

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Pasca Panen Agroteknologi Fakultas Pertanian, Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Penelitian dimulai bulan September sampai November 2016.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang akan digunakan di dalam penelitian ini yaitu alginat, buah Melon, gliserol, aquades, Pepton, Dextros, ekstrak *Yeast*, metanol, *essensial oli* Lemon, *essensial oli* Jeruk, agar-agar, alkohol, CaCl₂, Nelson A, Nelson B, Arsenomolibdat, Indikator PP 1%, NaOH 0,1N, Hexana.

Alat yang digunakan plastik *Wrapping*, sterofoam, pisau, mortar, *cooler*, petridisk, Autoklaf, pH meter, label, ketrans sampul, koran, kertas saring, *magnetic stirrer*, spektrotometer, tabung labu, vortex, erlenmeyer, *Plate count*, *glove*, masker, *tissue*, timbangan analitik, karet gelang, kapas, pelastik pp.

C. Metode Penelitian

Penelitian eksperimental terdiri dari 2 tahap yaitu 1) Uji Antimikroba *essential oil* Lemon dan Jeruk 2) Aplikasi *edible coating* alginat berantibakteri pada buah Melon potong segar. Tahapan penelitian tersaji pada lampiran 1.

Tahap I : Uji Antibakteri *essential oil* Lemon dan Jeruk disusun dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan rancangan percobaan faktor tunggal terdiri dari 6 perlakuan yaitu:

A : *Essential Oil* Lemon 0,6% (v/v)

B : *Essential Oil* Lemon 0,7% (v/v)

C : *Essential Oil* Lemon 0,8% (v/v)

D : *Essential Oil* Jeruk 0,6% (v/v)

E : *Essential Oil* Jeruk 0,7% (v/v)

F : *Essential Oil* Jeruk 0,8% (v/v)

Tahap II: Aplikasi *edible coating* alginat berantibakteri *essential oil* Lemon dan Jeruk disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rancangan percobaan faktor tunggal terdiri dari tunggal 6 perlakuan yaitu:

A : *Essential Oil* Lemon 0,6 % (v/v)

B : *Essential Oil* Lemon 0,7 % (v/v)

C : *Essential Oil* Lemon 0,8 % (v/v)

D : *Essential Oil* Jeruk 0,6 % (v/v)

E : *Essential Oil* Jeruk 0,7 (v/v)

F : *Essential Oil* Jeruk 0,8 (v/v)

G : Kontrol

Jumlah dari perlakuan yaitu 7 dengan setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga menghasilkan 21 unit. Setiap unit terdiri dari 21 potong sampel dengan lebar 3 cm, 21 sampel korban dan 3 sampel perlakuan. *Lay Out* penelitian (Lampiran 2).

D. Cara Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian inti. Penelitian inti terdiri dari tahap I: uji antibakteri dan tahap II : aplikasi *edible coating* Alginat dengan antibakteri *essential oil*.

1. Penelitian Pendahuluan

a. Pembuatan Melon Potong Segar

Melon dibersihkan dengan cara merendamnya dalam larutan sodium (300 ppm) lalu dicuci dan dikeringkan dengan tissue. Satu buah Melon dipotong dan diiris sebanyak 12 potong dengan lebar 3 cm menggunakan yang tajam. Potongan Melon dikemas menggunakan sterofom dan *wrapping* plastik lalu disimpan dalam *cooler* dengan suhu 10°C. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan parameter perubahan warna.

b. Isolasi dan Karakteristik Isolat Bakteri Pembusukan Buah Melon

i. Sterilasi Alat

Sterilisasi alat menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 15-30 menit. Alat-alat yang akan disterilkan dibungkus dengan kertas payung sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf. Alat yang disterilkan antara lain pestidish, erlemeyer, tabung reaksi, dryglaski, batang pengaduk.

ii. Pembuatan Media

Pembuatan media NA yaitu dengan melarutkan *Peptone* 5 gram dan atau *yeast ekstrak* sebanyak 3 gram dalam *aquades* 1000 ml dengan api kecil dan diaduk secara *continue* sampai homogen. Tambahkan agar-agar sebanyak 15

gram. Setelah homogen, medium diukur pH 7,2 lalu disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1,5 atm selama 15 menit.

