

III. TATA CARA PENELITIAN

A. Tempat dan Waktu Penelitian

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

B. Bahan dan Alat Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah buah apel Malang varietas Manalagi berumur 114 hari setelah bunga mekar, Alginat, media tumbuh mikroba PCA (Plate Count Agar), larutan NaOH 0,1 N (uji asam titrasi), alkohol 70 %, aquadest, minyak atsiri vanili, minyak atsiri kemangi, CaCl₂ 2 %, indikator PP, gliserol, Nelson A, Nelson B, Nelson C, Arsenol, plastik *wrap*, sterfoam, klorin 2 %, spirtus.

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah blender, panci, autoklaf, saringan, pemanas (kompor), lemari pendingin, pengaduk, statif, pisau, pipet tetes, botol suntik, botol *spray*, tabung reaksi, cawan petri, kawat ose, drigalsky, pemanas bunsen, mortar dan alu, *vortex*, penjepit, *spectrophotometer*, *hand pnetrometer*, *hand Refractometer*, gelas ukur, erlenmeyer, gelas piala, timbangan analitik, mikropipet, buret, kertas saring, *coloni counter*, *water bath*, pH meter *stick*, mikroskop.

C. Metode Penelitian

Penelitian dirancang dengan metode eksperimental berupa uji antibakteri berbagai minyak atsiri dan aplikasi *edible coating* alginat berantibakteri pada *fresh-cut* buah apel Manalagi yang disusun dalam Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan rancangan perlakuan faktor tunggal yang terdiri dari 6 perlakuan yaitu:

1. A1 M0 : Alginat 2 %
2. A1 V1 : Alginat 2 % + Minyak Atsiri Vanili 0,6 %
3. A1 V2 : Alginat 2 % + Minyak Atsiri Vanili 0,9 %
4. A1 K1 : Alginat 2 % + Minyak Atsiri Kemangi 0,3 %
5. A1 K2 : Alginat 2 % + Minyak Atsiri Kemangi 0,6 %
6. A0 M0 : Kontrol (Tanpa Alginat dan Minyak Atsiri)

Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali sehingga diperoleh 18 unit percobaan. Setiap unit terdiri dari 7 kemasan *fresh-cut* buah apel Manalagi sehingga jumlah kemasan yaitu 126 kemasan, setiap kemasan terdiri dari 4 ukuran potongan buah apel Manalagi sehingga jumlah keseluruhan buah apel potong segar yang digunakan yaitu 504 potong.

D. Tata Laksana Penelitian

Penelitian dilakukan melalui 2 tahap yaitu penelitian pendahuluan dan penelitian inti. Penelitian pendahuluan dilakukan guna memperoleh bakteri pembusuk yang terdapat pada *fresh-cut* buah apel Manalagi. Penelitian inti dilakukan untuk menguji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan menguji pengaruh kombinasi *edible coating* alginat dan minyak atsiri vanili, kemangi terhadap pertumbuhan bakteri pada *fresh-cut* buah apel Manalagi. Penelitian inti

meliputi tahap I: Uji antibakteri minyak atsiri vanili dan kemangi dan tahap II: Aplikasi *edible coating* alginat berantibakteri minyak atsiri pada *fresh-cut* apel Manalagi.

1. Penelitian Pendahuluan

a. Pembusukan *Fresh-cut* Buah Apel

Apel dicuci dengan larutan klorin konsentrasi $200 \mu\text{l/L}^{-1}$ dan dikeringkan dengan tisu. Satu buah apel dipotong menjadi 6 bagian menggunakan pisau *stainless steel* tajam. Potongan apel dikemas menggunakan sterofom dan plastik *wrapp* kemudian disimpan dalam *cooler* dengan suhu $5 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Pengamatan dilakukan setiap hari hingga terlihat potongan apel mulai membusuk guna mendapatkan bakteri.

b. Isolasi dan Karakteristik Isolat Bakteri pada *Fresh-cut* Buah Apel

i. Sterilisasi Alat

Sterilisasi alat menggunakan autoklaf pada tekanan 1 atm dengan suhu $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ selama 30 menit dengan cara dibungkus dengan kertas payung dan plastik sebelum dimasukkan ke dalam autoklaf. Alat yang akan disterilkan yaitu *petridish*, *erlenmeyer*, botol suntik, dan tabung reaksi.

ii. Pembuatan Media PCA

Pembuatan media PCA yaitu dengan melarutkan 22,5 gram PCA ke dalam 1000 ml aquades yang telah dipanaskan dan aduk hingga homogen. Setelah homogen, medium diukur pH 6-7 menggunakan pH meter. Larutan dimasukkan ke dalam *erlenmeyer* dan ditutup kemudian disterilkan menggunakan autoklaf selama 15 menit (Ruly, 2008).

