

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 yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan faktor lingkungan yang homogen. Penelitian ini menggunakan kulit pisang ambon lumut sebagai substrat dalam pembuatan medium fermentasi.

Penelitian ini dilakukan dalam beberapa tahapan yaitu tahap persiapan dan tahap produksi. Tahap persiapan meliputi pengumpulan kulit pisang ambon lumut, analisis komposisi kulit pisang ambon lumut, pembuatan media pertumbuhan mikroorganisme, pembuatan kurva tumbuh mikroorganisme, pembuatan kurva baku glukosa, dan pembuatan kurva standar alkohol. Selanjutnya tahap produksi, yang pertama yaitu fermentasi alkohol oleh *S. cerevisiae* melalui metode kultur curah. Variasi konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* yang digunakan yaitu 0%, 3%, 5%, dan 7% (v/v)

selama 5 hari. Tahapan selanjutnya adalah fermentasi asam asetat (asetifikasi) oleh *A. aceti* dengan variasi konsentrasi inokulum 0%, 3 %, 5%, dan 7% (v/v). Kadar alkohol yang paling tinggi dari fermentasi alkohol dijadikan sebagai substrat untuk asetifikasi sehingga dihasilkan *vinegar*. Banyaknya pengulangan 4 kali untuk masing-masing perlakuan.

C. Populasi dan Sampel

Populasi yang digunakan dalam penelitian ini adalah populasi pisang ambon lumut, sedangkan untuk sampel yaitu kulit pisang ambon lumut.

D. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini akan dilakukan mulai bulan April sampai bulan Juli tahun 2009 di Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Pendidikan Biologi Fakultas Pendidikan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam Universitas Pendidikan Indonesia.

E. Alat dan Bahan

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

Tabel 3.1 Daftar Alat Penelitian

No	Nama alat	Spesifikasi	Jumlah
1.	Autoclave	EYELA model HL36AE	Satu unit
2.	Inkubator	Gallenkamp Cooled Inkubator	Satu unit
3.	Lemari es	National	Dua buah
4.	pH meter	UCHIDA KT-1A	Satu unit
5.	Buret dan statif	-	@ Satu buah
7.	Mikropipet 1000 μm	Eppendorf	Satu unit
8.	Timbangan analitik	AND HF-300	Satu unit
9.	Spectrofotometer	Milton Rey Spectronic 20 D	Satu unit
10.	Magnetic stirrer with hot plate	Eyela magnetic stirrer RCH-3	Satu unit
11.	Respiratoring water bath	Eyela Unithermo Shaker NTS-130	@ Satu buah
12.	Oven	National	Satu unit
13.	Desikator bersilika gel	-	Satu buah
14.	Shaker	EYELA model multi shaker MMS	Satu unit
15.	Termometer	-	Satu buah
16.	Colony counter	SIBATA	Satu unit
17.	Transfer Box	-	Satu unit
18.	Vortex mixer	SIBATA TTM-1	Satu unit
19.	Cuvete	-	Dua buah
20.	Labu erlemeyer 250 ml, 500 ml, 100ml dan 50 ml	Pyrex	20 buah
21.	<i>Muffle Furnace</i>		Satu Unit
20.	<i>Crucible</i>		Dua buah
21.	Gelas ukur	10 ml, 100 ml, 1000 ml	@ Satu buah
22.	Gelas kimia	100 ml, 500 ml, 1000 ml	@ Satu buah
23.	Tabung reaksi	Pyrex 16 ml	30 buah
24.	Blender	National	@ Satu buah
25.	Lap, pisau, panci	-	@ Satu buah
27.	Lampu spirtus	-	Dua buah
28.	Jarum oase	-	Dua buah

