

TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan November 2015 sampai April 2016.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan. Bahan yang digunakan dalam penelitian terdiri dari :

- a. Bahan inokulasi : isolat *Zymomonas mobilis*, *Saccaromyces cereviciae* dan *Aspergillus niger*.
- b. Bahan pembiakan kultur : medium Pepton Glukosa Yeast Ekstrak Agar (PGYA), medium Pepton Glukosa Yeast Ekstrak cair (PGYC), dan medium PDA.
- c. Bahan baku bioethanol : limbah kulit nanas (nanas madu jenis queen)
- d. Bahan sterilisasi : Desinfektan, spirtus, alkohol 70%, kapas, plastik, kertas payung.
- e. Bahan analisis : NaOH 0,01 N, indikator PP, NaOH 15% ,reagen Nelson, reagen Arsenomolidat, aquades.

Alat. Alat-alat yang digunakan dalam penelitian meliputi :

- a. Alat sterilisasi : lampu Bunsen, autoclaf
- b. Alat inokulasi : jarum ose, jarum driglasky, lampu Bunsen, *micropipet*, *faintips*, tabung reaksi, *petridish*, *shaker*, *vortex*.
- c. Alat hidrolisis : *Autoclafe*, boiler.

- d. Alat fermentasi : botol selai, blender, plastik.
- e. Alat pengukur : pH meter, *Alkoholmeter*, gelas ukur, pipet ukur, timbangan analitik.
- f. Alat analisis : statip, biuret, corong, tabung reaksi, *colony counter*, *Spektrofotometer*, Erlenmeyer, cawan porselen, pipet tetes, labu ukur.
- g. Mesin bioetanol : alat distilasi, kompor listrik.

C. Metode Penelitian

Adapun tahapan penelitian yang akan dilakukan adalah:

Tahap 1. Karakterisasi kulit nanas.

Bahan yang digunakan pada penelitian ini yaitu limbah kulit nanas. Limbah kulit nanas diperoleh dari penjual buah di sekitr jalan Kaliurang KM 6 Pertama hal yang dilakukan yaitu limbah kulit nanas yang telah dipersiapkan sebelumnya dicuci bersih dan ditunggu agak kering agar air bekas cucian mengering. Setelah itu, limbah kulit nanas tersebut diblender dan disaring sehingga diperoleh limbah cair kulit nanas, dan dianalisis kandungan protein, karbohidrat, kadar serat, kadar air dan gula reduksi.

Tahap 2. Fermentasi kulit nanas menjadi etanol

Limbah cair kulit nanas difermentasi dengan menambahkan starter sesuai perlakuan yang akan diuji yaitu: A). *S. Cerevicae*, B). *S. Cerevicae* + *Z. mobilis* dan C). *S. cerevicae* + *Z. mobilis* + *A. niger*

Penelitian ini akan dilakukan dengan menggunakan metode percobaan yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap dengan rancangan percobaan faktor tunggal yaitu macam inokulum yang terdiri dari 3 perlakuan. Adapun perlakuannya adalah :

Perlakuan A. *S. Cerevicae*

Perlakuan B. *S. Cerevicae* + *Zymomonas mobilis*

Perlakuan C. *S. Cerevicae* + *Z. mobilis* + *A. niger*

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali dan setiap ulangan terdiri dari 3 sampel korban untuk hari ke 0 sampai hari ke 7 yang diuji mikrobiologis, kimiadan hasil etanol, sehingga total keseluruhan adalah $3 \times 3 \times 7 = 63$ unit percobaan (Lampiran 1).

D. Tata Laksana Penelitian

Tahap 1. Karakterisasi kulit nanas

Kulit nanas yang akan digunakan pada penelitian ini dikarakterisasi terlebih dahulu untuk mengetahui kandungan kulit nanas tersebut sebelum menjadi etanol.

