

III. BAHAN DAN METODE

3.1 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Kimia/Biokimia Hasil Pertanian dan Laboratorium Mikrobiologi Hasil Pertanian Jurusan Teknologi Hasil Pertanian, Fakultas Pertanian, Universitas Lampung pada bulan September 2011 sampai dengan November 2011.

3.2 Bahan dan Alat

Bahan baku yang digunakan dalam penelitian ini adalah CPO dan inti sawit (*kernel*) yang diperoleh dari Perusahaan Perseroan (Persero) PT Perkebunan Nusantara VII Unit Usaha Rejosari Kecamatan Natar Lampung Selatan. Bahan lain yang digunakan yaitu santan kelapa untuk pengujian stabilitas emulsi. Bahan kimia penunjang terdiri dari etanol teknis 96%, HCl teknis 35%, NaOH, heksana teknis dan aquades. Kultur mikroba yang digunakan dalam penelitian ini yaitu bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*). Media yang digunakan adalah NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*).

Alat-alat yang digunakan terdiri dari *hotplate-magnetic stirrer*, labu pemisah (*separating funnel*) 500 ml, kertas saring kasar, oven, tabung reaksi, tabung

sentrifuse, lemari pendingin, penangas air, autoklaf, cawan petri, mikropipet, lampu bunsen, jarum ose, *vorteks*, jangka sorong, sentrifuse 4000 rpm, timbangan analitik, termometer dan alat-alat gelas penunjang.

3.3 Metode Penelitian

Penelitian ini menggunakan perlakuan tunggal yaitu tingkat reaksi etanolisis yang terdiri dari 3 taraf (tingkat 1, tingkat 2 dan tingkat 3) sebanyak 3 kali ulangan. Reaksi etanolisis dilakukan pada suhu 40°C (Murhadi dan Zuidar, 2009) selama 8 menit pada kecepatan putar 1000 rpm. Data yang diperoleh disajikan dalam bentuk gambar histogram atau tabel (termasuk St. Dev) dan dibahas secara deskriptif.

3.4 Pelaksanaan Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini dilakukan dalam empat tahap yang meliputi :

(1) Persiapan bahan, (2) Persiapan Pelarut Etanol- NaOH, (3) Produksi produk etanolisis dari PKO dan CPO secara bertingkat yaitu : tingkat 1, tingkat 2 dan tingkat 3, (4) Pengamatan yang terdiri dari perhitungan nilai rendemen, pengujian aktivitas antimikroba dan daya stabilitas emulsi produk etanolisis campuran PKO dan CPO.

3.4.1 Persiapan bahan CPO dan PKO

Bahan utama CPO dan inti sawit (*kernel*) segar diperoleh dari Perusahaan Perseroan (Persero) PT Perkebunan Nusantara VII Unit Usaha Rejosari Kecamatan Natar Lampung Selatan. Selanjutnya CPO disaring menggunakan

kertas saring kasar sehingga dihasilkan CPO yang jernih dan bebas kotoran, lalu dikemas di dalam botol berwarna dan bertutup, disimpan pada suhu ruang.

PKO diperoleh dengan cara mengekstrak minyak yang terdapat pada inti sawit menggunakan pelarut heksana. Inti sawit yang diperoleh dari pabrik dikeringkan terlebih dahulu di dalam oven pada suhu 60°C selama 3-4 jam untuk mengurangi kandungan air inti sawit. Kemudian inti sawit dilakukan pengecilan ukuran dengan cara menumbuk. Selanjutnya dilakukan ekstraksi dengan teknik maserasi (perendaman menggunakan pelarut) selama 1 x 24 jam. Perbandingan antara inti sawit dan pelarut heksana yang digunakan yaitu 1:1 (b/v). Selanjutnya dilakukan penyaringan sehingga dihasilkan filtrat, dihilangkan sisa-sisa pelarutnya dengan cara dioven hingga diperoleh berat konstan. PKO yang diperoleh dikemas di dalam botol berwarna dan bertutup, disimpan pada suhu ruang sebagai stok PKO untuk pelaksanaan penelitian (Murhadi dan Zuidar 2009) dengan modifikasi tanpa proses ekstraksi menggunakan soxhlet.