Tabel 3.2 Daftar Bahan Penelitian

No	Nama bahan	Spesifikasi	Jumlahnya
1.	Kulit pisang ambon lumut		15 kg
2.	Kultur murni <i>Acetobacter aceti</i>	Isolat murni	1 tabung
3.	Kultur murni <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Isolat murni	1 tabung
4.	Gula pasir	Gulaku	1 kg
5.	Medium YEPD	<i>pure analytic (pa)</i>	500 ml
6.	Medium YEPDA	<i>pa</i>	500 ml
7.	Aquades	Medilabs	30 liter
8.	Reagen Somogyi I	<i>pa</i>	400 ml
9.	Reagen Somogyi II	<i>pa</i>	100 ml
10.	Reagen Nelson	<i>pa</i>	450 ml
11.	NaOH	Teknis & <i>pa</i>	255 gram
12.	Phenolftalein 1 %	<i>pa</i>	1 gram
13.	Anhidra asetat	<i>pa</i>	272 ml
14.	Alkohol 1-10%	-	@ 10 ml
15.	Alkohol 96%	-	400 ml
16.	Spirtus	-	400 ml
17.	Alumunium foil	-	1 gulung
18.	Plastik anti panas	Diamond	4 bungkus
19.	Tissue gulung	Multi	6 gulung
20.	Kain kassa	-	10 gulung
21.	Karet	-	1 ons
22.	Kertas saring	-	6 lembar
23.	pH indikator	-	secukupnya

F. Prosedur Penelitian

1. Tahap Persiapan

a. Pengumpulan Kulit Pisang

Kulit pisang yang digunakan adalah kulit pisang ambon lumut yang diperoleh dari Pasar Gordon Bandung.

b. Analisis Komposisi Kulit Pisang Ambon Lumut

1) Analisis Kadar Air

Analisis kadar air menggunakan metode pengeringan (thermogravimetri) (Sudarmadji *et al.*, 1986: 77). *Crucible* ditimbang, kemudian dikeringkan selama 1 jam dalam oven pada suhu 105°C, lalu didinginkan dalam desikator dan beratnya ditimbang (x). Sampel ditimbang sebanyak 5 gram (y), dimasukkan ke dalam *crucible*, lalu dimasukkan ke dalam oven selama 4 – 6 jam pada suhu 105°C, kemudian didinginkan dalam desikator dan ditimbang kembali. Pekerjaan ini diulang sampai 3 kali, hingga dicapai berat konstan (z). Rumus penentuan kadar air sebagai berikut:

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

2) Analisis Kadar Abu

Crucible dikeringkan dalam oven 105°C selama beberapa jam, kemudian didinginkan dalam desikator dan berat awal (x) ditimbang. Sampel bahan ditimbang dengan berat 5 gram (y) dan dimasukkan ke dalam *crucible*. Sampel tersebut dipijarkan di

atas nyala api pembakar bunsen sampai tidak berasap lagi, kemudian dimasukkan ke dalam *muffle furnace* dengan suhu 400-600°C. Sesudah sampel abu berwarna putih, kemudian diangkat dan didinginkan dalam desikator. Setelah kira-kira 1 jam, *crucible* ditimbang kembali (z). Penentuan kadar abu 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 menggunakan refraktometer. Kulit pisang yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam tabung, kemudian selama 5-10 menit disentrifuge dengan kecepatan 600 rpm, selanjutnya supernatan diambil. Sebelum digunakan untuk analisis kadar gula total, refraktometer dikalibrasi menggunakan aquades lalu kalibrasi menggunakan glukosa murni, kemudian supernatan sampel diukur kadar gula totalnya (Hilmi *et al.*, 2006: 48).

c. Pembuatan Media

Media yang digunakan untuk menumbuhkan dan memelihara *Saccharomyces cerevisiae* dan *Acetobacter aceti* adalah medium YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*). Terdapat dua macam media yaitu medium padat (YEPDA) dan medium cair (YEPDB). Untuk *A. aceti*, pada medium ditambahkan CaCO_3 sebagai penyangga.

