

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Pascapanen Fakultas Pertanian Universitas Muhammadiyah Yogyakarta pada bulan September 2018.

B. Bahan dan Alat

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi : buah apel Manalagi sebanyak 9,1 kg atau 46 buah didapatkan dari perkebunan apel di Malang, natrium bisulfit, l-arginin, media tumbuh mikroba PCA, alcohol, aquades, plastik wrap, sterofom, amilum 1%, klorin, NaOH 0,05 N, NaOH 1 N, dan Indikator PP 1%. (Perhitungan buah pada Lampiran 2).

Alat yang digunakan pada penelitian ini meliputi timbangan analitik, pisau, statif, gelas piala, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, botol suntik, botol spray, kawat ose, *drigladsky*, pemanas bunsen, mikropipet, mortar, alu, kertas saring, kertas payung, *refrigerator*, *coloni counter*, *waterbath*, *Hand Penetrometer*, *spectrophometer*, *Chromameter Minolta CR-400*, dan *hand refractometer*.

C. Metode Penelitian

Penelitian dirancang dengan metode eksperimental yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) faktor tunggal dengan 2 variabel. Perlakuan yang diujikan adalah berbagai konsentrasi Natrium bisulfit dan l-arginin yang terdiri dari 6 perlakuan dan 1 kontrol, yaitu :

A1 = Perendaman Natrium bisulfit 50 ppm

A2 = Perendaman Natrium bisulfit 100 ppm

A3 = Perendaman Natrium bisulfit 150 ppm

B1 = Perendaman L-arginin 50 mM

B2 = Perendaman L-arginin 100 mM

B3 = Perendaman L-arginin 150 mM

K0 = Tanpa perendaman Natrium bisulfit dan L-arginin

Dari masing-masing perlakuan tersebut diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 21 unit percobaan dengan setiap unit percobaan terdiri dari 4 sub unit (*Layout* pada Lampiran 1).

D. Tata Cara Penelitian

Penelitian ini dilakukan dengan dua tahapan yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian inti.

1. Penelitian Pendahuluan

a. Persiapan Alat dan Bahan

Persiapan alat meliputi pembersihan dan pengecekan alat-alat seperti timbangan analitik, pisau, statif, gelas piala, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, botol suntik, botol spray, kawat ose, *drikladsky*, pemanas bunsen, mikropipet, mortar, buret, kertas saring, kertas payung, rak tabung reaksi, lemari pendingin, *coloni counter*, *hand Penetrometer*, *spectrophometer*, *Chromameter Minolta CR-400*, dan *hand refractometer*. Penyiapan bahan dilakukan dengan menyiapkan buah apel Manalagi dengan ukuran yang seragam sebanyak 3 buah, penyiapan serbuk natrium bisulfit, pembelian serbuk arginine, media tumbuh mikroba

PCA, alcohol, aquades, plastic wrap, sterofoam, amilum 1%, klorin, NaOH 0,05 N, NaOH 1 N, dan Indikator PP 1%.

b. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 30 menit. Alat-alat yang akan disterilkan disumbat dengan kapas kemudian dibungkus dengan kertas payung sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf. Alat yang disterilkan antara lain petridish, erlenmeyer, pengaduk, botol suntik dan tabung reaksi.

c. Penyiapan Buah Apel Manalagi

Penyiapan buah apel Manalagi dilakukan dengan membeli buah di pasar buah. Buah apel dipilih yang memiliki ukuran sama (*grade A*) dengan umur panen yang seragam (114 hari setelah bunga mekar). Buah dengan kriteria tersebut memiliki ukuran yang besar dengan berat mencapai ± 250 gram/buah atau dalam 1 kg berisi 4-5 buah, buah tidak cacat dan tidak memiliki luka. Buah apel Manalagi dibawa ke laboratorium pascapanen. Buah disimpan pada suhu 20°C hingga diproses.

d. Pembuatan Media dan Sterilisasi

Pembuatan media yaitu dengan melarutkan PCA 22,5 gram dalam aquades 1000 ml kemudian diaduk hingga homogen. Setelah homogen, medium diukur pH 6-7 menggunakan kertas pH lalu disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang telah steril didinginkan sebentar kemudian dituang ke dalam

petridish dan ditunggu hingga padat. Pembuatan media ini digunakan dalam uji mikrobiologi.