3.4.2 Persiapan pelarut Etanol – NaOH 1%

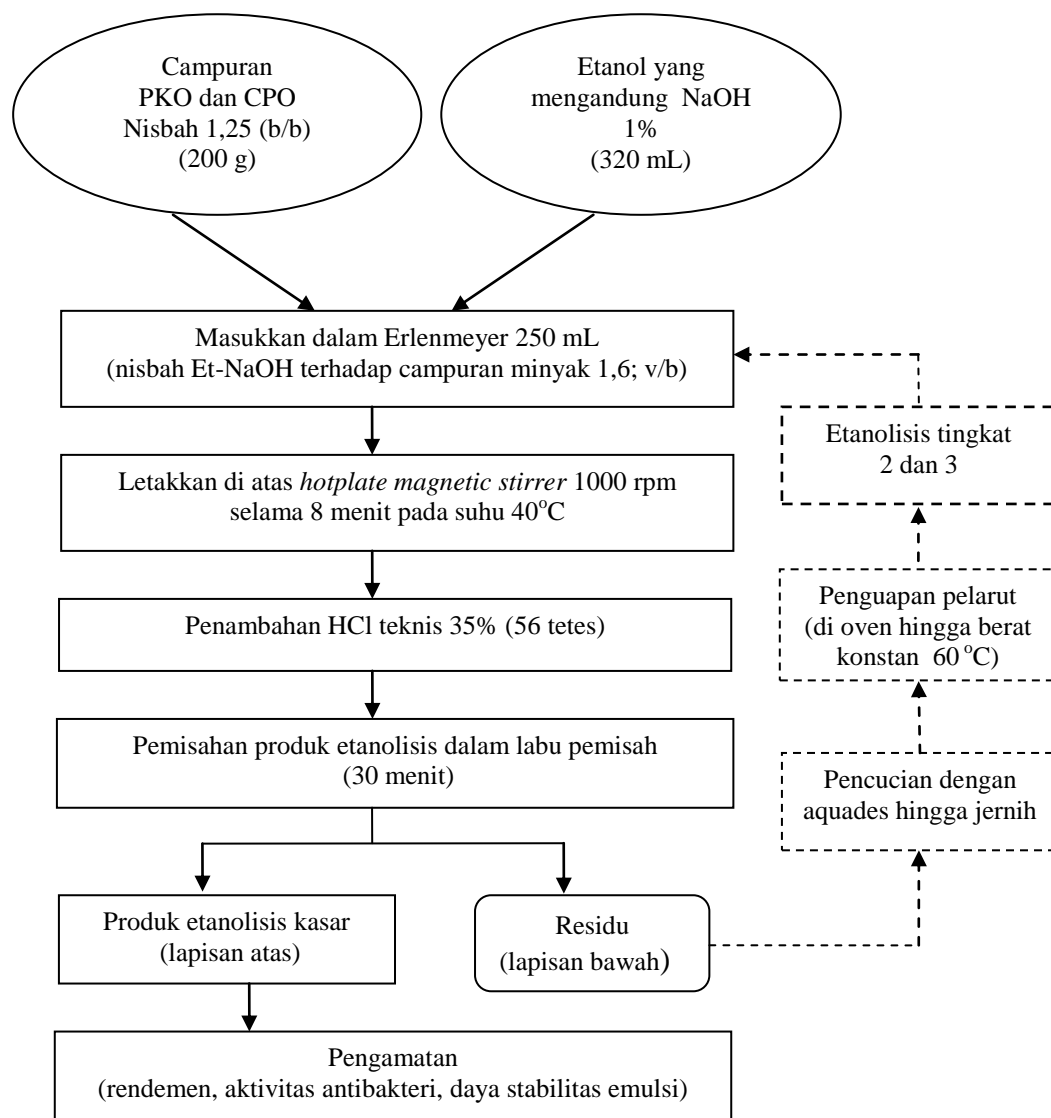
Pelarut etanol-NaOH 1% adalah bahan yang digunakan untuk proses etanolisis dengan reaksi bertingkat. Nisbah etanol yang telah mengandung NaOH 1% terhadap campuran PKO dan CPO yang digunakan adalah 1,6 (v/b) berdasarkan hasil penelitian sebelumnya (Murhadi dan Zuidar, 2009). NaOH ditimbang sesuai dengan yang dibutuhkan yaitu 2,00 gram untuk reaksi etanolisis tingkat 1 tiap ulangan. Reaksi etanolisis pada penelitian ini menggunakan etanol 96%, sedangkan etanol yang tersedia adalah etanol 100% sehingga dilakukan pengenceran menggunakan aquades.

Pembuatan pelarut etanol- NaOH 1% diawali dengan mencampurkan aquades dengan NaOH yang telah ditimbang. Keduanya dilarutkan dalam gelas beker secara perlahan lahan karena akan menimbulkan panas. Setelah selesai semua yaitu NaOH telah larut dalam aquades maka larutan tersebut dimasukkan dalam etanol kemudian dikocok hingga semuanya tercampur. Pelarut tersebut disimpan di dalam botol kaca dan digunakan sebagai bahan untuk proses etanolisis.

