

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Agrobioteknologi, Jurusan Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan September 2015.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan: tepung onggok (Lampiran 3.1.a), aquades, H_2SO_4 2M, molase (Lampiran 3.1.c), fermipan, malt extract, pepton, agar, NaOH, HCl, indikator PP, larutan KOH 0,1 N.

Alat yang digunakan: alat tulis, timbangan analitik, label, Erlenmeyer 250 ml, *glassware*, kompor, labu ukur, termometer, *timer*, autoklaf, pH meter, destilator, petridish, jarum ose, kertas karton, tabung reaksi, batang pengaduk, *rotary shaker*, *dryglasky*, pipet tetes, alkoholmeter, panci, botol jam, plastik, karet, kompor listrik.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini terdiri dari 2 tahap yaitu tahap 1 hidrolisis H_2SO_4 2M dengan rancangan lingkungan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan rancangan perlakuan berupa faktor tunggal dengan 3 perlakuan, yaitu :

- A. Hidrolisis H_2SO_4 dengan lama waktu 3 jam
- B. Hidrolisis H_2SO_4 dengan lama waktu 4 jam
- C. Hidrolisis H_2SO_4 dengan lama waktu 5 jam

Tahap kedua dengan rancangan lingkungan berupa Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan rancangan perlakuan berupa faktor tunggal yaitu kombinasi

perlakuan lama waktu hidrolisis dan konsentrasi molase terhadap fermentasi bioetanol, seperti berikut :

P1. Hidrolisis 3 jam dan Konsentrasi Molase 10%

P2. Hidrolisis 3 jam dan Konsentrasi Molase 15%

P3. Hidrolisis 4 jam dan Konsentrasi Molase 10%

P4. Hidrolisis 4 jam dan Konsentrasi Molase 15%

P5. Hidrolisis 5 jam dan Konsentrasi Molase 10%

P6. Hidrolisis 5 jam dan Konsentrasi Molase 15%

Pada penelitian ini dilakukan dua tahap penelitian, yaitu hidrolisis kemudian penambahan molase. Hal tersebut dilakukan dengan tujuan mendapatkan kadar gula yang lebih tinggi lagi dari kadar gula yang dihasilkan pada proses hidrolisis tepung onggok, dengan tidak sepenuhnya mengandalkan kadar gula tinggi yang diperoleh dari molase 100%. Pengamatan dilakukan berturut-turut selama 7 hari dengan uji kadar pati setelah proses hidrolisis, penambahan molase, dan fermentasi hari 1-7; uji gula total setelah proses hidrolisis, penambahan molase, dan fermentasi hari 1-7; uji pH, jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae*, dan asam tertitrasi pada proses fermentasi hari 1-7; uji kadar etanol setelah proses fermentasi.

D. Cara Penelitian

1. Karakterisasi Tepung Onggok

a. Analisa Kadar Protein (Sudarmadji dkk. 2007)

Uji kandungan protein dilakukan dengan cara menguji kadar Nitrogen dalam sampel (tepung onggok). Selanjutnya mengkonversi kadar nitrogen yang

didapat dengan 6,25. Hasil konversi yang didapat tersebut merupakan kandungan protein dalam sampel.

Cara menguji kadar Nitrogen, dilakukan dengan memasukkan sampel sebanyak 2 gram ke dalam labu Kjeidahl dan menambahkan katalis N (CuSO_4 dan K_2SO_4) 0,7 g, H_2SO_4 pekat 3 ml lalu didestruksi pada suhu 370-410°C dalam lemari asam sampai jernih kurang lebih 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 kemudian dipanaskan. Setelah melalui tahap destruksi, selanjutnya sampel didinginkan dan menambahkan 15 ml H_2O dan 15 ml NaOH 40% yang dimasukkan ke dalam labu destilasi. Hasil destilasi ditampung dalam Erlenmeyer 100 ml yang berisi 25 ml larutan HCl 40% dan meneteskan indikator PP 2-3 tetes. Destilasi berakhir bila semua ammonia terdestilasi sempurna dengan tanda destilat tidak bereaksi basis.