a. Analisis Karbohidrat

Karbohidrat dalam bentuk gula dan pati dianalisis dengan metode Nelson-Samogyi secara spektrofotometri (Sudarmadji dkk., 1984). Sampel (5 ml) ditambah 143,75 mg enzim amilase kemudian digojok dan didiamkan selama 6 jam. 1 ml sampel yang ditambah amilase dan 1 ml sampel tanpa amilase masing-masing ditambah akuades sampai volume akhir 10 mL , kemudian diambil 1 mL ditambah dengan 9 mL akuades dan digojok dengan vorteks. 1 ml arutan sampel

ditambahkan 1 ml larutan Nelson (campuran larutan Nelson A dan Nelson B; 25:1 v/v), kemudian dipanaskan dengan *water bath* pada suhu 100°C selama 20 menit. Larutan sampel didinginkan sampai mencapai suhu kamar, kemudian ditambahkan 1 ml larutan Arseno Molybdat. Larutan sampel digojog, kemudian ditambahkan akuades 7 ml dan digojog lagi. Larutan sampel diukur penyerapan (absorbansi) cahaya tampak (*visible*) pada panjang gelombang 540 nm. Nilai absorbansi sampel - nilai absorbansi blanko kemudian dikonversi ke mg/ml gula reduksi berdasarkan persamaan regresi senyawa standar (glukosa monohidrat). Kadar gula reduksi adalah kadar gula reduksi tanpa enzim amilase.

$$\text{Kadar pati} = (\text{Kadar gula reduksi setelah diberi enzim amylase} - \text{kadar gula reduksi tanpa enzim amilase}) \times 0,9.$$

b. Analisis Kadar Protein (Sudarmadji dkk., 2007)

Kandungan protein ditentukan dengan Analisis kandungan Nitrogen (Sudarmaji dkk., 2007). Uji kandungan protein dilakukan dengan cara menguji kadar Nitrogen dalam sampel. Kemudian hasilnya dikonversi dengan mengalikan kadar Nitrogen yang didapat dengan 6,25. Hasil konversi yang didapat itu merupakan kandungan protein dalam sampel. Untuk menguji kadar Nitrogen, sampel sebanyak 2 g dimasukkan dalam labu Kjeidahl. Ditambahkan katalis N (CuSO_4 dan K_2SO_4) 0,7 g dan ditambah H_2SO_4 pekat 3 ml lalu didestruksi pada suhu 370-410°C dalam lemari asam sampai jernih kurang lebih selama 1 jam. Pada tahapan ini asam sulfat pekat mendestruksi sampel menjadi unsur-unsurnya. Elemen Karbon, Hidrogen teroksidasi menjadi CO , CO_2 , dan H_2O . Sedangkan Nitrogen-nya (N) akan berubah menjadi $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Selanjutnya sampel masuk pada tahap destilasi, pada tahap ini Ammonium Sulfat dipecah menjadi ammonia (NH_3) dengan penambahan NaOH sampai alkalis dan dipanaskan. Setelah melalui tahap destruksi sampel didinginkan lalu ditambahkan 15 ml H_2O , lalu dimasukkan kedalam labu destilasi dan ditambahkan 15 ml NaOH 40%. Hasil destilasi ditampung dalam erlenmeyer 100 ml yang berisi 25 ml larutan HCl 40% yang diberi indikator PP 2-3 tetes. Destilasi diakhiri bila semua ammonia terdistilasi sempurna dengan ditandai destilat tidak bereaksi basis.

Hasil destilasi selanjutnya dititrasi dengan NaOH 0,1 N. akhir titrasi ditandai dengan warna merah muda dan tidak hilang selama 30 detik. Selisih jumlah titrasi blangko dan sampel merupakan jumlah ekuivalen Nitrogen. Persen protein dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\%N = \frac{\text{ml NaOH (blangko - sampel)}}{\text{berat sampel (g)} \times 1000} \times N. \text{NaOH} \times 14,008 \times 100\%$$

c. Analisis Kadar Serat Metode Gravimetri (Sudarmadji dkk., 2003)

Sampel ditimbang sebanyak 1-2 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml, kemudian ditambahkan 50 ml H_2SO_4 1,25% panaskan dan direflux selama 30 menit, setelah itu ditambahkan 50 ml NaOH 3,25% dan direflux selama 30 menit. Sampel yang telah dipanaskan, kemudian disaring panas-panas dengan kertas saring Whatman 42 yang telah diketahui bobotnya. Setelah disaring, lalu sampel dicuci dengan 50 ml H_2SO_4 1,25% dan 50 ml alkohol 36%, kemudian endapan dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C dan timbang sampai bobot konstan. Serat kasar dihitung dengan rumus :

$$\% \text{ serat kasar} = [(a-b)/c] \times 100\%$$

Keterangan :

a = berat kertas saring ditambah sampel yang telah dikeringkan (g)

b = berat kertas saring (g)

c = berat sampel (g)

