

I. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Pascapanen Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta dengan waktu pelaksanaan Bulan Juni sampai dengan Juli 2018.

B. Alat dan Bahan Penelitian

Bahan-bahan terdiri dari buah apel varietas Manalagi, bubuk CMC (*Carboxymethylcellulose*), minyak atsiri daun sirih, minyak atsiri lemon, akuades, bidest, reagen Folin Ciocalteu, natrium karbonat (Na_2CO_3) 15%, pyrocatechol 0,5 M, 50 mM buffer fosfat pH 7, guaiacol 0,5 %, H_2O_2 0,3 %, 1 % H_2O_2 , dan alkohol 50 %. Adapun detil kebutuhan dapat dilihat pada lampiran 2.

Alat yang digunakan dalam penelitian antara lain : lemari pendingin, *chromameter*, pengaduk, spektrofotometer, sentrifuge, *wrapping film*, mikropipet, timbangan analitik, mortar dan alu, pemanas (kompor), saringan, tabung reaksi, erlenmeyer, pisau, pipet tetes, baskom, sterofom, dan wadah plastik.

C. Metode Penelitian

Penelitian dilakukan secara eksperimental dengan rancangan lingkungan Rancangan Acak Lengkap (RAL) secara faktorial yang terdiri atas 2 faktor. Faktor pertama merupakan konsentrasi CMC yang terdiri dari 2 aras yaitu CMC 1 % dan CMC 1,5 %. Faktor kedua merupakan konsentrasi minyak atsiri yang terdiri dari 3 aras yaitu minyak atsiri 0% (tanpa pemberian minyak atsiri), minyak atsiri daun sirih 0,1 %, minyak atsiri lemon 2 %, sehingga

terdapat 6 kombinasi perlakuan ditambah dengan 1 perlakuan kontrol sebagai pembanding.

C1M0	: CMC 1 %
C2M0	: CMC 1,5 %
C1M1	: CMC 1 % + minyak atsiri daun sirih 0,1 %
C2M1	: CMC 1,5 % + minyak atsiri daun sirih 0,1 %
C1M2	: CMC 1 % + minyak atsiri lemon 2 %
C2M2	: CMC 1,5 % + minyak atsiri lemon 2 %
COM0	: Tanpa <i>edible coating</i> (kontrol)

Tiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga total terdapat 21 unit percobaan. Setiap unit percobaan terdiri dari 8 sub unit (*sterofam*) sehingga diperoleh 126 sub unit percobaan.

D. Tata Laksana Penelitian

Penelitian dilaksanakan melalui 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian inti. Penelitian inti terdiri dari 4 tahapan, meliputi penyiapan alat dan bahan, pemetikan dan pengangkutan buah apel, pembuatan *edible coating* CMC, dan aplikasi CMC pada *fresh-cut* apel.

1. Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan ditujukan untuk mempermudah dan memperlancar aktivitas pada penelitian inti. Selain itu, penelitian pendahuluan diperlukan untuk mengetahui kualitas, umur simpan dan bagaimana sifat fisiologis *fresh-cut* apel Manalagi tanpa perlakuan (kontrol). Oleh karenanya, pada penelitian ini dilakukan dengan 2 perlakuan yaitu 1) mengambil salah

satu perlakuan di antara 7 perlakuan (CMC 1 % & minyak atsiri lemon 2 %) serta 2) tanpa perlakuan (kontrol). Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Adapun tahap-tahapnya sebagai berikut.

a. Persiapan alat dan bahan

Persiapan alat meliputi pengecekan untuk memastikan alat-alat berfungsi sebagaimana mestinya, pencucian peralatan serta sterilisasi beberapa peralatan ke dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm. Persiapan bahan dilakukan dengan pembelian bahan yang akan digunakan dalam proses penelitian.

