

BAB III

METODE PENELITIAN

A. Jenis Penelitian

Jenis penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen. Termasuk penelitian eksperimen karena dalam penelitian ini terdapat kontrol sebagai acuan antara keadaan awal dengan sesudah diberi perlakuan, juga adanya replikasi dan randomisasi untuk meyakinkan hasil yang diperoleh (Nazir, 2003: 88).

B. Desain Penelitian

Desain penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor lingkungan yang relatif homogen (Nazir, 2003). Penelitian ini terdiri dari tiga tahap, yaitu tahap persiapan, tahap pra-penelitian dan tahap produksi (tahap penelitian). Tahap persiapan meliputi pengumpulan kulit pisang, pembuatan media tumbuh, aktivasi dan fermentasi, pembuatan larutan yang dibutuhkan untuk uji asam asetat dan uji kadar alkohol serta pembuatan *reagen* yang akan digunakan dalam penelitian. Tahap pra-penelitian meliputi analisis komposisi kimia meliputi kadar air, kadar abu, dan kadar gula. Selain itu yang dilakukan selama pra-penelitian yaitu pembuatan kurva tumbuh, kurva baku mikroorganisme, pembuatan kurva baku glukosa dan kurva standar alkohol. Tahap ketiga dari penelitian ini adalah tahap produksi.

Tahap produksi pada kultur campuran yaitu menggabungkan proses alkoholisasi serta asetifikasi dengan menggunakan beberapa perbandingan variasi konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* dan *A. aceti* sebesar 7% : 3%, 5% : 5%, 3% : 7% (v/v). Analisis sampel meliputi analisis kadar gula pereduksi, alkohol, pH serta kadar asam asetat. Setelah memperoleh hasil analisis, kemudian data diolah dengan menggunakan statistik dengan program SPSS versi 16.0. Langkah pertama yang dilakukan adalah menguji distribusi data dengan uji normalitas kemudian dilanjutkan uji homogenitas. Bila data homogen maka dilanjut dengan uji One Way Anova. Akan tetapi bila data tidak homogen, maka dilakukan uji non parametrik yaitu Kruskal-Wallis. Uji ini digunakan untuk menguji hipotesis dengan tingkat kepercayaan 95%. Bila data yang diperoleh terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilakukan dengan uji lanjutan.

C. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret 2009 sampai bulan Juni 2009 di Laboratorium Mikrobiologi, Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia Bandung.

D. Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang telah digunakan dalam penelitian dapat terlihat pada Tabel 3.1 :

Tabel 3.1 Alat dan Bahan

No	Alat-alat laboratorium	Spesifikasi	Jumlah
1.	Autoklaf	EYELA model HL36AE	1 unit
2.	Inkubator	Gallenkamp Cooled Inkubator	1 unit
3.	Oven dan Lemari es	National	@1 unit
4.	pH meter	UCHIDA KT-1A	1 unit
5.	Buret dan statif	Pinchvalve	2 buah
6.	Mikrosentrifugasi	Eppendorf	1 unit
7.	Makropipet 1ml, 2ml, 5ml dan 10ml	Eppendorf	@1 buah
8.	Timbangan analitik	AND HF-300	1 unit
9.	Spectrofotometer	Milton Rey Spectronic 20+	1 unit
10.	Cawan Porselen (<i>crucible</i>)	-	2 buah
11.	Respiratoring water bath	Eyela Unithermo Shaker NTS-130	1 unit
12.	Transfer Box	-	1 unit
13.	Desikator bersilika gel	-	1 unit
14.	Shaker	EYELA model multi shaker MMS	1 unit
15.	Termometer	-	1 unit
16.	Gelas Beaker; labu Erlenmeyer 100 ml, 250ml; gelas ukur 100 mL; gelas ukur 25 mL, 100 mL, 500 ml; tabung reaksi, <i>cuvete</i> .	Pyrex	30 buah
17.	Lap	-	1 buah
18.	Pisau, jarum inokulasi, lampu spiritus, rak tabung, mortar	-	@ 1 buah
19.	Cawan petri	Noermax 12x100 mm	20 buah
20.	<i>Muffle furnace</i>	-	1 unit
21.	Colony counter	SIBATA	1 buah
22.	Magnetic stirrer with <i>hot plate</i>	Eyela magnetic stirrer RCH - 3	@ 1 unit
23.	Vortex mixer	SIBATA TTM-1	@ 1 unit
24.	Blender	-	@ 1 unit
25.	Botol semprot	-	1 buah

