

### III. TATA CARA PENELITIAN

#### A. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Juli sampai Agustus 2018 di Laboratorium Pascapanen program studi Agroteknologi Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta.

#### B. Bahan dan Alat Penelitian

**Bahan :** Apel varietas Manalagi dengan umur panen seragam (114 hari setelah bunga mekar), Natrium bisulfit, Methanol, *Buffer Phosphate*, Guaiacol, Hidrogen Peroksida, Folin, *Pyrocatechol*, DPPH, Alkohol, *Aquadest*, *Aquabidest* dan *sterofom*.

**Alat :** Lemari pendingin, timbangan analitik, *Chromameter* CR – 400, *spectrophotometer*, pisau, gelas piala, gelas ukur, Erlenmeyer, tabung reaksi, botol spray, mikropipet, mortar, *sterofom*, plastik *wrap*, dan *waterbath*.

#### C. Metode Penelitian

Penelitian dirancang dengan metode ekperimental yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rancangan perlakuan faktor tunggal. Perlakuan yang diujikan adalah berbagai konsentrasi natrium bisulfit dan waktu pencelupan yang terdiri dari 8 perlakuan dan 1 kontrol, yaitu :

NIWI = natrium bisulfit 200 ppm + pencelupan selama 5 menit

N1W2 = natrium bisulfit 200 ppm + pencelupan selama 3 menit

N2W1 = natrium bisulfit 150 ppm + pencelupan selama 5 menit

N2W2 = natrium bisulfit 150 ppm + pencelupan selama 3 menit

N3W1 = natrium bisulfit 100 ppm + pencelupan selama 5 menit

N3W2 = natrium bisulfit 100 ppm + pencelupan selama 3 menit

N4W1 = natrium bisulfit 50 ppm + pencelupan selama 5 menit

N4W2 = natrium bisulfit 50 ppm + pencelupan selama 3 menit

N0W0 = Tanpa perlakuan (kontrol)

Setiap perlakuan diulang sebanyak 3 kali, diperoleh 27 unit percobaan. Setiap unit terdiri dari 7 sub-unit sehingga diperoleh 189 sub-unit percobaan atau potong buah (*Layout* pada lampiran 1).

#### **D. Tata Laksana Penelitian**

Penelitian dilakukan melalui dua tahapan, yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian inti.

##### **1. Penelitian Pendahuluan**

###### **a. Persiapan Alat dan Bahan**

Persiapan alat meliputi pembersihan lemari pendingin dan pengecekan suhu lemari pendingin, penyiapan dan pengecekan timbangan analitik, pengecekan alat *Chromameter* CR – 400 untuk pengamatan warna, pembersihan *spectrophotometer*, sterilisasi pisau, sterilisasi gelas ukur, Erlenmeyer, tabung reaksi, botol suntik, botol spray, mikropipet, mortar, dan pengecekan water bath. Sedangkan penyiapan bahan dilakukan dengan menyiapkan buah apel varietas Manalagi dengan ukuran yang seragam sebanyak 3 buah, penyiapan serbuk natrium bisulfit sebanyak 150 mg, *Methanol*, pengenceran *Buffer Phosphate*, *Guaiacol*, Hidrogen Peroksida, Folin, Alkohol, Aquades, plastik *wrap*, dan *sterfoam*.

**b. Penyiapan Buah Apel Manalagi**

Penyiapan buah apel Manalagi dilakukan dengan cara membeli buah apel Manalagi di pasar buah terdekat. Buah apel yang dipilih adalah apel yang termasuk ke dalam *Grade A*, yaitu dengan berat masing-masing buah sekitar 250 gram atau 4 – 5 buah per kilogram, buah tidak cacat dan tidak memiliki luka. Selanjutnya buah diangkut secara hati-hati hingga sampai ke Laboratorium Pascapanen untuk dilakukan proses selanjutnya.

**c. Pencucian Buah Apel**

Pencucian buah apel dilakukan dengan cara menyiapkan bak yang sudah berisi air yang telah dicampur klorin dengan konsentrasi  $200\mu\text{l L}^{-1}$ . Kemudian apel dicuci satu persatu untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada kulit buah kemudian ditiriskan.