Bahan yang perlu dipersiapkan yaitu buah apel yang banyak ditemui di pasaran sebagai pengganti buah Apel Manalagi untuk sementara dengan ukuran seragam, bersih, dan tidak terdapat cacat atau luka. Selain itu juga perlu dipersiapkan bahan-bahan yang akan digunakan dalam pembuatan *edible coating* dan parameter-parameter pengujian.

b. Pembuatan *edible coating* CMC

Edible coating dibuat berdasarkan konsentrasi perlakuan yang diperlukan. Untuk pendahuluan, *coating* dibuat sebanyak 200 ml saja. Adapun langkah pembuatannya yaitu bubuk CMC sebanyak 2 gram yang dimasukkan ke dalam 200 ml akuades yang telah dipanaskan menggunakan *waterbath* pada suhu 90 °C selama 10 menit, kemudian ditambahkan 3 ml gliserol dan minyak atsiri lemon 4 ml/200 ml sehingga dihasilkan larutan *edible coating*. Bahan-bahan dihomogenkan dan diaduk selama 5 menit.

Selain untuk pendahuluan, pada tahap ini juga sekaligus dibuat *coating* untuk penelitian inti nantinya. *Edible coating* dibuat berdasarkan konsentrasi perlakuan yang diperlukan. CMC pada konsentrasi 1 % dan 1,5 % diperlukan masing-masing bubuk CMC 5 gram dan 7,5 gram untuk dimasukkan ke dalam 500 ml akuades yang telah dipanaskan menggunakan *waterbath* dengan suhu 90°C selama 10 menit. Kemudian ditambahkan gliserol 7,5 ml serta minyak atsiri sesuai perlakuan yaitu masing-masing minyak atsiri lemon 10 ml/500 ml dan daun sirih 0,5 ml/500 ml sehingga dihasilkan larutan *edible coating*.

c. Aplikasi *edible coating* CMC diperkaya minyak atsiri & uji parameter

Buah apel yang sebelumnya tersimpan dalam refrigerator direndam ke dalam cairan klorin untuk menetralsir keberadaan bakteri maupun mikroba lainnya. Setelah itu, buah diangkat untuk dikeringkan hingga tiris. Tiap buah apel masing-masing perlakuan dipotong menjadi 6 bagian dengan penghilangan bagian isi atau tengah apel (*core*) menggunakan pisau *stainless steel* untuk selanjutnya langsung dicelupkan ke perlakuan *edible coating*. Potongan buah apel selanjutnya dimasukkan ke wadah *sterofoam* dan ditutup plastik *wrap*. Buah siap dimasukkan ke dalam refrigerator pada suhu 15 – 20°C. Pengamatan dilakukan setiap 3 hari sekali selama 15 hari (hari ke-0, 3, 6, 9, 12 dan 15) berdasarkan parameter warna, total fenol, kadar enzim PPO, serta kadar enzim POD.

2. Penelitian Inti

a. Persiapan alat dan bahan

Persiapan alat meliputi pengecekan untuk memastikan alat berfungsi sebagaimana mestinya, pencucian peralatan serta sterilisasi beberapa peralatan ke dalam autoklaf dengan tekanan 1 atm. Persiapan bahan dilakukan dengan pembelian bahan yang akan digunakan dalam proses penelitian.

b. Pemetikan dan Pengangkutan buah apel

Buah apel yang digunakan berasal dari wilayah Batu, Malang, Jawa Timur. Adapun karakteristiknya yaitu telah berumur 114 hari setelah bunga mekar, berjumlah 3 – 4 buah/kg, diameter buah antara 7 – 8 cm. Selain itu, sortasi juga dilakukan langsung di kebun dengan memilih buah yang ukurannya seragam, bebas penyakit, bersih, tidak terdapat cacat dan luka di penampakannya. Pengangkutan dari Batu ke Yogyakarta menggunakan mobil dengan estimasi waktu 8 – 9 jam. Buah disimpan terlebih dahulu dalam refrigerator bersuhu 14 °C sebelum diberi perlakuan *edible coating*.