e. Pembuatan Larutan Anti *Browning*

Pembuatan larutan untuk perlakuan pada penelitian pendahuluan ini dilakukan dengan menyiapkan 1 perlakuan saja, yaitu menggunakan larutan Natrium bisulfit 150 ppm dan L-arginin 50 mM. Pembuatan larutan dilakukan dengan cara melarutkan 150 mg natrium bisulfit ke dalam 1 liter akuades dan 8 gram L-arginin ke dalam 1 liter akuades kemudian dihomogenkan.

f. Tahap Aplikasi

Buah dicuci menggunakan larutan klorin dengan konsentrasi 200 $\mu\text{l L}^{-1}$ hingga bersih kemudian ditiriskan lalu dipotong menggunakan pisau tajam dan bersih menjadi 6 bagian untuk 1 buah apel dengan ukuran 3x2 cm dalam ruangan berpendingin. Selama penyiapan berlangsung buah apel yang telah dipotong, kemudian dicelupkan ke dalam masing-masing perlakuan yaitu natrium bisulfit dan l-arginin selama 5 menit kemudian ditiriskan dan dibungkus dengan sterefoam lalu di wrapping. Buah disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 5°C dengan RH 95% selama 3 hari.

g. Pengamatan

Pengamatan untuk penelitian pendahuluan dilakukan setelah potongan buah yang telah diberi perlakuan disimpan dalam lemari pendingin selama 3 hari. Pengamatan yang dilakukan meliputi susut bobot, uji kekerasan,

kadar gula reduksi, total asam titrasi, total padatan terlarut, uji mikrobiologi dan warna.

2. Penelitian Inti

a. Persiapan Alat dan Bahan

Persiapan alat meliputi pembersihan dan pengecekan alat-alat seperti timbangan analitik, pisau, statif, gelas piala, gelas ukur, erlenmeyer, tabung reaksi, cawan petri, botol suntik, botol spray, kawat ose, *drigladsky*, pemanas bunsen, mikropipet, mortar, buret, kertas saring, kertas payung, rak tabung reaksi, lemari pendingin, *coloni counter*, *hand Penetrometer*, *spectrophometer*, *Chromameter Minolta CR-400*, dan *hand refractometer*. Sedangkan penyiapan bahan dilakukan dengan menyiapkan buah apel Manalagi dengan ukuran yang seragam sebanyak 3 buah, penyiapan serbuk natrium bisulfit, pembelian serbuk arginine, media tumbuh mikroba PCA, alcohol, aquades, plastic wrap, sterofom, amilum 1%, klorin, NaOH 0,05 N, NaOH 1 N, dan Indikator PP 1%.

b. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu 121°C selama 30 menit. Alat-alat yang akan disterilkan disumbat dengan kapas kemudian dibungkus dengan kertas payung sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf. Alat yang disterilkan antara lain petridish, Erlenmeyer, pengaduk, botol suntik dan tabung reaksi.

c. Pemanenan 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 Pasca Panen Fakultas Pertanian UMY. Buah dimasukkan ke dalam lemari pendingin dengan suhu 20°C. (Perhitungan pada Lampiran 2).

d. Pembuatan Media dan Sterilisasi

Pembuatan media NA yaitu dengan melarutkan PCA 22,5 gram ke dalam aquades 1000 ml kemudian diaduk hingga homogen. Setelah homogen, medium diukur pH 6-7 menggunakan kertas pH lalu disterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media yang telah steril di dinginkan sebentar kemudian dituang ke dalam petridish dan ditunggu hingga padat. Pembuatan media ini digunakan dalam uji mikrobiologi dan dilakukan setiap 3 hari sekali setiap kali akan pengamatan. (Perhitungan pada Lampiran 2).

