

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan selama Bulan Oktober hingga Bulan November 2018, bertempat di Laboratorium Pasca panen Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah buah jambu air varietas Dalhari dengan *grade* A yang langsung dipetik dari kebun petani di Pedukuhan Jogotirto, Desa Krasakan, Kecamatan Berbah, Sleman. Bahan – bahan lain yang digunakan untuk antara lain Alkohol 70%, Minyak atsiri vanili, minyak atsiri kayu manis, minyak atsiri sirih, minyak atsiri cengkeh, minyak atsiri lemon, klorin, Aquades, indikator PP, NaOH, media PCA, media PDA.

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah pisau, gelas beker, neraca analitik, *sterofom*, jarum ose, *drigalsky*, tabung reaksi, plastik wrap, *tissue*, botol semprot, batang pengaduk, pipet mikro, pipet tetes, pipet ukur, labu ukur, gelas ukur, tabung reaksi, statif, handrefraktometer, penetrometer, kulkas, pH meter, kertas payung, dan cawan petri.

C. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal berbagai macam minyak atsiri dengan 7 perlakuan. Untuk pembanding menggunakan kontrol positif dan

kontrol negatif. Setiap perlakuan diulang sebanyak tiga kali dan unit percobaan menggunakan 2 sampel dan 6 korban. Jambu air yang dibutuhkan sebanyak 168 buah.

Perlakuannya yaitu :

1. A : Air Biasa
2. B : Minyak Atsiri Kayu Manis 0,5 %
3. C : Minyak Atsiri Vanili 0,6 %
4. D : Minyak Atsiri Cengkeh 0,7 %
5. E : Minyak Atsiri Sirih 0,1 %
6. F : Minyak Atsiri Lemon 0,8 %
7. G : Klorin 200 ppm

D. Cara Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan dua tahap yakni tahap pertama uji anti mikroorganisme dan tahap kedua yakni aplikasi pencucian jambu air Dalhari dengan minyak atsiri. Jambu air Dalhari diperoleh dari petani jambu di daerah Berbah, Sleman, DIY. Jambu air Dalhari yang digunakan adalah jambu yang berumur 60 hari setelah berbunga dan diperoleh dari jambu air yang telah dibungkus plastik selama pematangannya di pohon untuk menghindari adanya infeksi lalat buah. Jambu air ini kemudian diangkut dari Berbah menuju Taman Tirto menggunakan box dan mobil. Jambu air Dalhari disimpan di dalam kulkas dengan suhu 15°C sebelum diaplikasi.

1. Isolasi dan Karakterisasi Isolat Mikroorganisme Pembusukan Buah Jambu air Dalhari

a. Persiapan Alat dan Bahan

Alat dan bahan disterilisasi menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 20-30 menit. Alat-alat yang akan disterilkan dicuci bersih, dikeringkan, dan dibungkus dengan kertas payung sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf. Alat dan bahan yang disterilkan antara lain cawan petri, *erlemeyer*, tabung reaksi, botol suntik, tip, *Plate Count Agar* (PCA) (Agnes E., *et.al.* 2005).

b. Pembuatan Media

Plate Count Agar (PCA) diformulasikan untuk isolasi mikroorganisme jenis bakteri (Mohamed *et.al.*, 2018). Media PCA (*Plate Count Agar*) direkomendasikan untuk penentuan jumlah lempeng mikroorganisme dalam spesimen makanan, air dan air limbah. Cara pembuatannya yakni dengan melarutkan 22,5 g PCA ke dalam 1 liter air. Bahan-bahan pembuat *plate count agar* dihomogenkan dengan pemanasan dalam air mendidih sebanyak 1 liter, kemudian didinginkan hingga 45–50 ° C dan tuangkan ke dalam cawan petri dan biarkan selama 25-30 menit.

Potato dextrose Agar (PDA) digunakan untuk isolasi mikroorganisme jenis jamur (Mohamed *et.al.*, 2018). Cara pembuatannya yakni dengan melarutkan bubuk PDA ke dalam air mendidih. Larutan PDA disterilisasi menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu 121°C. Setelah disterilisasi, larutan PDA dibiarkan hingga suhunya menjadi lebih hangat dari sebelumnya dan dituang ke dalam cawan petri sebanyak 10 ml. Larutan PDA tersebut kemudian disimpan di Laminar Air Flow Cabinet hingga agarnya menjadi padat dan siap digunakan (Aldina dkk., 2017).

c. Isolasi Mikroorganisme Buah Jambu air Dalhari

Buah Jambu air Dalhari diisolasi, dengan cara menimbang sampel buah Jambu air Dalhari sebanyak 1 g. Sampel yang telah ditimbang, kemudian dihaluskan menggunakan mortar (penumbuk) dan dibuat suspensi sampai dengan konsentrasi 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} dan 10^{-9} . Larutan sebanyak 0,1 ml dari masing-masing pengenceran lalu diaplikasikan pada media PDA dan PCA dengan metode *surface* yang selanjutnya diinkubasi selama 48 jam.

d. Pemurnian dan Perbanyakan Mikroorganisme

Mikroorganisme yang diperoleh dari isolasi mikroorganisme pembusuk jambu kemudian dikarakterisasi secara morfologi menjadi *yeast*, bakteri dan jamur. Mikroorganisme jenis *yeast*, bakteri dan jamur yang telah dipilih kemudian diperbanyak dengan diinokulasikan pada media PCA (bakteri) dan PDA (*yeast* dan jamur) (Mohamed *et.al.*, 2018).