1) Medium Agar Miring

Saccharomyces cerevisiae dan *Acetobacter aceti* yang akan digunakan dalam penelitian ditumbuhkan dalam medium agar miring. Medium agar miring yang digunakan adalah medium YEPDA (*Yeast Extract Peptone Dextrose Agar*) yang dibuat dengan cara sebagai berikut: 0,5 gram ekstrak ragi, 1 gram pepton dilarutkan dalam 100 ml aquades, kemudian dipanaskan hingga mendidih dan aduk hingga larut. Kemudian ditambahkan 2 gram agar sedikit demi sedikit hingga larut. Setelah itu diangkat dari atas api, lalu ditambahkan 2 gram glukosa dan dicampur hingga larut. Dalam keadaan panas, sebanyak 5 ml dituang ke dalam masing-masing tabung reaksi, kemudian ditutup dengan kapas berlemak lalu disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 lbs, suhu 121° C selama 15 menit. Untuk medium agar miring *Acetobacter aceti*, pada medium ditambahkan 0,3 gram CaCO_3 .

2) Medium Aktivasi

Sebelum dimasukkan ke dalam medium fermentasi, inokulum *S. cerevisiae* dan *A. aceti* diaktivasi terlebih dahulu. Medium aktivasi yang digunakan adalah Medium YEPDB (*Yeast Extract Pepton Dextrose Broth*). Medium YEPDB dibuat dengan cara sebagai berikut: 0,5 gram ekstrak ragi, 1 gram pepton dilarutkan dalam 100 ml aquades, kemudian dipanaskan hingga

mendidih dan aduk hingga larut. Setelah mendidih, ditambahkan 2 gram glukosa dan aduk hingga larut lalu masukkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditutup dengan kapas berlemak. Selanjutnya disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 lbs, suhu 121° C selama 15 menit. Untuk medium aktivasi YEPDB *A. aceti* ditambahkan 0,3 gram CaCO₃.

3) Medium Fermentasi

Medium fermentasi merupakan medium yang terbuat dari kulit pisang ambon lumut yang dibuat dengan cara sebagai berikut: kulit buah pisang ambon lumut dibersihkan, dan dipotong-potong, lalu ditimbang. Kemudian kulit pisang direbus bersama air (2:3) suhu 80°C selama 5-10 menit lalu diblender dan disaring. Selanjutnya ditambahkan gula awal sebanyak 10 % (w/v) (Casmimi, 2004: 31), Selanjutnya dipanaskan selama 5-10 menit, setelah dingin diatur keasamannya sehingga pH-nya 5. Lalu dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer dan ditutup dengan kapas berlemak, kemudian disterilisasi dalam autoklaf pada tekanan 15 lbs, suhu 121°C selama 15 menit.

d. Pembuatan Kurva Tumbuh Mikroorganisme

Kurva tumbuh menggambarkan pertumbuhan mikroba dalam suatu kultur. Pembuatan kurva tumbuh bertujuan untuk menentukan umur inokulum *S. cerevisiae* dan *A. aceti* terbaik dalam medium aktivasi sebelum dimasukkan ke dalam medium fermentasi.

1) Kurva Tumbuh *Saccharomyces cerevisiae*

Kurva pertumbuhan *S. cerevisiae* dibuat dengan metode perhitungan mikroskopis langsung. Sebanyak 1 ose *S. cerevisiae* dari agar miring diinokulasikan ke dalam 10 ml medium YEPDB, kemudian dikocok pada *shaker* dengan kecepatan 120 rpm selama 24 jam (Seward *et al.*, 1996: 439) dengan suhu ruang. Selanjutnya medium tersebut dipindahkan ke dalam 90 ml medium YEPDB dan dihitung sebagai jam ke-0, kemudian dikocok selama 24 jam pada *shaker* dengan kecepatan 120 rpm dengan suhu ruang ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$). Penghitungan jumlah sel dilakukan setiap 2 jam selama 24 jam. Penghitungan jumlah sel ragi dilakukan menggunakan *Haemocytometer Improve Neubauer*. Cara penghitungan jumlah sel yaitu 1 ml sampel diencerkan ke dalam 9 ml akuades steril, kemudian dikocok dengan vorteks hingga merata, lalu suspensi diteteskan dengan pipet tetes ke atas permukaan ruang hitung *Haemocytometer*. Selanjutnya jumlah sel dapat dihitung. Jumlah sel dihitung dalam lima kotak (Hadioetomo, 1993: 75) :