**d. Pembuatan Larutan**

Pembuatan larutan untuk perlakuan pada penelitian pendahuluan ini dilakukan dengan menyiapkan 1 perlakuan saja, yaitu menggunakan larutan natrium bisulfit 150 ppm. Pembuatan larutan dilakukan dengan cara melarutkan 150 mg natrium bisulfit ke dalam 1 liter akuades kemudian dihomogenkan.

**e. Pemotongan Buah Apel dan Pencelupan**

Pemotongan buah apel dilakukan dengan cara membagi 1 buah apel menjadi 6 bagian, kemudian dihilangkan bagian *core* nya. Pada penelitian pendahuluan ini digunakan 2 perlakuan, yaitu buah apel yang dikemas tanpa

perlakuan/pencelupan dan buah apel yang diberi perlakuan/pencelupan menggunakan natrium bisulfit.

Buah apel tanpa perlakuan dikemas sesaat setelah buah dipotong, kemudian ditutup rapat menggunakan plastic *wrap* dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin. Sedangkan buah apel yang diberi perlakuan setelah pemotongan langsung dimasukkan ke dalam larutan natrium bisulfit 150 ppm dan direndam selama 3 menit. Pada langkah ini, bagian buah dipastikan terendam seluruhnya secara merata. Setelah 3 menit, buah ditiriskan dan diletakkan pada sterofom kemudian ditutup rapat menggunakan plastik *wrap*. Potongan buah yang telah diberi perlakuan dan dikemas ini disimpan pada lemari pendingin dengan suhu 5°C selama 3 hari.

#### **f. Pengamatan**

Pengamatan untuk penelitian pendahuluan ini dilakukan setelah potongan buah yang telah diberi perlakuan disimpan selama 3 hari. Pengamatan yang dilakukan meliputi uji aktivitas enzim *Peroxidase* (POX), uji aktivitas enzim *Polyphenol Oxidase* (PPO), uji Total Fenol, uji *Total Antioxidant Activity* (TAA) dan uji warna.

## **2. Penelitian Inti**

### **a. Persiapan Alat dan Bahan**

Persiapan alat meliputi pembersihan lemari pendingin dan pengecekan suhu lemari pendingin, penyiapan dan pengecekan timbangan analitik, pengecekan alat *Chromameter* CR – 400 untuk pengamatan warna, pembersihan *spectrophotometer*, pembersihan pisau, sterilisasi gelas ukur,

Erlenmeyer, tabung reaksi, botol suntik, botol spray, mikropipet, mortar, dan pengecekan water bath. Sedangkan penyiapan bahan dilakukan dengan menyiapkan buah apel varietas Manalagi, penyiapan serbuk natrium bisulfit, *Methanol*, pengenceran *Buffer Phosphate*, *Guaiacol*, Hidrogen Peroksida, Folin, Alkohol, Aquades, plastik *wrap*, dan *sterofom*.

**b. Panen Buah Apel Manalagi**

Pemanenan buah apel dilakukan di salah satu perkebunan apel di kota Batu, Malang. Buah apel yang dipanen adalah buah yang berumur 114 hari setelah bunga mekar, buah yang termasuk ke dalam *grade A* dengan kriteria buah berukuran 4 – 5 buah/kg, buah tidak cacat dan tidak luka. Setelah pemanenan dan penyortiran, buah apel dimasukkan ke dalam *box* buah yang didalamnya disekat menggunakan gabus tipis atau kertas untuk meminimalisir gesekan antar buah dan menghindari luka pada daging buah. Selanjutnya buah diangkut menggunakan kendaraan pribadi hingga sampai ke Laboratorium Pascapanen Fakultas Pertanian UMY. Buah dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 20°C.

**c. Pencucian Buah Apel**

Pencucian buah apel dilakukan dengan cara menyiapkan bak yang sudah berisi air yang telah dicampur klorin dengan konsentrasi 200µl L<sup>-1</sup>. Kemudian apel dicuci satu persatu untuk menghilangkan kotoran yang menempel pada kulit buah kemudian ditiriskan.

