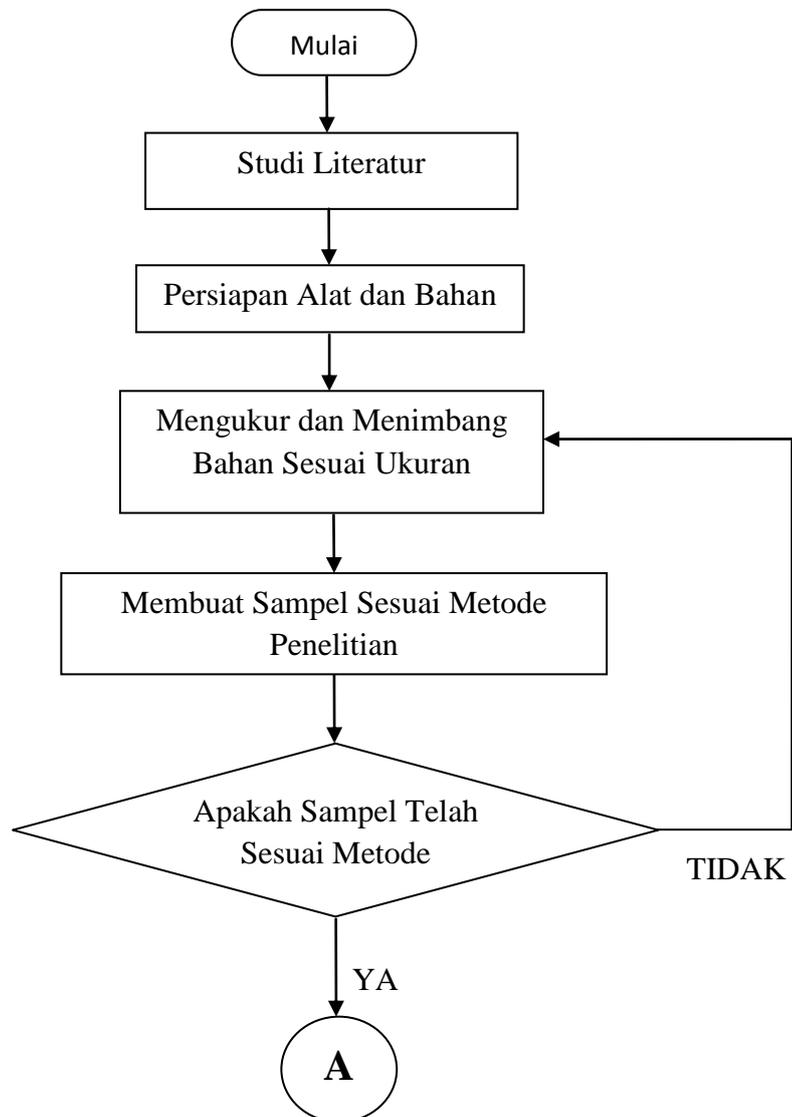
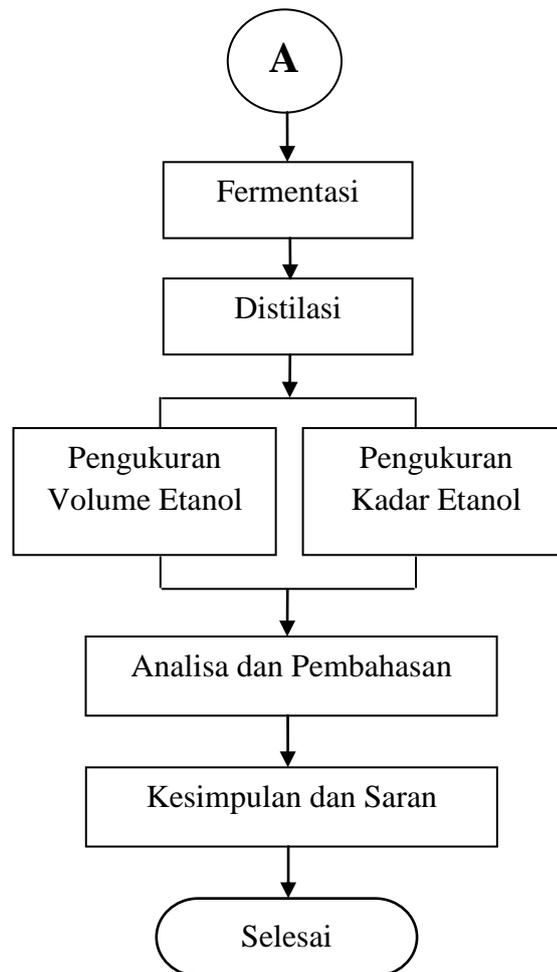


