BAB 3
METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan selama tujuh bulan yang dilaksanakan dari bulan Januari-Juli 2025. Tempat pelaksanan penelitian ini adalah di Laboratorium Bahan Alam Program Studi Farmasi S1 Fakultas Ilmu Kesehatan Universitas Bhamada Slawi.

3.2 Alat dan Bahan

3.2.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah satu set *gas chromatography* (GC) (Agilent 7890B) dengan menggunakan detektor FID (*Flame Ionization Detector*) dan kolom HP-5 (panjang 30 m dan diameter 320 µm), timbangan analitik (HWH DJ602B), gelas beker (Pyrex), gelas ukur (Pyrex), tabung reaksi (Pyrex), rak tabung reaksi, mikropipet (Socorex), *microtube* 2 mL, vial kaca bening 1,5 mL (Aijiren), pipet tetes, dan saringan.

3.2.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah kulit buah nanas, kulit buah jeruk berastagi, gula aren (MS), air PDAM, etanol, aquadest, gas H_2, gas N_2, gas O_2, dan kertas saring.

3.3 Rancangan Penelitian

Jenis penelitian yang dilakukan adalah penelitian eksperimental di laboratorium yang meliputi pengumpulan bahan, sortasi basah, pembuatan ekoenzim, pembuatan kurva kalibrasi standar etanol, preparasi sampel, uji

kualitatif alkohol, analisis kadar alkohol dengan metode *gas chromatography* (GC), dan analisis data.

3.3.1 Variabel Bebas

Variabel bebas pada penelitian ini adalah variasi waktu fermentasi ekoenzim dari kulit buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dan jeruk berastagi (*Citrus x aurantium* L.).

3.3.2 Variabel Terikat

Variabel terikat pada penelitian ini adalah kadar alkohol ekoenzim dari kulit buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dan jeruk berastagi (*Citrus x aurantium* L.) dengan berbagai variasi waktu fermentasi.

3.3.3 Variabel Terkontrol

Variabel terkontrol pada penelitian ini adalah pengambilan bahan, komposisi bahan, pemilihan jenis gula, dan metode analisis.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekoenzim

Pengumpulan kulit buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dan jeruk berastagi (*Citrus x aurantium* L.) diperoleh dari salah satu penjual buah nanas dan penjual buah di Desa Slawi Kulon, Kecamatan Slawi, Kabupaten Tegal, Jawa Tengah. Sortasi basah dilakukan terhadap limbah buah yang sudah matang dan berwarna kuning/jingga dengan kondisi tidak busuk, rusak, maupun berminyak. Pencucian dilakukan menggunakan air mengalir. Pembuatan ekoenzim dilakukan dengan mencampurkan gula aren, limbah organik, dan air (1:3:10) ke dalam wadah plastik, kemudian ditutup rapat agar proses fermentasi anaerob dapat berlangsung (Irianto et al., 2023; Suprayogi et al., 2022).

3.4.2 Preparasi Sampel

Ekoenzim disaring menggunakan saringan untuk memisahkannya dari potongan bahan organik. Filtrat yang didapatkan selanjutnya disaring kembali menggunakan kertas saring sebanyak empat kali untuk mengurangi bahan organik yang tersisa seminimal munngkin. Filtrat yang didapat selanjutnya disimpan dalam botol kaca coklat dan disimpan dalam lemari es pada suhu 4°C sebelum dilakukan pengujian.

Sampel yang telah dihomogenkan diambil sebanyak 1 mL, kemudian disentrifugasi apabila sampel keruh atau terdapat endapan. Sampel yang telah jernih dimasukkan ke dalam vial GC 2 mL.

3.4.3 Uji Organoleptis dan Uji pH

Parameter tampilan fisik pada ekoenzim dari kulit buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dan jeruk berastagi (*Citrus x aurantium* L.) dianalisis menggunkan uji organoleptis dengan tujuan memberikan penilaian terhadap karakteristik mutu ekoenzim. Sedangkan, pH ekoenzim ditentukan dengan menggunakan pH indikator universal. Stik pH indikator universal dicelupkan ke dalam sampel ekoenzim, kemudian ditunggu beberapa detik, lalu warna yang berubah dicocokan dengan warna-warna yang tertera pada kotak pH indikator universal (Suprayogi et al., 2022).

3.4.4 Uji Kualitatif Alkohol

Uji kualitatif alkohol pada ekoenzim dari kulit buah nanas (*Ananas comosus* (L.) Merr.) dan jeruk berastagi (*Citrus x aurantium* L.) menggunakan uji iodoform.

Uji kualitatif alkohol dilakukan dengan mereaksikan 5 mL larutan sampel dengan 1 mL NaOH 1 N, kemudian setelah 3 menit ditambahkan dengan 2 mL Iodium 0,1 N. Sampel dikatakan positif mengandung etanol apabila timbul bau iodoform dan terbentuk endapan kuning dalam waktu 30 menit (Pramiastuti et al., 2020; Rejeki et al., 2025).

3.4.5 Pembuatan Kurva Kalibrasi Standar Etanol

Pembuatan kurva kalibrasi standar etanol dilakukan di LPPT UGM menggunakan metode berdasarkan LPPT UGM. Pada pembuatan kurva kalibrasi, etanol digunakan sebagai larutan standar. Larutan deret standar etanol dibuat dengan konsentrasi 0,780; 1,561; 3,122; 6,244; 12,488; dan 24,975 %v/v melalui rumus pengenceran. Larutan standar etanol dibuat dengan pengenceran dalam labu ukur 50 mL, kemudian dipindahkan ke dalam botol kaca 100 mL dengan kondisi yang tertutup rapat dan disimpan dalam kulkas (suhu 4°C) untuk mengurangi penguapan etanol.

3.4.6 Analisis Kadar Alkohol

Pengujian dilakukan di LPPT UGM menggunakan metode berdasarkan LPPT UGM. Analisis kadar alkohol dilakukan dengan menginjeksikan 1 µL sampel yang sudah dipreparasi ke instrumen GC Agilent 7890B dengan kolom HP-5. Pengaturan instrumen GC dilakukan pada suhu injektor 200°C, tekanan 3,8141 psi, *total flow* 38,7 mL/min, *column flow* 0,7 mL/min, *purge flow* 3 mL/min, suhu detektor FID (*Flame Ionization Detector*) 210°C, dan split rasio (50:1). Laju alir

gas hidrogen 40 mL/menit dan laju air gas oksigen 400 mL/menit. Suhu awal kolom 45°C ditahan selama 5 menit, kemudian suhu dinaikkan secara bertahap sebesar 30°C per menit hingga suhu akhir kolom 110°C.

Perhitungan konsentrasi etanol dilakukan dengan cara berikut:

$$\text{Konsentrasi etanol dalam sampel} = \frac{(\text{Konsentrasi Pembacaan Alat x Volume Akhir})}{\text{Volume Sampel}}$$

3.5 Analisis Data

Data kadar alkohol ekoenzim dari kulit buah nanas (*Ananas comosus (L.) Merr.*) dan jeruk berastagi (*Citrus x aurantium* L.) dianalisis secara statistik menggunakan SPSS meliputi uji normalitas dan uji parametrik (*One-Sample T Test*) untuk mengetahui pengaruh lama variasi waktu fermentasi terhadap kadar alkohol ekoenzim.