No	Bahan – bahan	Spesifikasi	Jumlah
1.	Kulit buah pisang ambon lumut	-	5 kg
2.	Kultur <i>Acetobacter aceti</i>	Isolat murni	1 tabung
3.	Gula pasir	Gulaku	2 kg
4.	Kultur <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Isolat murni	1 tabung
5.	Aquades steril	Medilabs	10 Lt
6.	NaOH	p.a	100 g
7.	Phenolftalein 1 %	Teknis	100 mL
8.	Anhidra asetat	Teknis	150 mL
9.	Alcohol 1-10%	-	@ 10 ml
10.	Alcohol 96%	-	100 ml
11.	Alkohol 70%	-	250 ml
11.	Ekstrak ragi	p.a	100 gram
12.	Pepton	p.a	100 gram
13.	Bakto agar	p.a	100 gram
14.	Glukosa	p.a	100 gram
15.	CaCO ₃	p.a	5 gram
16.	Larutan Somogy I	p.a	200 ml
17.	Larutan Somogy II	p.a	50 ml
18.	Reagen Nelson	p.a	250 ml
19.	Alumunium foil	Bagus	1 pak
20.	Saringan	-	3 buah
21.	Plastik anti panas	-	5 bungkus
22.	Spirtus	-	100 ml
23.	Tissue gulung	-	10 gulung
24.	Kain kasa	-	10 gulung
25.	Karet	-	1 ons

E. Prosedur Penelitian

Cara kerja pada penelitian ini dibagi dalam 3 tahap, yaitu tahap persiapan, tahap pra-penelitian dan tahap pelaksanaan penelitian (tahap produksi) :

1. Tahap Persiapan

Tahap ini terdiri atas beberapa kegiatan, yaitu :

- a. Penyediaan kultur murni *S. cerevisiae* dan *A. aceti* diperoleh dari Laboratorium Bioproses, Jurusan Teknik Kimia ITB.
- b. Pembuatan larutan dan medium yang digunakan dalam penelitian yaitu larutan NaOH 0,1 M, larutan NaOH 1 M, larutan alkohol standar (10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%,1%), medium *Yeast Extract Pepton Dextrose Agar* (YEPDA) dan medium *Yeast Extract Pepton Dextrose Broth* (YEPDB).

2. Tahap Pra-Penelitian

Tahap pra-penelitian terdiri dari :

a. Analisis Komposisi Kimia Kulit Buah Pisang Ambon Lumut

Analisis komposisi kimia bahan baku (kulit buah pisang ambon lumut) meliputi analisis terhadap kadar air, kadar abu dan kadar gula.

1) Analisis Kadar Air

Crucible dikeringkan dalam oven 105°C selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator bersilika gel dan berat awal ditimbang (x). Setelah itu sampel ditimbang seberat 5 g (y) dan dimasukkan ke dalam *crucible*. Kemudian dimasukkan ke dalam oven selama 4–6 jam pada suhu 105°C. Setelah itu didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali hingga

dicapai berat konstan (z). Adapun rumus penentuan kadar air sebagai berikut (Sudarmadji *et al.*, 1986: 77) :