**d. Pembuatan Larutan Natrium bisulfit**

Pembuatan larutan natrium bisulfit dilakukan dengan cara membuat larutan stok terlebih dahulu. Larutan stok yang dibuat adalah larutan dengan konsentrasi 200 ppm, yaitu dengan cara memasukkan 1.600 mg natrium bisulfit ke dalam 8 liter air, kemudian dihomogenkan. Setelah itu, dilakukan proses pengenceran untuk membuat larutan dengan konsentrasi 150 ppm, 100 ppm dan 50 ppm. Pengenceran yang dilakukan dengan cara menambahkan akuades pada larutan stok sesuai hasil perhitungan menggunakan rumus :

$$V_1 \cdot M_1 = V_2 \cdot M_2$$

Keterangan :

$V_1$  = Volume Awal

$M_1$  = Konsentrasi Awal

$V_2$  = Volume Akhir

$M_2$  = Konsentrasi Akhir

**e. Pemotongan Buah Apel Manalagi dan Pencelupan**

Pemotongan buah apel dilakukan dengan cara membagi 1 buah apel menjadi 6 bagian, kemudian dihilangkan bagian *core* nya. Buah yang telah dipotong langsung dimasukkan ke dalam larutan natrium bisulfit dan direndam sesuai perlakuan. Perendaman ini dipastikan semua bagian potongan apel terendam larutan secara merata. Setelah direndam, potongan buah ditiriskan kemudian diletakkan di atas *sterofoam* dan ditutup rapat menggunakan plastik *wrap*. Potongan buah yang telah dikemas ini disimpan pada lemari pendingin dengan suhu 5°C selama 15 hari.

## f. Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama 15 hari dengan waktu pengamatan setiap 3 hari sekali. Setiap 3 hari sekali diambil sampel korban dari setiap perlakuan untuk dilakukan uji aktivitas enzim *Peroxidase* (POX), aktivitas enzim *Polyphenol Oksidase* (PPO), Fenol, *Total Antioxydant Activity* (TAA) dengan cara memotong dan menumbuk sampel, mengencerkan sampel menggunakan akuades, menambahkan larutan pada sampel sesuai dengan uji yang akan dilakukan dan sampel hasil pengenceran dimasukkan ke dalam *spectrophotometer* untuk kemudian hasilnya dihitung dengan menggunakan rumus. Pengamatan perubahan warna dilakukan dengan menggunakan alat *Chromameter CR – 400*.

## E. Parameter Pengamatan

### 1. Warna

Parameter warna diukur berdasarkan parameter a, dimana  $-a$  yang menunjukkan warna mendekati hijau, sedangkan nilai  $+a$  menunjukkan warna mendekati merah. Kecerahan diukur berdasarkan intensitas warna dengan menggunakan *Chronmameter Minolta CR - 400*. Pengamatan dilakukan setiap 3 hari sekali selama 15 hari.

Pengukuran warna meliputi atribut warna CIELAB (L, a, b, C,  $^{\circ}H$ ,  $\Delta E$ ). L menunjukkan kecerahan dengan nilai 0 (gelap/hitam) hingga 100 (terang/putih), sedangkan a dan b adalah koordinat – koordinat *chromameter*, dimana a untuk warna hijau (a negatif) sampai merah (a positif) dan b untuk

warna biru (b negatif) sampai warna kuning (b positif). Total perubahan warna ( $\Delta E$ ) selama penyimpanan diperoleh dengan menggunakan rumus :

$$\Delta E = [(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2] \times 0,5$$

Keterangan :

