

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni - November 2011 :

- a) Proses Fermentasi di Laboratorium Biokimia Jurusan Biologi Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Malang.
- b) Proses Destilasi di Laboratorium Kimia Organik Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Malang.
- c) Proses Analisis Kadar Gula Reduksi di Laboratorium UV-Vis & FTIR Jurusan Kimia Fakultas Sains dan Teknologi UIN Maliki Malang.

3.2. Rancangan Penelitian

Penelitian ini merupakan penelitian yang bersifat eksperimental laboratoris. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Kelompok (RAK) pola faktorial yang terdiri dari 2 faktor yaitu konsentrasi ragi tape dan waktu fermentasi, dengan 3 kali ulangan.

Faktor I : Konsentrasi ragi tape (K)

K1 = Konsentrasi ragi tape 3 gr/100 gr (3 %)

K2 = Konsentrasi ragi tape 4 gr/100 gr (4 %)

K3 = Konsentrasi ragi tape 5 gr/100 gr (5 %)

Faktor II : Waktu fermentasi (W)

W1 = waktu fermentasi 2 hari

W2 = waktu fermentasi 4 hari

W3 = waktu fermentasi 6 hari

W4 = waktu fermentasi 8 hari

Dari kedua faktor tersebut diperoleh 12 kombinasi perlakuan sebagai berikut:

K \ W	W1	W2	W3	W4
K1	K1W1	K1W2	K1W3	K1W4
K2	K2W1	K2W2	K2W3	K2W4
K3	K3W1	K3W2	K3W3	K3W4

Keterangan:

K1W1 = Konsentrasi ragi tape 3 %, waktu fermentasi 2 hari

K1W2 = Konsentrasi ragi tape 3 %, waktu fermentasi 4 hari

K1W3 = Konsentrasi ragi tape 3 %, waktu fermentasi 6 hari

K1W4 = Konsentrasi ragi tape 3 %, waktu fermentasi 8 hari

K2W1 = Konsentrasi ragi tape 4 %, waktu fermentasi 2 hari

K2W2 = Konsentrasi ragi tape 4 %, waktu fermentasi 4 hari

K2W3 = Konsentrasi ragi tape 4 %, waktu fermentasi 6 hari

K2W4 = Konsentrasi ragi tape 4 %, waktu fermentasi 8 hari

K3W1 = Konsentrasi ragi tape 5 %, waktu fermentasi 2 hari

K3W2 = Konsentrasi ragi tape 5 %, waktu fermentasi 4 hari

K3W3 = Konsentrasi ragi tape 5 %, waktu fermentasi 6 hari

K3W4 = Konsentrasi ragi tape 5 %, waktu fermentasi 8 hari

3.3. Variabel Penelitian

1. Variabel Bebas

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah variasi konsentrasi ragi tape dan waktu fermentasi yang berbeda.

2. Variabel Terikat

Variabel terikat dalam penelitian ini adalah kadar bioetanol dan kadar gula reduksi dan pH.

3. Variabel Kendali

Variabel yang diusahakan sama untuk penelitian ini yaitu kulit kentang dan pemberian enzim α -amilase saat hidrolisis.

3.4. Alat dan Bahan

3.4.1. Alat-Alat

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini, antara lain:

- 1). Peralatan gelas seperti beaker glass 50, 1000 ml; erlenmeyer 50, 100, 250 ml; gelas ukur 10, 50, 100 ml; labu ukur 100 ml; tabung reaksi; corong kaca; pipet tetes; pipet ukur; pengaduk; botol fermentor.
- 2). Alat penunjang seperti autoklaf, destilator skala laboratorium, spektrofotometer UV-Vis, piknometer, pH meter, termometer, timbangan analitik, hotplat, kompor listrik, blender, panci penangas, bola hisap, rak tabung, mortar, tissue, kapas, aluminium foil, kain saring, kertas saring, ember, karet gelang, plastik, dan kertas label.

