text{mol}}{0,1 \text{ L}} \\
 &= 6,03 \text{ M}
 \end{aligned}$$

D.3 Larutan Asam Sitrat ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) 0.1 M

Larutan asam sitrat 0.1 M dibuat sebanyak 100 mL (BM $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 = 192 \text{ g/mol}$).

$$\begin{aligned}
 \text{mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7 &= [\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7] \times V_{\text{larutan}} \\
 &= 0,1 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\
 &= 0.0 \text{ mol}
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Berat C}_6\text{H}_8\text{O}_7 &= \text{mol C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \times \text{BM C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \\
 &= 0,01 \text{ mol} \times 192 \text{ g/mol} \\
 &= 1,92 \text{ g}
 \end{aligned}$$

Jadi asam sitrat yang harus ditimbang untuk membuat larutan asam sitrat 0,1 M adalah 1,92 g.

D.4 Larutan Dinatrium Hidrogen Fosfat

Larutan dinatrium hydrogen fosfat 0,2 M dibuat sebanyak 100mL (BM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 142 \text{ g/mol}$).

$$\begin{aligned}\text{mol Na}_2\text{HPO}_4 &= [\text{Na}_2\text{HPO}_4] \times V_{\text{larutan}} \\ &= 0,2 \text{ mol/L} \times 0,1 \text{ L} \\ &= 0,02 \text{ mol}\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Berat Na}_2\text{HPO}_4 &= \text{mol Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{BM Na}_2\text{HPO}_4 \\ &= 0,02 \text{ mol} \times 142 \text{ g/mol} \\ &= 2,84 \text{ g}\end{aligned}$$

Jadi dinatrium hydrogen fosfat yang harus ditimbang untuk membuat larutan dinatrium hydrogen fosfat 0,2 M adalah 2,84 g.

D.5 Larutan buffer sitrat-fosfat pH 4

Untuk mendapatkan larutan buffer dengan pH yang diharapkan, dibuat dengan mencampur larutan asam sitrat dan larutan dinatrium hydrogen fosfat, berdasarkan persamaan dibawah ini :

$$\text{pH} = \text{pKa} + \log \frac{[\text{Garam}]}{[\text{Asam}]}$$

Untuk membuat larutan buffer sitrat-fosfat dengan pH 4, larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M yang dicampurkan sebanyak 25 mL, maka volume larutan asam sitrat yang ditambahkan adalah :

$$\begin{aligned}\text{pKa}_{\text{asam sitrat}} &= 4,62 \\ 4 &= 4,62 + \log \frac{(25 \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})}{(V \text{ mL} \times 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})} \\ -0,62 &= \log \frac{5}{0,1V} \\ 0,239 &= \frac{5}{0,1V} \\ V &= 209,2 \text{ mL}\end{aligned}$$

D.6 Larutan buffer sitrat-fosfat pH 5

Misalkan untuk membuat larutan buffer sitrat-fosfat dengan pH 5, larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M yang dicampurkan sebanyak 50 mL, maka volume larutan asam sitrat yang ditambahkan adalah :

$$\begin{aligned} \text{pKa}_{\text{asam sitrat}} &= 4,62 \\ 5 &= 4,62 + \log \frac{(50 \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})}{(V \text{ mL} \times 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})} \\ 0,38 &= \log \frac{10}{0,1V} \\ 2,399 &= \frac{10}{0,1V} \\ V &= 41,68 \text{ mL} \end{aligned}$$

D.7 Larutan buffer sitrat-fosfat pH 6

Untuk membuat larutan buffer sitrat-fosfat dengan pH 6, larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M yang dicampurkan sebanyak 50mL, maka volume larutan asam sitrat yang ditambahkan adalah :

$$\begin{aligned} \text{pKa}_{\text{asam sitrat}} &= 4,62 \\ 6 &= 4,62 + \log \frac{(50 \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})}{(V \text{ mL} \times 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})} \\ 1,38 &= \log \frac{10}{0,1V} \\ 23,988 &= \frac{10}{0,1V} \\ V &= 4,17 \text{ mL} \end{aligned}$$

D.8 Larutan Buffer Sitrat-Fosfat pH 7

Untuk membuat larutan buffer sitrat-fosfat dengan pH 7, larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M yang dicampurkan sebanyak 100 mL, maka volume larutan asam sitrat yang ditambahkan adalah :

$$\begin{aligned} \text{pKa}_{\text{asam sitrat}} &= 4,62 \\ 7 &= 4,62 + \log \frac{(100 \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})}{(V \text{ mL} \times 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})} \\ 1,38 &= \log \frac{20}{0,1V} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 239,88 &= \frac{20}{0,1 V} \\ V &= 0,83 \text{ mL} \end{aligned}$$