Pada Analisis karbohidrat metode serat kasar menggunakan sampel berupa nanas. Nanas yang berusia satu sampai dua tahun, tingginya 50- 150 cm, mempunyai tunas yang merayap pada bagian pangkalnya. Daun berkumpul dalam roset akar, dimana bagian pangkalnya melebar menjadi pelepah. Daun berbentuk seperti pedang, tebal dan liat, dengan panjang 80-120 cm dan lebar 2-6 cm, ujungnya lancip menyerupai duri, berwarna hijau atau hijau kemerahan. Buahnya berbentuk bulat panjang, berdaging, dan berwarna hijau, jika masak warnanya menjadi kuning, rasanya asam sampai manis.

Sama halnya dengan serat-serat alam lainnya yang berasal dari daun (*leaf fibres*), secara morfologi jumlah serat dalam daun nanas terdiri dari beberapa ikatan serat (*bundle of fibres*) dan masing-masing ikatan terdiri dari beberapa serat (*multi-celluler fibre*). Berdasarkan pengamatan dengan mikroskop, sel-sel dalam serat daun nanas mempunyai ukuran diameter rata-rata berkisar 10 μm dan panjang rata-rata 4,5 mm dengan rasio perbandingan antara panjang dan diameter adalah 450. Rata-rata ketebalan dinding sel dari serat daun nanas adalah 8,3 μm . Ketebalan dinding sel ini terletak antara serat sisal (12,8 μm) dan serat batang pisang (1,2 μm) (Sudarmadji, 2004).

d. Analisis Kadar Air (AOAC, 2003)

Kadar air ditentukan dengan mengeringkan sampel ke dalam oven pada suhu 80 °C dan didinginkan di dalam desikator kemudian ditimbang. Pengeringan dilakukan berulang ulang hingga beratnya konstan. Terakhir, menghitung kadar air.

Tahap 2. Fermentasi Kulit nanas

a. Persiapan Medium

Pembuatan medium dilakukan bersamaan dengan tahap karakterisasi, medium yang digunakan adalah PGYP untuk *Aspergillus niger*, *Saccaromyces cereviceae*, dan *Zymomonas mobilis*.

b. perbanyak inokulum

i) Saccharomyces cereviceae

Biakan *S.cerevisiae* yang digunakan berasal dari PAU Universitas Gajah Mada, lalu diambil satu ose sel ditumbuhkan pada 5 ml medium *Yeast Malt Extract* (YM) cair dengan komposisi pepton 0,5 g; *yeast extract* 0,3 g; *malt extract* 0,3 g; glukosa 1 g dan akuades hingga mencapai volume 100 ml. Biakan diinkubasi pada suhu 30° C selama 48 jam dengan metode *plate count*.

ii) Aspergillus niger

Tahap pertama yaitu pembiakan *Aspergillus niger* ke dalam medium PGYP (*Pepton Glucose Yeast Padat*). Persiapannya pembuatan PGYP, Pepton 0,75g, glukosa 0,2g, *yeast ekstrak* 0,45g dilarutkan dalam 100 ml aquades dan dipanaskan, setelah larut dimasukkan dalam Erlenmeyer dan ditutup untuk

diserilkan dalam *autoclave* dengan tekanan 1 atm selama 15 menit. Setelah 15 menit, larutan dikerluarkan dan dipindah ke dalam tabung reaksi dan dinginkan. Setelah dingin keluarkan digunakan sebagai medium penanaman *Aspergillus Niger*.