$$\text{Jumlah total sel sampel} = n \times 50000 \times d$$

Keterangan :

d = tingkat pengenceran

n = jumlah sel yang dihitung

Setelah didapatkan jumlah sel hasil penghitungan dengan menggunakan rumus di atas, kemudian dihitung kecepatan pertumbuhan tertinggi (μ)-nya untuk mendapatkan umur inokulum yang akan digunakan pada proses fermentasi alkohol.

2) Kurva Tumbuh *Acetobacter aceti*

Acetobacter aceti diaktivasi terlebih dahulu dengan menginokulasikan satu ose yang berumur 24 jam ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 10 ml medium YEPDB lalu dikocok pada *Water Bath Shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37 °C (Moonmangmee, 2007: 3) selama 24 jam. Setelah 24 jam, biakan *A. aceti* yang telah diaktivasi tersebut kemudian dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer yang telah berisi 90 ml medium YEPDB lalu dikocok lagi dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37 °C selama 24 jam. Metode yang digunakan untuk membuat kurva tumbuh ini dinamakan metode turbidimetri. Setiap 2 jam, diambil sebanyak 5 ml dari labu kultur, lalu dimasukkan ke dalam *cuvete*. Kemudian nilai absorbansi dihitung menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 600 nm (Boonmee & Intarapnich, 2006: 2082).

Kurva tumbuh dibuat berdasarkan hasil hubungan nilai absorbansi (sumbu Y) dengan waktu (sumbu X). Dari kurva tumbuh ini dapat diketahui umur biakan pada saat mencapai fase logaritmik. Kemudian dari fase logaritmik inilah ditentukan laju

pertumbuhan dan waktu generasi dari *A. aceti* sehingga umur inokulum dapat ditentukan (Cappuccino & Sherman, 1987: 117).

3) Pembuatan Kurva Baku *Acetobacter aceti*

Sebanyak satu ose *A. aceti* dari agar miring diinokulasikan ke dalam 10 ml medium YEPDB. Kemudian kultur dikocok pada *Water Bath Shaker* dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37 °C selama 24 jam. Biakan kemudian dipindahkan ke dalam labu erlenmeyer yang berisi 90 ml medium YEPDB lalu dikocok dengan kecepatan 150 rpm pada suhu 37 °C selama waktu yang dibutuhkan untuk mencapai fase logaritmik. Waktu pencuplikan ditentukan berdasarkan kurva tumbuh yaitu jam ke-4, 6, 8, dan 10. Selanjutnya diambil sebanyak 5 ml inokulum untuk dihitung nilai absorbansi. Bersamaan dengan itu, diambil 1 ml biakan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml akuades steril untuk pengenceran 10^{-1} , dari tabung tersebut kemudian diambil lagi sebanyak satu ml dan dimasukkan ke dalam 9 ml akudes steril lain untuk pengenceran 10^{-2} , begitu seterusnya hingga pengenceran 10^{-8} . Pada tiga pengenceran terakhir dilakukan *pour plate* (cawan tuang) secara duplo. Biakan tersebut diinkubasi pada inkubator dengan suhu 37 °C selama 24 jam. Jumlah koloni yang tumbuh dihitung, cara penghitungan mikroorganisme dapat dirumuskan sebagai berikut :

$$\text{Jumlah sel mikroorganisme} = \text{Jumlah koloni} \times \text{faktor pengenceran}$$

Dengan mengetahui jumlah bakteri dan nilai absorbansinya, maka dapat dilakukan pembuatan kurva baku (Cappuccino & Sherman, 1987: 75).

e. Pembuatan Kurva Baku 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 (Kusnadi, 2001: 40).