iii. Isolasi Pembuatan Bakteri Buah Melon Potong Segar

Buah Melon potong segar yang telah tidak enak rasanya diisolasi, dengan cara menimbang sampel buah melon yang telah busuk sebanyak 1 g. Sampel yang telah ditimbang, dihaluskan menggunakan mortar (penumbuk) kemudian dibuat suspensi sampai dengan konsentrasi 10^{-2} 10^{-4} dan 10^{-6} . Ambil 1 ml dari pengenceran yang terakhir sehingga mendapatkan 10^{-7} pada media lalu dituangkan pada cawan petri metode *surface* dan *streak* yang selanjutnya diinokulasi ke masing-masing media NA, diinkubasi selama 48 jam.

iv. Pemurnian Bakteri Buah Melon Potong Segar

Pemurnian mikroba diperoleh hasil dari tahap isolasi. Mikroba yang tumbuh diinokulasi pada media NA yang baru dan diinkubasi selama 48 jam.

v. Identifikasi dan Karakteristik Mikroba Buah Melon Potong Segar

Koloni mikroba yang telah tumbuh setelah dilakukan inkubasi selanjutnya dilakukan pengamatan secara makroskopis dan mikroskopis. Pengamatan secara makroskopis diamati dengan melihat morfologi. Pengamatan mikroskopis dilakukan dengan mengamati koloni mikroba di bawah mikroskop dengan pembesaran 40 x 10 (Lampiran 1a).

c. Pembanyakan Bakteri Pembusukan Buah Melon Potong Segar

Hasil isolasi yang didapatkan, dipindahkan pada media agar miring dan medium cair pada tabung reaksi, kemudian diinkubasi pada suhu kamar selama 48 jam. Kemurnian isolat, diuji kembali dengan pengamatan mikroskopis. Jika

setiap tabung terdapat satu jenis mikroba maka isolasi tersebut telah berhasil. Koloni mikroba yang telah dimurnikan selanjutnya diperbanyak pada NC, lalu digojog kultur selama 24 jam (10^9 CFU/ ml), dari inokulum cair mikroba siap diinokulasi (Lampiran 3).

2. Penelitian Inti

a. Tahap I : Uji Antibakteri *Essential Oil* Lemon dan Jeruk

i. Uji Daya Hambat Antimikroba dengan Metode *Paper Disk*

Pengujian aktivitas antimikroba dilakukan untuk mengetahui kemampuan daya hambat antara *essential oil* Lemon dan *essential oil* Jeruk pada bakteri pembusuk. Pada buah Melon potong segar. Pengujian ini menggunakan metode *Paper Disk* yaitu dengan cara mencelupkan lembaran *Paper Disk* 6 mm kedalam larutan antimikroba lalu dimasukkan ke dalam cawan petri yang sudah diisolasi Mikroba dari Pembusukan buah Melon potong segar.

Cawan petri diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 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 Antimikroba dengan Metode *Pour Plate*

Pengujian dengan metode *pour plate* dilakukan pada media NA yang dicampurkan Antimikroba kemudian dicampurkan ke dalam cawan petri. Stok mikroba kemudian dicampurkan ke dalam medium tersebut sebanyak 1 ml. selanjutnya diinkubasi selama 48 jam dan hasilnya diamati uji daya hambat dari bakteri yang tumbuh pada media tersebut.

d. Tahap II : Aplikasi *Edible Coating* Alginat Berantibakteri *Essential Oil* Lemon dan Jeruk

i. Pembuatan *Edible Coating* Berantibakteri

Edible coating dari alginat dijabarkan yaitu alginat pada 2% (w/v) dan gliserol pada 1,5% (v/v) yang dicampurkan ke dalam air suling steril dipanaskan pada 70° C dan diaduk sampai pelarutan total, dan yang terakhir tambahkan *essential oil* sesuai dengan perlakuan (0,6; 0,7; 0,8; % (v/v) (Rosa. *et al.*, 2007). Larutan kalsium klorida 2% (v/v) disiapkan secara terpisah.