Selanjutnya mentitrasi destilat dengan NaOH 0,1 N. Akhir titrasi ditandai dengan warna merah muda dan tidak hilang selama 30 detik. Selisih jumlah titrasi blanko dan sampel merupakan jumlah ekuivalen Nitrogen. Banyaknya ml NaOH yang digunakan untuk titrasi selanjutnya digunakan untuk menghitung persentase protein.

b. Analisa Kadar Abu (AOAC 2003)

Kandungan abu dalam tepung onggok ditentukan dengan AOAC (2003) dalam Setyo dkk. (2012). Teknik penentuan abu yaitu cawan kosong dan bersih dipanaskan pada suhu 600°C selama 1 jam dalam *muffle furnace*. Mendinginkan cawan tersebut ke dalam desikator kemudian menimbanginya. Berat cawan kosong sebagai W_1 . 1 gram sampel tepung onggok ditaruh dalam cawan (W_2). Selanjutnya meletakkan cawan tersebut ke dalam *muffle furnace* pada suhu 400°C selama 6 jam dan didinginkan dalam desikator. Menimbang cawan dari dalam desikator sebagai W_3 .

c. Analisa Kadar Serat Metode Gravimetri (Sudarmadji dkk. 2007)

Menimbang sampel 1-2 gram yang dimasukkan ke dalam Erlenmeyer 500 ml dan menambahkan 50 ml H_2SO_4 1,25% kemudian dipanaskan dan direflux selama 30 menit. Sampel yang telah dipanaskan, disaring menggunakan kertas saring Whatman 42 yang telah diketahui bobotnya. Selanjutnya mencuci sampel dengan 50 ml H_2SO_4 1,25% dan 50 ml alkohol 36%. Endapan dikeringkan dalam oven pada suhu 105°C dan ditimbang hingga mencapai bobot konstan untuk menghitung kadar serat.

d. Analisa Kadar Air (AOAC 2003)

Kadar air ditentukan dengan mengeringkan sampel tepung onggok (W_1) ke dalam oven pada suhu 80 °C dan didinginkan di dalam desikator kemudian ditimbang. Pengeringan dilakukan berulang ulang hingga beratnya konstan (W_2). Terakhir, menghitung kadar air.

e. Analisa Kadar Lemak (Sudarmadji dkk. 1984)

Pengujian kadar lemak dilakukan dengan menimbang berat selongsong/kertas saring dan menimbang juga berat selongsong dan sampel 1 gram kemudian menimbang berat selongsong dan sampel serta kapas. Selanjutnya kertas saring, sampel, dan kapas dimasukkan ke dalam oven sampai beratnya konstan kemudian ditimbang. Selanjutnya dimasukkan ke dalam soxhlet selama 4 jam menggunakan pelarut petroleum eter (PE) dan dimasukkan ke dalam oven hingga berat konstan lalu ditimbang.

f. Analisa Karbohidrat metode Nelson-Samogyi (Sudarmadji dkk. 1984)

Karbohidrat dalam bentuk gula dan pati dapat dianalisis dengan metode Nelson-Samogyi secara spektrofotometri. 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 aquades sampai volume akhir 10 ml, kemudian diambil 1 ml ditambah dengan 9 ml aquades dan digojog dengan vorteks. 1 ml larutan 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 arsenomolybdat. Larutan sampel digojog, kemudian ditambahkan aquades 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.

Untuk menggambarkan kurva hubungan kadar dan absorbansi, dapat digunakan metode kuadrat terkecil (*Least-Square*) agar diperoleh garis lurus yang konstan. Metode sering digunakan untuk menentukan ketepatan garis yang terbaik pada kurva baku (standar).

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

1. Isolasi dan Perbanyakkan *Saccharomyces cerevisiae*

a. Sterilisasi Alat dan Media

Mengisi tabung autoklaf sampai tanda kemudian meletakkan alat atau media yang akan disterilisasi ke dalam autoklaf. Menutup autoklaf dengan penunjuk tekanan menghadap ke depan kemudian mengencangkan pengunci secara bersamaan untuk pengunci yang saling berhadapan. Menyalakan kompor dengan posisi katup uap terbuka. Menutup katup saat diperoleh air telah mendidih dan keluar uap dari autoklaf yang telah dibiarkan selama 5 menit. Selanjutnya tekanan akan naik sampai 1 atm dan mempertahankannya sampai sterilisasi selesai (untuk alat 30 menit, media 15-20 menit, serta alat dan media 25 menit). Mematikan kompor setelah proses sterilisasi selesai dan menunggu tekanan turun sampai 0. Selanjutnya membuka pengunci autoklaf dan mengeluarkan alat atau bahan yang disterilisasi menggunakan sarung tangan tahan panas. Beberapa alat yang perlu disterilisasi untuk persiapan *plating* diantaranya petridish, tabung reaksi, Erlenmeyer, dryglaski, jarum ose, dan mikropipet.