$\Delta E$  = Total perbedaan warna

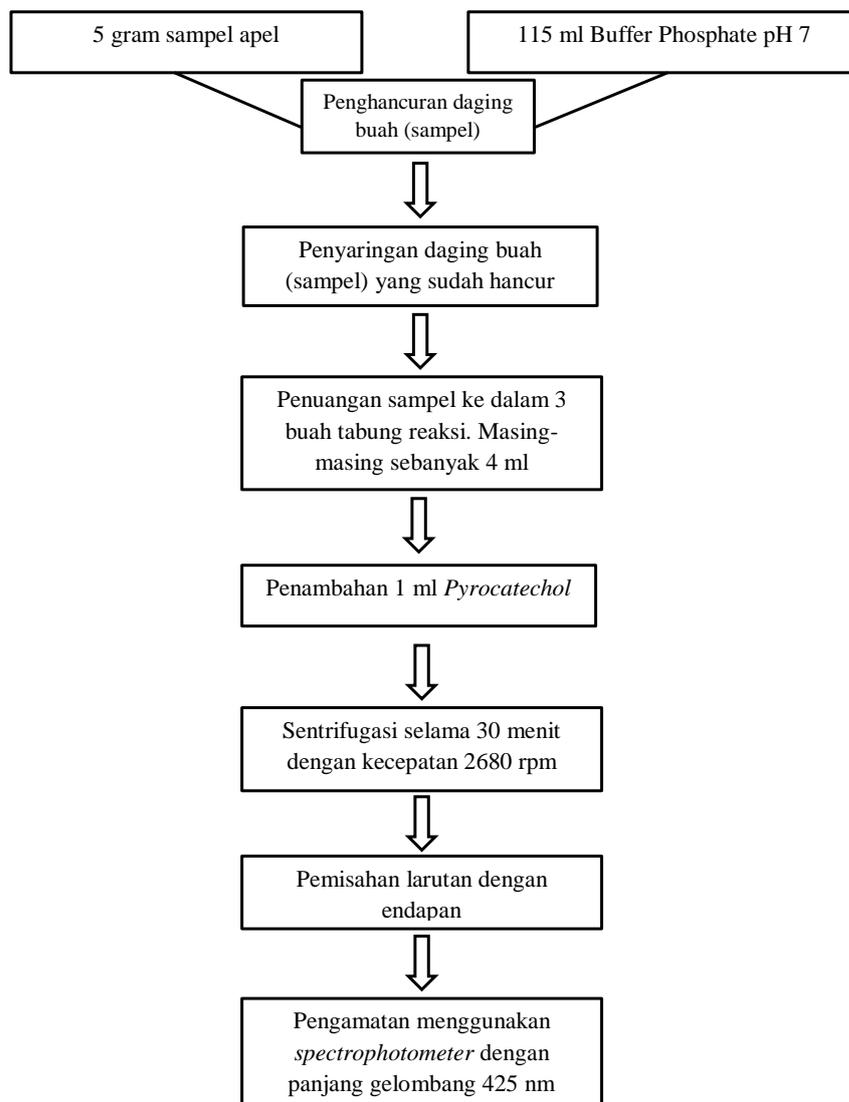
$\Delta L$  (L sampel dikurangi L standar) = Perbedaan terang dan gelap (+ = lebih terang, - = lebih gelap)

$\Delta a$  (a sampel dikurangi a standar) = Perbedaan merah dan hijau (+ = merah, - = hijau)

$\Delta b$  (b sampel dikurangi b standar) = perbedaan kuning dan biru (+ = kuning, - = biru)

## 2. Uji Aktivitas Enzim Polifenol Oksidase (PPO)

Pengujian aktivitas enzim Polifenol Oksidase (PPO) bertujuan untuk mengukur dan mengetahui aktivitas enzim Polifenol Oksidase yang terdapat pada sampel setelah dilakukan pemotongan, pencelupan menggunakan natrium bisulfit dan penyimpanan. Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode Galeazzi *et al.* (1981) yang juga digunakan dalam penelitian Supapvanich *et al.*, (2012). Metode ini mengkonversi hasil *spectrophotometer*, yaitu setiap 1 unit menunjukkan aktivitas enzim PPO sebanyak 0,001 unit per menit. Langkah pengujian enzim PPO ini ditunjukkan pada gambar 2.