Pembuatan kurva baku glukosa dimulai dengan menimbang glukosa murni sebanyak 200 mg dan dilarutkan dalam 1000 ml aquades dan dikocok sampai homogen. Dengan mikropipet larutan tersebut diambil dan dimasukkan 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 ke dalam tabung reaksi tersebut ditambahkan 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. Maka pada masing-masing tabung diperoleh konsentrasi glukosa 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180, 200 mg/ml.

Larutan Somogyi I sebanyak 1,6 ml dan Somogyi II sebanyak 0,4 ml ditambahkan ke dalam masing-masing tabung reaksi yang telah berisi larutan glukosa. 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 $\pm 20^{\circ}\text{C}$. Kemudian ditambahkan 2 ml larutan Nelson dan 4 ml aquades, maka volume total adalah 10 ml. Tabung reaksi ditutup dengan ibu jari dan dikocok dengan baik dan kuat, hingga gas CO_2 tidak keluar lagi. Masing-masing larutan diukur *optical density* (OD) dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 520 nm. Nilai absorbansi dari kadar glukosa standar dibuat dengan grafik linier, kemudian kurva baku glukosa dapat dibuat dan diperoleh persamaan yang akan digunakan dalam penentuan kadar gula pereduksi dari sampel.

f. Pembuatan Kurva Standar Alkohol

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 mengikuti Hidayat (1995: 44) yang dimodifikasi sebagai berikut:

1) Pembuatan Larutan Blanko

Satu ml aquades dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian dimasukkan 1 ml asam anhidrida asetat dan 2 tetes phenolftalein. Selanjutnya NaOH 1 M dari buret diteteskan secara hati-hati ke dalam erlenmeyer tersebut sambil digoyang-goyangkan sampai warnanya berubah (dari tidak berwarna menjadi warna merah muda). Kemudian dicatat kedudukan skala pada buret.

2) Pengujian Larutan Alkohol Standar

Satu ml larutan alkohol 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.

2. Tahap Produksi

a. Pembuatan Inokulum *S. cerevisiae* dan *A. aceti*

Inokulum *S. cerevisiae* yang diinokulasikan ke dalam medium fermentasi adalah inokulum hasil aktivasi kedua pada jam ke-6 (hasil dari kurva tumbuh) dengan jumlah sel/ml-nya adalah $8,1 \times 10^7$ sel/ml, sedangkan inokulum *A. aceti* yang akan diinokulasikan ke dalam medium hasil fermentasi alkohol adalah inokulum hasil aktivasi

kedua pada jam ke-4 (hasil dari kurva tumbuh) dengan jumlah sel/ml-nya adalah $3,74 \times 10^8$ sel/ml.

b. Fermentasi Alkohol

Variasi jumlah inokulum *S. cerevisiae* yang digunakan adalah 0, 3%, 5%, dan 7% (v/v) (Casmini, 2004: 33). Inokulum *S. cerevisiae* hasil aktivasi kedua (jam ke-6) diinokulasikan ke dalam medium fermentasi yang telah steril dengan variasi konsentrasi inokulum yang telah ditentukan. Kemudian medium diinkubasi pada suhu kamar ($26 \pm 2^\circ\text{C}$). Pengambilan sampel pada hari ke-1, 3, dan 5. Analisis yang dilakukan adalah pengukuran kadar alkohol, kadar gula pereduksi, dan pH.