2. Uji Daya Hambat Minimum/ Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

a. Uji Daya Hambat dengan Metode *Paper disk* (cm)

Uji aktivitas antimikroorganisme minyak atsiri vanili, kayu manis, sirih, cengkeh, dan lemon terhadap mikroorganisme pembusuk jambu air Dalhari dengan cara Kirby Bauer dalam Gusti A.A. dkk, (2013). Pada permukaan media PCA yang telah dituangi suspensi bakteri dan media PDA yang telah dituangi *yeast* dan jamur, kemudian diletakkan kertas cakram (*paper disk*) berdiameter 1,2 cm yang telah ditetesi masing-masing 0,1 ml larutan konsentrasi minyak atsiri yang telah ditentukan. Selanjutnya, media diinkubasi pada suhu ruang selama 48 jam. Zona hambat yang terbentuk dari masing-masing kertas cakram diukur menggunakan jangka sorong dengan satuan cm sebagai data penelitian.

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

Perhitungan daya hambat Metode *Pour plate* dilakukan dengan menghitung jumlah pertumbuhan bakteri pada media yang telah dicampurkan dengan konsentrasi antimikroorganisme. Kultur mikroorganisme sebanyak 1 ml dituangkan pada petri, kemudian pada petri tersebut dituangi media agar (PCA dan PDA) dan diratakan dengan cara mengerak-gerakkan petri membentuk angka 8. Kemudian hasil dari pertumbuhan mikroorganisme yang paling sedikit (CFU/ml) menentukan konsentrasi yang baik sebagai antibakteri (Pelczar and Chan, 2008 dalam Titin, 2018). Perhitungan mikroorganisme dengan plate count harus memenuhi beberapa syarat, yaitu sebagai berikut:

- i. Jumlah koloni tiap cendawan petri antara 30-300 koloni.
 - ii. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (spreader).
 - iii. 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.
 - iv. Jika dengan ulangan memenuhi syarat, maka hasilnya dirata-rata.
3. Aplikasi Pencucian Jambu Air Dalhari dengan berbagai konsentrasi Minyak Atsiri
- a. Pemilihan Jambu air Dalhari

Jambu air yang akan diberi perlakuan harus mempunyai umur dan ukuran yang sama. Jambu air dipetik langsung dari petani Pedukuhan Jogotirto, Desa Krasakan, Kecamatan Berbah, Sleman. Jambu air yang dipetik terlebih dahulu dibungkus plastik dalam proses pematangannya di pohon untuk menghindari adanya infeksi lalat buah.

b. Pembuatan larutan *sanitizer*

Minyak atsiri dengan konsentrasi yang ditentukan dari hasil uji MIC kemudian dicampur dengan tween 80 sebesar 10% dari konsentrasi minyak atsiri yang digunakan dan dicampur menggunakan mixer hingga membentuk emulsi (Ji Hoon dan Kyung Bin, 2018).

c. Proses Pencucian Jambu air Dalhari

Jambu air Dalhari yang telah dipetik kemudian dibersihkan dari bagian-bagian yang tidak dibutuhkan. Jambu air kemudian dicuci dan direndam dalam larutan minyak atsiri selama 3 menit dan perlakuan kontrol direndam dengan larutan natrium hipoklorit dengan konsentrasi $200 \mu\text{l L}^{-1}$. Setelah dicuci, jambu air kemudian dikering anginkan (Brendan, *et al.*, 2007).

d. Pengemasan

Jambu air yang telah dikering anginkan kemudian dikemas dengan *sterofoam* dan *wrap*, kemudian disimpan dalam *cooler* bersuhu 15°C .

4. Uji analisis flavonoid GC-MS (*Gas Chromatography Mass Spectrometry*) Setiap Minyak Atsiri

Fraksi minyak esensial yang menunjukkan aktivitas antimikroorganisme dianalisis dengan kromatografi gas / spektrometri massa (GC / MS) untuk memeriksa struktur kimianya. Analisis Uji GC-MS menggunakan alat GC-MS Chromeleon (c) Dionex Version 7.2.8.10783.