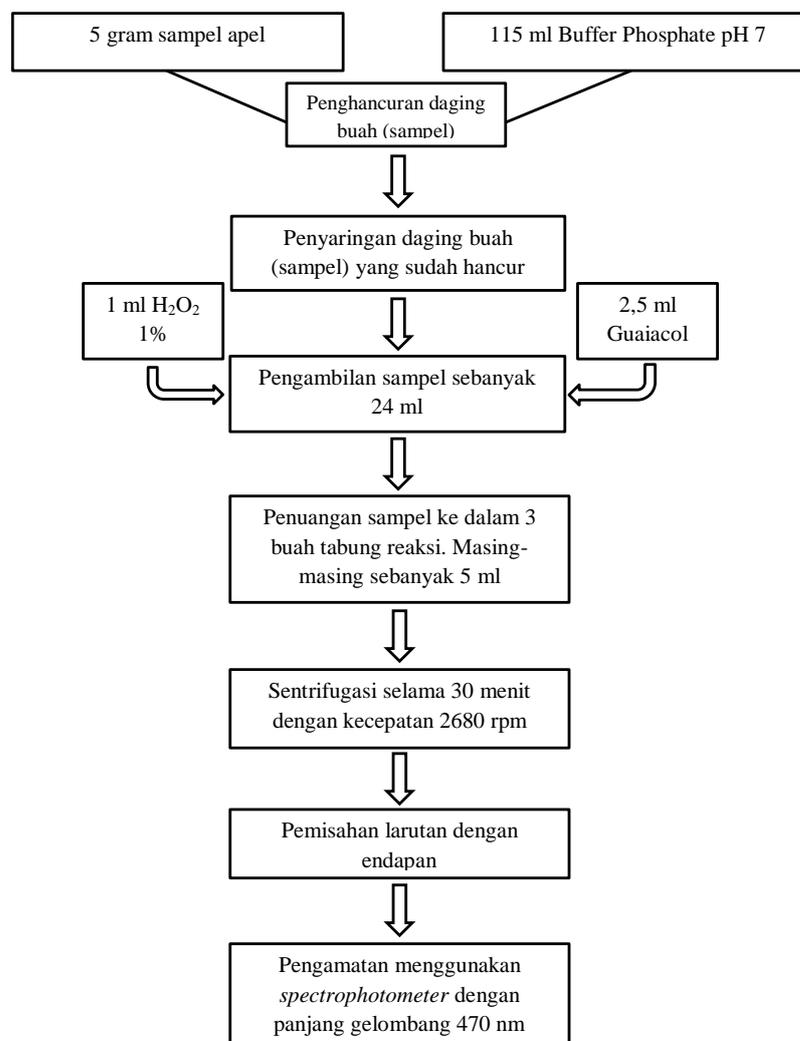


Gambar 1. Langkah-langkah pengamatan enzim PPO  
Sumber : Galeazzi *et al.*, (1981)

### 3. Uji Aktivitas Enzim Peroksidase (POD)

Pengujian aktivitas enzim Peroksidase (POD) bertujuan untuk mengukur dan mengetahui aktivitas enzim POD yang terdapat pada sampel yang menjadi salah satu pemicu proses pencoklatan pada daging buah pasca dipotong. Enzim peroksidase merupakan salah satu enzim termostabil yang

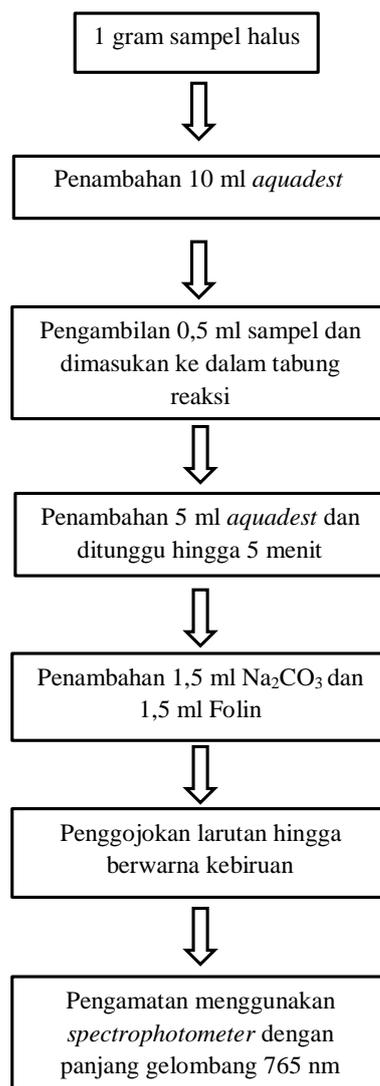
terlibat dalam aktivitas oksidasi elektron tunggal pada berbagai macam senyawa dengan adanya hidrogen peroksida ( $H_2O_2$ ) (Prontipa *et al.*, 2010). Metode yang digunakan pada penelitian ini adalah metode Galeazzi *et al.*, (1981) yang digunakan pula pada penelitian Supavanich *et al.*, (2012) dengan beberapa modifikasi. Metode ini mengkonversi hasil *spectrophotometer*, yaitusetiap 1 unit menunjukkan aktivitas enzim POD sebanyak 0,01 unit per menit. Langkah pengujian enzim POD ini ditunjukkan pada gambar 1.



Gambar 2. Langkah-langkah pengamatan enzim POD  
Sumber : Galeazzi *et al.*, (1981)

#### 4. Uji Total Fenol (mg GAE/100 FW)

Uji kadar senyawa fenol bertujuan untuk mengetahui jumlah fenol yang terdapat pada sampel. Pengujian total fenol pada penelitian ini menggunakan metode *Folin-Ciocalteu* yang dimodifikasi. Adapun tahapan pengukuran kadar senyawa fenol ditunjukkan pada gambar 3.