3.4.2. Bahan-Bahan

Bahan-bahan yang digunakan antara lain: kulit kentang (*Solanum tuberosum*), aquades, enzim α -amilase, ragi tape, gula pasir, HCl, NaOH, glukosa anhidrat, pereaksi nelson A dan B, arsenomolibdat, larutan buffer dan Aseton.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Tahap-Tahap Pembuatan Bioetanol

1. Sterilisasi Alat

Peralatan gelas disterilisasi di dalam autoklaf pada temperatur 121°C selama 15 menit.

2. Aktivasi ragi (Kusnadi dan Yusuf 2009)

- a) Ditimbang ragi tape masing-masing sebanyak 3, 4 dan 5 gram.
- b) Dimasukkan 1 gram gula putih kedalam 10 ml air hangat.
- c) Ditambahkan ragi kedalam larutan glukosa tersebut, dimasukkan kedalam masing-masing botol dalam kondisi anaerob.
- d) Diinkubasi ragi selama 24 jam, setelah itu ragi bisa dipakai untuk fermentasi kulit kentang.

3. Preparasi sampel (Arasyid, 2010)

- a) Ditimbang kulit kentang sebanyak 1200 gram.
- b) Dicuci sampel kemudian dipanaskan dengan menggunakan autoklaf.

- c) Diblender sampel dengan menambahkan aquades, perbandingan 3 : 1 (1200 gr: 400 ml).

4. Proses Hidrolisis (Soeprijanto, 2009 dan Banati, 2007)

- a) Dimasukkan bubuk kulit kentang ke dalam ember.
- b) Ditambahkan enzim α -amilase 0,4% (v/v).
- c) Diinkubasi pada suhu ruang selama 60 menit.
- d) Diukur kadar gula reduksi setelah proses hidrolisis.

5. Proses Fermentasi (Arapoglou,*et al.*, 2010 dan Soeprijanto, 2009)

- a) Diatur pH hingga mencapai 5 dengan penambahan HCl 1 M.
- b) Dimasukkan sampel sebanyak 100 gr ke dalam masing-masing botol fermentor yang berisi ragi yang sudah di aktivasi sebelumnya.
- c) Di inkubasi dalam inkubator pada suhu 27°C.
- d) Diukur kadar gula reduksi dan pH pada hari ke-2, 4, 6, 8.

6. Proses destilasi (Kurniawati, 2009)

- a) Mengambil sampel (hasil fermentasi) kemudian memasukkan ke dalam alat destilasi alkohol.
- b) Proses destilasi dilakukan pada suhu 80 °C , karena titik didih alkohol 78 °C dan titik didih air 100 °C.
- c) Mengembunkan uap hasil destilasi tersebut dan menampungnya ke dalam gelas penampungan (erlenmeyer).

- d) Bila uap sudah tidak menetes lagi, diambil hasil destilasi tersebut dan menyimpannya ke dalam botol.
- e) Selanjutnya hasil destilasi dianalisa kadar alkoholnya dengan piknometer.
- f) Dilakukan pengukuran kadar bioetanol pada hari ke-2, 4, 6, 8.

3.5.2. Pengukuran kadar gula reduksi, pH dan bioetanol

1. Penentuan kadar glukosa menggunakan Metode Somogy-Nelson

a) Penyiapan kurva standar (Sudarmadji, dkk, 1997)

1. Dibuat larutan glukosa standar (10 mg glukosa anhidrat/100 ml).
2. Dari larutan glukosa, dilakukan 5 kali pengenceran sehingga diperoleh larutan glukosa dengan konsentrasi masing-masing 2, 4, 6, 8 dan 10 mg/100 ml.
3. Disiapkan 6 tabung reaksi yang bersih, masing-masing diisi dengan 1 ml larutan glukosa standar tersebut diatas. Satu tabung diisi 1 ml air suling sebagai blanko.
4. Ditambahkan ke dalam masing-masing tabung diatas 1 ml pereaksi Nelson, dan dipanaskan semua tabung pada penangas air mendidih selama 20 menit.
5. Diambil semua tabung dan segera didinginkan bersama-sama dengan gelas piala yang berisi air dingin sehingga suhu tabung mencapai 25°C.
6. Setelah dingin, ditambahkan 1 ml pereaksi Arsenomolybdat, dikocok sampai semua endapan Cu_2O yang ada larut kembali.
7. Setelah semua endapan Cu_2O larut sempurna, ditambahkan 7 ml air suling, homogenkan.

