

IV. METODE PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Tempat : Laboratorium Mikrobiologi Jurusan Biologi MIPA dan Laboratorium Penelitian Tugas Akhir Kimia Jurusan Kimia Murni MIPA Universitas Diponegoro.

Waktu : 3 - 30 November 1993.

B. Bahan dan Alat

Bahan : - Biakan murni *Endomycopsis fibuligera*
- Biakan murni *Saccharomyces cerevisiae* 3012
- Medium Potato Dextra Agar (PDA)
- Beras umbuk
- Gula Pasir
- HCl 0,1 N
- NaOH 0,1 N
- Indikator PP 1%
- Spiritus
- Aquadest
- Vaselin

Alat : - Seperangkat alat destilasi - Buret
- pH meter elektronik - Autoklaf
- Kompor listrik - Ose
- Timbangan halus (digital) - Erlenmeyer
- Timbangan - Gelas ukur
- Botol fermentasi - Tabung reaksi

C. Cara Kerja

1. Pembuatan Medium Potato Dextra Agar (PDA) (Cook ,1958)

Komposisi medium :

- Potato	300,00	gram
- Dekstrosa	20,00	gram
- Agar	15,00	gram
- aquades	1,00	liter

Menimbang sejumlah 4,875 gram medium PDA atau sesuai dengan kebutuhan, kemudian ditambahkan 125 ml aquadest yang dituangkan ke dalam erlenmeyer. Dipanaskan sampai medium tampak homogen. Ditambahkan beberapa tetes HCl 0,1 N, pH diukur sekitar 4,5 sampai 5,5. Kemudian dituangkan ke dalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas dan dibungkus dengan kertas. Disterilisasi dengan autoklaf pada tekanan 2 atm, suhu 121°C selama 15 menit. Dibuat agar miring, kemudian dibuat isolat baru dari biakan murni *Endomycopsis fibuligera* dan biakan murni *Saccharomyces cerevisiae* 3012 yang disesuaikan dengan hari penelitian .

2. Persiapan Air Cucian Beras (Djajasukma dan Sastraatmadja, 1990)

Beras ditimbang sebanyak 100 g, 200 g dan 300 g. Dimasukkan dalam bejana, ditambahkan air sebanyak 1 liter kemudian diaduk selama 5 menit dan disaring serta dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Volume filtrat ditambah air hingga 1 liter. Kemudian ditambahkan gula pasir 10% . Dipasteurisasi pada suhu 70°C selama 15 menit dan

pH diatur sekitar 4,5 - 5,5 (Chaidir dkk., 1991). Filtrat ini dimasukkan ke dalam tabung fermentasi steril secara aseptik sebanyak 200 ml dengan masing-masing kode sebagai berikut:

- K = menunjukkan konsentrasi
H = menunjukkan lamanya hari.
- KOH0 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 0%
untuk hari ke-0
- KOH2 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 0%
untuk hari ke-2
- KOH4 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 0%
untuk hari ke-4
- KOH6 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 0%
untuk hari ke-6
- KOH8 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 0%
untuk hari ke-8
- K1H0 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 10%
untuk hari ke-0
- K1H2 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 10%
untuk hari ke-2
- K1H4 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 10%
untuk hari ke-4
- K1H6 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 10%
untuk hari ke-6
- K1H8 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 10%
untuk hari ke-8

- K2H0 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 20%
untuk hari ke-0
- K2H2 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 20%
untuk hari ke-2
- K2H4 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 20%
untuk hari ke-4
- K2H6 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 20%
untuk hari ke-6
- K2H8 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 20%
untuk hari ke-8
- K3H0 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 30%
untuk hari ke-0
- K3H2 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 30%
untuk hari ke-2
- K3H4 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 30%
untuk hari ke-4
- K3H6 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 30%
untuk hari ke-6
- K3H8 = limbah air cucian beras dengan konsentrasi 30%
untuk hari ke-8

3. Persiapan Stater (Djajasukma dan Sastraatmadja, 1990)

Sebanyak 1 liter filtrat air cucian beras dengan konsentrasi 0%, 10%, 20%, dan 30% masing-masing diambil 200 ml dan dimasukkan dalam erlenmeyer, pH diatur sekitar 4,5 sampai 5,5. Mengambil 2 ose dari biakan *Endomycopsis fibuligera* umur 24 jam dan dimasukkan ke dalam masing-masing filtrat tersebut secara aseptik. Di

shaker selama 1 x 24 jam dan diinkubasikan pada suhu kamar ($\pm 28^{\circ}\text{C}$, Wibowo, 1990). Metode yang sama dilakukan pada biakan *S. cerevisiae* 3012 dalam pembuatan stater.