**BAB III**  
**METODE PENELITIAN**

**3.1. Diagram Alir Penelitian**

Diagram alir merupakan penggambaran secara singkat dari suatu proses. Diagram alir dibuat untuk memudahkan dalam memahami suatu proses. Untuk memperjelas tahapan-tahapan pembuatan bioetanol yang akan di lakukan di buat diagram alir proses pembuatan bioetanol yang ditunjukkan pada gambar 3.1.





Gambar 3.1 Diagram Alir Penelitian

### 3.2. Perencanaan Penelitian

Fermentasi dilakukan pada suhu kamar yaitu antara 25 – 27 °C . Jumlah metode yang digunakan dalam penelitian pembuatan bioetanol ini adalah dua metode fermentasi dimana untuk setiap metodenya terdiri dari empat sampel. Jadi pada penelitian pembuatan bioetanol ini terdiri atas delapan sampel. Metode pertama adalah variasi terhadap jumlah *yeast* yang diberikan (0,5 ; 1 ; 1,5 ; dan 2) gram dengan volume fermentasi 250 ml dan keasaman awal diatur 4,5. Pemberian nutrisi urea sebanyak 0,1 g/250 ml dan NPK 0,125 g/250 ml untuk semua sampel. Metode kedua adalah variasi terhadap waktu fermentasi ( 24, 48, 72, dan 96 ) jam

dengan volume fermentasi 250 ml dan keasaman awal diatur 4,5 dengan banyaknya ragi yang diberikan berdasarkan hasil terbaik untuk metode pertama . Setelah dilakukan fermentasi maka langkah selanjutnya dilakukan pemurnian dengan cara distilasi pada suhu 78 °C . Distilasi ini bertujuan untuk mendapatkan volume dan kadar etanol yang lebih tinggi. Langkah terakhir adalah dilakukannya pengujian volume dan kadar etanol hasil distilasi.

### 3.3. Alat Penelitian

Dalam penelitian pembuatan bioetanol ini perlu adanya alat untuk mendukung proses penelitian yang dilakukan. Adapun peralatan tersebut adalah sebagai berikut :

#### 1. *Brix Refractometer*

*Brix refractometer* adalah alat yang digunakan untuk mengukur kadar gula pada nira siwalan. *Brix Refractometer* dengan merk ATC memiliki beberapa kelebihan. Kelebihan alat ini adalah alatnya yang berukuran sedang dan portable, sehingga dapat dibawa dan digunakan disemua tempat. Selain itu sampel yang dibutuhkan juga sedikit kurang lebih 1 ml. Namun kelemahan alat ini tidak dapat mengukur kadar gula lebih dari 30 persen. *Brix Refractometer* ditunjukkan pada gambar 3.2.



Gambar 3.2 *Brix Refractometer*

## 2. Alat pH Meter Digital

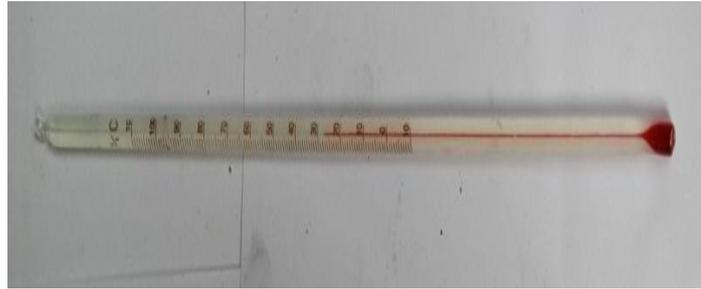
Alat pH meter merupakan alat yang digunakan untuk mengukur kadar keasaman (pH) pada nira siwalan. Kadar keasaman sangat mempengaruhi dalam proses fermentasi, untuk itu keasaman harus diukur dengan pasti. Alat pH meter digital dengan merk ATC memiliki kelebihan yaitu nilai terukur dapat ditunjukkan dengan angka, sehingga lebih mudah dalam pembacaan pengukuran. Selain itu alat ini yang simpel, sehingga mudah dibawa dan digunakan di semua tempat. Alat pH meter digital merk ATC ditunjukkan pada gambar 3.3.