- iii. Isolasi Bakteri *Fresh-cut* Buah Apel (Joseph Lister)
- a) Buah apel potong yang sudah berlendir dan terlihat membusuk dilumatkan dengan mortar, kemudian diambil sebanyak 1 gram dan dimasukkan ke dalam botol suntik yang berisi 99 ml aquadest steril dan dihomogenkan memperoleh seri pengenceran 10^{-2} .
 - b) Diambil 1 ml dari seri pengenceran 10^{-2} menggunakan mikropipet, kemudian dimasukkan ke dalam botol suntik 99 ml aquadest steril dan dihomogenkan memperoleh seri pengenceran 10^{-4} .
 - c) Diambil 1 ml dari seri pengenceran 10^{-4} kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi 9 ml aquadest steril memperoleh seri pengenceran 10^{-5} . Pada tahap ini diulangi hingga memperoleh seri pengenceran 10^{-9} .
 - d) Medium PCA dituangkan ke dalam petridist \pm 10 ml dan diberi label masing-masing petridish untuk pengenceran 10^{-4} hingga 10^{-9} .
 - e) Masing-masing suspensi hasil pengenceran 10^{-4} sampai dengan 10^{-9} diinokulasikan pada petridish yang berisi medium PCA sebanyak 0,1ml. Suspensi bakteri menggunakan metode *surface*.
 - f) Petridish yang berisi suspensi bakteri dibungkus dengan menggunakan kertas payung dan diberi label, kemudian diinkubasikan pada suhu 22 – 25⁰C di dalam inkubator (enkas) selama 48 jam dalam keadaan gelap dan posisi cawan terbalik.

iv. Pemurnian Bakteri *Fresh-cut* Buah Apel

Bakteri yang tumbuh setelah tahap isolasi dihitung menggunakan metode *plate count*. Bakteri yang tumbuh terbanyak diinokulasi pada media PCA petridish dan tabung miring menggunakan *streak*, kemudian diinkubasi selama 48 jam (Waluyo, 2005) .

v. Identifikasi dan Karakterisasi Bakteri *Fresh-cut* Buah Apel

Bakteri yang tumbuh setelah diisolasi pemurnian kemudian dilakukan pengamatan secara makroskopis berdasarkan sifat morfologinya. Hal-hal yang diamati dalam pengamatan ini, yaitu meliputi warna koloni, bentuk koloni atas, bentuk koloni bawah, tepi koloni, elevasi, diameter koloni. Selain pengamatan makroskopis juga dilakukan pengamatan mikroskopis yaitu dengan cara mengamati bakteri dibawah mikroskop dengan pembesaran 40 x 10. Hal-hal yang diamati yaitu meliputi bentuk konodia, ukuran, dan warna konodia (Waluyo, 2005).

c. Perbanyak Bakteri Pembusuk *Fresh-cut* Buah Apel

Bakteri yang murni diperbanyak dengan cara dipindahkan ke media cair dan media agar miring kemudian masing-masing bakteri diperbanyak dalam media NC pada erlenmeyer dan dishaker selama 48 jam (Dwidjoseputro, 1992).

2. Penelitian Inti

a. Tahap I : Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Pengujian aktivitas antibakteri minyak atsiri vanili dan kemangi terhadap bakteri pembusuk buah apel potong (*fresh-cut*) dengan menggunakan metode *paper disc* dan *pour plate* (agar tuang).

1) Metode *Paper Disc*

Uji daya hambat metode *paper disc* dengan kertas saring berukuran 1-1,2 cm dicelupkan ke dalam minyak atsiri vanili dan kemangi dengan berbagai konsentrasi dan untuk perlakuan kontrol direndam ke dalam aquadest selama 10 – 15 menit kemudian masukkan ke dalam cawan petri yang telah diinokulasi mikroba pembusuk buah apel potong dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Setelah itu diamati zona bening yang telah terbentuk dan dilakukan pengukuran diameter zona bening yang terbentuk (Lay, 1994).