iii) *Zymomonas mobilis*

Sebelum diinokulasi isolat *Zymomonas mobilis* diremajakan terlebih dahulu pada medium miring NA dengan mengambil 1 ose isolat, lalu diinkubasi selama 48 jam. Kemudian Inokulum dibuat dengan memindahkan sel *Zymomonas mobilis* dari medium agar miring ke labu 250mL yang mengandung 50 mL medium cair pH 5,5. Medium yang telah diinokulasi ini kemudian diinkubasi selama 20 jam pada suhu 30°C dan di shaker 125 rpm. Inokulum yang diperoleh ditransfer ke labu 1 liter yang mengandung 450/mL medium cair diinkubasi dan dishaker pada kecepatan 125 rpm. Setelah 17-18 jam inkubasi dihentikan sehingga diperoleh biomassa/starter biakan *Zymomonas mobilis* yang dipakai sebagai inokulat pada proses fermentasi (Arum dkk., 2015)

a. Pengolahan bahan baku

- 1) Kulit nanas dipotong diambil dagingnya yang masih tersisa kemudian ditambah aquadest untuk diblender dan diambil sarinya (lampiran5: 1a, 1b,1c)
- 2) Ekstraksi. Proses ekstraksi dilakukan dengan menghancurkan kulit nanas yang dengan menggunakan blender dengan perbandingan kulit nanas : aquadest 3:1.

- 3) Penyaringan. Filtrasi adalah proses pemisahan dari campuran heterogen yang mengandung cairan dan partikel-partikel padat dengan menggunakan medium yang hanya meloloskan cairan dan menahan partikel-partikel padat.
- 4) Proses pasteurisasi. Proses pasteurisasi merupakan proses pemanasan dengan suhu relatif rendah yaitu 70°C selama 15 menit dengan tujuan untuk membunuh pathogen.
- 5) Pendinginan. Pendinginan dapat dianggap sebagai proses penurunan suhu bahan dari suhu awal ke suhu tertentu sampai titik beku, kemudian larutan hasil hidrolisis diambil dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer sebanyak 500 ml dan mengatur pH sampai pH 4,5. Mensterilkan larutan tersebut ($T=104^{\circ}\text{C}$, $t=15$ menit).

a. Proses fermentasi kulit nanas

Sari kulit nanas yang sudah disaring lalu diberi starter sesuai dengan perlakuan setelah diberi starter lalu masukkan dalam botol jam dan ditutup rapat. Proses fermentasi dilakukan selama 7 hari (lampiran 2a). Kandungan di uji total asam (lampiran 3a), uji pH (lampiran 3b) dan uji mikrobiologi (lampiran 3c).

b. Destilasi

Setelah didapat larutan ethanol dari hasil fermentasi kemudian larutan tersebut dipisahkan dengan menggunakan destilator dengan suhu 78°C . Untuk memisahkan antara ethanol dengan air.

c. Pengujian Kadar Etanol

Untuk mengetahui kadar etanol dari hasil fermentasi dilakukan dengan cara, sampel cairan fermentasi diambil 100 ml kemudian diukur dengan alat alkoholmeter akan diketahui kadar alkohol yang diperoleh.

E. Parameter yang diamati

Parameter yang diamati dalam penelitian ini ada 2 tahap yaitu: Tahap fermentasi dan tahap karakterisasi dalam waktu 198 jam.

1. Karakteristik Ekstrak Kulit Nanas

a. Karbohidrat

Kadar pati = (Kadar gula reduksi setelah diberi enzim amylase –
Kadar gula reduksi tanpa enzim amilase) X 0,9.

b. Serat

Serat kasar dihitung dengan rumus :

$$\% \text{serat kasar} = [(a-b)/c] \times 100\%$$

Keterangan :

a = berat kertas saring ditambah sampel yang telah dikeringkan (g)

b = berat kertas saring (g)

c = berat sampel (g)

c. Protein

Persen protein dihitung dengan menggunakan rumus:

$$\% N = \frac{\text{ml NaOH (blangko - sampel)}}{\text{berat sampel (g)} \times 1000} \times N. \text{NaOH} \times 14,008 \times 100\%$$

d. Analisis Kadar Air

$$\% \text{Moisture} = (w1-w2)/w1 \times 100\%$$

Keterangan : W1 = berat pengeringan sampel pertama

W2 = berat pengeringan sampel terakhir (konstan)

2. Tahap Fermentasi

1. Uji gula reduksi (%)

Analisis kuantitatif gula reduksi

Cara kerja :