Gambar 3.3 pH Meter Digital

## 3. Termometer

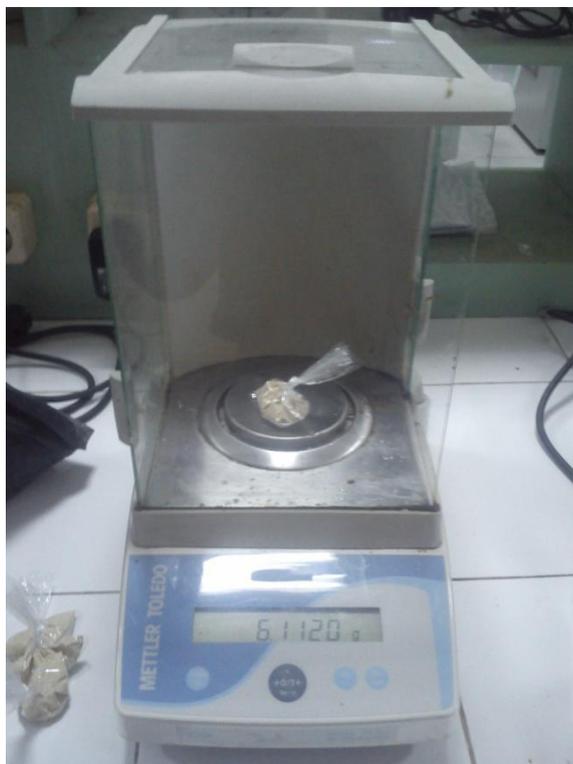
Termometer adalah alat yang digunakan untuk mengetahui berapa suhu cairan nira siwalan ataupun untuk menjaga suhu saat fermentasi dan distilasi. Suhu merupakan salah satu faktor yang sangat mempengaruhi hasil fermentasi ataupun distilasi. Termometer ditunjukkan pada gambar 3.4.



Gambar 3.4 Termometer

#### 4. Timbangan Digital

Neraca merupakan alat yang digunakan untuk mengukur massa *yeast* dan nutrisi (Urea dan NPK) yang harus diberikan pada proses fermentasi. Timbangan digital merk *Mettler Toledo* memiliki beberapa kelebihan. Kelebihan alat ini nilai terukur ditunjukkan dengan angka digital, sehingga mudah dalam pembacaan. Timbangan digital dapat ditunjukkan pada gambar 3.5.



Gambar 3.5 Timbangan Digital

## 5. Refraktometer Alkohol

Refraktometer alkohol merupakan alat yang digunakan untuk mengukur kadar alkohol yang telah dilakukan distilasi. Refraktometer alkohol dengan merk ATC ini memiliki beberapa kelebihan. Kelebihan alat ini antara lain, alatnya yang berukuran sedang dan portable sehingga dapat dibawa dan digunakan di semua tempat. Selain itu sampel yang dibutuhkan juga sedikit kurang lebih 1 ml. Namun kelemahan alat ini tidak dapat mengukur kadar alkohol sebelum dilakukan distilasi. Berikut gambar dari alkohol meter ditunjukkan pada gambar 3.6.



Gambar 3.6 Refraktometer Alkohol

## 6. Fermentor

Fermentor adalah alat yang digunakan untuk proses fermentasi. Fermentor menggunakan gelas minuman merk saparella dengan volume 300 ml. Dipilihnya botol ini sebagai fermentor karena botol terbuat dari kaca dan penutup dari seng, sehingga mampu terhadap tekanan  $\text{CO}_2$ . Dengan demikian alat ini tidak akan pecah saat fermentasi berlangsung lama. Selain itu dipilih volume 300 ml karena sampel fermentasi yang digunakan adalah 250 ml dengan penambahan *starter* 5-20 ml, sehingga volume botol terisi adalah 270 ml. Ruang botol 30 ml yang tersisa adalah sebagai udara untuk pernafasan *yeast* selama fermentasi berlangsung. Fermentor ditunjukkan pada gambar 3.7.



Gambar 3.7 Fermentor

#### 7. Satu Unit Alat Distilasi

Alat distilasi adalah alat yang digunakan untuk proses pemurnian alkohol hasil fermentasi. Alat ini dirancang sebagai alat distilasi sederhana untuk satu tingkat atau tahap distilasi. Berikut alat distilasi ditunjukkan pada gambar 3.8.



