

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Lokasi dan Waktu Percobaan

Percobaan ini dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi. Waktu pelaksanaan dimulai pada bulan Oktober 2023 sampai dengan Maret 2024.

3.2 Alat dan Bahan

Alat yang digunakan dalam percobaan ini adalah : hemositometer, mikroskop elektrik, *petridish disposable*, cawan petri, *laminar air flow* (LAF), baki, alat gelas, pipet ukur, pipet mikro, neraca analitik, *magnetic stirrer*, tempat pengeringan, termometer, hygrometer, alat tulis, alat ukur penggaris, alat ukur meteran, kertas cakram, hot plate, piknometer, autoklaf dan alat pirolisis.

Bahan yang digunakan dalam percobaan adalah : buah cabai yang berasal dari petani Kabupaten Tasikmalaya, limbah cangkang buah aren, potato dextrose agar (PDA), Aqua Demineralisata, NaOCl, tween 20 (polisorbat 20), phenolphthalein, NaOH, alkohol, FeCl₃ dan biakan patogen murni *Erwinia Carotovora*.

3.3 Rancangan Penelitian

3.3.1 Percobaan *in vitro*

Metode yang dilakukan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), terdiri perlakuan 6 konsentrasi asap cair dalam media agar dan diulang sebanyak 4 kali. Perlakuan pemberian asap cair pada media agar sebagai berikut:

a₀ = tanpa pemberian asap cair (kontrol)

a₁ = konsentrasi asap cair 2%

a₂ = konsentrasi asap cair 4%

a₃ = konsentrasi asap cair 6%

a₄ = konsentrasi asap cair 8%

a₅ = konsentrasi asap cair 10%

Data hasil percobaan dianalisis untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap variabel yang diamati dengan sidik ragam dan kaidah pengambilan keputusan berdasarkan uji F.

Tabel 1. Sidik ragam pola RAL

Sumber ragam	Db	JK	KT	F hit.	F tab. 5%
Perlakuan	5	$\sum X^2 - FK$	JK_p/db_p	KT_p/KT_G	2,77
Galat	18	$JK_T - JK_p$	JK_G/db_G		
Total	23	$\sum T^2/r - FK$			

Tabel 2. Kaidah pengambilan keputusan

Hasil analisis	Kesimpulan analisis	Keterangan
$F \text{ hit} \leq 0,05$	Tidak berbeda nyata	Tidak ada pengaruh
$F \text{ hit} > F 0,05$	Berbeda nyata	Ada pengaruh

(Sumber: Gomez Gomez, 2007)

Jika dari uji F terdapat perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji lanjut jarak berganda duncan pada taraf 5% dengan rumus :

$$LSR = S_x \times SSR.$$

Nilai S_x dapat dicari dengan rumus sebagai berikut :

$$S_x = \sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r}}$$

Keterangan : LSR = Least Significant Ranges;
 SSR = Studentized Significant Ranges;
 S_x = galat baku rata-rata;
 KT Galat = kuadrat tengah galat;
 r = jumlah ulangan.

(sumber: Gomez dan Gomez, 2007)

3.3.2 Percobaan *in vivo*

Percobaan *in vivo* merupakan kelanjutan dari uji *in vitro*, yaitu dosis yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri 100% dijadikan sebagai perlakuan dosis *in vivo*. Dosis yang digunakan diambil berdasarkan hasil uji *in vitro* dengan penghambatan 100% kemudian dikali 10. Ada dua taraf perlakuan yaitu perlakuan

asap cair dan perlakuan tanpa asap cair, masing-masing 20 kali ulangan sehingga diperoleh 40 unit percobaan.

Pengujian *in vivo* dilakukan dengan Uji-T Tidak Berpasangan (Paired T-test) yaitu menguji buah cabai dengan perlakuan asap cair dengan buah cabai kontrol tanpa asap cair.

Tahap penelitian ini diaplikasikan dalam rancangan percobaan petak berpasangan terhadap dua penelitian : (i) k_0 : kontrol/tanpa perlakuan ; dan (ii) k_1 : dengan perlakuan asap cair. Percobaan tersebut dilakukan 20 kali ulangan.

Tabel 3. Penempatan control (k_0) dan perlakuan asap cair (k_1) pada denah percobaan

1	2	3	4	n20
k_1	k_0	k_1	k_1	k_0
k_0	k_1	k_0	k_0	k_1

Keterangan: 1,2,3.....20 = nomor ulangan.