$$\text{Kadar Air} = \frac{(x + y - z)}{y} \times 100\%$$

2) Analisis Kadar Abu

Crucible dikeringkan dalam oven 105°C selama 1 jam, kemudian didinginkan dalam desikator bersilika gel dan berat awal ditimbang (x). Setelah itu sampel bahan ditimbang dengan berat kira-kira 5 g (y) dan dimasukkan ke dalam *crucible*. Sampel tersebut dipijarkan di atas nyala api pembakar Bunsen. Setelah itu dimasukkan ke dalam tanur listrik *muffle furnace* dengan suhu 400 - 600°C. Sesudah sampel abu berwarna putih, seluruh sampel diangkat dan didinginkan dalam desikator bersilika gel. Setelah 1 jam sampel ditimbang kembali (z). Kadar abu dalam sampel dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut (Sudarmadji *et al.*, 1986: 33) :

$$\text{Kadar Abu} = \frac{(z - x)}{y} \times 100\%$$

3) Analisis Kadar Gula Total

Analisis kadar gula total dilakukan dengan menggunakan *refraktometer*. Prinsip kerja *refraktometer* adalah menyerap cahaya yang terdapat pada sampel. Oleh karena itu, sampel yang digunakan adalah sampel yang cairannya bening. Cara yang

dilakukan adalah kulit buah pisang dihaluskan, kemudian dimasukkan ke dalam tabung. Setelah itu supernatan diambil dengan menggunakan *centrifuge* selama 5-10 menit dengan kecepatan 600 rpm. Sebelum digunakan untuk analisis kadar gula total refraktometer dikalibrasi dahulu dengan menggunakan aquades, kemudian dikalibrasi dengan gula murni. Setelah itu supernatan sampel diukur kadar gulanya (Hilmi *et al.*, 2006: 48).

b. Pembuatan Media

1) Medium Agar Miring *Yeast Extract Pepton Dextrose Agar*

Saccharomyces cerevisiae dan *Acetobacter aceti* yang akan digunakan dalam penelitian ini ditumbuhkan dahulu dalam agar miring. Medium agar miring yang digunakan adalah medium YEPDA, yang dibuat dengan cara sebagai berikut : 0,5 g ekstrak ragi dan 1 g pepton bakto dilarutkan dalam 100 ml akuades sambil dipanaskan. Setelah mendidih, ditambahkan agar bakto sebanyak 2 g sedikit demi sedikit kedalamnya hingga larut. Setelah itu diangkat dari atas api dan ditambah 2 g glukosa dan dicampur hingga larut. Dalam keadaan panas, sebanyak 5 ml dituang ke dalam masing-masing tabung reaksi, kemudian ditutup dengan kapas berlemak serta sisanya disimpan dalam labu erlenmeyer. Semua medium disterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Setelah itu

tabung reaksi dimiringkan sampai agar dingin dan membeku. Untuk medium agar miring *A. aceti*, pada medium YEPDA ditambahkan 0,3 g CaCO₃.

2) **Medium Aktivasi *Yeast Extract Pepton Dextrose Broth***

Sebelum dimasukkan ke dalam medium fermentasi, inokulum *S. cerevisiae* dan *A. aceti* diaktivasi terlebih dahulu.

Medium aktivasi yang digunakan adalah medium YEPDB yang dibuat dengan cara 0,5 g ekstrak ragi dan 1 g pepton bakto dilarutkan dalam 100 ml akuades sambil dipanaskan. Setelah itu ditambah 2 g glukosa dan dicampur hingga larut, dididihkan selama 20 menit di atas *hot plate*. Setelah homogen, pH-nya diatur sampai 5. Dalam keadaan panas, sebanyak 10 ml dituang ke dalam labu erlenmeyer 1 dan 90 ml ke dalam labu erlenmeyer 2. Kemudian disterilisasi pada autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit. Untuk medium aktivasi *A. aceti*, pada medium YEPDB ditambahkan 0,3 g CaCO₃.

