III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian telah dilakukan pada bulan Februari sampai April 2017 di Laboratorium Pascapanen Program studi Agroteknologi Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

B. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: buah apel Manalagi dengan umur panen yang seragam (114 hari setelah bunga mekar) sebanyak 126 buah didapatkan dari perkebunan apel di Malang, CMC, gliserol, minyak atsiri kayu manis, minyak atsiri sereh, minyak atsiri lemon, minyak atsiri daun sirih, media tumbuh mikroba NA, alkohol, aquades, plastik *wrap*, sterofoam, amilum, NaOH 1 N (uji asam titrasi), Indikator PP, Nelson A, Nelson B dan Arseno.

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi timbangan analitik, pisau, statif, gelas piala, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, botol suntik, botol *spray*, kawat ose, drigalsky, pemanas bunsen, mikropipet, mortar, buret, kertas saring, pisau, saringan, *spectrophotometer*, *coloni counter* dan *water bath*.

C. Metode Penelitian

Penelitian eksperimental terbagi menjadi 2 tahap yaitu (I) Uji antibakteri berbagai minyak atsiri (II) Aplikasi *edible coating* CMC berantibakteri pada *fresh-cut* buah Apel Manalagi.

Tahap I : Uji antibakteri berbagai minyak atsiri disusun dalam RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan rancangan faktor tunggal yang terdiri dari 4 perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali:

A : Minyak atsiri Kayu manis 0,7%

B : Minyak atsiri Sereh 0,7%

C : Minyak atsiri Lemon 3%

D : Minyak atsiri Sirih 0,1%

Tahap II : Aplikasi *edible coating* CMC beranti bakteri pada *Fresh-cut* buah apel Manalagi disusun dalam RAL (Rancangan Acak Lengkap) dengan rancangan faktor tunggal yang terdiri dari 6 perlakuan yaitu:

A : Tanpa CMC dan Minyak atsiri

B : CMC 1 %

C : CMC 1 % + Kayu manis 0,7%

D : CMC 1% + Sereh 0,7%

E : CMC 1 % + Lemon 3%

F : CMC 1 % + Sirih 0,1%

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga menghasilkan 18 unit percobaan. Setiap unit terdiri dari 1 sampel dan 6 korban buah apel.

D. Tata Laksana Penelitian

Penelitian ini dilakukan secara 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian inti. Penelitian inti meliputi tahap I: Uji antibakteri berbagai minyak atsiri dan tahap II: Aplikasi *edible coating* CMC berantibakteri minyak atsiri pada f*resh-cut* buah apel Manalagi.

1. Penelitian Pendahuluan

a. Pembuatan *Fresh-Cut* Buah Apel

Apel dicuci dengan air mengalir dan dikeringkan dengan tissue. Satu buah apel diiris 6 bagian berbentuk bulan sabit menggunakan pisau *stainless steel* tajam. Potongan apel dikemas menggunakan sterofoam dan *wrapping* plastik lalu disimpan dalam *cooler* dengan suhu 4°C. Pengamatan dilakukan setiap hari hingga terlihat telah membusuk untuk mendapatkan bakteri.

b. Isolasi dan Karakteristik Isolat Mikroba pada *Fresh-Cut* Buah Apel

i. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 30 menit. Alat-alat yang akan disterilkan dibungkus dengan kertas payung sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf. Alat yang disterilkan antara lain petridish, Erlenmeyer, botol suntuk dan tabung reaksi.

ii. Pembuatan media

Pembuatan media NA yaitu dengan melarutkan *Peptone* 2,5 gram dan *extrak beef* sebanyak 1,5 gram dalam *aquades* 500 ml dan diaduk secara *continue* sampai homogen, kemudian tambahkan agar-agar sebanyak 7,5 gram. Setelah homogen, medium diukur pH 6-7 lalu disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

iii. Isolasi mikroba pada *fresh-cut* buah apel

Apel potong yang telah berlendir dihaluskan menggunakan mortar dan pastle, kemudian 1 gram apel yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi 9 ml aquades steril dan dihomogenkan. Seri

pengenceran dibuat mulai dari 10^{-1}, 10^{-2} sampai 10^{-9} dengan diambil sebanyak 1 ml. Suspensi diisolasi pada media NA meggunakan metode *surface*. Kemudian petri dibungkus dengan menggunakan kertas payung, diberi label dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu kamar.