e. Pembuatan Larutan Anti Browning

Pembuatan larutan anti browning dilakukan dengan menimbang masing-masing konsentrasi setiap perlakuan sebanyak 50 ppm (50 mg/liter), natrium bisulfit 100 ppm (100 mg/liter), dan natrium bisulfit 150 ppm (150 mg/liter), lalu diaduk sampai natrium bisulfit terlarut dalam air. Kemudian untuk L-arginin dengan melarutkan bubuk l-arginin sesuai perlakuan yaitu l-arginin 50 m mol (8 g/liter), 100 m mol (16 g/liter), 150 m mol (24 g/liter), kemudian diaduk sampai l-arginin terlarut dalam air. (Perhitungan pada Lampiran 2)

f. Tahap aplikasi

Buah dicuci menggunakan larutan klorin dengan konsentrasi $200 \mu\text{l L}^{-1}$ hingga bersih kemudian ditiriskan lalu dipotong menggunakan pisau tajam dan bersih menjadi 6 bagian untuk 1 buah apel dengan ukuran 3x2 cm dalam ruangan berpendingin. Selama penyiapan berlangsung buah apel yang telah dipotong, kemudian dicelupkan ke dalam masing-masing perlakuan yaitu natrium bisulfit dan l-arginin selama 5 menit serta tanpa perlakuan. Buah kemudian ditiriskan dan dibungkus dengan sterefoam lalu di wrapping. Buah disimpan dalam lemari pendingin dengan suhu 5°C dengan RH 95% selama 15 hari.

g. 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 susut berat dengan menimbang buah, uji

kekerasan dengan menggunakan alat *Hand penetrometer fruit*, kadar gula reduksi, total asam titrasi dan uji mikrobiologi dengan menumbuk sampel, mengencerkan sampel menggunakan akuades, menambahkan larutan pada sampel sesuai dengan uji yang akan dilakukan dan sampel hasil pengenceran dilakukan pengujian dengan alat masing-masing dan dihitung menggunakan rumus, uji total padatan terlarut dilakukan menggunakan alat *hand refractometer*, uji warna dilakukan dengan alat *Chromameter Minolta CR-400* pada hari ke 0, 3, 6, 9 dan untuk uji organoleptik dilakukan dengan beberapa panelis.

E. Parameter Pengamatan

1. Presentase Susut Berat (%)

Pengamatan susut berat dilakukan untuk mengetahui kesegaran dan kenampakan buah yang telah kehilangan air dengan cara menimbang sampel buah menggunakan timbangan analitik. Hasil timbangan buah dinyatakan dalam gram dan presentasi susut bobot dinyatakan dalam satuan persen (Rahmawati,2015). Pengamatan dilakukan pada hari ke- 0, ke- 3 ke- 6, ke- 9, ke- 12 dan ke-15. Susut berat dihitung dengan menggunakan rumus sebagai berikut:

$$\text{Susut Bobot (\%)} = \frac{\text{bobot awal sebelum disimpan} - \text{bobot akhir setelah disimpan}}{\text{bobot awal sebelum disimpan}} \times 100\%$$

2. Kekerasan (N/mm²)

Pengujian kekerasan dilakukan dengan menggunakan alat *Hand penetrometer fruit* (Rahmawati, 2015). Permukaan daging buah apel Manalagi akan ditusuk jarum *probe* dengan diameter 3 mm pada tiga potong buah apel, sehingga kedalaman lubang yang diakibatkan oleh penusukan tersebut akan

menyatakan kelunakan buah apel dan *hand penetrometer* akan menunjukkan gaya yang dinyatakan dalam satuan N Pengamatan uji kekerasan dengan menggunakan alat *hand penetrometer* dalam satuan N/m^2 . Pengukuran kekerasan dilakukan dengan memasukkan pucuk alat berdiameter 3 mm pada 3 bagian buah secara acak dan hasilnya dirata-rata buah yang sudah dilakukan uji kekerasan kemudian digunakan untuk pengamatan lain (Gula reduksi, total asam titrasi, dan total padatan terlarut). Hasil uji kekerasan pada daging buah dinyatakan dalam satuan (N/mm^2).

$$\text{Kekerasan} = \frac{\text{Gaya yang diberikan}}{\text{luas permukaan}}$$

3. Kadar Gula reduksi (%)

Uji gula reduksi dilakukan untuk mengetahui banyaknya karbohidrat dalam suatu bahan. Metode yang digunakan untuk uji gula reduksi yaitu metode *Somogyi-Nelson* yang merupakan metode penetapan kadar gula pereduksi, dimana prinsipnya gula pereduksi akan mereduksi ion Cu^{2+} menjadi ion Cu^+ kemudian ion Cu^+ ini akan mereduksi senyawa arsenomolibdat membentuk kompleks berwarna biru-kehijauan (Nelson, 1944). Uji gula reduksi dilakukan dengan membuat nelson C dan larutan glukosa standar untuk mengetahui persamaan gula reduksi yang digunakan dalam perhitungan, adapun tahapan pengujian gula reduksi, antara lain :

- a. Sampel ditumbuk hingga halus dan ditimbang sebanyak 1 gram.
- b. Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan 100 ml aquadest.