D.9 Larutan Buffer Sitrat-Fosfat pH 8

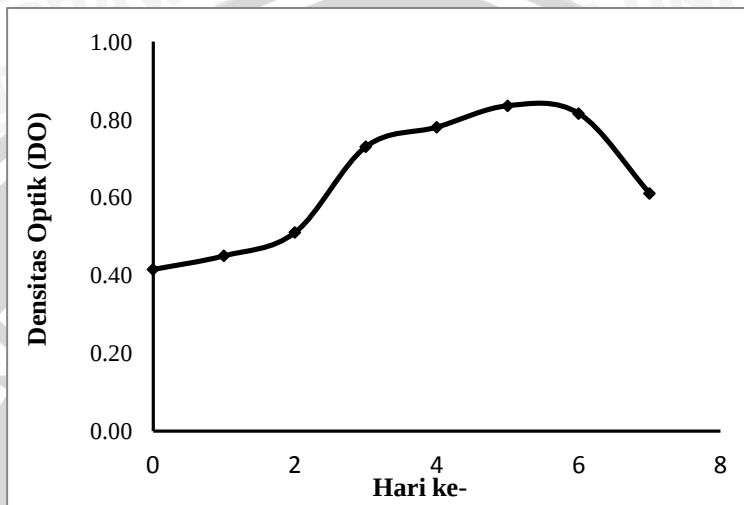
Untuk membuat larutan buffer sitrat-fosfat dengan pH 8, larutan dinatrium hidrogen fosfat 0,2 M yang dicampurkan sebanyak 100 mL, maka volume larutan asam sitrat yang ditambahkan adalah :

$$\begin{aligned} \text{pK}_a_{\text{asam sitrat}} &= 4,62 \\ 8 &= 4,62 + \log \frac{(100 \text{ mL} \times 0,2 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})}{(V \text{ mL} \times 0,1 \frac{\text{mmol}}{\text{mL}})} \\ 1,38 &= \log \frac{20}{0,1V} \\ 2398,8 &= \frac{20}{0,1 V} \\ V &= 0,08 \text{ mL} \end{aligned}$$

Lampiran E. Pembuatan Kurva Pertumbuhan *Raoultella* sp

Tabel E.1 Densitas optik sel *Raoultella* sp pada interval 7 hari

Hari ke-	DO		Rata-rata
	I	II	
0	0,430	0,400	0,420
1	0,480	0,420	0,450
2	0,580	0,440	0,510
3	0,790	0,670	0,730
4	0,840	0,720	0,780
5	0,880	0,790	0,840
6	0,870	0,760	0,820
7	0,690	0,530	0,610

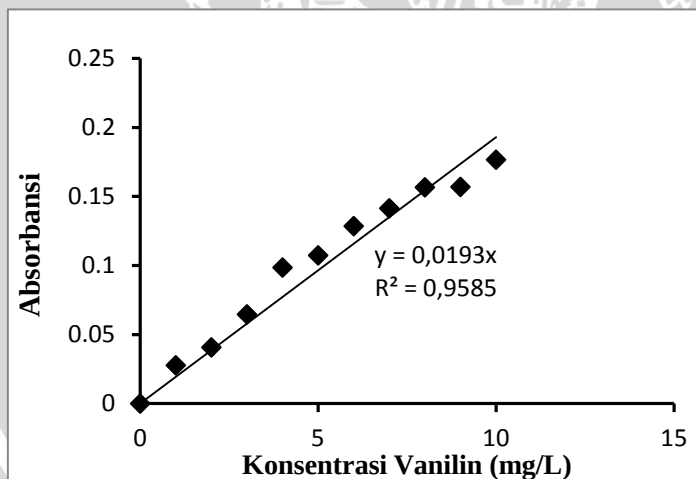


Gambar E.1 Kurva Pertumbuhan *Raoultella sp*

Lampiran F. Pembuatan Kurva Baku Vanilin

Tabel F.1 Absorbansi larutan standar vanilin λ 348 nm

KONSENTRASI(mg/L)	ABSORBANSI
0	0
1	0,0277
2	0,0407
3	0,0646
4	0,0985
5	0,1073
6	0,1285
7	0,1414
8	0,1566
9	0,1569
10	0,1766



Gambar F.1 Kurva Baku Vanilin

Lampiran G. Penentuan Kondisi Optimum Fermentasi Lignin dengan *Raoultella* sp.