3) **Medium fermentasi**

Medium fermentasi merupakan medium kulit buah pisang yang dibuat dengan cara sebagai berikut: Kulit buah pisang dibersihkan, ditiriskan dan dipotong-potong. Kemudian ditambah air dan direbus. Tahap selanjutnya pada kulit pisang ditambahkan gula sebanyak 10% (b/v). Kemudian dididihkan

selama 5-10 menit. Setelah dingin diatur keasamannya sehingga pH-nya 5 (Kusnadi dan Aditiwati, 2002: 154), kemudian dimasukkan ke dalam botol fermentasi. Setelah itu disterilisasi di autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 15 lbs selama 15 menit.

c. Pembuatan Kurva Tumbuh *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti*

- 1) Mengaktivasikan inokulum dengan cara mengambil satu ose (satuan jarum inokulum) dari sub kultur *S. cerevisiae* dan *A. aceti* yang masing-masing berumur 1x24 jam lalu memasukkannya ke dalam medium YEPDB sebanyak 10 ml.
- 2) Menginkubasikan sub kultur dalam *incubator shaker* EYELA model multi shaker MMS pada suhu ruang dengan kecepatan 120 rpm (Seward *et al.*, 1996: 439) selama 24 jam untuk *S. cerevisiae* sedangkan *A. aceti* dalam *waterbath shaker* EYELA (Unithermo Shaker NTS-1300) pada suhu 37°C (Moonmangmee *et al.*, 2007: 5) dengan kecepatan 150 rpm (Vega *et al.*, 1988: 749) selama 24 jam.
- 3) Memindahkan inokulum ke dalam 90 ml setelah inkubasi 24 jam.
- 4) Menghitung jumlah sel *A. aceti* dengan menggunakan metode Turbidimetri. Setiap interval waktu dua jam dari labu kultur diambil 5 ml, lalu dimasukkan ke dalam *cuvete*. Kemudian nilai

absorbansi dihitung dengan spektrofotometer dengan λ 600 nm (Moonmangmee *et al.*, 2007: 4).

- 5) Menghitung jumlah sel *S. cerevisiae* dengan menggunakan metode perhitungan mikroskopis langsung. Penghitungan jumlah sel dilakukan setiap 2 jam sekali selama 24 jam. Penghitungan jumlah sel ragi dilakukan dengan menggunakan *Haemocytometer* Improve Neubauer (Hadioetomo, 1993: 75). Cara penghitungan jumlah sel yaitu sampel diteteskan dengan pipet tetes ke atas permukaan ruang hitung *Haemocytometer*, kemudian ditutup dengan kaca objek.

Jumlah total sel sampel = $n \times 50000 \times d$ (Hadioetomo, 1993: 75)

Keterangan :

d = tingkat pengenceran

n = jumlah sel yang dihitung

Hasil penghitungan ini kemudian digunakan untuk menghitung kecepatan pertumbuhan mikroba pada fase eksponensial yang disebut kecepatan pertumbuhan tertinggi (μ). Rumus yang digunakan untuk menghitungnya adalah sebagai berikut (Schlegel, 1994: 228) :

$$\mu = 2,303 \frac{(\text{Log } N_t - \text{Log } N_0)}{t_t - t_0} \quad \text{atau} \quad \mu = \frac{(\text{Ln } N_t - \text{Ln } N_0)}{t_t - t_0}$$

Keterangan :

μ = kecepatan pertumbuhan (sel/jam)

N_t = jumlah sel/ml setelah waktu t (sel/ml)

N_0 = jumlah sel/ml awal (sel/ml)

t_t = waktu setelah jumlah sel ke t (jam)

t_0 = waktu awal (jam)

d. Pembuatan Kurva Baku

1) *Acetobacter aceti*

Acetobacter aceti diaktivasi terlebih dahulu di medium aktivasi 1, kemudian diinkubasi pada *Water Bath Shaker* dengan kecepatan 150 rpm (Vega *et al.*, 1988: 749) dengan suhu 37°C (Moonmangmee *et al.*, 2007: 5) selama 24 jam. Setelah 24 jam, biakan bakteri yang telah diaktivasi tadi kemudian ditambahkan ke dalam medium aktivasi 2 yang berisi 90 ml. Kemudian diinkubasi lagi dengan kecepatan 150 rpm dengan suhu 37°C. Berdasarkan hasil pembuatan kurva tumbuh, bakteri mencapai fase log mulai pada jam ke-2 hingga jam ke-10. Waktu pencuplikan ditentukan berdasarkan kurva tumbuh, yaitu pada jam ke-4, 6, 8 dan 10. Setelah itu, diambil sebanyak 5 ml inokulum, kemudian dimasukkan ke dalam *cuvette* untuk dihitung nilai absorbansinya. Bersamaan dengan itu, diambil 1 ml biakan ke dalam botol sampel yang berisi 9 ml akuades steril untuk pengenceran 10^{-1} . Dari botol tersebut kemudian diambil lagi sebanyak 1 ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml akudes steril