3.4.3 Produksi produk etanolisis dari campuran PKO dan CPO

Produksi produk etanolisis dilakukan mengikuti metode Hasanuddin *et al* (2003); Murhadi dan Zuidar (2009) dengan modifikasi. Sejumlah campuran 200 gram PKO (g) dan CPO (g) dengan nisbah PKO/CPO (b/b) 1,25 yaitu PKO sebanyak 111,12 gram dan CPO sebanyak 88,88 gram ditambahkan ke dalam pelarut etanol (mL) yang telah mengandung NaOH 1% (b/b campuran minyak) di dalam erlenmeyer 250 mL dengan nisbah etanol-NaOH terhadap campuran minyak adalah 1,6 (v/b), lalu diaduk di atas *hotplate-magnetic stirrer* (1000 rpm) selama 8 menit pada suhu ($40 \pm 1^\circ\text{C}$). Reaksi dihentikan menggunakan larutan HCl 35% sebanyak 56 tetes. Campuran produk reaksi dimasukkan ke dalam labu pemisah dan dibiarkan selama 30 menit, sehingga telah terlihat jelas pemisahan antar lapisan. Lapisan atas (produk etanolisis kasar) dipisahkan dari lapisan bawah (sisa PKO dll). Lapisan atas dibebaskan pelarutnya dengan penguapan etanol sisa di dalam oven hingga berat konstan. Lapisan bawah dicuci menggunakan aquades sebanyak tiga kali hingga air pencucian berwarna bening. Kemudian lapisan bawah di oven untuk menguapkan sisa air pencucian hingga diperoleh lapisan bawah dengan berat konstan. Selanjutnya lapisan bawah digunakan sebagai

media etanolisis tingkat ke dua dan seterusnya hingga tingkat tiga sesuai dengan prosedur di atas. Berat produk etanolisis kasar dapat ditentukan secara tidak langsung dengan cara menghitung berat campuran PKO dan CPO awal (sebelum reaksi) dikurangi berat sisa campuran PKO dan CPO, selengkapnya disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Diagram alir proses produksi etanolisis kasar dari campuran PKO dan CPO dengan reaksi bertingkat

Sumber: Murhadi dan Zuidar (2009) dengan modifikasi reaksi bertingkat

3.4.4 Persiapan kultur bakteri

Kultur bakteri Gram positif (*Staphylococcus aureus*) dan bakteri Gram negatif (*Escherichia coli*) dari biakan agar miring atau stok kultur diambil satu ose untuk membuat biakan agar miring baru (NA), diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam lalu diambil satu mata ose kemudian diinokulasi ke dalam tabung yang berisi medium cair steril (NB), diinkubasi selama 24 jam pada 37 °C dan digunakan sebagai stok bakteri.

3.5 Pengamatan

3.5.1 Rendemen produk etanolisis campuran PKO dan CPO

Rendemen produk etanolisis kasar yang dihasilkan dari campuran PKO dan CPO, dihitung dengan cara membagi berat (g) produk etanolisis kasar dari campuran PKO dan CPO dengan berat (g) awal campuran PKO dan CPO yang direaksikan, lalu dikali 100%. Berat masing-masing produk etanolisis kasar dari campuran PKO dan CPO (lapisan atas) dihitung dengan cara total berat campuran PKO dan CPO yang direaksikan dikurangi berat sisa campuran PKO dan CPO hasil reaksi etanolisis (lapisan bawah). Selanjutnya rendemen produk etanolisis dapat dihitung melalui persamaan berikut.

$$\text{Rendemen produk etanolisis} = \frac{\text{Berat Produk etanolisis (g);(lapisan atas)}}{\text{Berat awal (campuran PKO dan CPO yang direaksikan);(g)}} \times 100\%$$

3.5.2 Pengujian aktivitas antibakteri

Pengujian aktivitas antibakteri produk etanolisis campuran PKO dan CPO menggunakan metode difusi agar/ sumur (Murhadi dan Zuidar, 2009) dengan masing-masing 1 bakteri Gram positif dan 1 bakteri Gram negatif (*Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*). Pengamatan didasarkan pada kemampuan senyawa antibakteri produk etanolisis campuran PKO dan CPO untuk menghasilkan zona penghambatan terhadap bakteri berupa diameter zona hambat (d, mm).