2) Metode *Pour Plate* (Agar Tuang)

Perhitungan daya hambat dengan metode *pour plate* dilakukan dengan cara menghitung jumlah pertumbuhan mikroba pada media yang telah dicampurkan dengan konsentrasi antibakteri. Minyak atsiri vanili dan kemangi ditambahkan pada media PCA, kemudian dituang pada cawan petri dan stok media sebanyak 1 ml dicampurkan pada media selanjutnya diinkubasi selama 48 jam. Hasilnya diamati dari bakteri yang tumbuh pada media tersebut (Jutono dkk., 1980).

Perhitungan bakteri dengan metode *plate count* harus memenuhi syarat yaitu :

- a. Jumlah koloni yang tumbuh tiap cawan petri antara 30-300 koloni.
 - b. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (*spreader*).
 - c. Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya. Apabila sama atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya.
 - d. Jika dengan ulangan memenuhi syarat, hasilnya dirata-rata.
- b. Tahap II: Aplikasi *Edible Coating* alginat berantibakteri minyak atsiri vanili dan kemangi pada *fresh-cut* buah apel Manalagi

1) Pembuatan *Edible Coating* Alginat

Larutan *edible coating* disiapkan dengan melarutkan bubuk alginat yaitu alginat 2 % ke dalam air suling steril (aquadest) dalam gelas beaker dan dipanaskan pada suhu 85 °C di dalam *waterbath* serta diaduk sampai larut atau selama 30 menit, setelah larutan *edible coating* alginat terbentuk ditambahkan gliserol 1,5 % sebagai perekat dan yang terakhir minyak atsiri vanili dan kemangi ditambahkan sesuai dengan konsentrasi perlakuan (Rosa *et al.*, 2007).

2) Pembuatan Cairan Bakteri Pembusuk *Fresh-cut* Buah Apel

Stok bakteri pembusuk diambil 1 ose dan diperbanyak pada media NC. Setelah itu diinkubasi selama 48 jam. Pengambilan stok bakteri pada media yaitu 10 % dari jumlah volume larutan bakteri yang akan diaplikasikan dan homogenkan menggunakan shaker selama 48 jam.

a. Tahap Penyiapan Buah Apel Manalagi

Sebelum alginat dan minyak atsiri diaplikasikan, terlebih dahulu dilakukan pemetikan buah apel, pemetikan dilakukan di daerah Batu, Malang, Jawa Timur dengan kriteria buah memiliki grade A.

Buah yang dipetik kemudian dibawa ke laboratorium pasca panen untuk disortir, setelah disortir buah apel dicuci dengan air yang telah dicampur klorin $200 \mu\text{l/L}^{-1}$ hingga bersih lalu dipotong menggunakan pisau *stainless steel* menjadi 6 bagian dengan ukuran $2 \times 1,5 \times 1$ cm.

b. Tahap Aplikasi *Edible Coating*

Buah kemudian direndam ke dalam larutan alginat yang berantibakteri minyak atsiri vanili dan kemangi selama 3 menit hingga terlapisi secara merata kemudian dicelupkan pada CaCl_2 2 % dan setelah itu buah ditiriskan dan dikeringkan. Buah disemprot larutan bakteri murni dari hasil isolasi dengan menggunakan *hand sprayer*, dikemas menggunakan *sterofoam* dan *wrapping* kemudian disimpan dalam *cooler* dengan suhu 5°C selama 15 hari sesuai letak penempatan (Lampiran 1) (Rosa *et al.*, 2007).

c. Pengamatan

Pengamatan dilakukan selama 15 hari dengan pengamatan setiap tiga hari sekali. Pengamatan yang dilakukan meliputi persentase susut berat, tekstur (kekerasan), asam tirasi, total padatan terlarut, gula reduksi, pengujian mikrobiologi, dan pH (derajat keasaman).