Gambar 3. Langkah-langkah pengamatan total fenol

Sumber : Khadambi (2007)

Pengujian total fenol merupakan dasar pengujian aktivitas antioksidan, dimana senyawa tersebut berperan dalam mencegah terjadinya peristiwa oksidasi. Total fenol dari sampel apel pada penelitian ini diukur dengan prinsip *Folin-Ciocalteu* yang didasarkan pada reaksi oksidasi reduksi. Prinsip pengukuran total fenol dengan reagen *Folin-Ciocalteu* adalah dengan terbentuknya senyawa kompleks berwarna biru, dimana pereaksi ini mengoksidasi fenolat (garam alkali) atau gugus fenolik-hidroksi mereduksi asam heteropoli (*fosfomolibdat-fosfotungstat*) yang terdapat dalam pereaksi *Folin-Ciocalteu* menjadi suatu kompleks molibdenum-tungsten. Semakin pekatnya warna biru yang terbentuk, setara dengan konsentrasi ion fenolat yang ada dalam bahan makanan.

Kandungan fenol dinyatakan dalam GAE (*Gallic Acid Equivalent*), yaitu jumlah kesetaraan miligram asam galat dalam 1 gram sampel. Pembuatan kurva standar asam galat pada konsentrasi 5, 10, 20, 30, 40, dan 50 ppm (Khadambi, 2007). Kemudian ditambahkan 1,5 ml natrium karbonat 15 % dan 1,5 ml Reagen *Folin-Ciocalteu*. Larutan tersebut digojog sampai homogen dan didiamkan pada suhu ruang selama 75 menit. Serapan diukur pada panjang gelombang 725 nm menggunakan *spectrophotometer*.

Penentuan kadar fenol ditentukan berdasarkan regresi kurva standar asam galat. Nilai absorbansi yang diperoleh konsentrasi larutan dimasukkan ke dalam persamaan regresi larutan standar asam galat sehingga diperoleh kadar fenol total yang ditunjukkan dalam miligram asam galat ekuivalen per gram berat buah (mg GAE/100 FW). Adapun 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

## 5. Total Antioxidant Activity (TAA)

Menurut Sanchez Moreno *et. al.*, (1999), uji kuantitatif *total antioxidant activity* (TAA) dapat ditentukan dengan metode pemindahan 2,2-Diphenyl-1 picryl-hidrazil (DPPH). Larutan DPPH dibuat dengan cara mencampurkan 11,8 mg serbuk DPPH ke dalam 150 ml methanol (200 mM). Blanko yang digunakan yaitu 1 ml DPPH yang dilarutkan ke dalam 4 ml methanol. Uji total antioksidan dilakukan pada panjang gelombang 517 nm menggunakan *spectrophotometer*. Radikal DPPH merupakan senyawa radikal berwarna ungu dengan satu atom yang tidak berpasangan. Senyawa ini memiliki serapan pada panjang gelombang 515 – 517 nm. Radikal DPPH distabilkan dengan adanya donor satu atom H dari antioksidan atau donor elektron. Ketika radikal DPPH direduksi oleh antioksidan maka warna DPPH yang telah stabil akan berubah menjadi warna kuning dan menurunkan absorbansi larutan uji (Yondra dkk., 2014). Adapun langkah-langkah dalam pengamatan TAA ditunjukkan pada gambar 4.



Gambar 4. Langkah-langkah pengamatan TAA  
 Sumber : Sanchez Moreno *et. al.*, (1999)

TAA dinyatakan dengan persentase penghambatan radikal DPPH dan ditentukan dengan menggunakan persamaan :

$$TAA (\%) = \frac{OD\ blanko - OD\ sampel}{OD\ blanko} \times 100\%$$

Keterangan :

OD Blanko = Serapan radikal DPPH pada 517 nm

OD Sampel = Serapan radikal DPPH yang tersisa di dalam serum pada 517 nm.

## 1. Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan sidik ragam atau *Analysis of Variant* (ANOVA) pada taraf signifikansi  $\alpha$  5%. Apabila terdapat beda nyata antar perlakuan yang diujikan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan *Duncan's Multiple Range Test* (DMRT).