lain untuk pengenceran 10^{-2} , begitu seterusnya hingga pengenceran 10^{-8} . Pada pengenceran 10^{-8} , 10^{-7} , dan 10^{-6} diambil 1 ml biakan, lalu dimasukkan ke dalam cawan petri steril. Setelah itu medium YEPDA dimasukkan ke dalam cawan petri. Biakan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung setelah biakan berumur 24 jam. Dengan mengetahui jumlah bakteri dan nilai absorbansi pada fase eksponensial, maka dapat dilakukan pembuatan kurva baku *A. aceti* (Cappuccino dan Sherman, 1987: 75).

2) *Saccharomyces cerevisiae*

Pembuatan kurva baku dalam penelitian ini dibantu oleh alat spektrofotometer. Prinsip kerja alat ini adalah untuk mengukur kekeruhan biakan yang memiliki hubungan dengan jumlah mikroorganisme per ml biakan (Hadioetomo, 1993: 82). Sebelum digunakan, alat ini dihidupkan dulu selama 15 menit, kemudian ditentukan panjang gelombang yaitu 600 nm (Banati *et al.*, 2008: 3). Setelah itu dikalibrasi dengan medium aktivasi steril (tanpa inokulasi mikroba) sampai didapatkan 100% T pada galvanometer. Setelah dikalibrasi, sampel medium yang telah diinokulasikan disimpan dalam *cuvet* dan dimasukkan ke dalam ruang sampel. Kemudian % T-nya dapat dihitung. Sel-sel ragi dalam sampel yang terkena cahaya akan menyerap cahaya

tersebut, kemudian akan mencatat persen transmitans (%T). Setelah didapat nilai kekeruhan, maka kurva standar dapat dibuat. *Optical Density* berbanding lurus dengan konsentrasi sel. *Optical Density* dihitung dengan cara (Fardiaz, 1988: 33) yaitu :

$$OD = -\log \% T \text{ atau } OD = 2 - \log T.$$

Makin sedikit jumlah sel dalam suspensi maka makin besar intensitas cahaya yang melewati, sehingga semakin tinggi pula persen transmitannya (Hadioetomo, 1993: 83).

e. Pembuatan Inokulum Vinegar

Inokulum *S. cerevisiae* yang akan diinokulasikan ke dalam medium fermentasi adalah inokulum hasil aktivasi kedua pada umur 6 jam dengan jumlah sel/ml 810.000 dengan μ tertinggi sebesar 0,26. Sedangkan umur inokulum yang digunakan untuk *A. aceti* adalah hasil aktivasi kedua pada umur 4 jam dengan μ tertinggi sebesar 2.802.

3. Tahap Pelaksanaan Penelitian (Tahap Produksi)

a. Tahap Pengambilan Sampel

Sampel kulit pisang ambon lumut yang akan dijadikan produk *vinegar* diperoleh dari pasar Gordon Bandung.

b. Tahap Penyiapan Sampel

1) Penyiapan Inokulum

- a) Mengaktivasikan *S. cerevisiae* dan *A. aceti* ke dalam medium aktivasi 1 selama 24 jam.
- b) Memindahkan medium aktivasi 1 ke medium aktivasi 2 serta diinkubasi sesuai umur yang telah ditentukan sebelumnya pada kurva tumbuh.
- c) Melakukan inokulasi pada jam ke-6 untuk *S. cerevisiae* dan jam ke-4 untuk *A. aceti*.