8. Selanjutnya, baca absorbansi masing-masing larutan pada spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm.
9. Dibuat kurva standar yang menunjukkan hubungan antara kadar glukosa dan absorbansi.

b) Penentuan kadar glukosa pada sampel

1. Diambil 1 ml larutan sampel yang jernih kedalam tabung reaksi yang bersih.
2. Ditambahkan 1 ml pereaksi Nelson, dan selanjutnya diperlakukan seperti pada penyiapan kurva standar di atas.
3. Kadar gula reduksi dapat ditentukan berdasarkan OD larutan sampel dan kurva standar larutan glukosa

2. Pengukuran pH.

1. Dimasukkan pH meter ke dalam botol fermentor yang telah berisi sampel.
2. Dibaca dan dicatat pH pada skala pH meter.

3. Pengukuran kadar bioetanol (AOAC, 1990)

1. Piknometer diisi aquades dan ditutup. Kelebihan aquades pada puncak pipa kapiler dibersihkan kemudian ditimbang.
2. Piknometer dikosongkan, aquades yang tersisa diabsorpsi dengan aseton lalu dikeringkan dan ditimbang.
3. Piknometer kering diisi dengan destilat. Permukaan luar piknometer dikeringkan dan ditimbang.

4. Berat jenis dihitung dengan rumus berikut:

$$\text{Berat jenis sampel} = \frac{(a + b) - c}{(a + d) - c}$$

Keterangan :

(a + b) = berat piknometer berisi destilat

(a + d) = berat piknometer berisi aquades

c = berat piknometer kosong

5. Dari hasil perhitungan diperoleh nilai berat jenis, kemudian kadar etanol diperoleh dari tabel konversi berat jenis.

3.6. Teknik Pengumpulan Data

Data yang telah diperoleh dari penelitian ini yaitu berupa kadar gula reduksi, pH dan kadar bioetanol kulit kentang. Data tersebut dimasukkan dalam pada tabel seperti di bawah ini:

Tabel 3.6.1. Rancangan Data Kadar Gula Reduksi

Sampel	Ulangan			Total (%)	Rata-rata (%)
	1	2	3		
Kulit kentang sebelum dihidrolisis oleh α -amilase					
Bubur kulit kentang setelah dihidrolisis oleh α -amilase					

Tabel 3.6.1. Rancangan Data Kadar Gula Reduksi

Konsentrasi Ragi tape	Waktu Fermentasi	Kode	Ulangan			Total (%)	Rata-rata(%)
			1	2	3		
3 %	2 hari	K1W1					
	4 hari	K1W2					
	6 hari	K1W3					
	8 hari	K1W4					
4 %	2 hari	K2W1					
	4 hari	K2W2					
	6 hari	K2W3					
	8 hari	K2W4					
5 %	2 hari	K3W1					
	4 hari	K3W2					
	6 hari	K3W3					
	8 hari	K3W4					

Tabel 3.6.2. Rancangan Pengumpulan Data Kadar Etanol

Konsentrasi Ragi tape	Waktu Fermentasi	Kode	Ulangan			Total (%)	Rata- rata(%)
			1	2	3		
3 %	2 hari	K1W1					
	4 hari	K1W2					
	6 hari	K1W3					
	8 hari	K1W4					
4 %	2 hari	K2W1					
	4 hari	K2W2					
	6 hari	K2W3					
	8 hari	K2W4					
5 %	2 hari	K3W1					
	4 hari	K3W2					
	6 hari	K3W3					
	8 hari	K3W4					

3.7. Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan Two Way Anova untuk mengetahui pengaruh variasi konsentrasi ragi tape dan waktu fermentasi terhadap kadar bioetanol dari kulit kentang (*Solanum tuberosum* L.). Jika ada pengaruh yang signifikan, maka dilanjutkan dengan Uji Jarak Duncan (UJD) dengan tingkat signifikansi 5% untuk mengetahui perlakuan yang berpengaruh atau beda nyata diantara perlakuan yang lain.

3.8. Bagan Alir Penelitian