E. Parameter Pengamatan

1. Tahap I : Uji Antibakteri

a. Daya hambat menggunakan metode *Paper Disc* (cm)

Pengujian dilakukan dengan cara menggunakan *paper disc* dengan kertas saring berukuran 1 - 1,2 cm dicelupkan ke dalam minyak atsiri vanili dan kemangi dengan berbagai konsentrasidan untuk perlakuan kontrol direndam ke dalam aquadest selama 10 – 15 menit kemudian masukkan ke dalam cawan petri yang telah diinokulasi mikroba pembusuk buah apel potong dan diinkubasi selama 48 jam pada suhu ruang. Setelah itu diamati zona bening yang telah terbentuk di sekitar kertas saring masing-masing perlakuan dan dilakukan pengukuran diameter zona bening yang terbentuk dengan menggunakan mistar (Lay, 1994).

b. Daya hambat menggunakan metode *Pour Plate*

Perhitungan daya hambat dengan metode *pour plate* dilakukan dengan cara menghitung jumlah pertumbuhan mikroba pada media yang telah dicampurkan dengan konsentrasi antibakteri. Minyak atsiri vanili dan kemangi ditambahkan pada media PCA, kemudian dituang

pada cawan petri dan stok media sebanyak 1 ml dicampurkan pada media selanjutnya diinkubasi selama 48 jam. Hasilnya diamati dari bakteri yang tumbuh pada media tersebut (Jutono dkk., 1980).

Perhitungan bakteri dengan metode *plate count* harus memenuhi syarat yaitu :

- a. Jumlah koloni yang tumbuh tiap cawan petri antara 30-300 koloni.
- b. Tidak ada koloni yang menutup lebih besar dari setengah luas cawan petri (*spreader*).
- c. Perbandingan jumlah koloni dari pengenceran yang berturut-turut antara pengenceran yang lebih besar dengan pengenceran sebelumnya. Apabila sama atau lebih kecil dari 2 maka hasilnya dirata-rata, dan jika lebih besar dari 2 maka yang dipakai adalah jumlah koloni dari hasil pengenceran sebelumnya.
- d. Jika dengan ulangan memenuhi syarat, hasilnya dirata-rata.

2. Tahap II : Aplikasi *edible coating* alginat berantibakteri minyak atsiri vanili dan kemangi pada *Fresh-cut* buah Apel Manalagi

- a. Uji mikrobiologi (Jutono dkk., 1980)

Uji mikrobiologi dilakukan dengan menghitung total bakteri yang tumbuh menggunakan metode *plate count*. Langkah dalam pengujian yaitu buah apel dihaluskan dan ditimbang 1 g, kemudian dimasukkan ke dalam 99 ml aquades untuk memperoleh seri pengenceran 10^{-2} dan dilakukan pengenceran selanjutnya hingga 10^{-7} .

Pengenceran yang telah dilakukan diambil seri pengenceran 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} kemudian diinokulasi ke dalam petridish yang dituang media PCA dengan cara *surface* menggunakan *drygalsky* dan selanjutnya dibungkus dengan kertas payung, diinkubasi selama 48 jam. Hitung hasil pertumbuhan bakteri dengan menggunakan alat *coloni counter*.

Pengujian mikrobiologi dengan menggunakan media PCA dan diamati setiap 3 hari yaitu dihari ke-0; 3; 6; 9; 12; dan ke-15.

b. Susut berat (%) (AOAC, 2000)

Susut berat ditentukan dengan cara menimbang buah menggunakan timbangan analitik, hasil timbangan buah dinyatakan dalam gram dan persentasi susut berat dinyatakan dalam satuan persen (Rahmawati, 2015) dilakukan setiap 3 hari sekali yaitu pada hari ke-0; 3; 6; 9; 12; dan ke-15. Buah ditimbang dengan timbangan analitik dengan rumus sebagai berikut:

$$\% \text{ Susut berat} = \frac{\text{Berat awal} - \text{Berat akhir}}{\text{Berat awal}} \times 100\%$$

c. Kekerasan (N/m^2) (Magness-Taylor)

Kekerasan diukur menggunakan alat *hand penetrometer* dalam satuan N/m^2 (Rahmawati, 2015). Uji kekerasan dilakukan pada hari ke-0; 3; 6; 9; 12; dan ke-15. Permukaan daging buah naga ditusuk jarum *probe* dengan dengan diameter 3mm pada tiga potong buah apel dan hasilnya dirata-rata, sehingga kedalaman lubang yang diakibatkan oleh penusukan tersebut menyatakan kelunakan buah dan *penetrometer* menunjukkan gaya yang dinyatakan dalam satuan N.