Tabel G.1 Konsentrasi Vanilin pada Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Hari ke-	Absorbansi		Konsentrasi vanilin (mg/L)		Konsentrasi Vanilin Rata-rata (mg/L)
	I	II	I	II	
1	0,0906	0,1108	2,7	3,9	3,3
2	0,1229	0,1277	4,6	4,9	4,7
3	0,1334	0,1393	5,2	5,5	5,3
4	0,1781	0,189	7,7	8,3	8,0
5	0,2436	0,2674	11,4	12,8	12,1
6	0,1439	0,1487	5,8	6,0	5,9

Tabel G.2 Konsentrasi Vanilin pada Penentuan pH Optimum

pH	Absorbansi			Konsentrasi Vanilin(mg/L)			Konsentrasi Vanilin Rataan(mg/L)
	I	II	III	I	II	III	
4	0,1206	0,1156	0,1710	6,2	6,0	8,9	7,0
5	0,1737	0,1872	0,1849	9,0	9,7	9,6	9,4
6	0,2471	0,2445	0,2651	12,8	12,7	13,7	13,1
7	0,2911	0,3057	0,2830	15,1	15,8	14,7	15,2
8	0,2469	0,2562	0,2434	12,8	13,3	12,6	12,9

Tabel G.3 Konsentrasi Vanilin pada Penentuan Temperatur Optimum

T (°C)	Absorbansi			Konsentrasi Vanilin (mg/L)			Konsentrasi Vanilin Rataan(mg/L)
	I	II	III	I	II	III	
30	0,1708	0,191	0,1773	8,8	9,9	9,2	9,3
35	0,2244	0,2292	0,2508	11,6	11,9	13,0	12,2
40	0,3265	0,3172	0,3607	16,9	16,4	18,7	17,3
45	0,1507	0,1616	0,1537	7,8	8,4	8,0	8,0
50	0,0938	0,1384	0,1232	4,9	7,2	6,4	6,1

Lampiran H. Analisa Statistika

H.1 Penentuan Waktu Inkubasi Optimum

Untuk mengetahui pengaruh lamanya waktu inkubasi fermentasi lignin oleh *Raoultella* sp maka harus di analisis menggunakan pola RAL sebagai berikut :

Tabel H.1.1 Analisa pengaruh waktu inkubasi fermentasi terhadap konsentrasi vanilin

Hari ke-	Konsentrasi Vanilin (mg/L)		Konsentarsi Vanilin rata-rata (mg/L)
	I	II	
1	2.7443	3.892	3.3182
2	4.5795	4.8523	4.7159
3	5.1761	5.5114	5.3438
4	7.7159	8.3352	8.0256
5	11.4375	12.7898	12.1137
6	5.7727	6.0455	5.9091

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh tiap-tiap perlakuan, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{p \times n} = \frac{78.8522}{12} = 518.1391$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- a. JK Total (JKT)

$$\begin{aligned} JKT &= \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 - FK \\ &= 617.6412 - 518.1391 \\ &= 99.5021 \end{aligned}$$

- b. JK Perlakuan (JKP)

$$\begin{aligned} JKP &= \frac{\sum_{i=1}^p \left[\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{n} - FK \\ &= 615.7459 - 518.1391 \\ &= 97.6067 \end{aligned}$$

c. JK Galat Percobaan (JKG)

$$\text{JKG} = \text{JKT} - \text{JKP} = 99.5021 - 97.6067 = 1.8954$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$\text{a. KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{97.6067}{5} = 19.5231$$

$$\text{b. KT Galat percobaan} = \frac{\text{JKG}}{\text{dB percobaan}} = \frac{1.8954}{6} = 0.3159$$

4. Menghitung nilai F

$$\text{F hitung} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}} = \frac{19.5231}{0.3159} = 61.7971$$

$$\text{F table } 5\% = \text{F}(0.05; 5, 6) = 5.98$$

Hipotesis :

H_0 : tidak ada pengaruh perlakuan waktu inkubasi terhadap konsentrasi vanilin hasil fermentasi.

H_1 : ada pengaruh perlakuan waktu inkubasi terhadap konsentrasi vanilin hasil fermentasi.

Tabel H.1.2 Data Analisa Varian Satu Arah

Sebar Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	5	97.6067	19.521	61.80	5.98
Galat percobaan	6	1.8954	0.3159		
Total	11	99.5021			

Berdasarkan hasil analisis ragam pada table L.7.2, dapat diketahui nilai F hitung yang diperoleh sebesar 61.80, dimana nilai tersebut lebih besar dari F table (5%) sebesar 5.98, sehingga dapat H_0 ditolak, maka dapat disimpulkan bahwa ada pengaruh perlakuan waktu inkubasi terhadap konsentrasi vanilin hasil fermentasi.

