

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen. Termasuk penelitian eksperimen karena dalam penelitian ini terdapat perlakuan dan kontrol sebagai acuan antara keadaan awal dengan sesudah diberi perlakuan, sehingga terlihat sebuah perbedaan yang signifikan. Dalam penelitian ini juga dilakukan replikasi dan randomisasi untuk meyakinkan hasil yang diperoleh (Nazir, 2003).

B. Desain Penelitian

Penelitian dilakukan dalam dua tahap. Tahap pertama yaitu tahap pendahuluan dan tahap kedua adalah penelitian utama. Tahap pendahuluan meliputi tahap persiapan alat dan bahan, pembuatan larutan HCl 1N, 2N, 3N, 4N dan 5N yang akan dilakukan dalam penelitian pendahuluan untuk mengetahui konsentrasi HCl optimum yang akan digunakan untuk menghidrolisis bubuk kakao. Tahap pendahuluan juga meliputi pengeringan kulit kakao, penumbukan hingga *diblender* agar berbentuk bubuk sehingga gampang dihidrolisis.

Tahap penelitian utama meliputi tahap persiapan alat dan bahan, *pretreatment* dan *treatment*. Selanjutnya, pembuatan kurva standar alkohol, pembuatan kurva standar glukosa, serta pengujian kadar gula pereduksi tertinggi hasil hidrolisis kulit buah kakao. Tahap penelitian utama meliputi tahap *pretreatment* yaitu pemberian HCl pada suhu 100°C selama 2 jam (Balat *et al.*, 2008). Kadar gula pereduksi dalam sampel diukur dengan Metode Somogyi-Nelson untuk mengetahui konsentrasi yang paling optimal menghasilkan gula pereduksi

tertinggi. Tahap fermentasi yaitu dengan fermentasi hidrosilat dari kulit buah kakao menggunakan ragi tape dengan berbagai konsentrasi.

Rancangan dasar penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL), dengan faktor lingkungan yang dikondisikan homogen. Untuk perlakuan perbedaan konsentrasi ragi tape pada penelitian utama dilakukan dengan lima perlakuan kombinasi dengan empat replikasi (Gomez, 1995).

$$T(R-1) \geq 15$$

$$5R-5 \geq 15$$

$$5R \geq 20$$

$$R \geq 4$$

Variasi ragi tape yang digunakan adalah 0%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% (v/v) Penelitian yang dilakukan oleh Anggara (2010), menggunakan ragi tape dari 1% hingga 4% untuk fermentasi hidrolisat dari substrat sampah. Lama waktu fermentasi dilakukan selama 6 hari (Wangi, 2010). Pengujian parameter pH, kadar glukosa, dan kadar alkohol dilakukan setiap hari. Gula awal yang ditambahkan sebagai gula *starter* adalah 5%, suhu inkubasi 30°C dan pH yang akan digunakan dalam penelitian ini adalah 5, berdasarkan penelitian yang dilakukan sebelumnya (Anggara, 2010). Rentang waktu pengukuran kadar alkohol dilakukan setiap hari hingga 6 hari.

Kadar alkohol pada sampel ditentukan dengan cara titrasi asam basa. Untuk mengetahui kadar alkohol pada sampel terlebih dahulu dibuat kurva standar alkohol yang menyatakan hubungan antara kebutuhan NaOH sebagai sumbu X dan kadar

alkohol sebagai sumbu Y. Prosedur titrasi yang dilakukan dalam penelitian ini mengikuti Hidayat (1995: 44).

C. Populasi dan Sampel

Populasi dalam penelitian ini adalah semua kulit buah kakao yang berasal dari Perkebunan Coklat di Raja Wali, Jawa Barat. Sampel yang digunakan adalah kulit buah kakao yang akan digunakan dalam proses fermentasi.

D. Lokasi Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi dan Genetika Universitas Pendidikan Indonesia Jl. Dr Setiabudhi No 229 pada bulan Maret-Juni 2011.

E. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian ini terdapat pada Tabel 3.1 dan Tabel 3.2 berikut :

Tabel 3.1 Alat – Alat Penelitian

No	Alat-alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Alat destilasi	-	1 unit
2.	Alkoholmeter	-	1 buah
3.	Autoclave	EYELA model HL36AE	1 unit
4.	Blender	Merk Nasional	1 unit
5.	Botol fermentasi	-	80 buah
6.	Botol penampung bioetanol	Pyrex	4 unit
7.	Bunsen	-	3 buah
8.	Buret dan Statif	-	1 buah
9.	Ember	-	5 buah
10.	Gelas Beaker	Pyrex	5 buah
11.	Hotplate	Eyela magnetic stirrer RCH 3	1 unit
12.	Inkubator	Gallenkamp Cooled Inkubator	1 buah
13.	Kain penyaring	-	5 buah
14.	Kamera digital	Kodak	1 unit
15.	Kompor gas	Rinai	1 unit
16.	Lemari es	National	1 buah

17.	Makropipet 2 ml	Eppendorf	1 unit
18.	Panci Penangas	-	2 buah
19.	Pipet tetes dan volum	-	6 buah
20.	Pisau	-	1 buah
21.	Shaker	EYELA model multi shaker MMS	1 unit
22.	Spektrofotometer	Milton Rey Spectronic 20 D	1 buah
23.	Termometer	-	2 buah
24.	Timbangan Analitik	AND HF-300	1 buah
25.	Water bath	Eyela Unithermo Shaker NTS-130	1 unit

Tabel 3.2. Bahan - Bahan penelitian

No	Bahan – bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Reagent Somogyi-Nellson	p.a	2 liter
2.	Phenolftalein	p.a	50 ml
3	pH Indikator	-	1 pak
4.	NaOH 1 M	p.a	3 liter
5.	Medium PDB	-	200ml
6.	Medium PDA	p.a	200ml
7.	Kulit buah kakao	-	-
8.	Ragi	Ragi tape	20 gr
9.	HCl	p.a	1L
10.	Gula pasir	Gulaku	250 gram
11.	Aquades.	Medilabs	10L
12.	Anhidrat asetat	p.a	200 ml
13.	Alkohol absolut	p.a	100 ml

F. Prosedur Penelitian

Penelitian ini dibagi menjadi beberapa tahapan:

1. Tahap Pendahuluan (persiapan)

a. Persiapan Alat dan Bahan

Alat-alat berupa botol fermentasi, pipet, gelas ukur, tabung reaksi dan lain-lain, dibersihkan dengan cara merendam botol-botol tersebut dengan detergen dan bilas, lalu botol-botol tersebut direndam dengan larutan disinfektan selama 30 menit dan dibilas lagi dengan air mengalir, tiriskan.

b. Pembuatan Larutan HCl 1N, 2N, 3N, 4N dan 5N

Metode yang digunakan yaitu dengan pengenceran larutan HCl yang sudah tersedia. HCl yang tersedia di Laboratorium Mikrobiologi adalah HCl 12 N, sementara yang dibutuhkan adalah HCl 1N, 2N, 3N, 4N dan 5N dengan volume 1L. Sistem pengenceran menggunakan persamaan $N_1.V_1=N_2.V_2$.

c. Hidrolisis Untuk Penelitian Pendahuluan

Kulit kakao diberikan perlakuan fisik dengan pengeringan, pemotongan untuk memperkecil ukuran, kemudian ditumbuk untuk mempermudah penggilingan dengan *Blender* sehingga terbentuk bubuk kulit buah kakao. Setelah itu, bubuk kakao sebanyak 1 kg direndam dalam larutan HCl selama 24 jam dan dipanaskan pada suhu 100°C selama 2 jam menggunakan Presto. Hidrosilat disaring dan dimasukkan ke dalam botol fermentor masing-masing 100 ml. pH 5 diatur dengan NaOH 5 M.