2) Produksi Vinegar dari Kulit Buah Pisang Ambon Lumut

a) Penentuan Konsentrasi Terbaik Penambahan Gula Awal yang ditambahkan pada Medium Fermentasi

Penggunaan konsentrasi gula yang digunakan dalam penelitian ini adalah 10%, yang merupakan hasil dari penelitian-penelitian sebelumnya dimana konsentrasi gula 10% optimum untuk pertumbuhan ragi (Kusnadi dan Aditiwati, 2002: 153). Selain itu syarat gula reduksi yang dapat digunakan untuk proses fermentasi adalah 10%.

Dengan demikian, gula reduksi yang terdapat pada substrat dapat digunakan sebagai substrat pada proses glikolisis. Pada glikolisis, gula akan diubah menjadi 2 molekul asam

piruvat dalam kondisi anaerob. Kemudian asam piruvat direduksi menjadi etanol dan CO₂ (Banati *et al.*, 2008: 5).

b) Penentuan Perbandingan Inokulum *S. cerevisiae* dan *A. aceti*

Variasi perbandingan jumlah inokulum *S. cerevisiae* dan *A. aceti* yang diteliti adalah 7% : 3%, 5% : 5%, 3% : 7% (v/v). Medium fermentasi yang telah dibuat dengan penambahan konsentrasi gula terbaik sebesar 10% dimasukkan ke dalam botol fermentasi dan pH awal yang digunakan 5. Kemudian masing-masing inokulum diinokulasikan ke dalam medium fermentasi. Setelah itu dikocok pada kecepatan 150 rpm (Rosada, 1999) pada *incubator shaker* dan diinkubasi pada suhu kamar selama 14 hari.

c. Tahap Pengujian Sampel *Vinegar*

1) Pengujian Kadar Gula Pereduksi *Vinegar*

a) Pembuatan Kurva Baku Glukosa

Kurva baku glukosa menyatakan hubungan antara konsentrasi glukosa dengan kerapatan optik (serapan pada λ 520 nm). Kurva ini dibuat untuk menentukan harga konsentrasi larutan glukosa dengan pengukuran transmisi

cahaya menggunakan spektrofotometer dengan metode Somogyi-Nelson (Wood dalam Cindawati, 1996: 69).

Pembuatan kurva baku glukosa dimulai dengan menimbang glukosa murni dengan timbangan analitik sebanyak 200 mg dan dilarutkan dengan akuades dalam labu ukur 1000 ml yang diisi sampai tanda batas dan dikocok sampai homogen. Dengan makropipet larutan tersebut diambil dan dimasukkan kedalam 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 ke dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan akuades 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. Maka pada masing-masing tabung diperoleh volume total 2 ml.

Larutan Somogyi I sebanyak 1,6 ml dan Somogyi II sebanyak 0,4 ml dimasukkan ke dalam masing-masing tabung reaksi. Larutan tersebut dikocok dan ditutup dengan kelereng. Kemudian dimasukkan ke dalam penangas air mendidih selama 10 menit, lalu diangkat dan didinginkan dalam penangas es sampai mencapai suhu kurang lebih 20°C. Setelah itu ditambahkan 2 ml larutan Nelson dan 4 ml akuades, maka volume total menjadi 10 ml. Tabung reaksi

ditutup dengan ibu jari dan dikocok dengan baik dan kuat, hingga gas CO₂ tidak keluar lagi. Masing-masing larutan diukur *optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada λ 520 nm. Setelah mengetahui *optical density* dan konsentrasi gula maka dapat dibuat kurva standar glukosa.

b) Pengujian Kadar Gula Pereduksi pada Sampel *Vinegar*

Analisis kadar gula pereduksi (glukosa dan fruktosa) dilakukan untuk mengetahui penyerapan nutrisi selama proses fermentasi (Thontowi *et al.*, 2007: 256). Penentuan kadar gula pereduksi dilakukan seperti pada pembuatan kurva standar glukosa dengan mengambil 2 ml sampel *vinegar*. Kadar gula pereduksi sampel didapatkan dengan menggunakan persamaan regresi linier pada kurva tersebut.