c. Asetifikasi

Variasi konsentrasi inokulum *A. aceti* yang digunakan adalah 0%, 3%, 5%, dan 7% (v/v) (Modifikasi Kocher *et al.*, 2006: 265). Pada kondisi umur inokulum hasil aktivasi kedua (jam ke-4), *A. aceti* diinokulasikan sesuai variasi jumlah inokulum yang telah ditentukan ke dalam medium hasil fermentasi alkohol dengan konsentrasi inokulum *S. cerevisiae* 5% yang telah dipasteurisasi pada suhu 70°C selama 15 menit (Sener *et al.*, 2007: 305). Kemudian diinkubasi pada suhu ruang ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) dan dikocok dengan kecepatan 150 rpm (Rosada, 1999: 23). Pengambilan sampel pada hari ke- 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, dan 14. Analisis yang dilakukan adalah pengukuran kadar asam asetat, kadar alkohol, kadar gula pereduksi, dan pH.

d. Analisis Sampel

1) Analisis Kadar Gula Pereduksi

Kadar gula pereduksi dalam sampel diukur dengan metode Somogyi-Nelson. Sebanyak 2 ml sampel diambil kemudian ditambahkan reagen Somogyi-Nelson (pengerjaan sesuai dengan pembuatan kurva baku glukosa). Nilai absorbansi sampel dikonversikan ke dalam persamaan pada kurva baku glukosa sehingga didapatkan kadar gula pereduksi dari sampel.

2) Analisis pH

Analisis pH pada hasil fermentasi alkohol dan *vinegar* dari kulit pisang ambon lumut menggunakan pH meter.

3) Analisis Kadar Alkohol

Analisis kadar alkohol dalam *vinegar* dilakukan dengan cara titrasi. Sebanyak 1 ml sampel dimasukkan ke dalam erlenmeyer, kemudian ditambahkan 1 ml asam anhidrida asetat dan 2 tetes phenolftalein. Selanjutnya NaOH 1 M dari buret diteteskan secara hati-hati ke dalam labu erlenmeyer tersebut sambil digoyang-goyangkan sampai warnanya berubah (dari tidak berwarna menjadi warna merah muda). Kemudian kedudukan skala pada buret dicatat. Kadar alkohol pada sampel didapatkan dengan menggunakan persamaan dari kurva hasil titrasi alkohol standar. Sebelum melakukan titrasi dari sampel terlebih dahulu dilakukan pembuatan blanko.

4) Analisis Kadar Asam Asetat

Analisis kadar asam asetat ditentukan dengan metode titrasi. Pengujian dilakukan dengan cara mengambil sampel sebanyak 10 ml dan masukkan ke dalam erlenmeyer. Kemudian ditambahkan aquades sebanyak 10 ml dan 5 tetes phenoftalein 1% lalu ditetaskan NaOH 0,1 N ke dalam labu erlenmeyer secara hati-hati sambil digoyang-goyangkan sampai terjadi perubahan warna (dari tidak berwarna sampai berwarna merah muda). Rumus penghitungan kadar asam asetat adalah (Cappucino & Sherman, 1987: 276) :