b. Persiapan Air Steril untuk Pengenceran

Air steril untuk pengenceran pada tabung reaksi dan botol suntik dapat dibuat dengan mencuci bersih tabung reaksi dan botol suntik yang telah direbus dan dikeringkan. Selanjutnya mengisi aquades sebanyak 9 ml untuk tabung reaksi dan 99 ml untuk botol suntik dan disterilisasi menggunakan autoklaf. Botol suntik ditutup menggunakan plastik dan diikat karet. Tabung reaksi ditutup dengan pengumpat kapas dan dibungkus dengan kertas koran yang diikat karet.

c. Pembuatan Medium MEA

Banyaknya komposisi bahan MEA yang disiapkan tergantung dari volume MEA yang akan dibuat. 1000 ml MEA membutuhkan komposisi bahan berupa *malt extract* 30 gram, pepton 5 gram, dan agar 15 gram. Setelah bahan tersebut disiapkan, langkah selanjutnya yaitu memasukkan *malt extract*, pepton, dan aquades ke dalam beaker glass kemudian diaduk sampai homogen dan memasaknya hingga mendidih. Menuang larutan tersebut ke dalam Erlenmeyer yang telah diberi agar sesuai takaran dan menggojog larutan tersebut hingga homogen dan selanjutnya mengukur pH hingga media mencapai pH 4,8-5 dan di destilasi menggunakan Autoklaf. Menuang media tersebut sesuai kebutuhan (untuk petridish 8 ml dan tabung miring 5 ml).

d. Isolasi *Saccharomyces cerevisiae* dari Fermipan

Menimbang 1 gram fermipan yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi dan menambahkan 9 ml aquades steril (10^{-1}) kemudian dikocok hingga homogen. Mengambil 1 ml larutan aquades steril dan fermipan dalam tabung reaksi (pengenceran 10^{-1}) menggunakan pipet ukur kemudian memindahkannya ke

dalam tabung reaksi kedua dan menambahkan 9 ml aquadest steril (pengenceran 10^{-2}). Hal yang sama terus dilakukan hingga pengenceran 10^{-9} .

Membiakkan *Saccharomyces cerevisiae* dengan larutan hasil pengenceran pada medium MEA dengan cara mengambil 1 ose yang disebar pada permukaan medium MEA secara *streak* dan mendiampkannya selama 72 jam hingga koloni *Saccharomyces cerevisiae* tumbuh.

e. Karakterisasi *Saccharomyces cerevisiae*

Mengambil 1 ose koloni tunggal *Saccharomyces cerevisiae* hasil streak yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml air steril kemudian dikocok homogen. Selanjutnya, mengambil 0,1 ml dari larutan tersebut dan meletakkannya ke permukaan medium MEA dengan cara *streak* dan didiamkan selama 72 jam. Mencocokkan koloni yang tumbuh dengan kesesuaian karakteristik koloni *Saccharomyces cerevisiae* hingga didapatkan koloni yang sama seluruhnya (seragam) dalam petridish. Karakteristik koloni *Saccharomyces cerevisiae* secara makroskopik yaitu koloni berbentuk bulat, warna kuning muda, permukaan berkilau, licin, tekstur lunak (Lampiran 3.1.d). Karakteristik koloni secara mikroskopik yaitu sel bulat dengan askospora saat diamati menggunakan mikroskop.

