

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan tempat penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni sampai bulan Juli 2022 bertempat di Laboratorium Mikrobiologi dan Laboratorium Proteksi Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Kampus Mugarsari, Kota Tasikmalaya.

3.2 Bahan dan alat

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi asap cair yang berasal dari hasil pirolisis limbah bambu dari pabrik tusuk sate EBA (Era Bambu Alami) Jln. Panunggulan No. 50, RT/RW 003/004, Sukahurip, Kec. Tamansari, Kab. Tasikmalaya, Jawa Barat. Bakteri uji *R. solanacearum* di dapat dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Prodi Mikrobiologi Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta.

Bahan yang digunakan sebagai media pertumbuhan adalah *Nutrient Broth (NB)*, sedangkan media uji yang digunakan adalah *Nutrient Agar (NA)*. Bahan lain yang digunakan yaitu akuades, asam galat, follin C, Na_2CO_3 , NaOH 0,1 N, fenolftalein dan alkohol 70%.

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah set alat pirolisis, neraca analitik, botol kaca, indikator pH, labu ukur 10 ml dan 100 ml, spektrofotometer uv vis, autoklaf, laminar air flow, hotplate magnetic stirrer, shaker, bunsen, tabung reaksi, pipet elektrik, buret, erlenmeyer 100 ml, petridish, tabung reaksi, cotton bud steril, kertas cakram, pinset, kamera, light fotostudio, kertas label, alat tulis dan tissue.

3.3 Metode penelitian

Rancangan yang digunakan dalam pengujian daya hambat asap cair terhadap bakteri ini dengan metode difusi cakram adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan enam (6) perlakuan dan diulang sebanyak 4 kali. Akuades digunakan sebagai pelarut asap cair.

Kelima perlakuan itu adalah:

K_0 = kontrol

K_1 = Asap cair limbah bambu dengan konsentrasi 1%

K_2 = Asap cair limbah bambu dengan konsentrasi 2%

K_3 = Asap cair limbah bambu dengan konsentrasi 3%

K_4 = Asap cair limbah bambu dengan konsentrasi 4%

K_5 = Asap cair limbah bambu dengan konsentrasi 5%

Data yang diperoleh dari hasil pengamatan semua proses selanjutnya dianalisis secara deskriptif. Sementara itu, data hasil pengujian pengaruh Asap Cair Limbah Bambu terhadap bakteri *R. solanacearum* dianalisis statistik seperti pada Tabel 2.

Table 2. Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	Fhitung	Ftabel 5%
Perlakuan	t-1	JKP	KTP	KTP/KTG	
Galat	t(r-1)	JKG	KTG		
Total	(t.r)-1	JKT			

Sumber: Gomez dan Gomez (2015)

Table 3. Kaidah Pengambilan Keputusan

Hasil Analisis	Analisis	Kesimpulan Percobaan
$F_{hitung} \leq F_{0,05}$	Tidak berbeda nyata	Tidak ada perbedaan pengaruh antar perlakuan
$F_{hitung} > F_{0,05}$	Berbeda nyata	Terdapat perbedaan pengaruh antar perlakuan

Sumber: Gomez dan Gomez (2015)

Hasil dari sidik ragam bila berbeda nyata dilanjutkan dengan uji lanjut jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5%. Dengan rumus sebagai berikut :

$$LSR (\alpha, \text{dbg.p}) = SSR \cdot S_x$$

$$S_x = \sqrt{\frac{KTG}{r}}$$

Keterangan: LSR = *Least Significant Ranges*

SSR = Significant studentized range

S_x = Galat baku rata-rata (*standard error*)

α = Taraf nyata

dbG = Derajat bebas galat

p = Range (perlakuan)

KTG = Kuadrat tengah galat

r = Jumlah ulangan pada tiap nilai tengah perlakuan yang dibandingkan

3.4 Prosedur penelitian

3.4.1 Sterilisasi alat

Alat yang digunakan dalam uji *in vitro* disterilisasi dengan cara mencuci dengan sabun terlebih dahulu untuk membersihkan dari kontaminan yang menempel pada permukaan alat. Alat kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan kertas dan plastik anti panas. Alat dimasukkan ke dalam autoklaf, kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 20 menit. Peralatan yang tidak bisa diautoklaf disterilisasi dengan alkohol 70%.