- c. Mengambil filtrate 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi.
- d. Menambahkan 0,9 ml aquadest dan 1 ml nelson C (yang dibuat dari 0,96 ml nelson A dan 0,04 ml nelson B) kemudian dipanaskan dalam waterbath selama 20 menit.
- e. Setelah dingin, ditambahkan 1 ml arseno dan 7 ml aquadest pada filtrate kemudian di gojog dan didiamkan selama 30 menit lalu dilakukan pengecekan dengan alat *spectrophotometer* dengan panjang gelombang 540 nm. Hasil akhir di hitung persentase gula reduksi dengan rumus :

$$\% \text{ Gula Reduksi} = \frac{\text{konsentrasi x faktor pengenceran}}{\text{Mg Bahan}} \times 100\%$$

4. Total Asam Titrasi (%) (AOAC, 2000)

Total asam titrasi berkaitan dengan pH pada pada buah, karena pH digunakan untuk menyatakan tingkat keasaman atau kebasaan suatu larutan produk pangan. Pengujian Total Asam Titrasi dilakukan dengan cara menumbuk buah sampai halus dan ditimbang seberat 5 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar dan ditambahkan aquadest 100 ml kemudian digojog lalu disaring. Mengambil *filtrate* 10 ml menggunakan pipet ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan indikator *phenolphthalein* (PP) 1 % sebanyak 2-3 tetes. Kemudian, melakukan titrasi dengan menggunakan NaOH 0,1 N hingga *filtrate* berubah warna menjadi pink dan tidak berubah selama 30 detik. Perhitungan dari uji total asam titrasi dilakukan dengan menggunakan rumus :

$$\text{Total Asam (\%)} = \frac{\text{ml NaOH} \times \text{N NaOH} \times \text{BM Asam Malat} \times \text{FP}}{\text{mg sampel}} \times 100\%$$

Keterangan :

ml NaOH 1 N = volume NaOH yang digunakan untuk penitrasi
N NaOH 1 N = normalitas NaOH yang digunakan untuk menitrasi
FP = faktor pengenceran

5. Total Padatan Terlarut (°Brix)

Total padatan terlarut merupakan suatu cara untuk menguji kadar total padatan terlarut dalam suatu bahan makanan. Metode yang digunakan dalam uji total padatan terlarut yaitu metode refraktometri (Ranganna, 1986). Pengujian Total Padatan Terlarut dilakukan dengan cara menumbuk sampai halus seberat 1 gram dengan menggunakan mortal dan alu. Lalu mengambil 1-2 tetes sampel menggunakan sendok kecil kemudian diteteskan di atas prisma *refractometer* yang sudah distabilkan lalu dilakukan pembacaan, pengujian dilakukan sebanyak 3 kali ulangan. Sebelum dan sesudah digunakan, membersihkan prisma refraktometer dengan alkohol. Uji gula total dinyatakan dalam °Brix sukrosa (Muchtadi dan Sugiyono, 1990).

6. Uji Mikrobiologi (CFU/ml)

Uji mikrobiologi dilakukan untuk menduga daya tahan simpan suatu makanan dan sebagai indikator sanitasi makanan atau indikator keamanan makanan. Pengujian mikrobiologi diantaranya meliputi uji kuantitatif untuk menentukan mutu dan daya tahan suatu makanan, uji kualitatif bakteri patogen untuk menentukan tingkat keamanannya, dan uji bakteri indikator untuk mengetahui tingkat sanitasi makanan tersebut (Fardiaz, 1993). Metode yang digunakan untuk uji mikrobiologi yaitu metode *surface plate* dengan menginokulasikan sejumlah bakteri pada medium dan diratakan pada bagian

permukaan medium dengan menggunakan *drygladski*. Tahapan uji mikrobiologi yang dilakukan yaitu :