Gambar 3.8 Alat Distilasi

## 8. Alat Pengaduk

Alat pengaduk merupakan alat yang digunakan untuk mengaduk cairan nira selama pembuatan starter. Tujuan dari pengadukan ini adalah agar *yeast* dapat tercampur rata dengan nira siwalan, sehingga pertumbuhan mikroba dapat maksimal. Berikut alat pengaduk ditunjukkan pada gambar 3.9.



Gambar 3.9 Pengaduk

## 9. Aluminum Foil

Dalam penelitian ini, aluminium foil dapat digunakan sebagai pembungkus atau penutup botol fermentor saat proses fermentasi ataupun sebagai pembungkus hal lainnya. Aluminium foil didapat dari toko kue Intisari Yogyakarta. Aluminium foil ditunjukkan pada gambar 3.10.



Gambar 3.10 Aluminum Foil

## 10. Gelas Ukur

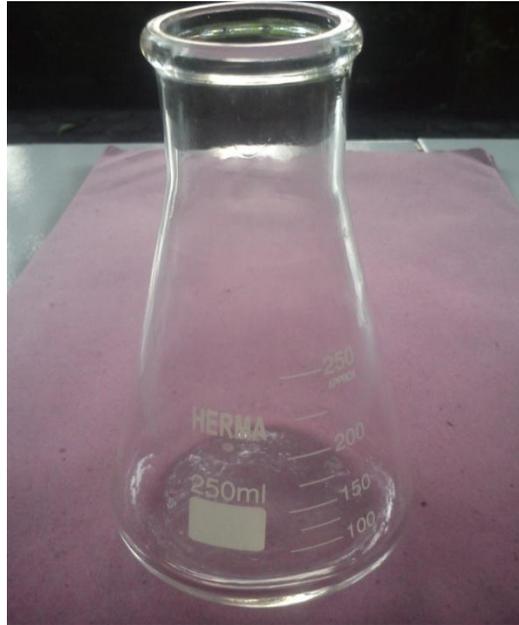
Gelas ukur merupakan alat yang digunakan untuk mengukur volume nira, volum starter ataupun volume etanol yang telah dihasilkan melalui proses distilasi. Gelas ukur yang digunakan adalah gelas ukur kapasitas 25 ml merek Herma dan gelas ukur kapasitas 50 ml merek *Pirex*. Gelas ukur merk Herma ataupun *Pirex* didapat dari peminjaman dari Laboratorium Agrobioteknologi UMY. Gelas ukur dapat ditunjukkan pada gambar 3.11.



Gambar 3.11 Gelas Ukur

## 11. Erlenmeyer

Labu enlemeyer merupakan alat yang digunakan sebagai tempat pembuatan starter. Labu erlenmeyer yang digunakan adalah labu *erlenmeyer* kapasitas 250 ml merek Herma. Labu *erlenmeyer* merk Herma didapat dari membeli di toko Alfa Kimia. Berikut adalah gambar dari labu *erlenmeyer* ditunjukkan pada gambar 3.12.



Gambar 3.12 *Erlenmeyer*

## 12. Jerigen

Jerigen digunakan sebagai tempat nira siwalan pada saat pengambilan pada petani nira. Jerigen yang digunakan adalah jerigen kapasitas 10 liter. Jerigen ditunjukkan pada gambar 3.13.



Gambar 3.13 Jerigen

### 13. Autoclave

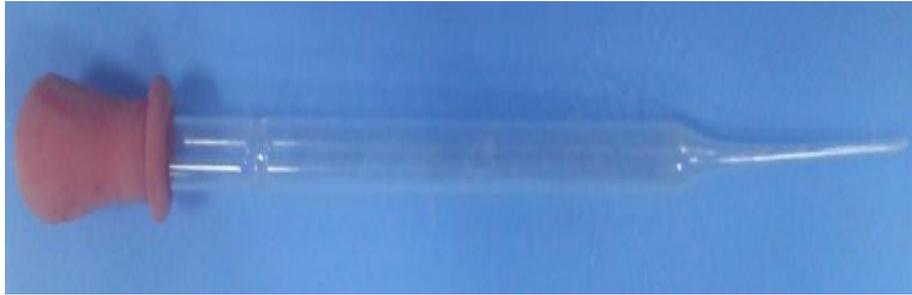
*Autoclave* adalah alat yang digunakan untuk sterilisasi nira siwalan, sehingga mikroba liar yang terdapat pada nira dapat mati. Sterilisasi diatur suhu pemanasan 121 °C pada tekanan 1 atm selama 15 menit. Dengan matinya mikroba liar maka kinerja *yeast* akan lebih maksimal untuk memproduksi etanol. *Autoclave* ditunjukkan pada gambar 3.14.