3.4.2 Prosedur pembuatan dan karakterisasi asap Cair

a. Pengambilan sampel limbah bambu

Bambu diambil dari sisa-sisa limbah Pabrik tusuk sate EBA (Era Bambu Alami) yang beralamat di Jln. Panunggulan No 50 Rt/Rw 003, Sukahurip, Kec.Tamansari, Kab. Tasikmalaya, Jawa Barat. Bambu yang digunakan dalam pembuatan asap cair ini adalah sisa potongan antar ruas atau node bagian atas maupun bagian bawah bambu kemudian dipotong-potong dengan panjang 5 cm menggunakan gergaji. Batang bambu yang sudah dipotong kemudian dikeringkan. Batang bambu yang dikeringkan ditata supaya bambu tidak menumpuk, Bambu kering ditimbang sebanyak 3 kg menggunakan timbangan digital dan selanjutnya dilakukan proses pirolisis dengan menggunakan alat pirolisator (Diatmika, Kencana dan Arda, 2019).

b. Pembuatan asap cair

Proses pembuatan asap cair diawali dengan menimbang batang bambu yang akan digunakan masing-masing sebanyak 3 kg, kemudian bambu dimasukkan ke dalam reaktor pirolisis yang sudah dilengkapi dengan kondensor terbuat dari stainless steel dan dilengkapi dengan kompor bertekanan tinggi yang digunakan sebagai sumber pemanas reaktor pirolisator. Setelah bambu dimasukkan ke dalam reaktor pirolisis kemudian reaktor pirolisis ditutup dengan rapat hal ini bertujuan untuk mencegah keluranya asap dari reaktor pirolisis selama berlangsungnya proses pirolisis (Diatmika, Kencana dan Arda, 2019). Asap Cair lalu didistilasi dengan menggunakan alat distilator kaca. Distilasi dilakukan untuk menghilangkan tar yang masih terkandung dan menjernihkan Asap cair sehingga tidak menimbulkan noda pada saat aplikasi.

c. Karakteristik asap cair

Asap cair dikarakterisasi kualitasnya berdasarkan standar kualitas dari Jepang. Parameter diuji secara kualitatif dan kuantitatif, meliputi parameter bobot jenis, pH, warna, transparansi, kandungan senyawa fenol, dan kadar asam.

3.4.3 Pembuatan media NA

Media NA dibuat dengan cara melarutkan NA bubuk sebanyak 20 gram dalam 1 liter aquades. Media dihomogenkan dengan *stirrer* sekaligus dipanaskan dengan menggunakan *hot plate*, kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, sehingga didapatkan media NA yang steril.

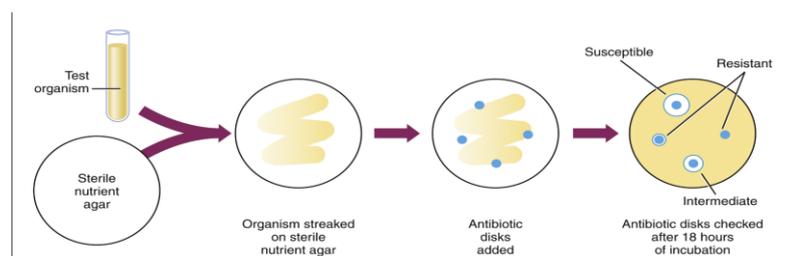
3.4.4 Perbanyak bakteri *R. solanacearum*

Sampel isolat *R. solanacearum* didapat dari koleksi Laboratorium Mikrobiologi Prodi Mikrobiologi Pertanian Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada, Yogyakarta. Sampel *R. solanacearum* diperbanyak dicawan petri dan juga diperbanyak dimedia miring dengan penggunaan botol biakan yang sudah diisi media NA serta diperbanyak dierlenmeyer yang sudah diisi media NB.

3.4.5 Uji aktivitas antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dilakukan dengan cara difusi cakram. Cotton swab steril dimasukkan pada erlenmeyer yang berisi media nutrient broth (NB) dengan stok biakan *R. solanacearum* dan didiamkan selama 5 menit, kemudian diinokulasikan diatas media nutrient agar (NA) beku dalam cawan petri dengan gaya zig-zag. Lima buah cakram Kertas ditempelkan di atas permukaan agar, pada masing-masing kertas cakram ditetesi larutan Asap cair limbah bambu menggunakan mikropipet sesuai perlakuan konsentrasi yang digunakan, yaitu 1%, 2%, 3%, 4%, dan 5% atau sebanyak 0,2 ml; 0,4 ml; 0,6 ml; 0,8 ml; dan 1 ml. Pengujian dilakukan sebanyak 4 ulangan. Semua media diinkubasi pada suhu 27°-29°C dalam inkubator selama 3x24 jam.

Tahapan uji aktivitas antibakteri dapat dilihat pada gambar 7.



Gambar 7. Pengujian aktivitas antibakteri (metode *disc diffusion*)
(sumber : Apriyanti *et al.* 2018)

3.5 Parameter pengamtan

3.5.1 Parameter penunjang

a. Karakteristik kualitas asap cair limbah bambu

Pengujian kualitas asap air dilakukan untuk mengetahui mutu atau kualitas asap cair dari limbah bambu yang belum mengalami pengujian sebelumnya. Parameter yang diambil mengacu pada standar kualitas asap cair di Jepang. Karakteristik yang diuji meliputi pH, kadar asam (total asam tertitrasi), berat jenis, warna, dan transparansi larutan. Berikut standar kualitas asap cair Jepang dalam Tabel 4.