ii. Pembuatan Kultur Bakteri

Stok bakteri pembusuk diambil 1 ose dan diisolasi ke dalam Nutrien Cair (NC). NC digunakan 10% dari jumlah volume larutan bakteri yang akan diaplikasi ke dalam NC dan digojog selama 48 jam. Setelah NC digojog selama 48 jam, diambil 1 ml dari NC yang berisikan bakteri dan dimasukkan ke dalam air steril 9 ml sehingga menjadi 10^{-1} , lalu diambil 1 ml dari 10^{-1} dan dimasukkan ke dalam air steril 99 ml sehingga menjadi 10^{-3} . Pengenceran bakteri 10^{-3} dimasukkan kedalam air steril 900 ml sehingga volum kultur bakteri yang didapatkan sebanyak 1000 ml.

iii. Aplikasi *Edible Coating* Berantibakteri

Melon dibersihkan dengan cara merendamnya dalam sodium (300 ppm) kemudian dicuci dan dikeringkan dengan kertas penyerap. Setelah bersih, buah Melon dipotong dan diiris lebar 3 cm dengan pisau dan kemudian dipotong dengan pisau yang tajam menjadi 12 potongan dalam satu buah Melon. Potongan

Melon dicelupkan ke dalam *edible coating* berantimikroba selama 2 menit pada suhu ruangan sebesar 18 °C, setelah itu dibiarkan menetes selama 1 menit (Rosa. *et al.*, 2007). Setelah tidak ada lagi yang menetes, dicelupkan ke dalam larutan CaCl₂ 2% selama 2 menit. Sebelum dikemas dan disimpan dalam *cooler* bersuhu 10°C, Melon potong segar dan disemprot dengan kultur bakteri pembusuk (Lampiran 5d).

iv. Pengamatan

Pengamatan dilakukan lima hari sekali selama 15 hari penelitian. Parameter yang diamati menguji sifat biologis (mikrobiologi), fisik (susut bobot, dan warna), kimia (pH, gula reduksi, dan asam tertitrasi) (Lampiran 1b).

E. Parameter yang Diamati

1. Tahap I : Uji Antibakteri

a. Daya Hambat dengan Metode *Paper Disk* (cm)

Uji aktivitas antibakteri *essential oil* Lemon dan Jeruk terhadap bakteri pembusukan Melon potong segar dengan cara Kirby Bauer dalam Gusti. dkk, (2013). Pada permukaan media yang berisi bakteri, diletakkan *paper disk* (kertas cakram) berdiameter 1,6 cm yang telah ditetaskan masing-masing larutan konsentrasi 0,6; 0,7; 0,8 % (v/v) pada setiap perlakuan. Selanjutnya, diinkubasi selama 48 jam pada suhu 37 °C. Zona hambat yang terbentuk dari masing-masing kertas cakram diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan cm sebagai data penelitian.

b. Daya Hambat dengan Metode *Pour Plate* (CFU/ml)

Perhitungan daya hambat metode *Pour Plate* dilakukan dengan cara menghitung jumlah pertumbuhan bakteri pada media yang telah dicampurkan dengan konsentrasi antimikroba. Kemudian hasil dari pertumbuhan mikroba yang paling sedikit (CFU/ml) menentukan konsentrasi yang baik sebagai antibakteri. Perhitungan bakteri dengan *plate count* harus memenuhi beberapa 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.

2. Tahap II: Aplikasi *Edible Coating Alginat Berantibakteri Essential Oil* Lemon dan Jeruk

a. Uji Mikrobiologi (CFU/ml)

Uji mikrobiologi dilakukan dengan menghitung total mikrobial menggunakan metode *plate count*. Media yang digunakan yaitu NA untuk bakteri dan pengamatan dilakukan pada hari ke 0, 5, 10 dan 15. Seri pengenceran dilakukan dengan menghaluskan bahan dan ditimbang sebanyak 1 g, kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi 9 ml aquades steril digojog sampai

homogen dengan *vortex*. Diencerkan 10^{-2} , diambil 1 ml hasil penyaringan pada langkan pertama hingga mendapatkan pengenceran 10^{-3} . Lalu, kegiatan pengenceran diulangi sampai mendapatkan pengenceran 10^{-7} .

Petridis yang berisi media sebanyak 8 ml dan mengental, diinokulasi dari hasil pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} dengan metode *sureface* menggunakan *dryglasky*. Setelah diinokulasi, suspensi diinkubasi selama 48 jam sehingga hasilnya mampu dihitung pertumbuhan mikroba dengan *coloni Counter*.