c. Aplikasi *edible coating* CMC diperkaya minyak atsiri

- i. Setelah disortir ukuran yang seragam, apel dicuci dengan klorin 200 *microliter/liter*
- ii. Buah dipotong buah menjadi 6 bagian diikuti dengan penghilangan bagian tengah (*core*) dengan pisau *stainless steel* dengan ukuran 2 x 1,5 x 1 cm
- iii. Pencelupan potongan buah apel sesuai perlakuan lalu ditiriskan hingga *edible coating* kering dan tidak menetes

- iv. Potongan buah langsung diletakkan pada wadah *sterofoam* dan ditutup dengan *wrap film*
 - v. Masing-masing wadah diletakkan pada lemari pendingin untuk selanjutnya dilakukan pengamatan
 - vi. Pengamatan dilakukan sebanyak 6 kali selama 15 hari yaitu pada hari ke-0, ke-3, ke-6, ke-9, ke-12, ke-15 sesuai parameter pengamatan.
- d. Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama 12 hari dengan selang waktu 3 hari sekali (hari ke-0, ke-3, ke-6, ke-9, dan ke-12) pada tiap sampel ulangan dari setiap perlakuan untuk pengujian Uji Warna, Total Fenol Enzim Polifenol Oksidase (PPO), dan Enzim Peroksidase (POD).

E. Parameter Pengamatan

1. Uji Warna

Perubahan warna diukur menggunakan alat chromameter CR-400 dengan analisis L^* (*lightness*), a^* (*red-green*), b^* (*yellow-blue*) di ruang warna pada kondisi pencahayaan konstan setelah distandarisasikan berdasarkan warna hitam dan plat putih. L menunjukkan kecerahan dengan nilai 0 (gelap/hitam) hingga 100 (terang/putih), sedangkan a dan b adalah koordinat-koordinat chroma, dimana a untuk warna hijau (a negatif) sampai merah (a positif) dan b untuk warna biru (b negatif) sampai kuning (b positif). Perubahan warna (ΔE^*) menurut Robertson (1976) dihitung secara kuantitatif menggunakan rumus :

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

Keterangan :

$$\begin{aligned} \Delta L &= L_1 - L_0 (L_{\text{sampel}} - L_{\text{standar}} = \text{perbedaan terang (+) dan gelap (-)}) \\ \Delta a &= a_1 - a_0 (a_{\text{sampel}} - a_{\text{standar}} = \text{perbedaan merah (+) dan hijau (-)}) \\ \Delta b &= b_1 - b_0 (b_{\text{sampel}} - b_{\text{standar}} = \text{perbedaan kuning (+) dan biru (-)}) \\ \Delta E &= \text{total perubahan warna} \end{aligned}$$

2. Total fenol (ppm)

Pengujian total fenol dilakukan tiap 3 hari sekali pada hari ke-0, ke-3, ke-6, ke-9, dan ke-12 di Laboratorium Pascapanen Universitas Muhammadiyah Yogyakarta. Adapun tahapan pengukuran kadar total fenol didasarkan dengan metode Folin-Ciocalteu (Singleton and Rossi, 1965) yang dimodifikasi yaitu sebagai berikut :

1. Sample tiap ulangan dihaluskan kemudian ditimbang seberat 1 gram untuk nantinya dilarutkan ke dalam 10 ml akuades.
2. Kemudian diambil 0,5 ml ke dalam tabung reaksi, lalu ditambahkan 5 ml akuades.
3. Setelah 5 menit tambahkan natrium karbonat 15% sebanyak 1,5 ml dan 1,5 ml reagen Folin-Ciocalteu untuk selanjutnya digojok manual menggunakan tangan.
4. Pengukuran kadar fenol dilakukan dengan memasukkan larutan ke dalam alat *spektrofotometer* dengan panjang gelombang 765 nm.