Gambar 3.14 *Autoclave*

### 14. Pipet

Pipet adalah alat yang digunakan untuk mengambil sampel saat akan diukur kadar gula nira siwalan ataupun kadar etanol hasil distilasi. Pipet didapat dari pembelian alat refraktometer. Pipet ditunjukkan pada gambar 3.15.



Gambar 3.15 Pipet

### 15. Alat Tulis

Alat tulis merupakan alat yang digunakan untuk melakukan pencatatan ataupun keperluan lainnya. Alat tulis yang digunakan diantaranya sepidol, bolpoin, ataupun alat sejenisnya. Berikut gambar dari alat pencatat ditunjukkan pada gambar 3.16.



Gambar 3.16 Alat Pencatat

### 16. *Stopwatch*

*Stopwatch* merupakan alat yang digunakan untuk mengukur waktu saat sterilisasi didalam *autoclave*, pengadukan cairan selama pembuatan *starter*, dan pencatat waktu saat fermentasi ataupun proses distilasi. *Stopwacth* yang digunakan adalah merk Lasebo. *Stopwatch* dapat ditunjukkan pada gambar 3.17.



Gambar 3.17 *Stopwatch*

#### 17. Kamera atau Alat Dokumentasi

Kamera digunakan untuk mengambil gambar atau dokumentasi selama proses penelitian. Pengambilan gambar dilakukan menggunakan kamera *handphone* dikarenakan memiliki lensa yang kecil sehingga dapat memudahkan dalam pengambilan gambar pada lensa refraktometer yang relative kecil.

#### 3.4. Bahan Penelitian

Adapun bahan yang diperlukan dan dipersiapkan dalam penelitian ini adalah :

##### 1. Nira Siwalan

Nira siwalan digunakan sebagai substrat bahan pokok pembuatan bioetanol. Kandungan gula yang terdapat pada nira ini nantinya dilakukan fermentasi kemudian dilakukan distilasi untuk pemurnian sehingga didapat kandungan kadar bioetanol yang lebih tinggi. Setelah dilakukan pengujian kadar gula menggunakan refraktometer alkohol, nira siwalan dari kabupaten pati memiliki kandungan gula 12% brix. Pada setiap sampel menggunakan nira sebanyak 250 ml untuk dilakukan fermentasi. Nira siwalan diambil dari

Kabupaten Pati dan Kabupaten Rembang. Nira siwalan ditunjukkan pada gambar 3.18.



Gambar 3.18 Nira Siwalan

## 2. HCL

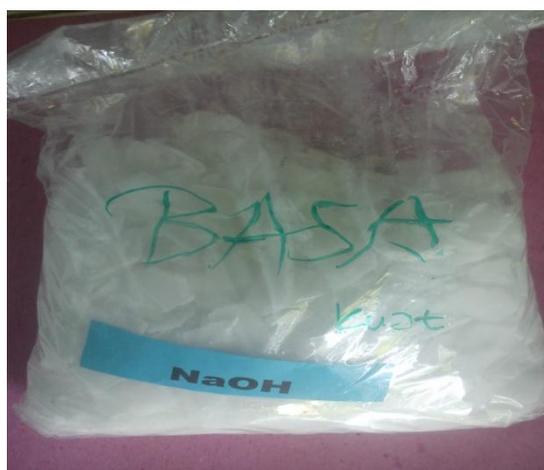
HCL atau bahan sejenis lainnya adalah bahan yang digunakan dalam pengontrolan kadar keasaman (pH) pada fermentasi yaitu sebagai penurun keasaman. HCL yang digunakan memiliki kandungan 0,1 N. Pengaturan keasaman dilakukan dengan penambahan HCL sedikit demi sedikit kemudian diaduk dan dilakukan pengujian keasaman sampai keasaman substrat sudah sesuai yang diinginkan. HCL merupakan produk PT. Segara Husada Mandiri – Jakarta yang didapat dari toko alfa kimia - Yogyakarta. HCL dapat ditunjukkan pada gambar 3.19.