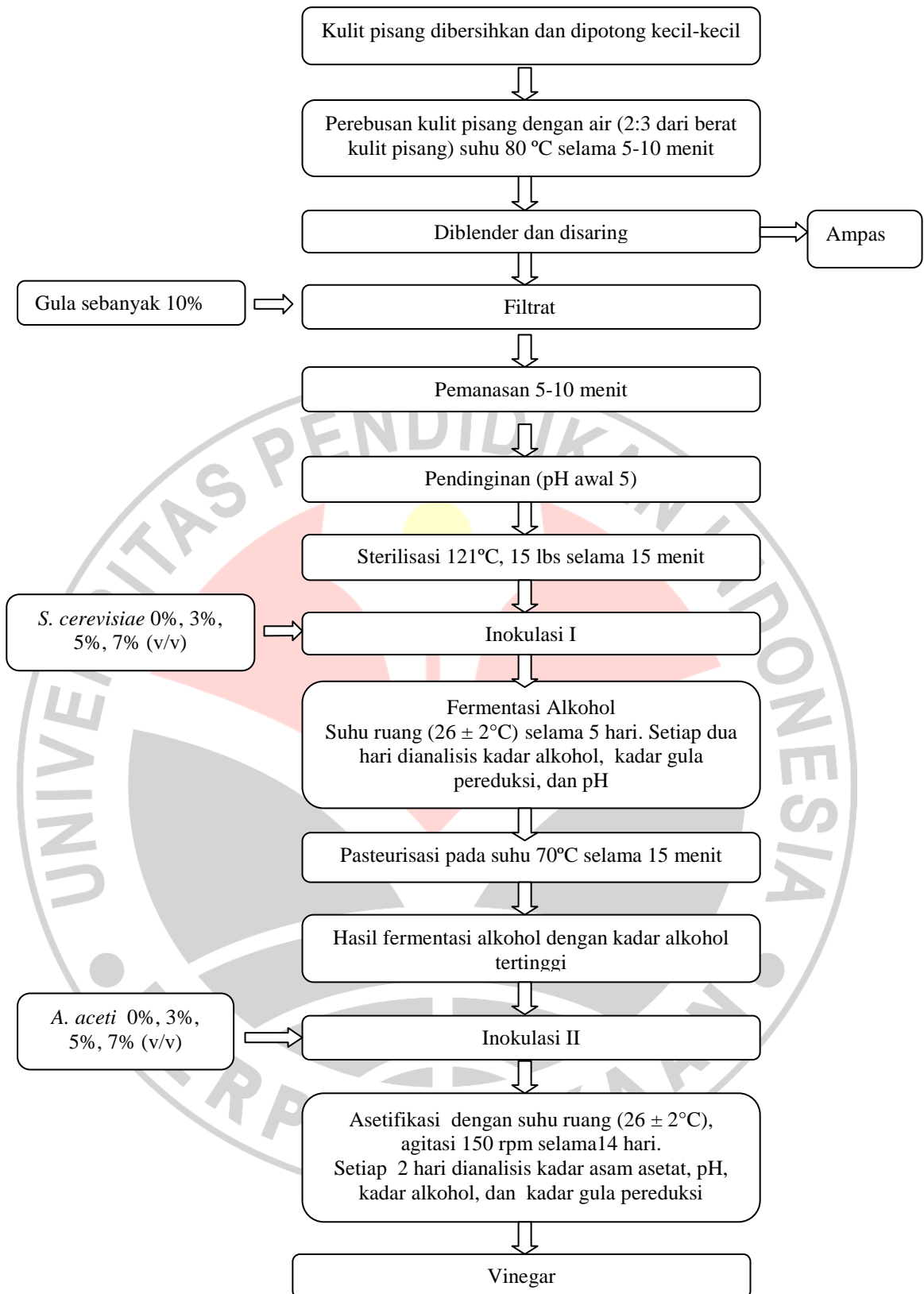
$$\text{Kadar asam asetat (\%)} = \frac{\text{mlNaOH} \times 0,1 \times 6,0}{\text{BeratSampel}(g)}$$

e. Uji Statistika

Data yang diperoleh, diolah menggunakan dengan SPSS versi 10.0 *for windows*. Langkah yang pertama yang dilakukan adalah uji Normalitas. Uji ini dilakukan untuk mengetahui apakah data yang diperoleh berdistribusi normal atau tidak. Kemudian uji Homogenitas Variansi untuk mengetahui variansi data. Apabila data yang diperoleh normal dan homogen, maka dilanjutkan dengan uji parametrik. Untuk menguji hipotesis dilakukan uji ANOVA, apabila terdapat perbedaan yang signifikan antar perlakuan dilanjutkan dengan uji Tukey.

Jika data yang diperoleh tidak homogen atau tidak normal maka untuk menguji hipotesis dilakukan uji Kruskal-Wallis sedangkan untuk mengetahui perbedaan yang signifikan dari konsentrasi inokulum *A. aceti* terhadap kadar asam asetat *vinegar* kulit pisang digunakan uji Dunnett T3.





Gambar 3.1 Diagram Alir Pembuatan *Vinegar* dari Kulit Pisang Ambon Lumut