Apabila data hasil pengamatan terdapat perbedaan yang nyata maka dilakukan uji LSD (*least significance different*) (Montgomery, 2013)

$$LSD = \frac{t_{\alpha}}{2} \cdot N - a \sqrt{\frac{2MSE}{n}}$$

Keterangan: LSD = least significance different
 t_{α} = tabel distribusi t dengan tingkat signifikansi
 α N-a = db galat
MSE = Mean Squared Error
n = jumlah sampel

(Sumber. Montgomery, 2013).

3.4 Prosedur penelitian

3.4.1 Pembuatan asap cair

1. Proses pirolisis

Cangkang buah aren dibersihkan dari kotoran, kemudian dipecah menjadi beberapa bagian agar luas pembakaran menjadi lebih besar dan pembakaran berlangsung lebih cepat. Selanjutnya cangkang buah aren dikeringkan di bawah sinar matahari hingga kadar airnya menurun sampai 10% - 20%. Sebanyak 3 kg cangkang buah aren kering dimasukkan ke dalam reaktor pirolisis. Tabung reaktor yang sudah diisi cangkang buah aren ditutup rapat menggunakan tutup yang memiliki saluran keluarnya asap yang menuju ke kondensor. Suhu maksimal pada

pembakaran cangkang buah aren adalah 300°C . Hasil kondensasi berupa asap cair yang masih mengandung tar dan *bio oil* kemudian ditampung dalam wadah dan diukur volumenya. Asap cair *crude* yang diperoleh selanjutnya didestilasi pada suhu 100 sampai 110°C hingga volume yang tersisa sebanyak $\pm 40\%$. Destilasi yang dihasilkan kemudian didestilasi kembali dengan suhu dan langkah yang sama. Hasil distilasi yang kedua kali memiliki tingkat kemurnian yang lebih tinggi dibandingkan asap cair yang hanya didestilasi satu kali.

2. Uji sifat fisika kimia asap cair

Uji sifat fisika asap cair dilakukan terhadap warna, transparansi, rendeman, dan berat asap cair. Pengukuran berat jenis dilakukan dengan menggunakan piknometer dengan cara sebagai berikut; menimbang bobot piknometer kosong dengan neraca analitik. Selanjutnya piknometer diisi dengan asap cair dan ditimbang kembali bobotnya.

Uji sifat kimia yang dilakukan terhadap total asam tertitrasi, total fenol dan pH. Pengujian kadar asam dilakukan dengan metode titrimetri. Penentuan total asam tertitrasi dalam asap cair dilakukan dengan mengencerkan 1 ml asap cair dalam 10 ml aquadest lalu ditambahkan 3 tetes indikator phenolphthalein. Selanjutnya dilakukan titrasi menggunakan $\text{NaOH } 0.1 \text{ N}$. Titrasi dihentikan ketika telah berbentuk warna merah keunguan dan stabil (Noor, Luditama dan Pari., 2016).

Fenol diuji menggunakan larutan FeCl_3 dengan cara meneteskan sebanyak 5 tetes pada larutan asap cair lalu dihomogenkan hingga berubah warna menjadi coklat.

3.4.2. Percobaan *in vitro*

1) Sterilisasi alat

Alat yang akan digunakan, terlebih dahulu dicuci dengan sabun dan air mengalir hingga bersih kemudian dikeringkan. Setelah kering alat dibungkus menggunakan kertas dan plastik tahan panas. Alat yang sudah dibungkus dimasukkan ke dalam autoklaf untuk di sterilisasi menggunakan uap panas bertekanan tinggi dengan suhu 121°C selama 20 menit. Alat yang tidak tahan panas disterilisasi dengan menggunakan alkohol 70% .

2) Pembuatan media PDA

Media PDA instan sebanyak 20 g dimasukkan ke dalam erlenmeyer bersama dengan aquadm sebanyak 500 ml. Mulut erlenmeyer yang berisi media ditutup menggunakan *aluminium foil* kemudian dihomogenkan menggunakan *hot plate* dan *magnetic stirrer* dengan suhu 100°C sampai homogen. Kemudian media yang telah homogen dan mendidih disterilisasi menggunakan autoklaf selama 20 menit pada suhu 121°C.

3) Persiapan dan identifikasi *Erwinia carotovora*

Isolat cendawan *Erwinia carotovora* diperoleh dari buah cabai yang terkena penyakit busuk basah. Isolat *Erwinia Carotovora* bakteri ditanam dalam media PDA dan diinkubasi pada suhu 25°C. Identifikasi makroskopis isolat dilakukan dengan menggunakan alat indera penglihatan, sedangkan untuk mikroskopis menggunakan mikroskop elektrik. Pengamatan mikroskopis diawali dengan mengambil koloni bakteri yang tumbuh, lalu disimpan dalam kaca objek kemudian ditetesi aquadm. Amati preparat tersebut pada pembesaran 10x dan 40x.