Gambar 3.19 HCL

### 3. Natrium Hidroksida (NaOH)

Natrium Hidroksida berfungsi sebagai pengontrolan kadar pH, namun pengontrolan yang dimaksud yaitu menambah atau memperbesar kadar pH karena NaOH bersifat basa. NaOH ditambahkan sedikit demi sedikit sampai kadar keasaman yang diinginkan telah terpenuhi. NaOH didapat dari toko Alfa Kimia - Yogyakarta. Untuk lebih jelasnya NaOH ditunjukkan pada gambar 3.20.



Gambar 3.20 NaOH

#### 4. *Yeast* atau Ragi Fermentasi

*Yeast* atau ragi adalah jenis mikroba yang berperan mengubah gula menjadi etanol pada saat fermentasi. Dalam fermentasi ini menggunakan *saccharomyces cerevisiae* dikarenakan mikroba jenis ini (*saccharomyces cerevisiae*) mempunyai daya fermentasi yang tinggi terhadap glukosa, fruktosa, galaktose, maltose dan mempunyai daya tahan dalam lingkungan di kadar alkohol yang relatif tinggi serta tahan terhadap mikroba lain. *Yeast saccharomyces cerevisiae* ditunjukkan pada gambar 3.21.



Gambar 3.21 *Yeast Saccharomyces Cerevisiae*

#### 5. Urea

Urea atau bahan sejenis merupakan bahan pendukung yang bertindak sebagai nutrisi atau makanan bagi mikroba yang terdapat pada *saccharomyces cerevisiae*. Urea yang diberikan sebanyak 0,1 gram untuk sampel fermentasi sebanyak 250 ml. Jadi komposisi yang tepat akan memberikan kinerja mikroba akan maksimal dan nantinya didapat kadar bioetanol yang tinggi. Urea ditunjukkan pada gambar 3.22.



Gambar 3.22 Urea

## 6. NPK

NPK atau bahan sejenis merupakan bahan pendukung yang bertindak sebagai nutrisi atau makanan bagi mikroba yang terdapat pada *saccharomyces cerevisiae*. NPK yang diberikan sebanyak 0,125 gram untuk sampel fermentasi sebanyak 250 ml. NPK ditunjukkan pada gambar 3.23.



Gambar 3.23 NPK

## 7. Aquades

Aquades berfungsi sebagai pelarut *yeast* atau *nutrient* yang nantinya akan diberikan pada nira. Dipilihnya aquades sebagai bahan pelarut karena aquades adalah air murni bebas mineral dan keasaman air adalah 7. Sehingga aquades cocok digunakan sebagai bahan pelarut yeast ataupun urea dan NPK yang digunakan sebagai nutrisi mikroba. Aquades ditunjukkan pada gambar 3.24.



Gambar 3.24 Aquades

## 8. Air Mineral

Air mineral berfungsi sebagai pendinginan uap etanol yang melewati kondenser, sehingga nantinya uap yang mengalir melalui kondenser dapat berubah menjadi cair yang nantinya menjadi produk bioetanol.

### 3.5. Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini mulai dilaksanakan pada tanggal 24 Mei - 23 Juni 2016 di Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

### **3.6. Tahapan Pembuatan Bioetanol**

Tahapan-tahapan dalam proses penelitian pembuatan bioetanol dilakukan sebagai berikut :

#### **3.6.1. Proses Fermentasi**

Fermentasi adalah proses pertama dalam pembuatan bioetanol. Dalam proses fermentasi, gula pada bahan (nira siwalan) diubah menjadi etanol dan produk samping. Langkah-langkah proses fermentasi adalah sebagai berikut:

##### **1. Persiapan Alat dan Bahan**

Langkah pertama adalah mempersiapkan alat dan bahan yang digunakan untuk penelitian. Setelah persiapan alat dan bahan telah selesai maka dilakukan pengecekan alat dan dilakukan kalibrasi jika alat ada ketidakakuratan.

##### **2. Pengukuran dan Penimbangan Bahan**

Langkah skedua adalah pengukuran dan penimbangan bahan yang digunakan. Pengukuran yang dilakukan adalah penimbangan urea, NPK, dan *yeast* sesuai ukuran. Setelah nira telah tersedia maka dilakukan pengukuran kadar gula dan derajat keasaman. Tujuan dilakukannya pengukuran kadar gula untuk mengetahui gula awal nira siwalan, sehingga laju penurunan gula selama fermentasi dapat diketahui. Pada proses fermentasi ini dilakukan pengaturan keasaman (pH) awal 4,5 dengan tujuan pertumbuhan dan kinerja mikroba dapat maksimal. Setelah derajat keasaman dan kadar gula nira sesuai, maka dilakukan pengambilan sampel sebanyak 250 ml untuk dilakukan fermentasi.