iv. Pemurnian mikrobia *fresh-cut* buah apel

Mikroba yang tumbuh setelah tahap isolasi, dihitung menggunakan metode *plate count.* Mikroba yang tumbuh terbanyak akan diinokulasi pada media NA tabung miring dan NA petridish menggunakan metode *streak*, kemudian diinkubasi selama 48 jam.

v. Identifikasi dan karakteristik mikrobia *fresh-cut* buah apel

Bakteri yang tumbuh setelah pemurnian selanjutnya dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan makroskopis dengan melihat morfologinya seperti bentuk koloni, warna koloni, tepi dan permukaan koloni. Pengamatan mikroskopis dengan mengamati koloni mikrobia di bawah mikroskop dengan pembesaran 40 x 10.

c. Perbanyakan Bakteri Pembusuk *fresh-cut* buah apel

Bakteri yang murni diperbanyak dengan cara dipindah ke media agar miring dan media cair. Kemudian masing-masing bakteri di perbanyak dalam media NC dan dishaker selama 48 jam.

2. Penelitian Inti

a. Tahap I : Uji antibakteri berbagai minyak atsiri

Pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri kayu manis, sereh, daun sirih dan lemon terhadap bakteri pembusuk *fresh-cut* dilakukan dengan metode *paper disk* dan *pour plate*.

i. Uji daya hambat antibakteri dengan metode *paper disk*

Pengujian aktivitas antibakteri dilakukan untuk mengetahui kemampuan daya hambat berbagai minyak atsiri pada bakteri pembusuk *fresh-cut* apel. Lembaran *paper disk* (kertas saring) berdiameter 1,2 cm dicelupkan ke dalam larutan minyak atsiri, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri yang sudah diisolasi mikroba pembusuk *fresh-cut* buah apel dan diinkubasi selama 48 jam. Setelah melalui masa inkubasi, akan muncul zona penghambatan dan dilakukan pengukuran diameter zona penghambatan dengan cara diameter zona bening yang terbentuk.

ii. Uji daya hambat antibakteri dengan metode *pour plate*

Berbagai minyak atsiri ditambahkan pada media NA, kemudian dimasukkan ke dalam cawan petri. Stok mikrobia dicampurkan pada medium sebanyak 1 ml, lalu diinkubasi selama 48 jam dan hasilnya diamati uji daya hambat dari bakteri yang tumbuh pada media tersebut.

b. Tahap II : Aplikasi *edible coating* CMC berantimikroba berbagai minyak atsiri

i. Pembuatan *edible coating* CMC

CMC ditimbang sebanyak 10 gram, kemudian dilarutkan pada 1000 ml aquades untuk mendapatkan larutan CMC 1%. Larutan diaduk hingga homogen dan dipanaskan pada suhu ± 90°C. Menggunakan Gliserol 1,5% yang ditambahkan ke dalam larutan sebagai *plasticizer*, kemudian diaduk kembali hingga homogen pada suhu ± 90 ^{o}C. Setelah terbentuk larutan CMC, tambahkan minyak atsiri sesuai dengan konsentrasi perlakuan. Jika larutan telah homogen maka siap untuk diaplikasikan.

ii. Pembuatan cairan bakteri pembusuk

Stok bakteri pembusuk diambil 1 ose dan diperbanyak pada media NC. Setelah diinkubasi selama 48 jam, NC digunakan 10% dari jumlah volume larutan bakteri yang akan diaplikasikan ke dalam NC dan dihomogenkan selama 48 jam.