E. Parameter yang Diamati

Penyimpanan jambu air yang diberikan perlakuan pencucian dengan berbagai minyak atsiri dan klorin dilakukan selama beberapa hari, dengan pengamatan

parameternya dilakukan setiap 3 hari sekali pada dari ke-0, ke-3, ke-6, ke-9, ke-12, dan ke-15. Parameter yang diamati antara lain:

1. Analisis sifat fisik

a. Susut Bobot

Pengukuran susut bobot dilakukan untuk mengetahui perkembangan kadar air yang ada pada setiap buah. Pengukuran susut bobot dilakukan setiap hari dengan timbangan analitik menggunakan 3 sampel buah dengan membandingkan selisih bobot sebelum penyimpanan dengan sesudah penyimpanan. Rumus yang digunakan adalah:

$$\% \text{ susut bobot} = \frac{\text{bobot awal} - \text{bobot akhir}}{\text{bobot awal}} \times 100\%$$

b. Pengujian tekstur buah

Pengujian tekstur buah dilakukan untuk mengetahui tingkat perubahan turgor pada buah. Pengujian tekstur buah diukur dengan alat penetrometer dengan cara menusukkannya ke permukaan buah jambu air dengan 3 kali ulangan setiap buahnya ditempat yang berbeda-beda setiap 3 hari sekali. Nilai dari gaya untuk menekan kekerasan jambu akan secara otomatis muncul pada alat penetrometer yang digunakan (Santi dkk., 2014).

Kekerasan dapat dihitung dengan menggunakan rumus:

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

2. Analisis sifat kimia

a. Asam Titrasi

Uji total asam tertitrasi dilakukan untuk mengukur keadaan total asam organik pada larutan sampel menggunakan metode titrasi dengan cara memasukkan sampel

sebanyak 1 gram dan diencerkan menggunakan aquadest sebanyak 100 ml, diambil 10 ml dengan menambahkan indikator PP sebanyak 1-3 tetes kemudian dititrasi dengan NaOH 1 N sampai terjadi perubahan warna menjadi merah jambu secara stabil dan dilakukan setiap 3 hari sekali (OAOC 1995 dalam Sari dkk., 2018).

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

b. Total Padatan Terlarut

Penentuan *total soluble solid* (TSS) atau total padatan terlarut adalah menentukan kadar senyawa organik yang terkandung dalam buah yang diukur dengan menggunakan alat *handrefractometer*. Buah dihaluskan terlebih dahulu kemudian dimasukkan sebanyak 5 g ke dalam beaker glass dan ditambahkan 20 ml akuades. Setetes larutan diambil dan diletakkan pada lensa lalu dilihat batas terang dan gelap. Angka yang tertera pada batas tersebut merupakan nilai total padatan terlarut (AOAC 1984 dalam Desnoviani dkk., 2017). Dihitung total padatan terlarut dengan rumus :

Total padatan terlarut (°Brix) = angka handrefractometer x faktor pengenceran.

Pengukuran kadar gula total dilakukan mulai hari ke 0 dan selanjutnya setiap 3 hari sekali menggunakan sampel yang berbeda pada setiap kali pengukuran. Pengukuran kadar gula total menggunakan 1 buah jambu korban pada setiap perlakuan dan 3 ulangan.

c. Uji pH

Penentuan nilai pH menggunakan pH meter (Merynda. dkk., 2012). Elektroda pH meter dinetralkan dengan larutan buffer dan dibersihkan menggunakan aquadest kemudian dikeringkan. Sampel jambu air Dalhari dihancurkan lalu ditimbang sebanyak 1 gram. Sample kemudian ditambahkan 5 ml aquadest dan digojog sampai homogen. Setelah itu, elektroda dicelupkan ke dalam sample dan dibiarkan hingga diperoleh pembacaan pH yang stabil. Nilai pH dapat langsung dibaca pada skala pH meter.

3. Analisis Sifat Biologi

a. Uji Mikrobiologi (CFU/ml)

Uji mikrobiologi dilakukan dengan menghitung total mikroorganisme menggunakan metode *plate count*. Media yang digunakan yaitu PCA untuk bakteri dan PDA untuk jamur dan yeast. Pengamatan dilakukan pada hari ke 0, 3, 6, 9, 12 dan 15. Bahan diambil sebanyak 1 g dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi kemudian ditambahkan akuades 9 ml dan diaduk sampai merata. Hasil pengenceran ini diambil dengan pipet volume sebanyak 1 ml kemudian ditambahkan akuades 9 ml. Pengenceran ini dilakukan hingga mencapai 3 pengenceran terbaik yang didapatkan dari uji sebelumnya. Dari hasil 3 pengenceran terbaik pada tabung reaksi kemudian diambil sebanyak 0,1 ml dan diratakan dengan metode surface menggunakan dryglasky pada media *Plate Count Agar* (PCA) dan *Potato Dextrose Agar* (PDA). Media PCA dan PDA yang telah disiapkan di atas cawan petri,

selanjutnya diinkubasi selama 24 jam pada suhu 32 oC dengan posisi terbalik. Jumlah koloni yang ada dihitung dengan colony counter (Fardiaz, 1992).

Perhitungan mikroorganisme 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.

F. Analisis Data

Data hasil pengamatan akan dianalisis dengan sidik ragam pada taraf kesalahan 5%. Jika terdapat beda nyata antar pengaruh perlakuan maka dilakukan uji lanjut *Duncan Multiple Range Test* pada taraf 5%.