Setelah masing-masing stater siap, tiap stater dari *E. fibuligera* diambil sebanyak 10 ml (Wibowo, 1990), dimasukkan dalam tiap-tiap botol fermentasi secara aseptik dan diinkubasikan selama ± 18 jam. Selaput yang muncul di permukaan air dalam botol fermentasi dikeluarkan secara aseptik (Kapti dan Sudarmadji, 1986). Kemudian mengambil 10 ml stater dari *S. cerevisiae* 3012 dan dimasukkan pada masing-masing perlakuan tersebut secara aseptik. Setelah itu di inkubasikan selama 0, 2, 4, 6 dan 8 hari pada suhu kamar. Kemudian hasilnya dianalisa meliputi kadar alkohol, pH dan total asamnya selama perlakuan tersebut.

4. Penentuan Kadar Alkohol (Metode Wiseman)

Penentuan kadar alkohol ditentukan dengan titik didih alkohol dengan proses destilasi.

Sampel masing-masing perlakuan diambil sebanyak 100 ml dimasukkan dalam labu takar destilasi dan ditutup. Dipanaskan dengan pemanas atau kompor listrik sampai mencapai titik didih alkohol $78,4^{\circ}\text{C}$ (Perry, 1984). Pada saat titik didih tersebut tercapai, tetesan yang keluar dari alat destilasi ditampung dalam suatu botol selama kurang lebih 15 menit. Sedangkan tetesan yang mengalir baik sebelum maupun sesudah titik didih alkohol

ditampung di tempat lain dan ini tidak dianalisa. Hasil yang diperoleh pada saat titik didih alkohol tersebut ditimbang dengan timbangan halus (digital) sebagai kadar alkohol.

Perhitungan kadar alkohol diperoleh dengan rumus :

$$\% \text{ alkohol (b/v)} = \frac{A}{B} \times 100 \%$$

Di mana :

A = hasil proses destilasi yang ditampung (mg)

B = filtrat sampel yang diambil untuk dianalisa (100 ml)

% alkohol = kadar alkohol (dalam berat per volume) dalam prosen (%)

(Wiseman, 1985)

5. Penentuan Total Asam (Kartika *dkk.*, 1992)

Keasaman total sampel diukur dengan cara titrasi dengan larutan NaOH 0,1 N dengan cara sebagai berikut : sampel air cucian beras dari masing-masing perlakuan diambil sebanyak 100 ml. Kemudian sampel tersebut dimasukkan ke dalam erlenmeyer. Diambil dengan pipet sebanyak 25 ml dan diberi beberapa tetes (2-3 tetes) indikator PP 1%. Selanjutnya dititrasi dengan larutan NaOH 0,1 N sehingga terbentuk warna merah muda. Setelah muncul warna merah muda, titrasi dihentikan dan dicatat volume NaOH yang digunakan.

Total asam dihitung dengan menggunakan rumus sebagai keasaman total dalam prosen :

$$\text{Rumus : } A = \frac{B \times C}{D}$$

Di mana :

A = keasaman total sebagai volume (ml) 0,1 NaOH setiap 100 ml sampel

B = 100 (digunakan karena perhitungan didasarkan pada 100 ml sampel)

C = volume 0,1 N NaOH yang digunakan

D = volume sampel yang digunakan

6. Penentuan pH

pH diukur dengan menggunakan pH meter elektronik. pH awal diukur pada saat perlakuan-perlakuan tersebut diinkubasikan pada suhu kamar. pH akhir diukur pada waktu tiap perlakuan akan dianalisa kadar alkoholnya dan total asamanya.

D. Analisa Data (Steel and Torrie, 1991; Srigandono, 1987)

Hasil yang telah diperoleh kemudian dihitung, meliputi kadar alkohol, total asam dan pH. Kemudian hasil-hasil tersebut dianalisa dengan Rancangan Acak Lengkap dengan pola percobaan Faktorial 4 x 5 dengan masing-masing 3 ulangan, diuji dengan Uji Beda Nyata Jujur (HSD) pada taraf uji 1% dan 5% .

Model matematisnya adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \Sigma_{ij}$$

Di mana :

Y_{ij} = kadar alkohol / total asam /pH pada perlakuan konsentrasi ke-i, hari ke-j

μ = nilai rata-rata/efek tetap

α_i = efek konsentrasi ke-i

β_j = efek hari ke-j

Σ_{ij} = efek error/ galat pada konsentrasi ke-i, hari ke-j