f. Perbanyakan *Saccharomyces cerevisiae*

Setelah didapatkan koloni yang seragam dari karakterisasi dan dapat dinyatakan sebagai *Saccharomyces cerevisiae*, selanjutnya mengambil 1 ose dari koloni tersebut untuk dipindahkan ke satu MEA miring dan mendiampkannya selama 72 jam. Pada penelitian ini, akan dilakukan 15 kali perbanyakan, 2 kali

perbanyak sebagai kultur stok dan 13 kali perbanyak yang akan digunakan untuk fermentasi sebanyak 126 perlakuan.

g. Pembuatan Inokulum *Saccharomyces cerevisiae* sebagai starter fermentasi

Memindahkan 2 ose koloni ke masing-masing 3 tabung MEC 9 ml untuk setiap perlakuan dan diinkubasi selama 72 jam sampai *Saccharomyces cerevisiae* tumbuh. Selanjutnya memindahkan 3 tabung MEC tersebut ke Erlenmeyer 250 ml yang berisi MEC dengan volume 140 ml untuk setiap perlakuan dan melakukan shaker Erlenmeyer tersebut selama 48 jam.

Volume inokulum 140 ml dari setiap Erlenmeyer 250 ml ditentukan dari 10% volume media fermentasi. Volume media fermentasi dari setiap unit percobaan dihitung dari jumlah komponen media, berupa 40 gram tepung onggok dan 160 ml aquades. 10% dari setiap volume media fermentasi 200 ml adalah 20 ml. Setiap perlakuan dilakukan uji dan pengamatan berurutan selama 7 hari, sehingga total volume inokulum dari setiap perlakuan adalah 140 ml (20 ml x 7 hari) yang disiapkan dalam 1 erlenmeyer.

Volume inokulum MEC 9 ml sebanyak 3 tabung dan 2 ose koloni *Saccharomyces cerevisiae* dari setiap tabung ditentukan dari 20% volume inokulum 140 ml pada Erlenmeyer. Berdasarkan uji pendahuluan yang telah dilaksanakan, 20% volume inokulum pada tabung memiliki viabilitas sel $3,92 \times 10^9$ yang telah memenuhi standar 1×10^{-7} sampai 1×10^{-9} .

2. Persiapan Bahan Baku Tepung Onggok

a. Pengeringan Onggok

Membuat tepung onggok dengan cara mengeringkan onggok basah yang didapat dari produksi tapioka dibawah sinar matahari selama 2-3 hari atau pengeringan oven dengan suhu 80°C selama 4 jam. Menghaluskan onggok kering tersebut dengan cara giling atau *grinder* menjadi tepung onggok dan siap digunakan.

b. Pemasakan dan Pencairan Tepung Onggok

Memasukkan tepung onggok dan aquades dengan perbandingan 1:4, yaitu 40 gram tepung onggok dan 160 ml aquades untuk 126 botol jam sehingga total dibutuhkan 5040 gram tepung onggok dan 20.160 ml aquades, kemudian memasak tepung onggok tersebut menjadi bubur onggok (Lampiran 3.1.b) menggunakan panci hingga memiliki tekstur menggeliat rata seperti lem atau mencapai suhu 82°C. Setelah mendidih, bubur onggok didiamkan hingga dingin kemudian dibagi dengan volume per 200 ml ke 126 botol jam yang telah diberi label perlakuan. Menghitung kadar pati pada bubur onggok sebelum melaksanakan hidrolisis bubur onggok.

Penentuan perbandingan tepung onggok dan aquades berdasarkan penelitian Edi dkk. (2009) yang memberikan hasil kadar bioetanol dari singkong berkisar 85%-95% dengan perbandingan singkong dan air 1:4 menggunakan teknik hidrolisis penambahan enzim α -amilase 200 ppm dan glukosa amilase 150 ppm.

3. Hidrolisis Tepung Onggok

Menambahkan larutan H_2SO_4 2M sebanyak 3% dari volume media dengan lama waktu 3 jam, 4 jam, dan 5 jam sesuai perlakuan ke dalam masing-masing bubur onggok. Selanjutnya memasukkan Erlenmeyer berisi bubur onggok tersebut ke dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit, kemudian didinginkan. Menghitung kadar pati dan gula total setelah hidrolisis bubur onggok.