- a. Menyiapkan media PCA yang telah dibuat sebelumnya.
- b. *Fresh cut* apel ditumbuk sampai halus dengan mortar dan alu seberat 1 gram.
- c. Kemudian dimasukkan ke dalam botol suntik 99 ml aquades steril untuk dijadikan pengenceran 10^{-2} lalu dihomogenkan.
- d. Mengambil 1 ml suspensi dari pengenceran 10^{-2} lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi 9 ml air steril atau pengenceran 10^{-3} lalu dihomogenkan.
- e. Mengambil 1 ml suspensi dari pengenceran 10^{-3} lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi 9 ml air steril atau pengenceran 10^{-4} lalu dihomogenkan.
- f. Mengambil 1 ml suspensi dari pengenceran 10^{-4} lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi 9 ml air steril atau pengenceran 10^{-5} lalu dihomogenkan.
- g. Mengambil 0,1 ml suspensi dari masing-masing seri pengenceran dan melakukan plating surface menggunakan *drygladsky* steril diatas bunsen agar tetap steril dalam petridish yang berisi medium NA. Inokulasi dilakukan dari pengenceran 10^{-3} menjadi 10^{-4} , 10^{-4} menjadi 10^{-5} , 10^{-5} menjadi 10^{-6} dan masing-masing diulang sebanyak 3 kali.
- h. Hasil inokulasi di bungkus dengan kertas payung dan diberi label sesuai perlakuan.

- i. Menginkubasi suspensi selama 48 jam dan menghitung hasil pertumbuhan mikroba menggunakan alat *coloni counter*.

Uji mikrobiologi dilakukan dengan menghitung total mikroba menggunakan metode *plate count* dengan menunjukkan jumlah mikroba yang terdapat dalam suatu produk dengan cara menghitung jumlah koloni bakteri yang ditumbuhkan pada media agar. Perhitungan mikroba dilakukan dengan metode *plate count* harus memenuhi syarat, yaitu sebagai berikut 1) Jumlah koloni tiap cawan 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.

7. Warna (HUE)

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 *Chromameter Minolta CR - 400*. Pengamatan dilakukan setiap 3 hari sekali selama 15 hari. Pengukuran warna meliputi atribut warna CIELAB (L, a, b, C, $^{\circ}H$, ΔE). 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 (ΔE) selama penyimpanan diperoleh dengan menggunakan rumus :

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

Keterangan :

ΔE = Total perbedaan warna

ΔL (L sampel dikurangi L standar) = Perbedaan terang dan gelap (+ = lebih terang, - = lebih gelap)

Δa (a sampel dikurangi a standar) = Perbedaan merah dan hijau (+ = merah, - = hijau)

Δb (b sampel dikurangi b standar) = perbedaan kuning dan biru (+ = kuning, - = biru)

8. Uji organoleptic

Menurut Tietel *et al* (2011); Arnon (2015) uji organoleptik/ sensoris dilakukan untuk mengetahui sejauh mana konsumen masih menerima perubahan mutu buah yang menyangkut perubahan sifat fisik dan kimia selama penyimpanan dingin. Uji organoleptik ini dilakukan dengan metode *Hedonic Scale Scoring* (Kartika, dkk., 1987/1988). Uji organoleptik dilakukan setiap 3 hari sekali selama 15 hari. Organoleptik dilakukan dengan memberi penilaian suka terhadap rasa, aroma, tekstur dan warna *fresh cut* apel Manalagi menggunakan *scoring* sebagai berikut:

Nilai 1 untuk sangat tidak suka

Nilai 2 untuk tidak suka

Nilai 3 untuk cukup suka

Nilai 4 untuk suka

Nilai 5 untuk sangat suka

Uji organoleptic dilakukan dengan minimal 10 panelis yang kemudian di hitung score dengan rumus :

$$\text{Score} = \frac{(\text{Score} \times \text{Jumlah panelis yang memilih score})}{\text{Jumlah total panelis}}$$

F. Analisis Data

Analisis data dilakukan dengan menggunakan sidik ragam dengan taraf nyata 5%, bila ada beda nyata antar perlakuan maka dilakukan uji lanjut dengan menggunakan uji DMRT (*Duncan's Multiple Range Test*). Dengan tingkat kesalahan <5% dan data akan dihasilkan dalam bentuk grafik histogram.

