

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Pasca Panen, Laboratorium Tanah dan Pupuk, dan Laboratorium Agrobioteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta selama 3 bulan pada bulan Maret 2018 hingga Mei 2018.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Alat yang digunakan yaitu pisau, botol suntik, panci, *erlenmeyer*, autoklaf, kompor gas, bunsen, kasa pemanas, pengaduk, gelas beaker, jarum ose, kapas, timbangan, *vortex*, tabung reaksi dan rak tabung, pH meter *stick*, kertas saring, cawan petri, mikroskop, preparat, *coverglass*, penggaris, inkubator, *waterbath*, sterofom, cup plastik, *handsprayer*, blender, labu takar, petridish, pipet ukur, *drigalsky*, *coloni counter*, mikropipet, mortar dan alu, spektrofotometer, hand penetrometer, refraktometer, dan lemari pendingin.

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini, yaitu buah naga merah dengan umur panen (30 hari setelah bunga mekar), alginat, CaCl₂ 2%, minyak atsiri vanili, minyak atsiri kayu manis, aquadest, alkohol 70%, ekstrak daging (*beefekstrak*), *peptone*, spirtus, gliserol (*glycerin*), plastik *wrapt*, Nelson A dan Nelson B, arsenomolybdat, media tumbuh mikroba PCA (*Plate Count Agar*) dan NA (*Nutrient Agar*) larutan amilum 1%, larutan PP, NaOH 0,1 N, klorin 1%, dan cat gram.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode percobaan laboratorium yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rancangan perlakuan faktor tunggal yang terdiri dari 2 tahap yaitu (I) Uji antibakteri minyak atsiri vanili dan kayu manis dengan berbagai konsentrasi yaitu 0,3%; 0,5%; 0,6%; 1%; dan 1,5%; dan tahap (II) Aplikasi *edible coating* alginat yang dicelupkan pada CaCl₂ 2% berantibakteri minyak atsiri vanili dan kayu manis. Terdiri dari 6 perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 18 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri dari 1 sampel dan 6 korban perlakuan.

Perlakuannya yaitu :

1. P1 : CaCl₂2%
2. P2 : CaCl₂2% + Alginat 2% + Minyak Atsiri Vanili 0,6%
3. P3 : CaCl₂2% + Alginat 2% + Minyak Atsiri Kayu Manis 0,5%
4. P4 : Alginat 2% + Minyak Atsiri Vanili 0,6%
5. P5 : Alginat 2% + Minyak Atsiri Kayu Manis 0,5%
6. P6 : Kontrol (Tanpa pemberian CaCl₂, Alginat, dan Minyak Atsiri Vanili 0,6% dan Minyak Atsiri Kayu Manis 0,5%)

D. Cara Penelitian

1. Penelitian Pendahuluan

a. Pembusukan Buah Naga Merah Potong

Untuk mendapatkan mikroba pembusuk buah naga merah potong, dilakukan pembusukkan buah naga merah potong. Buah naga merah dikupas kulitnya dan diiris menjadi 8 bagian. Potongan buah naga dikemas dengan

styrofoam dan plastik *wrapt* lalu disimpan dalam *cooler* dengan suhu 4⁰C.

Dilakukan pengamatan setiap hari sehingga buah terlihat telah membusuk.

b. Isolasi dan Karakterisasi Isolat Bakteri pada Buah Naga Merah Potong

1) Sterilisasi alat

Alat – alat yang akan disterilkan dibungkus dengan kertas payung dan plastik. Kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121⁰C selama 30 menit.

2) Pembuatan media PCA (*Plate Count Agar*) :

- a. 22,5 gr bubuk PCA dilarutkan dalam 1000 ml larutan aquades dan diaduk hingga homogen
- b. Setelah homogen, medium diukur dengan pH indikator hingga mencapai pH 6 -7
- c. Larutan dimasukkan ke dalam labu takar (*erlenmeyer*) dan ditutup dengan kapas hingga rapat.
- d. Kemudian dimasukkan ke dalam autoklaf bersamaan dengan cawan petri selama 15 – 20 menit pada suhu 121⁰C dengan tekanan 15 psi (*per square inchi*).

3) Isolasi Mikroba pada Buah Naga Merah Potong

- a. Buah naga merah potong yang sudah berlendir dan terlihat membusuk dilumatkan dengan mortar, kemudian diambil sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam botol suntik yang berisi 99 ml aquadest steril dan dihomogenkan (seri pengenceran 10⁻²)

- b. Diambil 1 ml air sampel dari buah yang sudah dilumatkan dengan menggunakan mikropipet, kemudian dimasukkan ke dalam botol suntik 99 ml aquadest steril dan digojog hingga homogen (seri pengenceran 10^{-4}).
- c. Diambil 1 ml dari seri pengenceran 10^{-4} kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi 9 ml aquadest steril (seri pengenceran 10^{-5}). Pada tahap ini diulangi kembali hingga seri pengenceran 10^{-9} .
- d. Medium PCA dituangkan ke dalam petridish \pm 10 ml dan diberi label masing-masing petridish untuk pengenceran 10^{-4} hingga 10^{-9} .
- e. Masing-masing suspensi hasil pengenceran 10^{-4} hingga 10^{-9} diinokulasikan pada petridish yang berisi medium PCA sebanyak 0,1 ml
- f. Suspensi mikroba diratakan dengan *drigalsky* pada metode sebar (*spread plate*)
- g. Petridish yang berisi suspensi bakteri diinkubasikan pada suhu 22 – 25⁰C di dalam inkubator (enkas) selama 48 jam hingga 2 hari dalam keadaan gelap dan posisi cawan terbalik.

4) Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri

Bakteri yang tumbuh setelah diisolasi sebelumnya dilakukan pengamatan secara makroskopis berdasarkan sifat-sifat morfologinya. Hal-hal yang diamati dalam pengamatan bakteri, yaitu warna koloni, bentuk koloni atas (*top colony*), bentuk koloni bawah (*reverse colony*), tepi koloni, elevasi, diameter koloni.

Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan cara melihat bakteri dibawah mikroskop.

c. Pemurnian dan Perbanyakkan Bakteri Pembusuk Buah Naga Merah Potong

Bakteri yang tumbuh setelah tahap isolasi, dihitung dengan menggunakan metode *plate count*. Mikroba yang tumbuh kemudian dilakukan identifikasi dan karakterisasi. Kemudian bakteri dimurnikan dan diperbanyak dengan cara diinokulasi ke media miring PCA serta media cair NC pada erlenmeyer. Kemudian dishaker selama 48 jam dan di *plate count* untuk mendapatkan jumlah populasi bakteri.

2. Penelitian Inti

I. Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) metode *paper disk* dan *pour plate*.

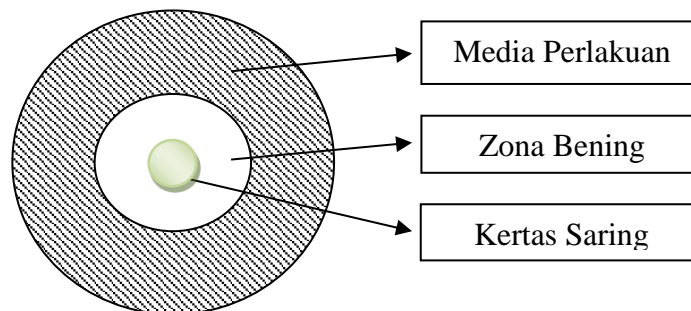
a. Metode *Paper Disk*

Uji daya hambat metode *paper disk* dengan kertas saring. Kertas saring berukuran 1-1,2 cm dicelupkan ke dalam minyak atsiri vanili dan kayu manis dengan berbagai konsentrasi dan untuk perlakuan kontrol di rendam ke dalam aquades selama 10 – 15 menit. Kemudian ditempatkan pada medium agar padat yang sebelumnya telah diinokulasi bakteri. Inkubasi pada suhu 30°C selama 48 jam dan diamati diameter zona bening yang terbentuk di sekitar kertas saring (Jawetz *et al.*, 2005).