Kandungan fenol dinyatakan berdasarkan persamaan kurva standar asam galat (*gallic acid*) yang dibuat pada konsentrasi 5, 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm (Khadambi, 2007). Penentuan kadar fenol ditentukan berdasarkan regresi kurva standar asam galat dengan rumus perhitungannya yaitu :

$$\text{Kadar Total Fenol} = \frac{C \times V \times fp}{G}$$

Keterangan :

- C = konsentrasi ekivalen dari grafik (nilai x)
- V = volume yang digunakan (ml)
- fp = faktor pengenceran
- G = berat sampel yang digunakan

3. Aktivitas enzim polifenol oksidase (PPO) (unit/menit)

Adapun tujuan pengujian enzim PPO yaitu untuk mengetahui dan mengukur kadar enzim atau aktivitas PPO pada *fresh-cut* apel Manalagi setelah diberi pelapisan *edible coating* CMC dan pengaruh minyak atisiri yang diberikan. Pengujian aktivitas enzim PPO didasarkan pada metode Supapvanich *et al.*, (2012) yang telah dimodifikasi. Adapun tahapannya yaitu :

- a. sampel tiap ulangan dihaluskan kemudian ditimbang seberat 5 gram untuk dilarutkan (diblender) ke dalam 115 ml *buffer* fosfat pH 7;
- b. larutan kemudian disaring untuk memisahkan filtrat dan ekstrak;
- c. ekstrak diambil sebanyak 4 ml ke tabung reaksi, lalu ditambahkan 1 ml *pyrocatechol*;
- d. kemudian disentrifugasi pada 2683 g selama 30 menit pada suhu 5 °C;
- e. aktivitas enzim PPO ditera pada alat *spectrophotometer* dengan panjang gelombang 425 nm.

Satu unit aktivitas PPO didasarkan pada perubahan absorbansi 0,001 per menit. Kadar senyawa PPO dihitung dengan menggunakan persamaan :

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

Keterangan :

- AF_{sample} = Penyerapan akhir dari sampel
- AI_{sample} = Penyerapan awal dari sampel
- AF_{blank} = Penyerapan awal dari control

AI_{blank} = Penyerapan akhir dari control
 t = waktu dalam satuan menit

4. Aktivitas enzim peroksidase (POD) (unit/menit)

Aktivitas enzim peroksidase dapat ditentukan berdasarkan tingkat oksidasi guaiacol oleh senyawa uji hidrogen peroksida (H_2O_2). Pengujian ini didasarkan pada metode Supapvanich *et al.*, (2012) dengan modifikasi sebagai berikut :

- sampel tiap ulangan dihaluskan kemudian ditimbang seberat 5 gram untuk dilarutkan (diblender) ke dalam 115 ml *buffer* fosfat pH 7;
- ekstrak diambil 24 ml untuk ditambahkan guaiacol 2,5 ml dan 1 ml H_2O_2 1 %;
- kemudian disentrifugasi pada 2683 g selama 30 menit pada suhu 5 °C;
- aktivitas enzim POD ditera pada alat *spectrophotometer* dengan panjang gelombang 470 nm.

Satu unit aktivitas POD didasarkan pada perubahan absorbansi 0,001 per menit. Kadar senyawa Peroxidase dihitung dengan menggunakan persamaan :

$$\text{Activity (U.ml}^{-1}\text{)} = [(AF_{\text{sample}} - AI_{\text{sample}}) - (AF_{\text{blank}} - AI_{\text{blank}})] / (0,001 \times t)$$

Keterangan :

AF_{sample} = Penyerapan akhir dari sampel
 AI_{sample} = Penyerapan awal dari sampel
 AF_{blank} = Penyerapan awal dari kontrol
 AI_{blank} = Penyerapan akhir dari kontrol
 t = waktu dalam satuan menit

F. Analisis Data

Data hasil penelitian ini diolah menggunakan analisis ragam *Analysis of Variance* (Anova). Apabila terdapat perbedaan yang nyata, maka analisis ini digunakan dengan Uji Jarak Berganda Duncan (*Duncan's Multiple Range Test*) taraf simpangan 5% atau dapat menggunakan analisis tabel maupun grafik.