Perhitungan mikroba dengan *plate count* harus memenuhi beberapa 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 Warna

Pengujian warna bertujuan untuk mengetahui kualitas hasil tangkapan dengan menggunakan indera sensori pengelihatatan. Pengujian warna dilakukan dengan menggunakan alat berupa *skor sheet* warna dan *muncell color*. Pada *skor sheet* digunakan angka 1 sebagai nilai terrendah dan angka 4 untuk nilai tertinggi.

Pengujian tersebut dilakukan oleh 10 panelis dengan dengan skala penilaian sebagai berikut (Lampiran 5e):

Tabel 1. Skala Perubahan Warna Melon

Skala	Keterangan
1	2,5 <i>green yellow</i> 8/10
2	5 <i>yellow</i> 8/10
3	2,5 <i>yellow</i> 5/6
4	2,5 <i>yellow</i> 5/4

Selanjutnya nilai dari warna buah Melon potong segar dihitung menggunakan

$$\text{rumus : warna} = \frac{(\text{skor} \times \text{nilai mutu panelis})}{\text{jumlah panelis}} \times 100\%$$

c. Susut Bobot

Susut bobot dapat dilakukan dengan menimbang buah Melon potong segar mulai dari hari ke-0 hingga hari ke-15 selama penyimpanan, hasil timbangan buah dapat dinyatakan dalam persen. Susut bobot dapat dihitung dengan rumusan yang digunakan yaitu :

$$\text{susut bobot (\%)} = \frac{(B_0 - B_t)}{B_0} \times 100\%$$

Keterangan : B_0 = berat awal

B_t = berat pada saat pengamatan

d. Uji Gula Reduksi

Uji kadar gula reduksi menggunakan metode Nelson-Somogyi. Gula reduksi dapat mereduksi ion kupri menjadi kupro-oksida, dalam hal ini mereduksi reagen Nelson (Arsenomolibdat) menghasilkan warna biru. Campurkan Nelson A 25 ml dengan Nelson B 1 ml. Lalu masukan sampel dipipet sebanyak 1 ml ditambah 1 ml reagens C masukkan ke tabung reaksi lalu ditutup dan dipanaskan dalam *waterbath* selama 20 menit. Sampel didinginkan dan ditambahkan 2 ml

reagen Arsenomolibdat kemudian digojok lalu tambahkan 7 ml akuades. Setelah itu dibaca absorbansinya pada $\lambda = 540$ mm dengan *spektrofotometer*.

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

e. Total Asam Titrasi

Penentuan total asam titrasi dilakukan dengan menghancurkan buah Melon potong segar sebanyak 5 g dan dimasukkan ke dalam gelas piala tambahkan 100 ml akuades dan digojok. Kemudian disaring dan didapatkan filtrat Melon potong segar. Filtrat lalu diambil 10 ml dengan pipet dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer kemudian ditambahkan 1-2 tetes *indicator phenolphthalein* (PP) 1% maka diperoleh larutan Melon potong segar. Langkah selanjutnya yaitu dititrasi dengan NaOH 0,1 N hingga berwarna merah muda.

Selanjutnya hasil titrasi dihitung menggunakan rumus :

$$TA = \frac{(V_{\text{NaOH}}(\text{ml}) \times FP \times \text{Meq berat asam yang dominan} \times 100 \%)}{\text{berat equivalen (g)} \times 1000}$$

f. Uji pH

Penentuan nilai pH menggunakan pH meter (Merynda. dkk., 2012), elektroda pH meter sebelum digunakan distandarisasi menggunakan larutan buffer. Kemudian dibersihkan menggunakan aquadest dan dikeringkan. Sampel Melon potong segar dihancurkan lalu ditimbang sebanyak 1 gram. Kemudian sample 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 hasil pengamatan diolah dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) dengan taraf nyata $\alpha = 5\%$. Apabila terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan yang dicobakan, maka dilakukan uji lanjutan menggunakan *Duncan Multiple Range Test* (DMRT) dengan $\alpha = 5\%$, sedangkan data daya hambat (metode *paper disk* dan *pour plate*), mikrobiologi, warna dan pH dianalisa menggunakan histogram secara deskriptif.