$$F = \text{Gaya} / \pi r^2$$

Keterangan:

r = jari jari

$\pi = 22/7$ (3,14)

d. Total asam titrasi (%) (AOAC, 2000)

Buah ditumbuk sampai halus dan ditimbang seberat 5 gram, kemudian dimasukkan ke dalam labu takar dan ditambahkan aquadest 100 ml kemudian digojog dan disaring. Mengambil filtrat 10 ml menggunakan pipet ke dalam erlenmeyer dan ditambahkan indikator *phenolphthalein* (PP) 1% sebanyak 1-3 tetes. Kemudian melakukan titrasi dengan menggunakan NaOH 0,1N hingga filtrat berubah warna menjadi pink dan tidak berubah selama 30 detik. Pengamatan dilakukan pada hari ke-0; 3; 6; 9; 12; dan ke-15.

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

Keterangan:

FP = Faktor Pengenceran

BM = Berat Molekul

N = Normalitas

e. Total padatan terlarut (*brix* %) (SNI 01-3546-2004)

Uji total padatan terlarut dilakukan dengan mengambil cairan dari buah korban lalu diukur dengan menggunakan alat *Hand Refractometer* (Atago, PAL-1 (3810), Jepang) yang dilakukan 3 hari sekali pada hari ke-0, hari ke-3, hari ke-6, hari ke-9, hari ke-12, hari ke-15. Uji kadar gula pada buah dilakukan dengan cara menumbuk sampel daging buah sampai halus kemudian diambil 1 tetes sampel menggunakan sendok kecil. Kemudian pada *refractometer* ditekan tombol *start* kemudian

tekan *zero*, selanjutnya ditetesi dengan ekstrak buah hingga muncul nilai kadar gula dengan satuan brix %.

f. Gula Reduksi (Somogyi-Nelson)

Uji gula reduksi dilakukan dengan membuat Nelson C dan larutan glukosa standar untuk mengetahui persamaan gula reduksi yang digunakan dalam perhitungan gula reduksi.

- i. Sampel ditumbuk hingga halus dan ditimbang sebanyak 1 gram
- ii. Setelah itu, sampel dimasukkan ke dalam labu ukur 100 ml dan ditambahkan 100 ml aquadest
- iii. Diambil Filtrat 0,1 ml dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- iv. Ditambahkan 0,9 ml aquadest dan 1 ml Nelson C, kemudian dipanaskan selama 20 menit
- v. Setelah dingin, ditambahkan 1 ml arseno dan 7 ml aquadest pada filtrat lalu dilakukan pengecekan dengan alat *spectrophometer*.

Pengamatan uji gula reduksi dilakukan pada hari ke-0; 3; 6; 9; 12; dan ke-15.

Rumus:

$$\% \text{ Gula reduksi} = \frac{\text{Konsentrasi x faktor pengenceran}}{\text{Berat sampel (mg)}} \times 100\%$$

g. Uji pH (SNI 06-6989.11-2004)

Penentuan uji pH (derajat keasaman) digunakan untuk mengetahui kandungan pH buah, dimana pH buah sebagai parameter untuk mengetahui kondisi lingkungan hidup yang sesuai pertumbuhan bakteri. Alat yang digunakan yakni pH meter. Caranya elektroda pH meter

sebelum digunakan dikalibrasi terlebih dahulu menggunakan larutan *buffer* (penyangga) kemudian dibersihkan menggunakan aquades dan dikeringkan. Sampel *fresh-cut* buah apel ditumbuh lalu ditimbang sebanyak 1 gram. Sampel ditambah aquades sebanyak 5 ml, digojok sampai homogen. Dichelupkan elektroda ke dalam sampel, dibiarkan elektroda sampai diperoleh pembacaan stabil. Nilai pH dapat secara langsung dibaca pada skala pH meter. Pengamatan uji pH dilakukan pada hari ke-0; 3; 6; 9; 12; dan ke-15.

F. Analisis Data

Data yang diperoleh dari penelitian ini dianalisis menggunakan sidik ragam Analysis of Variance (ANOVA) dengan taraf nyata $\alpha = 5 \%$. Apabila terdapat pengaruh yang signifikan dari perlakuan yang dicobakan, maka akan dilakukan uji lanjutan dengan Duncan Multiple Range Test pada taraf $\alpha = 5 \%$.