iii. Tahap aplikasi

Apel dicuci dengan air yang telah dicampur klorin 200 microliter/liter hingga bersih kemudian ditiriskan. Apel dipotong enam bagian berbentuk bulan sabit dengan bobot masing-masing antara 11-12,5 gram. Pemotongan buah menggunakan pisau *stainless steel*. Selama penyiapan berlangsung buah apel yang telah dipotong, dicelupkan pada air dingin untuk menghambat terjadinya *browning*. Kemudian potongan apel dicelupkan ke dalam larutan CMC dan berbagai minyak atsiri hingga buah terlapisi merata. Setelah ditiriskan dan kering, potongan buah apel disemprot dengan larutan

bakteri. Setelah itu, dikemas menggunakan *sterofoam* dan *wrapping* plastik lalu disimpan dalam *cooler* dengan suhu 4 ^{o}C.

iv. Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama 15 hari dengan jenjang waktu pengamatan tiga hari sekali. Setiap tiga hari sekali diambil dua buah korban dari setiap perlakuan untuk dilakukan pengujian Mikrobiologi, organoleptik, Total asam tertitrasi, Kadar gula reduksi dan uji pH. Setiap satu hari sekali dilakukan pengamatan terhadap enam buah sampel untuk ditimbang susut bobotnya dan menghitung presentase kerusakan buah.

E. Parameter Pengamatan

1. Tahap I : Uji Antimikroba

a. Daya hambat dengan metode *paper disk* (cm)

Zona hambat yang terbentuk dari kertas saring masing-masing perlakuan diukur menggunakan mistar sebagai data penelitian.

b. Daya hambat dengan metode *pour plate* (CFU/ml)

Perhitungan daya hambat metode *pour plate* dilakukan dengan cara menghitung jumlah pertumbuhan mikroba pada media yang telah dicampurkan dengan perlakuan minyak atsiri.

2. Tahap II: Aplikasi *edible coating* CMC berantimikroba minyak atsiri kayu manis, sereh, lemon dan sirih.

a. Uji mikrobiologi (CFU/ml)

Uji mikrobiologi dilakukan dengan menghitung total mikroba menggunakan metode *plate count*. Media yang digunakan yaitu NA

pengamatran dilakukan pada hari ke 0, 3, 6, 9 dan 15. Buah apel dihaluskan dan ditimbang 1 g, kemudian dimasukkan ke dalam 99 ml aquades steril untuk dijadikan pengenceran 10^{-2}. Pengenceran dilakukan hingga mendapatkan 10^{-7}.

Petridish yang telah dituang media Na dan mengeras, kemudian di inokulasi dari pengenceran 10^{-5}, 10^{-6} dan 10^{-7} dengan cara *surface* menggunakan *drigalsky*. Inkubasi suspensi selama 48 jam dan hitung hasil pertumbuhan mikroba menggunakan alat *coloni counter*. Perhitungan mikroba dengan metode *plate count* harus memenuhi syarat, yaitu sebagai berikut 1) Jumlah koloni tiap cendawan petri antara 30-300 koloni; 2) Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (spreader); 3) Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran sebelumnya, jika sama atau lebih kecil 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya; 4) Jika dengan ulangan memenuhi syarat, maka hasilnya dirata-rata.

b. Uji susut berat (%)

Pengukuran susut berat dilakukan pada hari ke-0, 3, 6, 9, 12, dan 15. Buah ditimbang menggunakan timbangan analitik, kemudian dihitung pengurangan berat buah sebagai susut berat dengan menggunakan rumus :

$$\text{Susus Bobot (\%)} = \frac{bobot\ awal\ sebelum\ disimpan - bobot\ akhir\ setelah\ disimpan}{bobot\ awal\ sebelum\ disimpan} \text{x } 100\%$$

c. Uji organoleptik

Uji ini dilakukan dengan menggunakan responden untuk mengetahui warna dan aroma buah apel pada hari ke-0, hari ke-3, hari ke-6, hari ke-9, hari

ke-12, dan hari ke-15 sehingga dapat diketahui pada hari ke-berapa tingkat kesukaan responden. Adapun kriteria tingkat kesukaan sebagai berikut:

Nilai 1 untuk sangat tidak suka

Nilai 2 untuk tidak suka

Nilai 3 untuk cukup suka

Nilai 4 untuk suka

Nilai 5 untuk sangat suka

d. Uji Total Asam Tertitrasi (%)

Buah yang sudah dihaluskan ditimbang 5 g dan dilarutkan pada 100 ml aquades. Filtrat kemudian diambil 10 ml untuk dimasukkan ke Erlenmeyer dan diteteskan indikator PP sebanyak 1-3 tetes. Setelah itu titrasi dengan NAOH 1 N sampai terjadi perubahan warna menjadi merah jambu. Perhitungan dilakukan dengan menggunakan rumus :

Total asam (%) = $\frac{ml\ NaOH\ x\ N\ NaOH\ X\ BM\ Asam\ Malat\ x\ FP}{mg\ sample}$ x 100%

Keterangan :

ml NAOH 1 N = volume NAOH yang digunakan untuk penitrasi

N NAOH 1 N = normalitas NAOH yang digunakan untuk menitrasi

FP = faktor pengenceran

e. Kadar Gula Reduksi (%)

Uji kadar gula reduksi dilakukan sebanyak 5 kali pada hari ke-0, 3, 6, 9, 12 dan 15. Pengujian menggunakan metode Nelson-Somogyi (Hasanul dan Hari, 2016), dimana prinsipnya, gula pereduksi akan mereduksi ion Cu2+ menjadi ion Cu+, kemudian ion Cu+ ini akan mereduksi senyawa

arsenomolibdat membentuk kompleks berwarna biru kehijauan, intensitasnya diukur dengan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer pada panjang gelombang 540 nm.

i. Pembuatan Kurva standar

Melarutkan 10 mg glukosa pada 100 ml aquades. Kemudian membuat pengenceran dengan mengambil larutan sebanyak 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9ml. Larutan ditambahkan 1 ml Nelson C dan dipanaskan dalam *waterbath* selama 20 menit dengan suhu sekitar 70°C. Larutan didinginkan dan ditambahkan 1 ml regensi arsenomolybdat. Setelah homogen larutan ditera pada *spektrofotometer*. Kurva standar (regresi linear) dibuat untuk menunjukkan hubungan antara presentasi glukosa dan absorbansi.

ii. Penentuan gula reduksi pada sampel

Buah apael yang telah dihaluskan ditimbang sebanyak 1g dan dilarutkan pada 100 ml aquades. Sampel dipipet 0,1ml dan ditambahkan 0,9 ml aquades. Regensi nelson C ditambahkan 1 ml pada larutan sample, kemudian dipanaskan. Setelah sample dingin tambahkan 1 ml arsenomolibdat dan 7 ml aquades. Ditera pada *spectrophotometer* dan hasilnya dihitung dengan rumus:

$$\%\ Gula\ Reduksi = \frac{Konsentrasi\ x\ Faktor\ Pengenceran}{Mg\ Bahan}\ x\ 100\%$$

f. Uji pH

Penentuan nilai pH menggunakan pH meter (Merynda. dkk., 2012), elektroda pH meter sebelum digunakan distandarisasi menggunakan larutan buffer. Kemudian dibersihkan menggunakan aquades dan dikeringkan.

Sampel apel potong segar dihancurkan lalu ditimbang sebanyak 1 gram. Kemudian sampel ditambahkan aquadest sebanyak 5 ml, digojog sampai homogen. Dicelupkan elektroda ke dalam sampel, dibiarkan elektroda sampai diperoleh pembacaan yang stabil. Nilai pH dapat langsung dibaca pada skala pH meter.

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Sidik Ragam atau *Analysis of Variance* (ANOVA) pada taraf signifikansi α 5%. Apabila terrdapat beda nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan Duncan*'s Multiple Range Test* (DMRT). Parameter uji gula reduksi dan total asam tertitrasi diuji kembali menggunakkan analisis kontras ortogonal. Sedangkan data daya hambat metode *pour plate*, mikrobiologi, pH dan organoleptik (kenampakkan dan aroma) dianalisa menggunakan histogram atau tabel secara deskriptif.