Untuk membuat kurva standar terlebih dahulu dibuat larutan glukosa dengan konsentrasi 0, 200, 400, 600, 800, dan 1000 ppm. Setelah itu diambil 1 mL dari masing-masing konsentrasi dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Kemudian ditambahkan ke dalam tabung reaksi 1 mL reagen dan dihomogenkan. Ditutup mulut tabung dengan aluminium foil dan dipanaskan dalam air mendidih selama 5-15 menit sampai larutan berwarna merah-coklat. Kemudian ditambahkan 1 mL larutan KNa-Tartrat 40 %. Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan. Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

Penetapan kadar gula reduksi dalam sampel :

- a). Timbang sampel buah 1 g dan diekstrak dengan 20 ml air
- b). Saring dan masukkan labu ukur 100 ml, tera sampai tandabatas
- c). Pipet 1 ml larutan jernih sampel dan encerkan sampai 100 ml
- d). Siapkan 2 tabung reaksi. Masukkan 1 ml aquades (blanko) pada salah satu tabung dan tabung yang lain diisi dengan 1 ml sampel

- e). Tambahkan masing-masing tabung dengan 1 ml reagen DNS dan dihomogenkan.
- f). Ditutup mulut tabung dengan alumunium foil dan dipanaskandalam air mendidih selama 15 menit sampai larutan berwarnamerah-coklat.
- g). Kemudian ditambahkan 1 mL larutan KNa-Tartrat 40 %.
- h). Tabung reaksi didinginkan dan ditambahkan dengan aquades hingga volumenya menjadi 10 mL dan dihomogenkan
- i). Selanjutnya diukur absorbansinya dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.
- j). Kadar gula reduksi dihitung dengan rumus berikut :

Kadar gula reduksi

= $\frac{\text{konsentrasi glukosa sampel berdasarkan kurva standar} \times \text{fp} \times 100 \%}{\text{Konsentrasi sampel untuk analisis}}$

fp = faktor pengenceran

2. Total asam

Uji Total asam dilakukan dengan meneteskan larutan fermentasi dengan NaOH 0,1 N sampai berubah warna menjadi merah muda.

$$\%N = \frac{\text{ml NaOH (blangko-sampel)} \times \text{NaOH} \times 14,008 \times 100\%}{\text{Berat sampel (g)} \times 1000}$$

3. pH

Pengecekan pH dilakukan dengan menggunakan pH meter.

4. Kadar Etanol

Pengecekan kadar etanol dilakukan pada pengamatan hari terakhir dengan menggunakan Alkoholmeter. Uji etanol dilakukan dengan cara kualitatif dan

kuantitatif. Uji kualitatif dilakukan dengan meneteskan larutan campuran antara $K_2Cr_2O_7$ dan H_2SO_4 pekat serta dengan uji nyala. Uji kuantitatif dilakukan dengan metode berat jenis menggunakan piknometer, namun apabila volume etanol kurang dari 25 ml, berat jenis dapat dihitung dengan rumus:

$$\text{Berat Jenis} = \frac{\text{massa (g)}}{\text{Volume (ml)ml}} = g$$

5. Populasi Mikroba

Perhitungan populasi menggunakan metode *Plate count* pada medium PDA dan dihitung jumlah isolatnya dengan menggunakan koloni counter. Penentuan jumlah koloni dapat dihitung dengan rumus sebagai berikut:

$$\text{Jumlah bakteri per ml sampel (CFU/ml)} = \frac{\text{Jumlah koloni}}{\text{Faktor pengenceran}}$$

Penentuan jumlah jumlah bakteri per mililiter dengan menggunakan cara *Total Plate Count* harus memenuhi syarat sebagai berikut:

- i. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30 – 300 koloni
- ii. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (*Spreader*)
- iii. Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya. Jika sama atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya
- iv. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat hasilnya dirata-rata (Agung_Astuti dkk, 2014).

F. Analisis Data

Data hasil pengamatan secara periodik disajikan dalam bentuk histogram dan grafik, sedangkan hasil akhir dianalisis sidik ragam (*Analysis of variance*) menggunakan uji F pada tingkat kesalahan α 5%. Untuk perlakuan yang berbeda nyata diuji lebih lanjut dengan uji jarak berganda Duncan *Multiple Range Test* (DMRT).