Banyaknya H_2SO_4 2M sebanyak 3% yang akan digunakan ditentukan berdasarkan penelitian Yusrin dkk. (2010) yang memberikan hasil kadar etanol tertinggi pada onggok yaitu sebesar 9,11% dari perlakuan hidrolisis H_2SO_4 3% selama 3 jam. Penelitian Citra dkk. (2012) yang memberikan hasil kadar etanol tertinggi pada kayu karet yaitu 4,60% yang diperoleh dari perlakuan hidrolisis H_2SO_4 3%.

4. Fermentasi Tepung Onggok

Menambahkan molase dengan konsentrasi 10% dan 15% ke dalam masing-masing hidrolisat bubur onggok sesuai perlakuan (Lampiran 3.2.a) kemudian melakukan uji pati dan gula total. Selanjutnya membuat kondisi substrat fermentasi tersebut sesuai untuk *Saccharomyces cerevisiae* beraktivitas, yaitu dengan mengatur pH substrat fermentasi 4-5, suhu optimum $28-30^\circ\text{C}$. Selanjutnya, memasukkan masing-masing 20 ml inokulum *Saccharomyces cerevisiae* ke dalam masing-masing perlakuan. Menutup medium dengan plastik dan diikat menggunakan karet. Langkah selanjutnya memfermentasi masing-masing perlakuan selama 1,2,3,4,5,6, dan 7 hari (Lampiran 3.2.b). Melakukan uji

pati, gula total, pH, asam tertitrasi, dan menghitung jumlah sel *Saccharomyces cerevisiae* yang tumbuh menggunakan metode *plate count*.

Lama fermentasi 1,2,3,4,5,6,7 hari ditentukan berdasarkan penelitian Sutiyono dkk. (2013) yang memberikan hasil kadar etanol tertinggi pada onggok yaitu 15,82% diperoleh pada fermentasi 6 hari dengan starter *Saccharomyces cerevisiae* 10%. Selain lama fermentasi 6 hari, kadar etanol pada penelitian Sutiyono dkk. (2013) juga tidak jauh beda pada perlakuan fermentasi 8 hari yaitu 15,23%. Selanjutnya, penelitian Akyunul (2008) yang memberikan hasil kadar etanol onggok tertinggi yaitu 19% diperoleh dari lama fermentasi 7 hari dengan dosis *Saccharomyces cerevisiae* 10%.

5. Destilasi

Memisahkan larutan dari residu kemudian memasukkan larutan tersebut ke dalam destilator untuk dihasilkan etanol. Selanjutnya menghitung kadar etanol dari fermentasi hari 1,2,3,4,5,6, dan 7 serta menghitung efisiensi fermentasi.

6. Uji Parameter Penelitian

a. Kadar Gula dan Pati metode Nelson Samogyi

Karbohidrat dalam bentuk gula dan pati dapat dianalisis dengan metode Nelson-Samogyi secara spektrofotometri. 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 aquades sampai volume akhir 10 ml, kemudian diambil 1 ml ditambah dengan 9 ml aquades dan digojog dengan vorteks. 1 ml larutan 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 arsenomolybdat. Larutan sampel digojog, kemudian ditambahkan aquades 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.

Untuk menggambarkan kurva hubungan kadar dan absorbansi, dapat digunakan metode kuadrat terkecil (*Least-Square*) agar diperoleh garis lurus yang konstan. Metode ini sering digunakan untuk menentukan ketepatan garis yang terbaik pada kurva baku (standar).

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

b. Uji pH dengan pH meter

Pengamatan pH berfungsi sebagai indikator pertumbuhan *Saccharomyces cerevisiae*. Caranya dengan memasukkan kertas pH ke dalam media fermentasi dan mencocokkan warna yang dihasilkan pada label tempat pH (Lampiran 3.3.a).

c. Uji Asam Total (metode Titrasi)

Mengukur keadaan tingkat keasaman pada larutan sampel menggunakan metode titrasi KOH 0,1 N yaitu memasukkan larutan contoh sebanyak 25 ml ke dalam Erlenmeyer dengan menambahkan indikator PP sebanyak 1-3 tetes kemudian dititrasi dengan KOH 0,1 N sampai terjadi perubahan warna menjadi merah jambu (Lampiran 3.3.b). Presentase total asam tertitrasi dimaksudkan untuk mengetahui jumlah asam yang dihasilkan dalam proses sakarifikasi dan fermentasi

dari pengaruh macam inokulum secara kuantitatif. Asam adalah bentuk lain dari hasil proses sakarifikasi dan fermentasi suatu biomassa. Pada proses sakarifikasi, asam terbentuk bersamaan dengan proses sakarifikasi. Pengamatan dilakukan pada hari 1,2,3,4,5,6,dan 7 dengan menggunakan metode titrasi KOH.