### 3. Melarutkan Nutrisi dan *Yeast*

Nutrisi seperti urea dan NPK harus dilarutkan terlebih dahulu menggunakan akuades sebelum dituangkan dalam nira fermipan. Tujuan dari proses pelarutan agar nutrisi dapat tercampur merata dengan nira sehingga kinerja mikroba bekerja dengan maksimal. Untuk melarutkan *yeast* cairan yang digunakan adalah nira siwalan. Tujuan dari pelarutan *yeast* agar terjadi pemecahan sel mikroba yang terdapat dalam *yeast*.

### 4. Penuangan Nutrisi pada Sampel Fermentasi

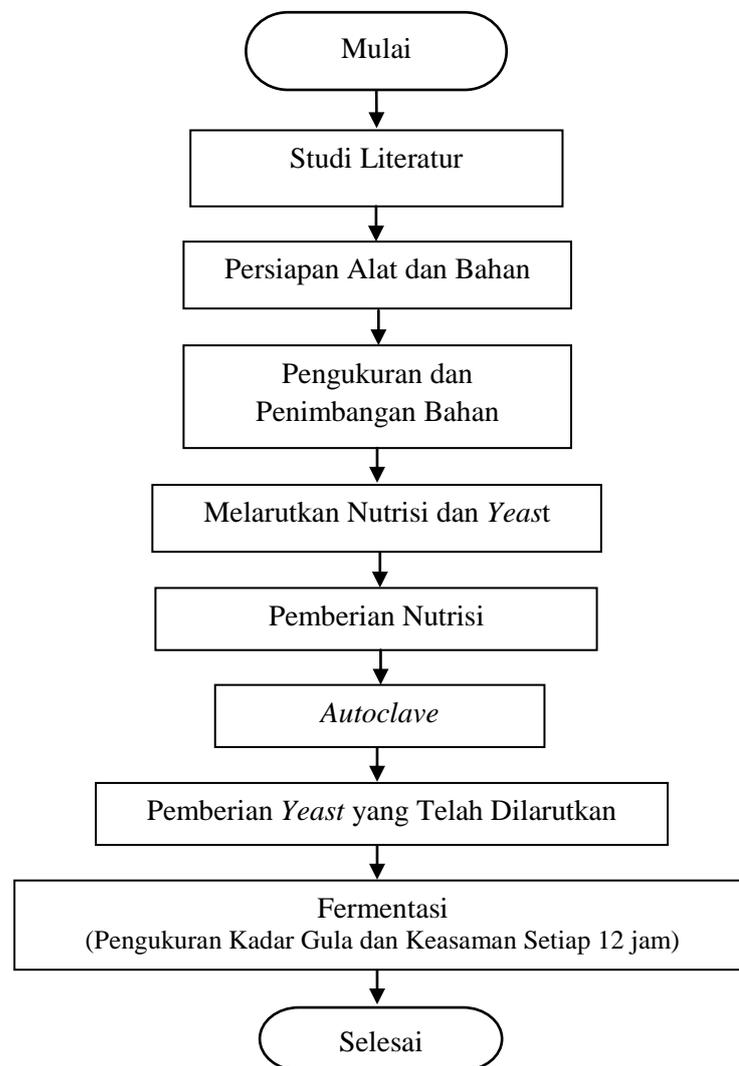
Setelah nutrisi larut keseluruhan, maka larutan nutrisi (urea dan NPK) dituangkan dalam sampel fermipan 250 ml yang akan dilakukan fermentasi. Sampel sudah siap dilakukan langkah selanjutnya.

### 5. *Autoclave*

*Autoclave* bertujuan agar mikroba yang ada dapat mati. *Autoclave* dilakukan pada suhu 121 °C. Waktu *autoclave* selama 15 menit. Setelah 15 menit bahan dikeluarkan lalu didinginkan.