d. Pembuatan Kurva Standar Alkohol

Sebanyak 1 ml alkohol dari konsentrasi standar (1-10%) dimasukkan ke dalam Erlenmeyer kemudian ditambahkan 1 ml asam anhidrida asetat dan 2 tetes phenolftalein. Sambil digoyang-goyangkan, ke dalam erlenmeyer tersebut ditambahkan NaOH 1 M sampai terjadi perubahan warna (dari tidak berwarna menjadi warna merah muda). Kemudian dicatat kedudukan skala pada buret.

e. Pembuatan Kurva Standar Glukosa

Sebelum dilakukan analisis kadar gula pereduksi pada sampel, maka terlebih dahulu dibuat kurva baku glukosa. Kurva baku glukosa menyatakan hubungan antara konsentrasi glukosa dengan kerapatan optik (panjang gelombang 520 nm). Kurva ini dibuat untuk menentukan harga konsentrasi larutan glukosa dengan pengukuran

transmisi cahaya menggunakan spektrofotometer dengan metode Somogyi-Nelson (Sadasivam, 1996).

Pembuatan kurva baku glukosa dimulai dengan menimbang glukosa murni sebanyak 200 mg dan dilarutkan dalam 1000 ml akuades dan dikocok sampai homogen. Langkah selanjutnya yaitu mengambil dan memasukkan larutan tersebut dengan mikropipet ke dalam tabung reaksi masing-masing sebanyak 0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml; 0,8 ml; 1,0 ml; 1,2 ml; 1,4 ml; 1,6 ml; 1,8 ml dan 2,0 ml. Selanjutnya menambahkan aquades masing-masing sebanyak 1,8 ml; 1,6 ml; 1,4 ml; 1,2 ml; 1,0 ml; 0,8 ml; 0,6 ml; 0,4 ml; 0,2 ml; dan 0 ml sehingga volume masing-masing tabung 2 ml. Sehingga pada masing-masing tabung diperoleh konsentrasi glukosa 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 mg/ml.

Tahap selanjutnya yaitu menambahkan sebanyak 1,6 ml larutan Somogyi I dan 0,4 ml Somogyi II ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah berisi larutan glukosa. Kemudian menutup tabung dengan kelereng dan mengocok larutan tersebut hingga homogen. selanjutnya memasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 10 menit, lalu diangkat dan dinginkan dalam penangas es sampai mencapai suhu $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Kemudian ditambahkan 2 ml larutan Nelson dan 4 ml akuades, maka volume total adalah 10 ml. Menutup tabung reaksi dengan ibu jari dan kocok dengan baik dan kuat, hingga gas CO_2 tidak keluar lagi. Mengukur masing-masing larutan *optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Nilai absorbansi dari kadar glukosa standar dibuat dengan grafik linier, kemudian membuat kurva baku glukosa dan mencari persamaan yang akan digunakan dalam penentuan kadar gula pereduksi dari sampel.

2. Tahap Penelitian Utama

a. Hidrolisis kulit buah kakao

Hidrolisis pada penelitian utama sama dengan hidrolisis pada penelitian pendahuluan, tetapi hidrolisis pada penelitian utama menggunakan HCl (Normalitas) yang optimum dari penelitian pendahuluan. Setelah itu, bubuk kakao sebanyak 0,5 kg direndam dalam larutan HCl 4N 5L selama 24 jam dan dipanaskan pada suhu 120°C selama 2 jam menggunakan Presto. Hidrosilat disaring dan dimasukkan ke dalam botol fermentor masing-masing 100 ml. pH 5 diatur dengan NaOH 5 M.

b. Aktivasi ragi tape

Ragi tape digunakan sebagai fermentor dalam proses fermentasi glukosa. Langkah-langkah aktivasi yaitu dengan menimbang ragi tape sebanyak 3 gram (Anggara, 2010). Kemudian masukkan 1 gram gula putih ke dalam 10 ml air hangat ($\pm 40^{\circ}\text{C}$) dan tambahkan ragi ke dalam larutan tersebut. Masukkan ke dalam plastik dalam kondisi anaerob dan biakan ragi selama 24 jam dalam inkubator. Selanjutnya ragi tape siap digunakan untuk fermentasi glukosa kulit buah kakao.