d. Jumlah Sel *Saccharomyces cerevisiae*

Mengencerkan 1 ml cairan hasil fermentasi secara bertingkat sampai 10^{-9} ml dengan cara mengambil 1 ml larutan sampel hasil fermentasi kemudian memasukkannya ke dalam botol suntik yang berisi 99 ml aquades steril (pengenceran 10^{-2}). Menggojog sampai homogen. Membuat seri pengenceran kelipatan $10^{-4} - 10^{-6}$ kemudian dilanjutkan dengan pengenceran kelipatan 10^{-7} sampai 10^{-8} dengan mengambil 1 ml pada pengenceran sebelumnya ke dalam tabung reaksi yang berisi aquades steril 9 ml. Menyiapkan petridish dengan 3 kali pengulangan untuk setiap pengenceran yang berisi medium MEA kurang lebih 8 ml dan masing-masing diberi label untuk pengenceran $10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}$ sesuai perlakuan. Menginokulasikan masing-masing suspensi hasil pengenceran $10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}$ sebanyak 0,1 ml pada petridish yang berisi medium. Meratakan suspensi mikrobial dengan menggunakan driglasky steril. Menginokulasikan petridish yang berisi mikrobial pada temperatur kamar (Lampiran 3.3.c), kemudian menghitung jumlah mikrobial yang tumbuh menggunakan metode *plate count*.

e. Kadar Bioetanol

Kadar bioetanol dihitung menggunakan alat Alkoholmeter dengan cara memasukkan destilat sebanyak 100 ml ke dalam gelas ukur kemudian alkoholmeter dicelupkan ke dalam destilat. Batas yang tercelup pada permukaan

destilat menunjukkan kadar alkohol pada sampel yang diuji. Tahapan penelitian bioetanol tepung onggok terlampir pada lampiran 3.

E. Parameter yang Diamati

1. Karakterisasi Tepung Onggok

a. Analisa Kadar Protein

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

b. Analisa Kadar Abu

$$\% \text{ Abu} = \frac{w_2 - w_3}{\text{berat sampel}} \times 100\%$$

Keterangan : W_2 = berat cawan + 1 gram sampel (g)
 W_3 = berat cawan + sampel dari desikator (g)

c. Analisa Kadar Serat Metode Gravimetri

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

Keterangan : a = berat kertas saring ditambah sampel kering (g)
 b = berat kertas saring (g)
 c = berat sampel (g)

d. Analisa Kadar Air

$$\% \text{ Moisture} = \frac{w_1 - w_2}{w_1} \times 100\%$$

Keterangan : W_1 = berat pengeringan sampel pertama
 W_2 = berat pengeringan sampel terakhir (konstan)

e. Kadar Lemak

Pengujian kadar lemak dilakukan sebelum penelitian/prapenelitian dengan menggunakan rumus :

$$\text{Kadar Lemak} = \frac{d - e}{b - a} \times 100\%$$

Keterangan : a = berat selongsong/kertas saring
 b = berat selongsong dan sampel
 c = berat selongsong dan sampel serta kapas
 d = kertas saring, sampel, dan kapas beratnya konstan
 e = berat konstan

f. Kadar Gula dan Pati

Kadar Gula dihitung menggunakan persamaan *Least-Square* yang menjelaskan satu garis lurus (linier) :

$X = aY + b$, dengan :

X (absis) = kadar larutan glukosa standar (mg/100 ml)
 Y (ordinat) = Absorbansi (tanpa enzim amilase)
 a dan b = tetapan yang dihitung dari persamaan :

$$a = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{(\sum y^2)(\sum y^2)}$$

$$b = \frac{(\sum y^2)(\sum x) - (\sum y)(\sum xy)}{N(\sum y^2)(\sum y^2)}$$
 dengan
 N = Banyaknya pengamatan

Kadar Pati dihitung dengan rumus: (Kadar gula setelah diberi enzim amilase – kadar gula tanpa enzim amilase) x 0,9.