2) Pengujian Kadar Alkohol *Vinegar*

Pengujian kadar alkohol *vinegar* menggunakan metode titrasi asam basa (modifikasi Hidayat T, 1995: 44).

a) Pengujian Larutan Blanko

Satu ml akuades dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer, kemudian 1 ml asam anhidrida asetat dan 2 tetes phenolftalein ditambahkan ke dalam erlenmeyer tersebut. Selanjutnya NaOH 1 M dari buret diteteskan secara hati-hati sambil digoyang-goyangkan hingga warna berubah (dari

tidak berwarna menjadi warna merah muda). Kemudian catat skala pada buret ketika terjadi perubahan warna.

b) Pengujian Larutan Alkohol Standar

Satu ml larutan alkohol standar (1-10%) dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 1 ml asam anhidrida asetat serta 2 tetes phenolftalein. Selanjutnya NaOH 1 M dari buret diteteskan secara hati-hati sambil digoyang-goyangkan hingga warna berubah (dari tidak berwarna menjadi warna merah muda). Kemudian catat skala pada buret ketika terjadi perubahan warna.

c) Pengujian Kadar Alkohol pada Sampel

Satu ml sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian 1 ml asam anhidrida asetat dan 2 tetes phenolftalein ditambahkan ke dalam erlenmeyer tersebut. Selanjutnya NaOH 1 M dari buret diteteskan secara hati-hati sambil digoyang-goyangkan hingga warna berubah (dari tidak berwarna menjadi warna merah muda). Kemudian catat skala pada buret ketika terjadi perubahan warna. Kadar alkohol pada sampel ditentukan dengan cara memasukkan persamaan regresi linier yang telah didapatkan dari perhitungan kadar alkohol pada blanko dan larutan alkohol standar.

3) Pengujian Kadar Asam Asetat *Vinegar*

Kadar asam asetat diukur dengan cara metode titrasi. Sebanyak 10 ml larutan sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan 10 ml akuades, kemudian ditetesi phenolphtalein 1% sebanyak 5 tetes. Setelah itu teteskan dengan NaOH 0,1 N dari buret sampai larutan berubah warna. Kadar asam asetat dihitung dengan rumus (Cappuccino dan Sherman, 1987: 276) :

$$\% \text{ asam asetat} = \frac{\text{ml NaOH} \times 0,1 \text{ NaOH} \times 6,0}{\text{berat sampel (g)}}$$

Keterangan : 1 ml = 1 gram

4) Pengujian pH *Vinegar*

Analisis pH pada produksi vinegar dari kulit pisang ambon lumut menggunakan pH meter.

F. Pengolahan Data

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan, kemudian diolah dengan metode statistik yang sesuai untuk menguji hipotesis penelitian dengan program SPSS versi 16.0. Langkah yang dilakukan sebagai berikut :

1. Uji Normalitas Populasi

Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah data yang akan diolah berdistribusi normal atau tidak. Uji normalitas yang digunakan adalah uji Kolmogorov-Smirnov.