Tabel 4. Standar Kualitas Asap Cair Jepang

Jenis Analisis	Nilai
Keasaman, Ph	1.5 –3.7
Berat jenis, g/mL	>1.0005
Warna	Kuning pucat – coklat kemerahan
Transparansi	Tidak keruh, tidak ada zat terdispersi
Kadar asam (%)	1-18

Sumber : Yatagai, 2002

Tahapan pengujian dalam karakterisasi asap cair :

- 1) Pengujian bobot jenis menggunakan alat piknometer yang dapat mengukur volume larutan dengan akurat. Timbangan yang digunakan dalam uji bobot jenis berskala 10 sampai 4 g sehingga ketepatannya cukup tinggi lalu bobot jenis dihitung dalam rumus :

$$\text{Bobot jenis}(\rho) = \frac{\text{piknometer isi} - \text{piknometer kosong}}{\text{volume piknometer}}$$

Satuan yang digunakan, bobot jenis (ρ) dalam satuan g/ml; bobot bahan dalam gram (g); volume piknometer dalam mililiter (ml).

- 2) Pengujian warna dilakukan secara kualitatif dengan menggunakan Aplikasi Android Colorimeter version 5.5.1 yang dapat mengukur parameter warna seperti CIELAB, Chroma, Hue°, RGB dan nama warna cahaya tampak 400 hingga 700 nm berdasarkan publikasi Ravindranath *et al.* (2018). Asap cair dimasukkan ke dalam gelas kaca bersih lalu diambil gambar dalam Lightbox Photos Studio agar pencahayaan baik dan pengambilan warna stabil. Kamera yang digunakan menggunakan kamera smartphone Oppo A7 13 MP. Gambar yang didapatkan diproses dalam aplikasi sehingga akan didapatkan data nama warna serta panjang gelombang masing-masing warna.
- 3) Pengujian pH dilakukan dengan menggunakan alat indikator pH universal. Ujung indikator yang terdiri dari beberapa baris warna dicelupkan ke dalam larutan beberapa saat sampai baris warna berubah lalu pH ditentukan dengan membandingkan baris warna angka pH dalam kemasan alat.

- 4) Pengujian kandungan senyawa fenol dilakukan dengan metode kualitatif. Larutan cuka kayu distilasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 5 ml lalu tambahkan larutan FeCl_3 1% sebanyak 5 tetes. Kocok beberapa saat, reaksi positif ditunjukkan dengan adanya perubahan warna larutan dari warna ungu sampai coklat (Asirvatham, 1992).
- 5) Kadar asam diuji dengan metode titrimetri. Buret yang akan digunakan dibilas terlebih dahulu sebanyak tiga kali dengan akuades untuk memastikan tidak ada sisa larutan NaOH yang tertinggal kemudian keringkan. Ke dalam buret ditambahkan larutan NaOH 0,1 N sampai menyentuh angka 1 pada buret. Larutan sampel 1 ml dilarutkan dengan aquadm sampai volume 10 ml lalu ditambahkan larutan indikator *Phenolphthalein* (PP) sebanyak tiga tetes. Selanjutnya dilakukan titrasi sampai larutan sampel berubah warna menjadi merah muda stabil dan dicatat volume NaOH yang berkurang. Perhitungan kadar asam dilakukan dengan menggunakan rumus:

$$\% \text{ asam} = \frac{\text{volume NaOH tertitrasi} \times \text{konsentrasi NaOH} \times \text{Mr CH}_3\text{COOH}}{\text{bobot sampel} \times 1000} \times 100\%$$

Keterangan:

Kadar asam (%)

Volume NaOH tertitrasi (ml)

Konsentrasi NaOH (N)

Bobot sampel (g)

Titrasi dilakukan secara triplo (tiga kali ulangan) agar hasil yang didapat lebih akurat. Hasil tiga ulangan titrasi kemudian dirata-ratakan untuk memperoleh kadar asam akhir.

3.5.2 Parameter utama

a. Pengamatan diameter zona hambat

Pengukuran Diameter zona hambat Setelah dilakukan proses inkubasi selama 3x 24 jam, maka dilakukan pengamatan ukuran diameter zona hambat yaitu daerah yang tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Pengukuran diameter dilakukan dengan menggunakan jangka sorong manual dengan ketelitian 0,01 mm. Diameter zona hambat diukur dari tepi (break poin) ke tepi (break point)

zona hambat yang bersebrangan melewati pusat cakram kertas. Jika tidak terdapat zona hambat disekitar cakram kertas, maka nilai zona hambat dikatakan 0.00 mm (Putra, Setyowati dan Susilorini, 2016).

b. Pengamatan konsentrasi hambat minimum (KHM)

Konsentrasi terkecil dari sampel yang mampu menghambat bakteri yang diinokulasikan dengan terbentuknya zona bening merupakan nilai konsentrasi hambat minimum (KHM) dari sampel tersebut.