c. Proses fermentasi

Fermentasi merupakan tahap yang sangat penting dalam penelitian ini, dimana substrat akan difermentasikan dengan berbagai konsentrasi ragi tape setelah *pretreatment* kimiawi, untuk mengetahui konsentrasi optimum yang akan menghasilkan kadar alkohol tertinggi. Ragi tape hasil aktivasi dengan dengan konsentrasi 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5% dimasukkan ke dalam botol yang berisis 100 ml substrat hasil hidrolisis kulit buah kakao. Kemudian dilakukan pengukuran kadar alkohol, glukosa pada hari ke 0 hingga hari ke 6.

d. Pengukuran kadar Glukosa (Somogyi-Nelson)

Ambil 2 ml sampel ke dalam tabung reaksi kemudian tambahkan 1,6 ml larutan Somogyi I dan 0,4 larutan Somogyi II kemudian homogenkan dengan menggunakan vorteks. Tabung ditutup dengan menggunakan kelereng lalu dipanaskan dalam penangas selama 10 menit. Setelah 10 menit pindahkan tabung ke dalam es kemudian tambahkan 2 ml larutan Nelson dan 4 ml Akuades, setelah itu homogenkan larutan, masukan larutan dalam cuvet kemudian ukur dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 520 nm. Jika larutan terlalu pekat dan tidak terbaca pada spektrofotometer dilakukan pengenceran, ambil 1 ml larutan kemudian encerkan dengan menambahkan 9 ml akuades.

e. Pengukuran kadar Alkohol

Setiap hari selama 6 hari, hasil fermentasi dari fermentor diambil sebanyak 1 ml ke dalam labu erlenmeyer 100 ml, tambahkan 1 ml anhidrat asetat dan 2 tetes phenolftalein kemudian titrasi dengan NaOH 1 M dengan buret sampai terlihat perubahan warna menjadi warna merah muda. Kadar alkohol yang telah digunakan pada sampel ditentukan dengan cara memasukkan jumlah NaOH yang digunakan ke dalam persamaan yang diperoleh pada kurva standar alkohol.

3. Tahap Perlakuan Skala Pilot**a. Perlakuan**

Sebanyak 1 kg bubuk kulit buah kakao direndam dalam HCl 4N 10L dengan konsentrasi yang paling optimum pada penelitian pendahuluan dan penelitian utama. Dipanaskan selama 2 jam pada suhu 100°C. Ditambahkan gula awal 5% ke dalam larutan, kemudian dihomogenkan. Masukan ke dalam labu Erlenmeyer, setelah dingin diinokulasikan dengan konsentrasi ragi tape optimum dari penelitian utama, kemudian

disimpan pada inkubator dengan suhu 30⁰C selama waktu optimum dari penelitian utama (hari).

b. Destilasi

Alkohol yang terbentuk dari hasil fermentasi dari pilot plan kemudian akan didestilasi dengan menggunakan destilator.

c. Uji *Gas Chromatograph-Mass Spectrometry* (GC-MS)

Uji GC-MS hasil destilasi akan dilakukan di Laboratorium kimia AKA (Akademi Kimia Analitik) Bogor