2. Uji Homogenitas Variansi

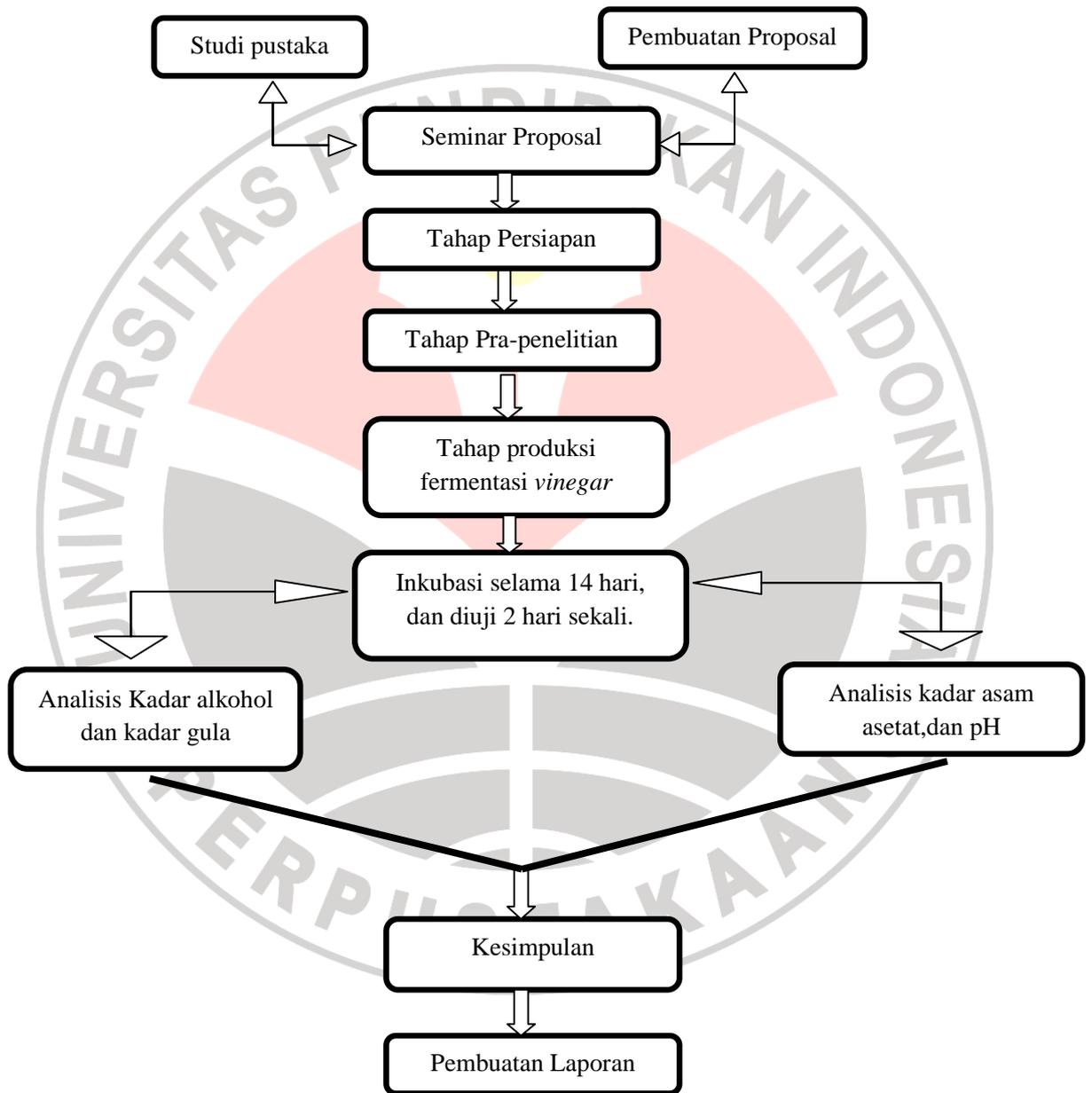
Uji homogenitas ini adalah untuk mengetahui variansi data dari hasil penelitian homogen atau tidak.

3. Uji Hipotesis Penelitian

Setelah data berdistribusi normal, maka dilakukan uji one way ANOVA (ANAVA) yang digunakan untuk menguji hipotesis dengan tingkat kepercayaan 95%. Jika hasil uji ANAVA memperlihatkan terdapat perbedaan yang signifikan di antara perlakuan, maka dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan yaitu uji Tukey. Akan tetapi bila data tidak homogen, maka dilakukan uji non parametrik, yaitu uji Kruskal-Wallis untuk menguji hipotesis dengan tingkat kepercayaan 95%. Jika hasil uji Kruskal-Wallis memperlihatkan terdapat perbedaan yang signifikan, maka dilakukan uji lanjutan untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan yaitu uji Dunnett's T3.

G. Alur Penelitian

Alur penelitian dalam penelitian ini dapat dilihat pada Gambar 3.1



Gambar 3.1 Bagan Alur Penelitian Pembuatan *Vinegar*