4) Pemurnian dan panen isolat *Erwinia carotovora*

Pemurnian dilakukan dengan memindahkan sepotong kecil koloni yang telah dihasilkan kemudian dipindahkan ke dalam media kultur PDA yang steril. Kemudian dilakukan pemurnian untuk menghindari tumbuhnya patogen selain *Erwinia Carotovora*. Strain bakteri dapat dipanen setelah berumur 7-10 hari. Pemanenan dilakukan dengan menambahkan air steril yang mengandung 0,05% Tween-20, lalu disebar secara halus menggunakan *loop* steril dan dikondisikan pada konsentrasi konidia/ml (Wang dkk, 2020). Pengukuran konsentrasi galur sebanyak 1ml dilakukan menggunakan *hemocytometer* di Laboratorium.

5) Uji aktivitas antibakteri asap cair secara *in vitro*

Pengujian aktivitas antibakteri asap cair terhadap pertumbuhan *Erwinia Carotovora* dilakukan pada media PDA. Hasil pengamatan dari uji *in vitro* akan dijadikan penentuan taraf konsentrasi pada uji *in vivo*. Pengujian ini dilakukan dengan cara menambahkan asap cair ke dalam media PDA sesuai dengan konsentrasi yang diharapkan. Konsentrasi yang digunakan dalam pengujian *in vitro* adalah 0%, 2%, 4%, 6%, 8% dan 10%.

Pengujian diawali dengan memasukkan asap cair sebanyak 0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1 ml ke dalam cawan petri, tambahkan media PDA steril sampai volume \pm 10 ml lalu dihomogenkan. Langkah selanjutnya adalah memasukkan sebanyak 10 μ l suspensi konidia dengan kerapatan 10^5 mL⁻¹ di bagian tengah media. Media diinkubasi pada suhu 25°C. Aktivitas pencampuran tersebut dilakukan di dalam *Laminar Air Flow Cabinet*. Pengamatan dilakukan setiap hari dengan menghitung diameter zona hambat bakteri yang terbentuk.

3.4.3. Percobaan *in vivo*

1. Pengadaan Buah Cabai

Buah cabai yang digunakan yang matang dan permukaan buahnya berwarna merah, buah disortir berdasarkan ukuran dan kondisi fisik permukaan yang baik. Percobaan ini terdiri dari 2 perlakuan dan setiap perlakuan terdiri dari 1 buah cabai. Sebelum aplikasi patogen, permukaan buah cabai direndam pada desinfektan NaOCl 2% selama 3 menit, kemudian dibilas menggunakan air mengalir dan dikering anginkan.

2. Uji aktivitas antibakteri asap cair secara *in vivo*

Larutan asap cair untuk uji *in vitro* dibuat dengan konsentrasi larutan 0%, 2%, 4%, 6% 8% dan 10%, dengan konsentrasi 0 sebagai kontrol yaitu 0% asap cair. Untuk menentukan konsentrasi dalam uji *in vivo* diambil dari perlakuan konsentrasi yang memiliki penghambatan paling efektif pada hasil uji *in vitro* dikali 10.

Pengamatan aktivitas anti bakteri asap cair *in vivo* dilakukan pada buah cabai segar. Kemudian buah cabai yang telah dipreparasi direndam ke dalam larutan asap cair sesuai perlakuan dikering anginkan. Buah diberi luka sedalam 3 mm dan lebar 3 mm dengan menggunakan jarum yang steril pada bagian atas buah cabai merah. Larutan konidia bakteri diinokulasi dengan konsentrasi 10^5 sebanyak 10 μ l kemudian dikering anginkan.

Buah yang sudah mendapat perlakuan disimpan dalam kotak plastik pada suhu 25°C dan kelembaban 80%. Pengamatan Intensitas serangan dan diameter lesi buah yang terjadi dilakukan pada 1 HSI hingga hari ke 7 HSI sedangkan untuk susut bobot buah dilakukan pada 7 HSI.