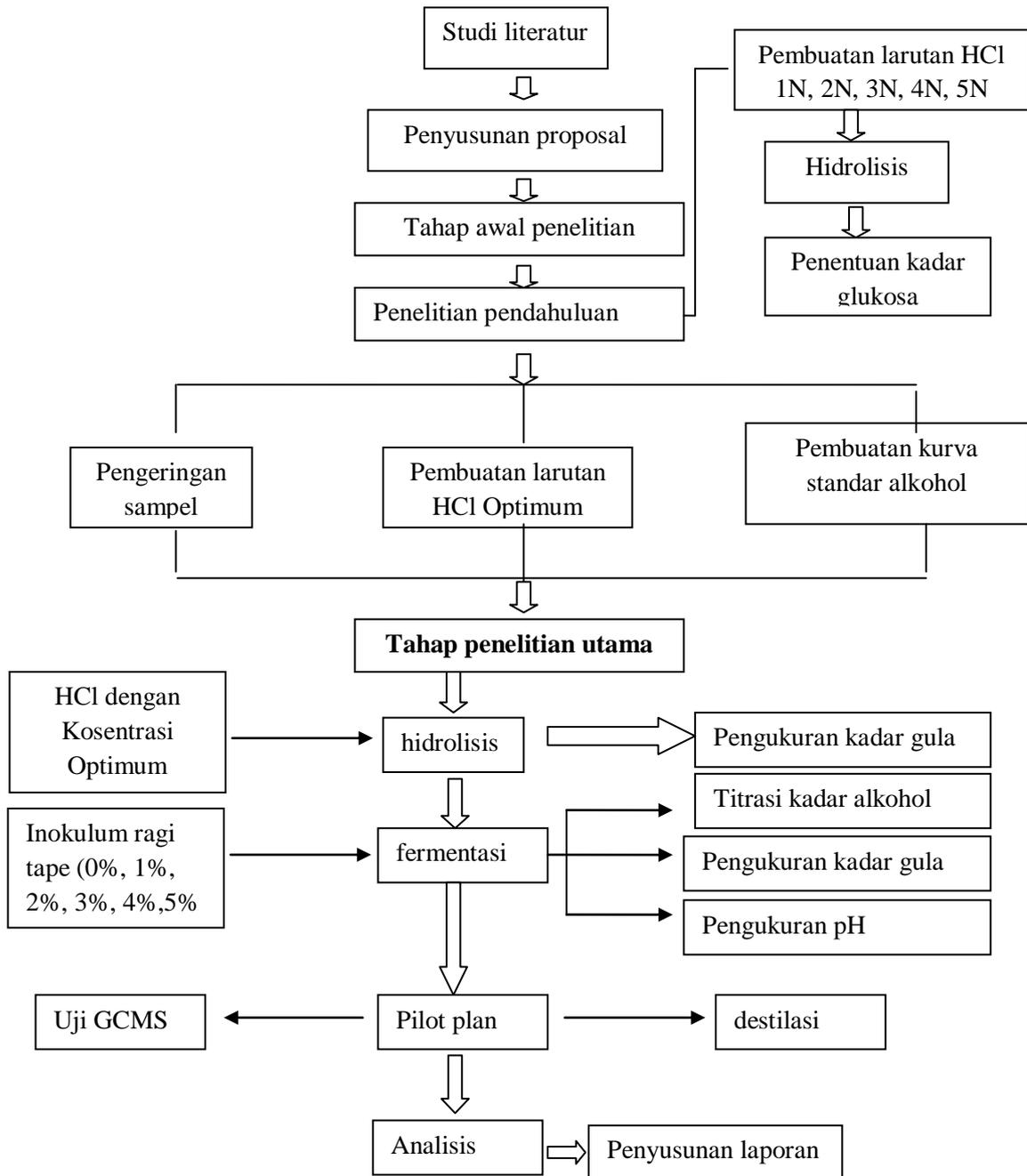
G. Pengolahan Data

Analisis data digunakan untuk mengetahui perlakuan awal yang menghasilkan kadar gula pereduksi tertinggi dari asam klorida (HCl) dan perlakuan yang menghasilkan alkohol terbanyak pada penelitian utama. Pengolahan data dilakukan dengan menggunakan *software SPSS 17.0 for windows*.

Pada uji pendahuluan terdiri dari satu faktor yaitu kadar HCl terbaik, sedangkan pada uji penelitian utama terdiri dari dua faktor yaitu kosentrasi inokulum ragi tape dan lama fermentasi, sehingga pengujian dilakukan melalui tahap-tahap sepertiberikut:

1. Uji Normalitas dan Homogenitas
2. Uji Anova dua jalur (*two way ANOVA*), untuk menentukan perbedaan banyaknya kadar gula pereduksi dan kadar alkohol yang diperoleh dari setiap perlakuan
3. Uji lanjutan menggunakan Uji Tukey untuk menentukan perlakuan yang menghasilkan kadar gula pereduksi dan kadar alkohol paling banyak yang dilanjutkan dengan analisis korelasi.

H. Alur Penelitian



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian