

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilakukan di Laboratorium Farmatologi, Progran Studi Farmasi, Fakultas Kedokteran, Universiras Muhammadiyah Yogyakarta, Laboratorium Pascapanen dan Laboratorium Bioteknologi, Program Studi Agroteknologi, Fakultas Pertanian, Universiras Muhammadiyah Yogyakarta selama 2 bulan yaitu Oktober-November 2015.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : timbangan analitik, *hand pnetrometer*, lemari pendingin, *hot plate*, pengaduk, statif, gelas piala, gelas ukur, erlenmeyer, pisau, pipet tetes, botol suntik, tabung reaksi, mikropipet, cawan petri, vortex, mortar dan alu, kertas payung, pemanas (kompor), penjepit tabung reaksi, saringan, pisau, kertas saring, *indexs warna*, beaker glass, *sprayer*, *spectrophotometer*, *coloni counter*.

Sedangkan bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah buah tomat yang seragam, gliserol, larutan iod 0,01N (uji vitamin C), media tumbuh mikroba NA (pepton, beef extract, agar), larutan NaOH 1 N (uji asam titrasi), alkohol, aquadest, ekstrak daun belimbing wuluh, pati/tepung kanji, kitosan, asam asetat (CO_3COOH) 100%, indicator PP, Amilum, *Nelson C*, *Arseno*.

C. Metode Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan metode eksperimental yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal yaitu kombinasi pelapisan yang terdiri dari 4 perlakuan, yaitu:

- A. Kitosan
- B. Ekstrak Daun Belimbing Wuluh
- C. Ekstrak Daun Belimbing Wuluh + Kitosan
- D. Tanpa Pelapisan (Kontrol)

Setiap perlakuan terdiri dari 3 ulangan, sehingga diperoleh 12 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdapat 21 buah sampel sehingga diperoleh 252 buah sampel. Tomat yang dipilih memiliki ukuran, warna, dan umur yang sama. Peletakkan unit percobaan dapat dilihat pada lampiran 2.

D. Cara Penelitian

Penelitian dilakukan melalui 5 tahap yaitu: Isolasi Bakteri Penyebab Tomat Busuk, Pembuatan Ekstrak Daun Blimbing Wuluh, Pembuatan Kitosan, Tahap Aplikasi *Coating* pada Buah Tomat dan Tahap Pengamatan.

1. Isolasi Bakteri Penyebab Tomat Busuk
 - a. Pembuatan media: dilakukan dengan menimbang bahan yang diperlukan (NA 100ml: dibutuhkan aquades 100ml, pepton 0,5 gram, ekstrak daging 0,5 gram, agar 1,5 gram dan pH 6,8)
 - b. Isolasi dengan metode surface: mengambil 1 ml isolat tomat busuk, hingga seri pengenceran menjadi 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} . Petri dibungkus

dengan menggunakan kertas payung dan diberi label. Diamkan selama 48 jam, kemudian diamati bakteri apa saja yang tumbuh.

- c. Pemurnian : murnikan masing-masing bakteri yang tumbuh di petri dan memindahkan ke media miring.
- d. Perbanyak: bakteri yang murni diperbanyak dengan cara dipindah ke media cair. Diamkan selama 48 jam, kemudian masing-masing bakteri di shaker dalam NC selama 2 hari, setelah selesai aplikasi pada buah tomat yang steril dengan cara penyemprotan dan pengamatan, tujuannya untuk mengetahui bakteri mana yang paling membusukkan buah tomat.

2. Pembuatan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh

- a. Daun belimbing wuluh yang digunakan adalah daun yang dipetik dipohon yang sama dengan ukuran yang sama dan warna yang sama.
- b. Daun belimbing wuluh yang telah dipetik kemudian dicuci bersih menggunakan sabun pencuci buah.
- c. Setelah dicuci daun dipotong dengan pisau yang steril (disemprot alkohol), kemudian potongan daun dijemur dan dimasukkan kedalam oven hingga beratnya konstan barulah kemudian dimasukkan dalam blender yang steril.
- d. Ekstrak daun belimbing wuluh yang halus dilarutkan dengan etanol 96% (2gr EDBW : 5ml etanol).
- e. Ekstrak yang diperoleh kemudian disaring dengan saringan biasa (penyaringan dilakukan sebanyak 3 kali).
- f. Lalu disaring lagi dengan menggunakan kertas saring (penyaringan dilakukan sebanyak 3 kali).

g. Semua kegiatan dilakukan di dalam ruang steril dan didekat bunsen.

3. Pembuatan Kitosan

- a. Percobaan dilakukan dengan cara CH_3COOH 100% (asam asetat 1 ml) dimasukkan kedalam *beaker glass*, *beaker glass* diletakkan diatas kompor dan diaduk dengan kecepatan sedang sambil ditambahkan aquades dan kitosan sedikit demi sedikit sampai terbentuk larutan tersuspensi.
- b. Setelah larutan kitosan sudah larut, tambahkan gliserol 0,2 ml kemudian aduk kembali sambil ditambahkan larutan kanji hingga homogen.
- c. Setelah terbentuk larutan kitosan, tambahkan ekstrak daun belimbing wuluh (5ml) sehingga terbentuk larutan yang homogen dan kitosan siap diaplikasikan.

4. Tahap Aplikasi

- a. Sebelum kitosan diaplikasikan, terlebih dahulu dilakukan pemetikan buah tomat, pemetikan dilakukan di Keteb, Jawa Tengah dengan kriteria buah berumur, berukuran dan berwarna sama.
- b. Buah yang dipetik dibawa ke lab untuk disortir dan dicuci dengan pencuci buah, setelah dicuci buah tomat dipasang tali pada tangkainya dan buah disemprot alkohol.
- c. Kemudian buah direndam kedalam larutan sesuai perlakuan dan setelah itu buah digantung pada tali raffia untuk dikering anginkan.
- d. Saat tomat sudah kering letakan sesuai pengacakan barulah dilakukan pengamatan di hari (ke-0, ke-5, ke-10, ke-15, ke-20, ke-25) sesuai parameter pengamatan.

5. Tahap Pengamatan

- a. Pengamatan meliputi Susut Berat dengan cara menimbang sampel buah menggunakan timbangan analitik dan pengamatan warna dengan menggunakan *index warna*. (lampiran 3).
- b. Kekerasan : dengan alat *Pnetrometer Hand* dalam satuan N/m^2 . Pengukuran dilakukan dengan memasukkan pucuk alat berdiameter 8 pada 3 bagian buah secara acak dan hasilnya dirata-rata, buah yang sudah dilakukan uji kekerasan kemudian digunakan untuk pengamatan lain (Asam Tertitrasi, Vitamin C, Uji Mikrobiologi dan Gula Reduksi)
- c. Total Asam Tertitrasi dilakukan dengan cara:
 - i. Buah ditumbuk dan ditimbang 5 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar 100 ml dan ditambahkan aquadest sampai tanda, kemudian digojog dan disaring.
 - ii. Mengambil filtrate sebanyak 10 ml dengan pipet dimasukkan pada erlenmeyer dan ditambahkan indikator *phenol phthalein* (PP) 1% sebanyak 2 – 3 tetes. Setelah itu, melakukan titrasi dengan NaOH 0,1 N sampai berwarna merah muda yang tidak hilang selama 30 detik.
 - iii. Melakukan perhitungan total asam dengan berat molekul asam malat 116.
- d. Kadar Vitamin C
 - i. Mengambil 10 gram sampel buah yang telah dihaluskan dan ditambahkan aquadest hingga 250 ml.

- ii. Setelah itu, mengambil 25 ml filtrat dan ditambahkan 2 ml larutan amilum.
 - iii. Melakukan titrasi dengan menggunakan larutan Iod hingga berwarna kebiruan.
- e. Gula Reduksi

Uji gula reduksi dilakukan dengan membuat larutan Glukosa Standar untuk mengetahui persamaan gula reduksi yang digunakan dalam perhitungan gula reduksi.

- i. Glukosa Standar ditimbang sebanyak 0,01 gram, setelah itu dimasukkan kedalam 100 ml aquadest kemudian menambahkan *Nelson C* 1ml, kemudian dipanaskan selama 20 menit, didinginkan, kemudian ditambahkan 1 ml *arseno molib* dan 7 ml aquadest, lalu dilakukan pengecekan dengan alat *spectrophotometer*.
- ii. Mengambil sampel yang telah ditumbuk halus sebanyak 1 gram
- iii. Setelah itu, dimasukkan dalam botol suntik dan ditambahkan 100ml aquades
- iv. Mengambil filtrat sebanyak 0,1 ml ditambah 0,9 aquades.
- v. Menambahkan *Nelson regensia C* sebanyak 1 ml kemudian dipanaskan selama 20 menit
- vi. Setelah dingin, menambahkan 1 ml *anseno molib* dan 7 ml aquadest pada filtrat kemudian digojog dan didiamkan selama 30 menit lalu dilakukan pengecekan dengan alat *spectrophotometer*.

f. Uji Mikrobiologi

Tomat ditumbuk dan ditimbang sebanyak 1 g, kemudian dimasukkan kedalam botol suntik dengan seri pengenceran hingga 10^{-5} . Media tumbuh bakteri yang digunakan dalam uji ini yaitu media NA (Nutrien Agar). Mikroba yang diisolasi dengan *metode surface* kemudian dibungkus dengan kertas payung dan didiamkan selama 48 jam setelah itu hitung jumlah mikroba dengan *plate count*.

E. Parameter yang Diamati

Parameter yang diamati yaitu meliputi Uji Fisik, Uji Kimia dan Uji Mikrobiologi:

1. Uji Fisik (dilakukan setiap 2 hari sekali untuk Susut Berat dan Warna, 5 hari sekali untuk Kekerasan)
 - a. Susut Berat (%) (AOAC, 2000)

Dilakukan dengan alat timbangan analitik. Rumus yang digunakan adalah :

$$\text{Susut Berat(\%)} = \frac{\text{bobot awal sebelum disimpan} - \text{bobot akhir setelah disimpan}}{\text{bobot awal sebelum disimpan}} \times 100\%$$
 - b. Warna (Indeks Warna)
 - c. Kekerasan (N/m^2)

$$F = \text{Gaya} / \pi r^2$$

Keterangan:

r = jari-jari

$\pi = 22/7$ (3,14)

2. Uji Kimia (dilakukan setiap 5 hari sekali)

a. Total Asam Tertitrasi (%) (AOAC, 2000)

$$\text{Total asam (\%)} = \frac{\text{mlNaOH} \times \text{NNaOH} \times \text{BMAsamMalat} \times \text{FP}}{\text{mgsampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

FP = Faktor Pengenceran

BM= Berat Molekul

N = Normalitas

b. Kadar Vitamin C (%) (iodimetri)

$$\text{Vitamin C (\%)} = \frac{\text{Vtotaliod} \times \text{N} \times \text{FP} \times 0,88 \text{ mg}}{\text{gramsampel}} \times 100\%$$

Keterangan:

FP = Faktor Pengenceran

N = Normalitas

c. Kadar Gula Reduksi (%)

Uji gula reduksi dilakukan setiap 5 hari sekali pada masing-masing perlakuan. Pengujian dilakukan di Fakultas Farmasi, Kedokteran, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

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

3. Uji Mikrobiologis (cfu)

Dilakukan setiap 5 hari sekali dengan menggunakan *metode surface* seri pengenceran hingga 10^{-5} . Penghitungan mikroba dengan *plate count*.

F. Analisis Data

Data yang telah diperoleh dan analisis dengan menggunakan sidik ragam (Analysis of variance) dengan tingkat α 5%, bila ada beda nyata antar perlakuan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT (Duncan's Multiple

Range Test) dengan α 5%. Hasil pengamatan periodik disajikan menggunakan Tabel dan Diagram.