Persentase daya hambat dihitung dengan metode paper disk dengan mengukur daerah zona bening metode yang digunakan oleh Lestari dkk., 2013.

$$\% \text{ Daya hambat} = \frac{\text{diameter perlakuan} - \text{diameter kontrol}}{\text{diameter kontrol}} \times 100\%$$

Gambar 1 : Area Pengukuran Diameter



b. Metode *Pour Plate* (agar tuang)

Perhitungan daya hambat dengan metode *pour plate* dilakukan dengan cara menghitung jumlah pertumbuhan bakteri pada media yang telah dicampurkan dengan konsentrasi minyak atsiri. Caranya Medium PCA ditambahkan konsentrasi minyak atsiri, dituangkan pada petridish lalu cawan diputar untuk menghomogenkan. Kemudian ditetaskan 1 ml suspensi bakteri pada medium padat. Diinkubasi selama 48 jam dan diamati uji daya hambat bakteri yang tumbuh pada medium tersebut. Menurut Jutono dkk (1980) perhitungan mikroba dengan metode *plate count* harus memenuhi syarat yaitu :

- a. Jumlah koloni yang tumbuh tiap cawan petri antara 30 – 300 koloni.
- b. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (*spreader*)
- c. Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran yang berturut – turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya. Jika sama

atau lebih kecil 2 maka hasilnya dirata-rata dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari pengenceran sebelumnya.

d. Jika dengan ulangan memenuhi syarat hasilnya dirata-rata.

II. Aplikasi *Edible Coating* Alginat dan CaCl_2 Diperkaya Minyak Atsiri Vanili Dan Kayu Manis pada Buah Naga Merah Potong

1. Kriteria Buah

Buah naga merah dipilih yang memiliki tingkat kematangan yang sama yakni umur 30 – 32 hari setelah berbunga. Buah naga merah yang dipanen memiliki kriteria yakni kulit buah merah mengkilap, sisik atau jumbai berubah warna dari hijau menjadi kemerahan. Dalam 1 kg berisi 2-3 buah.

2. Pembuatan *Edible Coating* Alginat

Larutan *edible coating* disiapkan dengan melarutkan bubuk alginat ke dalam aquadest dan dipanaskan pada suhu 80°C selama 30 menit hingga larutan menjadi jernih. Larutan kemudian ditambahkan 1,5% gliserol sebagai *plasticizer* (perekat). Setelah larutan *edible coating* alginat terbentuk, minyak atsiri vanili dan kayu manis ditambahkan sesuai dengan kombinasi perlakuan diaduk hingga homogen, setelah itu siap diaplikasikan.

3. Pembuatan Cairan Bakteri Pembusuk

Stok mikroba pembusuk diambil 1 ose dan diperbanyak pada media *nutrient* cair (NC), kemudian diinkubasi selama 2 hari (48 jam). Pengambilan stok bakteri pada media diambil 10% dari jumlah volume larutan yang akan diaplikasikan, kemudian dishaker selama 48 jam.

4. Pengupasan Buah Naga Merah dan Aplikasi *Edible Coating*

Buah naga merah dikupas, lalu dipotong dengan ukuran yang sama. Kemudian dibersihkan dari kotoran lalu ditimbang. Buah naga kemudian dimasukkan dalam larutan klorin dengan konsentrasi $200 \mu\text{l L}^{-1}$ hingga bersih, lalu dikering anginkan dan dibersihkan dari bagian-bagian yang tidak dibutuhkan. Kemudian *fresh-cut* buah naga merah dicelupkan pada larutan CaCl_2 2% sebelum aplikasi. Lalu pencelupan buah sesuai dengan perlakuan aplikasi, pada P2, P3, P4 dan P5 dicelupkan pada larutan alginat berantibakteri minyak atsiri vanili dan kayu manis hingga terlapisi secara merata. Buah pada perlakuan P1, P2, dan P3 sesegera mungkin dicelupkan ke dalam larutan CaCl_2 setelah aplikasi hingga terbentuk lapisan. Lalu ditiriskan dan dikering anginkan, kemudian buah naga merah potong disemprot dengan mikroba murni hasil isolasi dengan *hand sprayer* dengan volume *nozzle* yang sudah diatur. Setelah itu, dikemas menggunakan *styrofoam* dan di *wrapping*, lalu disimpan dalam *cooler* dengan suhu 10°C selama 15 hari.

5. Pengamatan

Pengamatan *fresh-cut* buah naga merah dilakukan selama 15 hari masa penyimpanan dengan waktu pengamatan tiap tiga hari sekali. Parameter yang diamati meliputi sifat fisik (susut bobot dan kekerasan), sifat kimia (asam titrasi, total padatan terlarut, gula reduksi, dan pH), dan sifat biologis (mikrobiologi).

E. Parameter Yang Diamati

1. Pengujian Mikrobiologi (CFU/ml)

Uji mikrobiologi dilakukan setiap 3 hari sekali, yaitu pada hari ke-0, ke-3, ke-6, ke-9, ke-12, dan ke-15 yang diambil dari buah sampel. Perhitungan total mikrobia yang tumbuh dengan menggunakan metode *plate count*. Langkah-langkah dalam uji mikrobiologi sebagai berikut (Jutono dkk., 1980) :

a. Membuat medium PCA

Cara pembuatan media PCA :

1. Menimbang 22,5 gr bubuk PCA dan melarutkannya ke dalam 1000 ml aquadest, mengaduknya hingga homogen
2. Setelah homogen, mengukur kandungan pH medium yang telah larut hingga mencapai pH 6-7
3. Memasukkan medium ke dalam botol dan menutupnya dengan kertas payung serta mengikat dengan karet.
4. Melakukan sterilisasi pada medium yang telah dibuat ke dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit
5. Mendinginkan medium yang telah steril hingga mencapai suhu 45-50⁰C
6. Menuangkan media ke dalam petri dan menunggu hingga padat

b. Menyiapkan sampel

Buah naga merah dihaluskan dan ditimbang 1 gram, kemudian dimasukkan ke dalam 99 ml aquadest steril untuk dijadikan pengenceran 10⁻². Pengenceran dilakukan hingga mendapatkan seri pengenceran yang sesuai. Petridish yang telah dituang media PCA mengeras, kemudian di inokulasikan

bakteri. Metode yang digunakan metode *surface* menggunakan *drigalsky*. Kemudian diinkubasi selama 48 jam dan hasil pertumbuhan mikroba dilakukan perhitungan dengan metode *plate count*, menggunakan alat *colony counter*.

2. Persentase Susut bobot (%) (AOAC, 1995)

Susut bobot buah dilakukan setiap 3 hari sekali, yaitu pada hari ke-0, ke-3, ke-6, ke-9, ke-12, dan ke-15 yang diambil dari 1 buah sampel. Berat awal buah ditimbang sebelum perlakuan dan berat buah dilakukan pengamatan setelah perlakuan, kemudian dihitung pengurangan berat buah sebagai susut bobot dengan menggunakan rumus :

$$\text{Susut bobot} = \frac{W_a - W_b}{W_a} \times 100\%$$

W_a = berat awal sebelum perlakuan

W_b = berat akhir setelah perlakuan

3. Pengujian Tekstur Buah

Kekerasan buah diamati setiap 3 hari sekali, yaitu pada hari ke-0, ke-3, ke-6, ke-9, ke-12, dan ke-15 yang diambil dari buah korban. Kekerasan buah diukur dengan *handpnetrometer*.

