

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Rencana Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan pada bulan Juli sampai Agustus 2018 di Laboratorium Pascapanen Program studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

B. Bahan dan Alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi: buah apel Manalagi (*Malus sylvestris* Mill) dengan umur panen yang seragam (114 hari setelah bunga mekar) sebanyak 126 buah yang didapatkan dari perkebunan apel di Malang, Natrium bisulfit, Asam sitrat, L-arginin, 0,05 M Na *bupper Phosphat*e pH 7, Guaiacol 0,5%, Larutan Hidrogen Peroksida (H₂O₂) 0,3%, *pyrocatechol* 0,5 M, Natrium karbonat (Na₂CO₃), *Reagen Folin-ciocalteu*, *Diphenyl-1 picryl-hidrazil* (DPPH), Methanol, Klorin, HCL, alkohol 50%, aquades, aquabides, plastik *wrapping*, *sterofom*, label dan tissue.

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi timbangan analitik, pisau *stainless steel*, *cooler*, *spectrophotometer*, *chromameter* CR-400, *Sentrifuge*, *wrapping film*, batang pengaduk, baskom kecil, statif, gelas piala, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, mikropipet, mortar dan alu, buret, blender, gelas plastik, sendok, kain saring, saringan, sarung tangan steril, botol sprej dan kamera.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan dengan metode eksperimental faktor tunggal yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang diujikan yaitu tahap uji *antibrowning* menggunakan larutan natrium bisulfit, asam sitrat, L-

arginin dan ditambah dengan satu perlakuan pembanding yaitu kontrol (tanpa pencelupan bahan anti *browning*). Adapun perlakuan dalam penelitian ini yaitu:

A1 : Natrium Bisulfit 50 ppm perendaman selama 5 menit

A2: Natrium Bisulfit 150 ppm perendaman selama 5 menit

B1 : Asam Sitrat 50 ppm perendaman selama 10 menit

B2 : Asam Sitrat 100 ppm perendaman selama 10 menit

C1 : Arginin 50 mmol perendaman selama 10 menit

C2 : Arginin 100 mmol perendaman selama 10 menit

D : Kontrol (tanpa perlakuan)

Penelitian ini terdiri dari 7 perlakuan dengan 3 ulangan sehingga menghasilkan 21 unit percobaan. Setiap satu unit percobaan terdiri dari 6 potong buah dengan bobot masing-masing antara 11-12,5 gram, sehingga diperoleh 189 buah yang setara dengan 6,3 kg buah apel Manalagi (*Malus sylvestris Mill*). Ukuran buah apel Manalagi yang digunakan yaitu 3 X 2 Cm.

D. Tata Laksana Penelitian / Cara Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan tahap uji pendahuluan dan penelitian inti. Penelitian inti terdiri dari tahap: Persiapan alat dan bahan, penyortiran buah, pencucian buah, pemotongan buah, pembuatan larutan natrium bisulfit, asam sitrat dan arginin, pencelupan bahan anti *browning* dan pengamatan.

1. Penelitian Pendahuluan

a. Persiapan alat dan bahan

Persiapan alat dan bahan, persiapan alat meliputi pembersihan lemari pendingin dan pengecekan suhu lemari pendingin, penyiapan pengecekan alat-alat

yang dibutuhkan seperti timbangan analitik, *sentrifuge*, *spectrophotometer*, *chromameter* CR-400 untuk pengamatan warna, pisau, sterilisasi gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, botol spray, mikropipet, mortar dan alu. Sedangkan penyiapan bahan meliputi menyiapkan buah apel varietas Manalagi yang memiliki ukuran seragam, penyiapan serbuk natrium bisulfit, asam sitrat dan L-arginin, methanol, pengenceran *Buffer Phosphate*, Guaicol, Hidrogen perioksida, Folin, Alkohol, Aquades, Plastik *Wrapping* dan *sterof foam*.

b. Pembuatan bahan anti *browning*

Pembuatan bahan *browning* disesuaikan dengan perlakuan konsentrasi yang dibutuhkan, setelah diperoleh konsentrasi yang diinginkan, bahan *browning* seperti natrium bisulfit disiapkan dengan melarutkan bubuk natrium bisulfit sesuai perlakuan yaitu 50 ppm (8gram) dimasukkan ke dalam wadah kemudian ditambahkan aquades sebanyak 1 L yang berfungsi sebagai pelarut.

c. Pencelupan *fresh-cut* apel Manalagi

Buah apel Manalagi dicuci menggunakan air yang telah dicampur klorin 200 microliter/liter hingga bersih kemudian ditiriskan dan dipotong menjadi enam bagian berbentuk bulan sabit dengan bobot masing-masing antara 11-12,5 gram. Pemotongan buah menggunakan pisau *stainless steel*, kemudian dicelupkan ke dalam larutan natrium bisulfit, asam sitrat, dan L-arginin hingga buah tercelup merata. Setelah itu buah ditiriskan hingga menjadi kering, kemudian buah dikemas menggunakan *sterof foam* dan *wrapping* plastik lalu disimpan dalam *cooler* dengan suhu 5°C selama 3 hari. Pengamatan yang dilakukan meliputi uji

warna, Uji Total fenol, uji aktivitas enzim *polyphenol Oxidase* (PPO), uji aktivitas enzim *peroxidase* (POD) dan uji Total *Antioxsidant Activity* (TAA).

2. Penelitian Inti

a. Persiapan alat dan bahan

Persiapan alat dan bahan, persiapan alat meliputi pembersihan lemari pendingin dan pengecekan suhu lemari pendingin, penyiapan pengecekan alat-alat yang dibutuhkan seperti timbangan analitik, *sentrifuge*, *spectrophotometer*, *chromameter* CR-400 untuk pengamatan warna, pisau, sterilisasi gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, botol suntik, botol spray, mikropipet dan mortar. Sedangkan penyiapan bahan meliputi menyiapkan buah apel varietas Manalagi yang memiliki ukuran seragam, penyiapan serbuk natrium bisulfit, asam sitrat dan L-arginin, methanol, pengenceran *Buffer Phosphate*, Guaicol, hidrogen perioksida, Folin, Alkohol, Aquades, Plastik *Wrapping* dan *sterofom*.

b. Penyortiran buah

Buah apel berasal dari kebun buah apel Manalagi yang berada di Malang, Jawa Timur yang telah dipanen pada pagi hari dari kebun buah apel Manalagi dengan kesegaran kematangan telah berumur 114 hari setelah bunga mekar, dibersihkan dari kotoran yang menempel dengan tangan kemudian dilakukan sortasi dengan memilih ukuran buah apel Manalagi dengan kriteria buah yang memiliki umur, ukuran, dan warna yang sama yang terbebas dari penyakit tanaman. Buah yang sudah disortasi kemudian dibungkus menggunakan kertas koran, diletakkan dalam keranjang plastik dan dibawa ke laboratorium Pascapanen Universitas Muhammadiyah Yogyakarta menggunakan mobil.

c. Pencucian buah

Buah apel yang telah disortasi kemudian dilanjutkan dengan pencucian menggunakan air yang telah dicampur klorin 200 microliter/liter hingga bersih kemudian ditiriskan.

d. Pemotongan buah

Apel dipotong menjadi enam bagian berbentuk bulan sabit dengan bobot masing-masing antara 11-12,5 gram dengan ukuran buah apel Manalagi yang digunakan dengan ketebalan sebesar 3 X 2 Cm. Pemotongan buah menggunakan pisau *stainless steel*.

e. Pembuatan larutan Natrium bisulfit, asam sitrat dan L-arginin.**1. Natrium Bisulfit**

Larutan natrium bisulfit disiapkan dengan melarutkan bubuk natrium bisulfit sesuai perlakuan yaitu natrium bisulfit 50 ppm (8 gram) dan 150 ppm (16 gram), kemudian ditambahkan aquades 10.000 ml serta diaduk sampai L-arginin terlarut dalam air.

2. Larutan asam sitrat

Larutan asam sitrat disiapkan dengan melarutkan bubuk asam sitrat sesuai perlakuan yaitu asam sitrat 50 m mol (8 gram) dan 100 m mol (16 gram), kemudian ditambahkan aquades 10.000 ml serta diaduk sampai asam sitrat terlarut dalam air.

3. Larutan L-arginin

Larutan L-arginin disiapkan dengan melarutkan bubuk L-arginin sesuai perlakuan yaitu L-arginin 50 m mol (8 gram) dan 100 m mol (16 gram), kemudian ditambahkan aquades 10.000 ml serta diaduk sampai L-arginin terlarut dalam air.

f. Pencelupan bahan anti *browning*

Buah apel yang telah dipotong dicelupkan ke dalam larutan natrium bisulfit, asam sitrat, dan L-arginin hingga buah tercelup merata. Setelah itu buah ditiriskan, kemudian buah dikemas menggunakan *sterofom* dan *wrapping* plastik lalu disimpan dalam *cooler* dengan suhu 5 °C.

3. Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama 15 hari dengan jenjang waktu pengamatan tiga hari sekali pada masing-masing perlakuan pada hari ke-0, ke-3, ke-6, ke-9, ke-12 dan ke-15. Setiap tiga hari sekali diambil dua buah korban dari setiap perlakuan untuk dilakukan pengujian *Polyphenol Oksidase* (PPO), Enzim *Perioxsidase* (POD), Total Anti Oksidan (TAA) dan Fenol yang dilakukan dengan cara memotong buah dan menumbuk sample, kemudian mengencerkan sample menggunakan aquades kemudian menambahkan larutan pada sample sesuai dengan uji yang akan dilakukan dan sample hasil pengamatan dimasukkan kedalam *spectrophotometer* untuk mengetahui hasilnya dengan cara dihitung menggunakan rumus. Pengamatan warna dilakukan dengan menggunakan alat *chromameter* CR-400.

E. Parameter Pengamatan

1. Warna

Warna merupakan sifat produk pangan yang dapat dipandang sebagai sifat fisik (obyektif) dan sifat organoleptik (subyektif). Warna diukur berdasarkan parameter a , dimana $-a$ yang menunjukkan warna yang mendekati hijau, sedangkan nilai $+a$ menunjukkan warna yang mendekati merah. Kecerahan diukur berdasarkan intensitas warna dengan menggunakan *Chromameter* CR – 400.

Menurut Hutchings (1999), pengukuran warna dilakukan menggunakan alat *Chromameter* CR – 400. Pengukuran meliputi atribut warna CIELAB ($L, a, b, C, 0H, \Delta E$). L menunjukkan kecerahan dengan nilai 0 (gelap atau hitam) hingga 100 (terang/putih), sedangkan a dan b adalah koordinat-koordinat *chrommameter*, dimana a untuk warna hijau (a negatif) sampai merah (a positif) dan b untuk warna biru (b negatif) sampai kuning (b positif). Total perubahan warna (ΔE) selama penyinaran diperoleh dengan menggunakan rumus:

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2]^{1/2}$$

Keterangan:

$\Delta L^* = (L^* \text{ sample dikurangi } L^* \text{ standar}) = \text{perbedaan terang gelap (+ = lebih terang, - = gelap)}$

$\Delta a^* = (a^* \text{ sample dikurangi } a^* \text{ standar}) = \text{perbedaan merah dan hijau (+ = merah, - = hijau)}$

$\Delta b^* = (b^* \text{ sample dikurangi } b^* \text{ standar}) = \text{perbedaan kuning dan biru (+ = kuning, - = biru)}$

$\Delta E^* = \text{Total perbedaan warna.}$

2. Total Fenol (mg GAE/100 FW)

Uji kadar senyawa fenol bertujuan untuk mengetahui jumlah fenol yang terdapat pada sampel. Pengujian total fenol merupakan dasar pengujian untuk aktivitas antioksidan karena senyawa tersebut berperan dalam mencegah terjadinya peristiwa oksidasi. Uji fenol menggunakan metode *folin-Ciocalteu* yang didasarkan pada reaksi oksidasi reduksi. Absorbansinya diukur dengan panjang gelombang 765 nm (pourmorand dkk; 2006). Pengujian Aktivitas Total Fenol dilakukan dengan cara:

- a. Melarutkan 1 gram sample kedalam aquades 10 ml
- b. Mengambil 0,5 ml lalu ditambahkan aquades 5 ml dikocok menggunakan tangan secara manual.
- c. Menunggu selama 5 menit kemudian larutan ditambahkan Na_2CO_3 5% selama 5 menit dan di tambahkan 1,5 folin lalu dihomogenkan secara manual dengan tangan.
- d. Setelah itu, dilakukan pengukuran dengan spektrofotometer pada panjang gelombang 765 nm.

Kadar fenol ditentukan berdasarkan persamaan asam standar. Standar yang di gunakan untuk pembuatan kurva standar adalah asam galat (*galic acid*). Standar asam galat dibuat dengan konsentrasi 5,10,20,30,40,50 ppm (khadambi,2007).

Berikt rumus total fenol:

$$\text{Kadar Total Fenol} = \frac{(\text{abs.sample} - \text{blanko}) - a \times \text{vol .awal} \times \text{Fp}}{b}$$

Berat sample

3. Uji Aktivitas Enzim Polyphenol Oksidase (PPO)

Pengujian aktivitas enzim *Polyphenol Oksidase* (PPO) bertujuan untuk mengukur dan mengetahui kadar enzim Polyphenol Oksidase yang terdapat pada sampel. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode Fujita *et.al.*, (1995) yang telah di modifikasi. Pengujian aktivitas enzim PPO dilakukan dengan cara :

- a. Sampe tiap ulangan ditimbang seberat 5 gram untuk nantinya dihaluskan dengan menggunakan blender dengan ditambah bahan pelarut 115 ml buffer phosphate.
- b. Menyaring larutan yang telah larut, kemudian diambil 4 ml sampel dan dimasukan kedalam tabung reaksi.
- c. Tambahkan pyrocatecol sebanyak 1 ml, kemudian dimasukan kedalam *sentrifuge* selama 30 menit.
- d. Pengukuran aktivitas enzim polyphenol oksidase dilakukan dengan memasukkan larutan ke dalam alat *spektrofotometer* dengan panjang gelombang 425 nm.

Kadar senyawa oksidase dihitung dengan menggunakan persamaan (Supavanich *et.al.*, 2012):

$$\text{Activity (U.Mi}^{-1}\text{)} = [(\text{AF}_{\text{sample}} - \text{AI}_{\text{Sample}}) - (\text{AF}_{\text{blank}} - \text{AI}_{\text{blank}})] / (0,001 \times t)$$

Keterangan:

AF_{sample} = Penyerapan akhir dari sample

AI_{sample} = Penyerapan awal dari sample

AF_{blank} = Penyerapan awal dari control

AI_{blank} = Penyerapan akhir dari control

t = waktu dalam satuan menit

4. Uji Aktivitas Enzim Peroxidase (POD)

Pengujian Aktivitas Enzim *Peroxidase* (POD) bertujuan untuk mengukur dan mengetahui kadar enzim perioksidase yang terdapat pada sample. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode Khan dan Robinson (1991).

Pengujian Aktivitas Enzim Peroxidase (POD) dilakukan dengan cara:

- a. Sampe tiap ulangan ditimbang seberat 5 gram untuk nantinya dihaluskan dengan menggunakan blender dengan ditambah bahan pelarut 115 ml *buffer phosphate*.
- b. Menyaring larutan yang telah larut, kemudian diambil 24 ml sampel dan dimasukkan kedalam tabung reaksi.
- c. Tambahkan 2,5 ml guaiacol dan H_2O_2 1% sebanyak 1 ml, masukan 5 ml kedalam tabung reaksi kemudian campuran larutan dan sampel masukan kedalam *sentrifuge* selama 30 menit.
- d. Pengukuran aktivitas enzim *polyphenol oxidase* dilakukan dengan memasukkan larutan ke dalam alat *spektrofotometer* dengan panjang gelombang 470 nm.

Kadar senyawa peroksidase dihitung dengan menggunakan persamaan (Supavanich *et.al.*, 2012):

$$\text{Activity (U.Mi}^{-1}\text{)} = [(\text{AF}_{\text{sample}} - \text{AI}_{\text{sample}}) - (\text{AF}_{\text{blank}} - \text{AI}_{\text{blank}})] / (0,001 \times t)$$

Keterangan:

AF_{sample} = Penyerapan akhir dari sample

AI_{sample} = Penyerapan awal dari sample

AF_{blank} = Penyerapan awal dari kontrol

AI_{blank} = Penyerapan akhir dari kontrol

t = waktu dalam satuan menit

5. *Total Antioxidant Activity (TAA)*

Menurut Sanchez Moreno *et. al.*, (1999), *Total antioxidant activity (TAA)* ditentukan dengan metode pemindahan 2,2-Diphenyl-1 picryl-hidrazil (DPPH). Absorbansi diukur pada 517 nm dengan menggunakan *spectrophotometer*. TAA dinyatakan dengan persentase penghambatan radikal DPPH dan ditentukan dengan menggunakan persamaan Sanchez Moreno *et. al.*, (1999):

$$TAA(\%) = \frac{Abs_{sampel} - Abs_{kontrol}}{Abs_{sampel}} \times 100$$

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan Sidik Ragam atau *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan software SAS pada taraf signifikansi α 5%. Apabila terdapat beda nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).