Untuk mengetahui variasi waktu inkubasi mana saja yang berpengaruh terhadap konsentrasi vanilin, maka dilanjutkan uji BNT dengan $\alpha = 0.05$.

$$BNT = t_{\alpha/2.dbg} \sqrt{\frac{2KTG}{n}}$$

$$BNT_{5\%} = t(0.025; 6) \times (2 \times 0.3159/2)^{0.5}$$

$$= 2.179 \times 0.5620 = 1.2246$$

Tabel H.1.3 Data uji BNT 5% terhadap variasi waktu inkubasi

Perlakuan	Konsentrasi Vanilin (rata-rata)	Hari1	Hari2	Hari3	Hari6	Hari4	Hari5	Notasi
		3.318	4.716	5.344	5.909	8.026	12.114	
Hari1	3.318	0						a
Hari2	4.716	1.398	0					bc
Hari3	5.344	2.026	0.628	0				cd
Hari6	5.909	2.591	1.193	0.565	0			d
Hari4	8.026	4.708	3.31	2.682	2.117	0		e
Hari5	12.114	8.796	7.398	6.77	6.205	4.088	0	f

H.2 Penentuan pH Optimum

Untuk mengetahui pengaruh lamanya pH fermentasi lignin oleh *Raoultella* sp maka harus di analisis menggunakan pola RAL sebagai berikut :

Tabel H.2.1 Analisa pengaruh pH fermentasi terhadap konsentrasi vanilin

pH	Konsentrasi Vanilin (mg/L)			Konsentrasi Vanilin rata-rata (mg/L)
	I	II	III	
4	6.2487	5.9896	8.8601	7.0328
5	9.000	9.6995	9.5803	9.4266
6	12.8031	12.6684	13.7358	13.0691
7	15.0829	15.8394	14.6632	15.1952
8	12.7927	13.2746	12.6114	12.8929

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh tiap-tiap perlakuan, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}]^2}{p \times n} = \frac{29877.0329}{15} = 1991.8022$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- d. JK Total (JKT)

$$\begin{aligned} JKT &= \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 - FK \\ &= 2125.6711 - 1991.8022 \\ &= 133.8689 \end{aligned}$$

e. JK Perlakuan (JKP)

$$\begin{aligned} \text{JKP} &= \frac{\sum_{i=1}^p [\sum_{j=1}^n Y_{ij}]^2}{n} - \text{FK} \\ &= 2118.7280 - 1991.8022 \\ &= 126.9255 \end{aligned}$$

f. JK Galat Percobaan (JKG)

$$\text{JKG} = \text{JKT} - \text{JKP} = 133.8689 - 126.9255 = 6.9434$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

c. $\text{KT Perlakuan} = \frac{\text{JKP}}{\text{dB perlakuan}} = \frac{126.9255}{4} = 31.7318$

d. $\text{KT Galat percobaan} = \frac{\text{JKG}}{\text{dB percobaan}} = \frac{6.9434}{10} = 0.6943$

4. Menghitung nilai F

$$\text{F hitung} = \frac{\text{KTP}}{\text{KTG}} = \frac{31.7318}{0.6943} = 45.6999$$

$$\text{F table } 5\% = F(0.05; 4, 10) = 4.46$$

Hipotesis :

H_0 : tidak ada pengaruh perlakuan pH terhadap konsentrasi vanilin hasil fermentasi

H_1 : ada pengaruh perlakuan pH terhadap konsentrasi vanilin hasil fermentasi

Tabel H.2.2 Data Analisa Varian Satu Arah

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	126.926	31.731	45.70	4.46
Galat percobaan	10	6.944	0.694		
Total	14	133.870			

Karena $F \text{ hitung} > F \text{ table}$ maka H_0 ditolak, artinya variasi pH fermentasi berpengaruh terhadap konsentrasi vanilin yang dihasilkan. Untuk mempengaruhi variasi pH

mana saja yang berpengaruh terhadap konsentrasi vanilin, maka dilanjutkan uji BNT dengan $\alpha = 0.05$.

$$BNT = t_{\alpha/2.dbg} \sqrt{\frac{2KTG}{n}}$$

$$BNT = t_{\alpha/2.dbg} \sqrt{\frac{2KTG}{n}}$$

$$BNT_{5\%} = t(0.025; 10) \times (2 \times 0.694/3)^{0.5}$$

$$= 2.2281 \times 0.6801 = 1.5153$$

Tabel H.2.3 Data uji BNT 5% terhadap variasi pH

Perlakuan	Konsentrasi Vanilin (rata-rata)	pH 4	pH 5	pH 8	pH 6	pH 7	Notasi
		7.0328	9.4266	12.8929	13.0691	15.1952	
pH 4	7.0328	0					a
pH 5	9.4266	2.3938	0				b
pH 8	12.8929	5.8601	3.4663	0			cd
pH 6	13.0691	6.0363	3.6425	0.1762	0		d
pH 7	15.1952	8.1624	5.7686	2.3023	2.1261	0	e