Kultur bakteri murni dipindahkan ke dalam tabung agar miring NA steril dan diinkubasi pada 37°C selama 24 jam, selanjutnya sebanyak 1 ose kultur tersebut diinokulasikan ke dalam tabung reaksi yang berisi 10 mL medium NB steril, diinkubasi selama 24 jam pada 37°C, dihomogenkan (vorteks), lalu diinokulasikan sebanyak 10-20 µL ke dalam cawan petri (100 x 15 mm) yang berisi sekitar 20 mL medium agar cair (NA, 44-45°C) steril, dikocok merata dan dibiarkan sampai membeku. Selanjutnya dibuat 2-4 lubang (sumur) secara aseptis dengan diameter sumur 6.0 mm. Ke dalam tiap lubang, diinokulasi dengan 60 µL produk etanolisis kasar dari campuran PKO dan CPO.

Zona penghambatan yang diukur adalah radius (r, mm) penghambatan berupa areal bening di sekeliling sumur uji, setelah diinkubasi selama 24 jam pada 37°C. Pengukuran jari-jari (r, mm) zona hambat di sekeliling sumur uji dilakukan dengan cara mengukur jarak dari tepi sumur uji ke batas lingkaran zona hambat menggunakan jangka sorong (ketelitian 0.01 mm) pada beberapa sisi sumur uji, lalu dirata-ratakan. Selanjutnya dengan asumsi tinggi atau tebal media agar di dalam cawan petri uji adalah sama (9,0 cm) dan volume media agar cair yang

ditambahkan sama (20 mL), maka perhitungan diameter zona hambat riil dapat menggunakan konsep dimensi luas lingkaran (dua dimensi). Perhitungannya sebagai berikut (Murhadi, 2010) :

1. Dihitung luas kotor (L_1 , mm^2) lingkaran areal bening akibat daya hambat bakteri uji disekeliling sumur uji dengan persamaan luas :

$$L_1 = \pi \cdot r_1^2, \text{ dimana } r_1 = r_p + r_s$$

r_p = jarak dari lingkaran luar sumur ke lingkaran terluar areal bening di sekeliling sumur uji (mm),

r_s = jari-jari sumur uji (mm),

$$\pi = 3,14$$

2. Dihitung luas kontrol (L_2 , mm^2) areal bening akibat daya hambat pelarut organic yang digunakan sebagai pengencer dengan persamaan luas, yaitu :

$$L_2 = \pi \cdot r_2^2, \text{ dimana } r_2 = r_k + r_s$$

r_k = jarak dari lingkaran luar sumur ke lingkaran terluar areal bening di sekeliling sumur uji (mm) akibat daya hambat/pengencer organik,

r_s = jari-jari sumur uji (mm)

$$\pi = 3,14$$

3. Dihitung luas bersih (L_3 , mm^2) dengan persamaan : $L_3 = L_1 - L_2$
4. Dihitung jari-jari zona hambat riil (r_r , mm) dengan persamaan:

$$r_r = \sqrt{(L_3/3,14)}$$

5. Dihitung nilai diameter zona hambat rill (d_r , mm) dengan persamaan :

$$d_r = 2 \cdot r_r$$

6. Akhirnya dapat dihitung nilai diameter zona hambat hasil konversi

$$(d_c, \text{ mm}) \text{ dengan persamaan: } d_c = 2 \cdot r_c$$

3.5.3 Pengujian daya stabilitas emulsi produk etanolisis dari campuran PKO dan CPO

Pengujian daya stabilitas pengemulsi produk santan kelapa segar (kental) yang ditambah dengan produk etanolisis kasar dari campuran PKO dan CPO, dilakukan dengan mengukur stabilitas emulsinya secara pemusingan dengan sentrifuge (Murhadi dan Suharyono, 2008). Pembuatan santan kelapa kental, dilakukan sebagai berikut. Santan kelapa kental dibuat dengan cara meremas-remas parutan kelapa tua (1 kg) di dalam 500 mL air hangat (sebelumnya dididihkan), lalu disaring.

Pengujian daya pengemulsi dilakukan dengan cara memasukkan 10 mL campuran santan kelapa kental yang ditambah dengan produk etanolisis kasar dari campuran PKO dan CPO sebanyak 5% (v/v) ke dalam tabung pemusing (sentrifuge). Selanjutnya semua tabung sampel dihomogenkan dengan alat *vorteks*. Semua tabung (perlakuan) dimasukkan ke dalam penangas air pada suhu konstan 70°C selama 30 menit, lalu dipusing selama 45 detik pada kecepatan 1000 rpm (Murhadi dan Suharyono, 2008).

Fraksi minyak yang terpisah (sebagai santan/krim dan skim/air) diukur volumenya untuk digunakan dalam penentuan stabilitas emulsi relatif menggunakan persamaan berikut:

$$\text{Stabilitas emulsi (\%)} = \frac{10 \text{ mL} - \text{volume skim yang terpisah (mL)}}{10 \text{ mL (volume santan)}} \times 100\%$$