7. Proses Hidrolisis

a. Kadar Gula dan Pati

Kadar Gula dihitung menggunakan persamaan *Least-Square* yang menjelaskan satu garis lurus (linier) :

$X = aY + b$, dengan :

X (absis) = kadar larutan glukosa standar (mg/100 ml)
 Y (ordinat) = Absorbansi (tanpa enzim amilase)
 a dan b = tetapan yang dihitung dari persamaan :

$$a = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{(\sum y^2)(\sum y^2)}$$

$$b = \frac{(\sum y^2)(\sum x) - (\sum y)(\sum xy)}{N(\sum y^2)(\sum y^2)}$$
 dengan
 N = Banyaknya pengamatan

Kadar Pati dihitung dengan rumus: (Kadar gula setelah diberi enzim amilase – kadar gula tanpa enzim amilase) x 0,9.

b. Uji Asam Total

Menghitung kadar asam tertitiasi menggunakan rumus :

$$\text{Kadar Asam Tertitiasi} = \frac{(\text{ml KOH} \times \text{N KOH} \times \text{BE asam asetat} \times 100\%)}{\text{berat sampel (mg)}}$$

Keterangan : ml KOH = volume KOH yang digunakan untuk titrasi
 N KOH = normalitas KOH yang digunakan untuk titrasi
 BE asam malat = bilangan equivalen asam malat (67)

8. Proses Fermentasi

a. Kadar Gula dan Pati

Kadar Gula dihitung menggunakan persamaan *Least-Square* yang menjelaskan satu garis lurus (linier) :

$X = aY + b$, dengan :

X (absis) = kadar larutan glukosa standar (mg/100 ml)

Y (ordinat) = Absorbansi (tanpa enzim amilase)

a dan b = tetapan yang dihitung dari persamaan :

$$a = \frac{N(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{(\sum y^2)(\sum y^2)}$$

$$b = \frac{(\sum y^2)(\sum x) - (\sum y)(\sum xy)}{N(\sum y^2)(\sum y^2)}$$

N = Banyaknya pengamatan

Kadar Pati dihitung dengan rumus: (Kadar gula setelah diberi enzim amilase – kadar gula tanpa enzim amilase) X 0,9.

b. Uji Asam Total

Menghitung kadar asam tertitiasi menggunakan rumus :

$$\text{Kadar Asam Tertitiasi} = \frac{(\text{ml KOH} \times \text{N KOH} \times \text{BE asam asetat} \times 100\%)}{\text{berat sampel(mg)}}$$

Keterangan :

ml KOH = volume KOH yang digunakan untuk titrasi

N KOH = normalitas KOH yang digunakan untuk titrasi

BE asam malat = bilangan equivalen asam malat (67)

c. Uji pH

Menggunakan alat pH meter.

d. Jumlah Sel *Saccharomyces cerevisiae*

Jumlah sel = $(X_1 + X_2 + \dots + X_n) : n$

Keterangan :

X_1, X_2, \dots, X_n = jumlah sel terhitung sesuai syarat pada ulangan 1,2,...
hingga ulangan ke n

n = jumlah banyaknya ulangan

dengan beberapa syarat :

- a. Jumlah koloni tiap cawan petri antara 30-300 koloni.
- b. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan (*spreader*) perbandingan jumlah koloni dari pengenceran berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dari pengenceran sebelumnya. Jika sama atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya rata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya.
- c. Jika dengan ulangan setelah memenuhi syarat maka hasilnya dirata-rata.

e. Uji Kadar Bioetanol

Menggunakan alat Alkoholmeter. Nilai yang terbaca pada alat dicatat dan kadar alkohol

F. Analisis Data

Data hasil pengamatan periodik di analisis menggunakan grafik. Selanjutnya, hasil data yang diperoleh dianalisis data menggunakan sidik ragam dengan uji F pada taraf 5%. Apabila ada beda nyata antar perlakuan yang dicobakan maka dilakukan uji *Duncan Multiple Range Test* (DMRT).