H.3 Penentuan Temperatur Optimum

Untuk mengetahui pengaruh lamanya waktu inkubasi fermentasi lignin oleh *Raoultella* sp maka harus di analisis menggunakan pola RAL sebagai berikut :

Tabel H.3.1 Analisa pengaruh temperatur fermentasi terhadap konsentrasi vanilin

Temperatur (°C)	Konsentrasi Vanilin (mg/L)			Konsentrasi Vanilin rata-rata (mg/L)
	I	II	III	
30	8.8497	9.8964	9.1865	9.3109
35	11.6269	11.8756	12.9948	12.1658
40	16.9171	16.4352	18.6891	17.3472
45	7.8083	8.3731	7.9637	8.0484
50	4.8601	7.171	6.3834	6.1382

Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh tiap-tiap perlakuan, maka dilakukan uji F dengan langkah-langkah sebagai berikut :

1. Menghitung Faktor Korelasi (FK)

$$FK = \frac{\left[\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{p \times n} = \frac{25290.8272}{15} = 1686.0551$$

2. Menghitung Jumlah Kuadrat (JK)

- g. JK Total (JKT)

$$\begin{aligned} JKT &= \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n Y_{ij}^2 - FK \\ &= 1921.6040 - 1686.0551 \\ &= 235.5491 \end{aligned}$$

- h. JK Perlakuan (JKP)

$$\begin{aligned} JKP &= \frac{\sum_{i=1}^p \left[\sum_{j=1}^n Y_{ij} \right]^2}{n} - FK \\ &= 1914.2230 - 1686.0551 \\ &= 228.1682 \end{aligned}$$

i. JK Galat Percobaan (JKG)

$$JKG = JKT - JKP = 235.5491 - 228.1682 = 7.3809$$

3. Menghitung Kuadrat Tengah (KT)

$$e. \text{ KT Perlakuan} = \frac{JKP}{\text{dB perlakuan}} = \frac{228.1682}{4} = 57.0420$$

$$f. \text{ KT Galat percobaan} = \frac{JKG}{\text{dB percobaan}} = \frac{7.3809}{10} = 0.7380$$

4. Menghitung nilai F

$$F \text{ hitung} = \frac{KTP}{KTG} = \frac{57.0420}{0.7380} = 77.2835$$

$$F \text{ table } 5\% = F(0.05; 4, 10) = 4.46$$

Hipotesis :

H_0 : tidak ada pengaruh perlakuan temperatur terhadap konsentrasi vanilin hasil fermentasi

H_1 : ada pengaruh perlakuan temperatur terhadap konsentrasi vanilin hasil fermentasi

Tabel H.3.2 Data Analisa Varian Satu Arah

Sebar Keragaman	dB	JK	KT	F hitung	F tabel
Perlakuan	4	228.168	57.042	77.28	4.46
Galat percobaan	10	7.381	0.738		
Total	14	235.549			

Karena $F_{hitung} > F_{table}$ maka H_0 ditolak, artinya variasi temperatur fermentasi berpengaruh terhadap konsentrasi vanilin yang dihasilkan. Untuk mempengaruhi variasi temperatur fermentasi mana saja yang berpengaruh terhadap konsentrasi vanilin, maka dilanjutkan uji BNT dengan $\alpha = 0.05$.

$$BNT = t_{\alpha/2, dbg} \sqrt{\frac{2KTG}{n}}$$

$$BNT_{5\%} = t(0.025; 106) \times (2 \times 0.738/3)^{0.5}$$

$$= 2.2281 \times 0.7014 = 1.5628$$

Tabel H.3.3 Data uji BNT 5% terhadap variasi temperatur

Perlakuan	Konsentrasi Vanilin (rata-rata) (mg/L)	T50	T 45	T 30	T 35	T 40	Notasi
		6.1382	8.0484	9.3109	12.1658	17.3472	
T50	6.1382	0					a
T45	8.0484	1.9102	0				bc
T30	9.3109	3.1727	1.2625	0			c
T35	12.1658	6.0276	4.1174	2.8549	0		d
T40	17.3472	11.209	9.2988	8.0363	5.1814	0	e