$$\text{Uji kekerasan} = \frac{\text{gaya yang diberikan}}{\text{luas permukaan}}$$

4. Pengukuran Total Padatan Terlarut (Brix %)

Uji ini dilakukan dengan menggunakan *refractometer* terhadap tingkat kemanisan atau kadar gula buah yang dilakukan setiap 3 hari sekali, yaitu pada hari ke-0, ke-3, ke-6, ke-9, ke-12, dan ke-15 yang diambil dari buah korban.

5. Pengujian Gula Reduksi (%)

Uji kadar gula reduksidilakukan setiap 3 hari sekali, yaitu pada hari ke-0, ke-3, ke-6, ke-9, ke-12, dan ke-15 yang diambil dari buah korban. Menurut Hasunul dan Hari (2016), pengujian gula reduksi menggunakan metode Nelson-Somogyi prinsipnya gula pereduksi dapat mereduksi ion kupri menjadi kuproksida, dalam hal ini mereduksi reagen Nelson (Arsenomolibdat) yang menghasilkan warna biru. Nelson A 18 ml dicampurkan dengan Nelson B 0,72 ml. Sampel dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 0,1 ml dan 0,9 ml aquadest, ditambah 1 ml reagen C ke dalam tabung reaksi, dipanaskan dalam *waterbath* dengan suhu 70⁰C selama 20 menit. Sampel kemudian didinginkan selama 30 menit kemudian ditambah aquadest 7 ml dan ditambahkan 1 ml reagen Arsenomolibdat kemudian digojog. Selanjutnya, dibaca absorbansinya dengan panjanggelombang (λ) 540 mm dengan menggunakan alat *spektrofotometer* (Nelson-Somogyi).

$$\% \text{ gula reduksi} = \frac{\text{konsentrasi} \times \text{faktor pengenceran}}{\text{berat sampel (mg)}} \times 100\%$$

6. Pengukuran Kandungan Asam Tertitrasi (%)

Uji total asam tertitrasi dilakukan setiap 3 hari sekali, yaitu pada hari ke-0, ke-3, ke-6, ke-9, ke-12, dan ke-15 yang diambil dari buah korban. Uji total asam tertitrasi dilakukan untuk mengukur keadaan tingkat keasaman pada larutan sampel menggunakan metode titrasi dengan cara memasukkan sampel sebanyak 5 gram dan diencerkan menggunakan aquadest sebanyak 50 ml, diambil 10 ml dengan menambahkan indikator PP sebanyak 1-3 tetes kemudian dititrasi dengan

NaOH 1 N sampai terjadi perubahan warna. Perhitungan dilakukan menggunakan rumus :

$$\text{Total asam tertitrasi} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{FP} \times \text{BE asam malat} \times 100\%}{\text{berat sampel (mg)}}$$

Keterangan :

ml NaOH 1 N = volume NaOH yang digunakan untuk penitrasi

N NaOH 1 N = normalitas NaOH yang digunakan untuk menitrasi

FP = faktor pengenceran

7. pH

Uji pH (derajat keasaman) digunakan untuk mengetahui kandungan pH buah. Alat yang digunakan yakni pH meter (Merynda dkk., 2012). Caranya elektroda pH meter sebelum digunakan dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan *buffer* (penyangga). Kemudian dibersihkan menggunakan aquades dan dikeringkan.

F. Analisis Data

Data hasil pengamatan akan dianalisis dengan Sidik Ragam atau *Analysis of Variance* (ANOVA) pada taraf kesalahan α 5%. Jika terdapat beda nyata pada perlakuan yang diujikan, maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan α 5%. Pada data daya hambat metode *paper disk* dan *pour plate* serta mikrobiologi dianalisa dengan menggunakan histogram secara deskriptif.