3.5 Pengamatan

3.5.1 Pengamatan penunjang

Pengamatan penunjang adalah pengamatan yang dilakukan terhadap perlakuan yang datanya tidak diuji secara statistik untuk menunjang data penelitian dan mengetahui kemungkinan pengaruh lain dari luar perlakuan. Pengamatan penunjang yang diamati adalah sebagai berikut:

1) Karakteristik asap cair cangkang buah aren

Karakteristik asap cair yang diuji meliputi rendeman, berat jenis, warna, transparansi, pH, kadar asam dan kadar fenol. Rendamen asap cair dihitung dengan menggunakan rumus (Jaya, Sandri, dan Setiawan, 2019):

$$\text{Rendeman} = \frac{\text{jumlah asap cair yang dihasilkan}}{\text{jumlah berat bahan baku sebelum diolah}} \times 100\%$$

Bobot jenis asap cair dapat dihitung dengan memasukkan hasil pengukuran persamaan berikut :

$$\text{Berat jenis (g/cm}^3\text{)} = \frac{Bc - Bp}{\text{volume piknometer}}$$

Keterangan : Bc = Bobot piknometer + contoh (g);
Bp = Bobot piknometer kosong (g)

Nilai total asam tertitrasi dapat dihitung berdasarkan persamaan berikut (Setiawati dan Yunianta, 2018):

$$\text{Total asam (\%)} = \frac{\text{volume NaOH} \times \text{Normalitas NaOH} \times \text{BM Asam Asetat} \times 100\%}{\text{Berat sampel} \times 1000}$$

2) Identifikasi isolat *Erwinia carotovora*

Identifikasi dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang ditemukan merupakan *Erwinia Carotovora*. Pengamatan makroskopis dilakukan dengan mengamati pertumbuhan koloni bakteri pada cawan petri meliputi warna koloni, bentuk konidia dan warna konidia. Pengamatan secara mikroskopis dengan mikroskop elektrik untuk mengamati bentuk konidia.

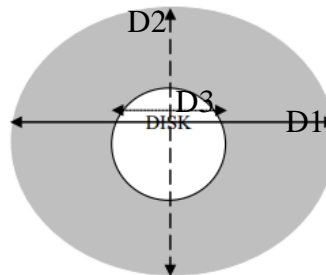
3.5.2 Pengamatan utama

Pengamatan utama adalah pengamatan yang dilakukan pada setiap perlakuan yang datanya diuji secara statistik, tujuannya adalah untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan yang diuji. Adapun parameter yang diamati adalah:

1. Hasil uji *in vitro*

a. Diameter zona hambat

Pengukuran dilakukan dengan menggunakan alat ukur penggaris dengan titik tengah yang sudah ditentukan sebelumnya. Pengamatan dilakukan pada 7 hari setelah inokulasi. Diameter zona hambat diukur dengan rumus (Adries, Gunawan, dan Supit, 2014):



$$DH (\%) = \frac{(D1-D3)+(D2-D3)}{2}$$

Keterangan : D1 (diameter zona hambat horizontal), D2 (diameter zona hambat vertikal), D3 (diameter sumuran), dan L (zona hambat).

2. Hasil uji *in vivo*

a. Intensitas serangan

Untuk mengetahui kerusakan pada buah atau biasa disebut dengan intensitas serangan yang terjadi pada buah dihitung dengan menggunakan rumus intensitas serangan tidak mutlak (Marhani, 2018). Rumus ini digunakan karena pengamatan hanya terfokus pada buah saja.

$$I = \frac{\sum (nv)}{NZ} \times 100\%$$

Keterangan: I = Intensitas serangan
 n = Jumlah buah yang terinfeksi
 v = Besar skala serangan
 Z = Skala tertinggi dari kategori terinfeksi
 N = Banyaknya buah yang diamati

Nilai skala penilaian intensitas serangan berdasarkan persentase tanaman yang terinfeksi, seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Nilai skala untuk tiap kategori serangan

Nilai skala (Z)	Kategori serangan
0	Tidak ada kerusakan
1	Rusak ringan $\leq 25,00\%$
2	Rusak sedang $> 25,01\% - 50,00\%$
3	Rusak berat $> 50,01\% - 75,00\%$
4	Rusak sangat berat $> 75,01\% - 100\%$

Sumber: Marhani (2018)

a. Diameter lesi buah

Pengamatan diameter luka dilakukan dengan menggunakan alat ukur meteran sejak 3 hari setelah inokulasi. Data diameter luka buah didapatkan dari hasil rata-rata diameter luka vertikal dan horizontal dari pusat infeksi setiap buahnya dikurangi luka awal.

b. Susut bobot buah

Pengamatan susut bobot buah ini dilakukan untuk menghitung kehilangan bobot buah akibat serangan penyakit *Erwinia Carotovora*. pengamatan dilakukan dengan menimbang buah cabai pada hari ke 1 dan hari ke 7 menggunakan timbangan analitik, setelah itu dihitung selisih berat buahnya.