### 6. Penuangan *Yeast* yang Telah Larutan

*Yeast* dituangkan pada sampel fermipan setelah *autoclave* bertujuan agar mikroba yang terdapat pada *yeast* tidak mati akibat dari *autoclave*. Oleh sebab itulah mengapa penuangan *yeast* setelah dilakukan sterilisasi melalui cara *autoclave*. Selanjutnya Sampel telah siap dilakukan fermentasi. Fermentasi dijaga pada suhu kamar antara 27 – 30 °C, dikarenakan pada suhu tersebut mikroba *Saccharomyces Cerevisiae* sangat produktif dalam merombak gula menjadi bioetanol. Pada saat proses fermentasi, setiap 12 jam dilakukan pengukuran kadar gula menggunakan alat *brix refractometer* dan pengukuran keasaman menggunakan pH meter. Untuk memperjelas tahapan proses fermentasi dapat dilihat pada diagram alir gambar 3.25.

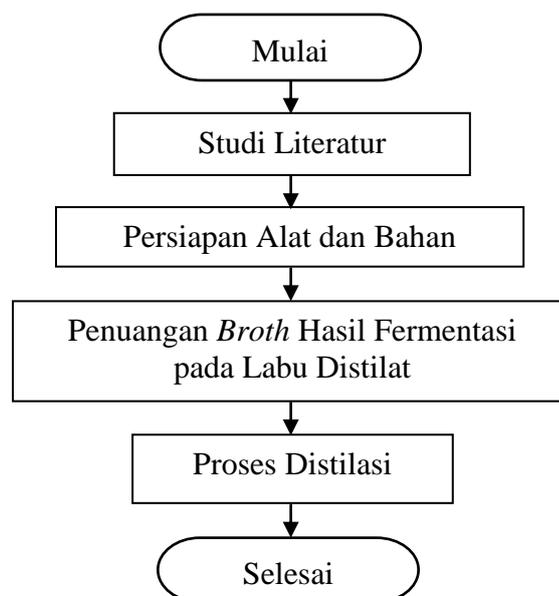


Gambar 3.25 Diagram Alir Proses Fermentasi

### 3.6.2. Proses Distilasi

Distilasi dilakukan dengan tujuan memisahkan etanol dengan *broth* fermentasi sehingga mendapatkan kadar etanol yang lebih tinggi. Langkah pertaman *broth* setelah dilakukan fermentasi dimasukkan pada distilat, kemudian dipanaskan dan dilakukan pengaturan suhu. Distilasi dilakukan dengan menggunakan rangkaian distilasi sederhana dan suhu dijaga pada suhu 78 °C agar etanol dapat menguap. Pada suhu tersebut etanol sudah dapat menguap namun air

belum menguap, sehingga antara etanol dan air dapat terpisah. Penjagaan suhu dengan cara manual yaitu menekan tombol ON– OFF pada kompor listrik. Ketika suhu sudah mencapai 78 °C maka tombol OFF ditekan dan ketika suhu turun menjadi 76 °C maka kompor dihidupkan dengan cara menekan tombol ON. Meskipun pada teorinya air tidak ikut menguap, namun realitanya sebagian kecil kandungan air masih terbawa dan tercampur pada uap etanol. Etanol yang telah menguap tersebut kemudian dialirkan menuju kondensor untuk didinginkan, sehingga uap akan kembali dalam wujud cair. Untuk memperjelas tahapan-tahapan proses distilasi yang akan di lakukan di buat diagram alir proses distilasi yang di tunjukkan pada gambar 3.26.



Gambar 3.26 Tahap Distilasi

### 3.7. Cara Pengukuran Volume dan Kadar Etanol

Setelah proses distilasi dilakukan, maka etanol yang dihasilkan dilakukan pengukuran volume dan kadar etanol. Pengukuran volume etanol dilakukan dengan cara menuangkan hasil distilasi kedalam gelas ukur kapasitas 50 ml untuk

setiap sampelnya. Penunjukan ukuran volume etanol terbaca pada angka yang terdapat pada gelas ukur, dengan demikian volume etanol dapat diketahui.

Pengujian kadar etanol dilakukan secara manual menggunakan refraktometer alkohol. Pengukuran kadar alkohol dilakukan dengan cara meneteskan hasil distilasi secukupnya pada *prism*, kemudian untuk mengetahui seberapa besar kadar etanol yang terdapat pada hasil distilasi dilakukan pengamatan pada *eyepiece*. Angka terukur akan terlihat berdasarkan perbedaan warna. Besarnya angka terukur akan berwarna putih pada angka skala *prism*.