

BAB III

METODE PERCOBAAN

3.1. Tempat dan waktu percobaan

Percobaan ini dilaksanakan di Laboratorium Dasar Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya dan Laboratorium Teknologi Pangan Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman Purwokerto. Adapun waktu percobaan ini dimulai pada bulan Februari sampai Juni 2018.

3.2. Alat dan bahan percobaan

Alat yang digunakan pada percobaan ini di antaranya: gelas ukur, tabung reaksi, gelas beaker, erlenmeyer, jarum ose, kain kasa, alumunium foil, cawan petri, spatula, pinset, mikropipet, timbangan elektrik, bunsen, kompor gas, oven, blender, *laminar air flow*, *refrigerator*, *rotary evaporator*, termometer, autoklaf, pisau, jangka sorong, *paper disc*, corong, kertas saring, pH indikator universal.

Adapun bahan yang digunakan dalam percobaan ini di antaranya: kulit buah manggis, media *nutrient agar* (NA), media *nutrient broth* (NB), media *plate count agar* (PCA), *aquadest*, biakan murni *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* (*Xoo*), etanol 95%, NaCl, alkohol 70%, dan antibiotik kloramfenikol.

3.3. Rancangan percobaan

3.3.1. Ekstraksi kulit buah manggis

Ekstraksi bertujuan untuk menarik komponen kimia (ekstrak) yang terdapat pada bahan kulit buah manggis (*pericarp*). Ekstrak yang dihasilkan digunakan untuk tahapan percobaan selanjutnya. Adapun besarnya rendemen ekstrak dihitung berdasarkan rumus berikut:

$$\%Rendemen\ Ekstrak = \frac{b - a}{m} \times 100\%$$

Keterangan : a = bobot labu sebelum ekstraksi (g); b = bobot labu setelah ekstraksi (g);
m = massa sampel (g) (sumber: Martin, 2016)

3.3.2. Uji aktivitas antibakteri ekstrak kulit buah manggis secara *in-vitro*

Pengujian dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh aktivitas antibakteri yang diberikan oleh ekstrak kulit buah manggis terhadap pertumbuhan bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, serta ditemukannya konsentrasi ekstrak kulit buah manggis terendah yang memiliki daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri uji. Adapun metode yang dilakukan adalah penelitian eksperimental dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang disusun secara faktorial, dengan dua faktor perlakuan yaitu:

- a. Faktor pertama yaitu suhu penyimpanan (S), terdiri dari 3 taraf.

s_1 = suhu 0 °C

s_2 = suhu 13,5 °C

s_3 = suhu 27 °C

- b. Faktor kedua yaitu lama penyimpanan (P), terdiri dari 3 taraf.

p_1 = 1 hari

p_2 = 7 hari

p_3 = 14 hari

Dengan demikian diperoleh 9 kombinasi perlakuan dengan tiga kali ulangan, sehingga menghasilkan 27 unit percobaan. Berikut ini ialah tabel yang menjabarkan kombinasi perlakuan suhu dengan lama penyimpanan, analisis ragam, dan kaidah pengambilan keputusan berdasarkan uji F.

Tabel 1. Kombinasi perlakuan suhu dengan lama penyimpanan

Suhu (S)	Lama penyimpanan (P)		
	p_1	p_2	p_3
s_1	s_1p_1	s_1p_2	s_1p_3
s_2	s_2p_1	s_2p_2	s_2p_3
s_3	s_3p_1	s_3p_2	s_3p_3

Tabel 2. Tabel analisis ragam (ANOVA)

Sumber ragam	db	JK	KT	F hit.	F tab.	
					5%	1%
Perlakuan	8	$\sum T^2/r - FK$				
Suhu (S)	2	$\sum S^2/rp - FK$	JK_S/db_S	KT_S/ KT_G	3,55	6,01
Lama penyimpanan (P)	2	$\sum P^2/rs - FK$	JK_P/db_P	KT_G/ KT_G	3,55	6,01
S x P	4	$JK_T - JK_S - JK_P$	$JK_{S,P}/db_{S,P}$	$KT_{S,P}/ KT_G$	2,93	4,58
Galat	18	$JK_{\text{kumum}} - JK_T$	JK_G/db_G			
Umum	26	$\sum X^2 - FK$				

Tabel 3. Kaidah pengambilan keputusan

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

Jika dari uji F terdapat berbeda nyata, maka dilakukan uji lanjut jarak berganda Duncan pada taraf tidak nyata 5 % dengan rumus $LSR = S_x \times SSR$.

Nilai S_x dapat dicari dengan rumus sebagai berikut :

1. Bila terjadi interaksi

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

2. Bila berbeda nyata pada perlakuan suhu

$$\sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r.p}}$$

3. Bila berbeda nyata pada perlakuan lama penyimpanan

$$\sqrt{\frac{KT \text{ Galat}}{r.s}}$$

Keterangan : LSR = *Least Significant Ranges*; SSR = *Studentized Significant Ranges*; S_x = galat baku rata-rata; KT Galat = kuadrat tengah galat; r = jumlah ulangan; p = jumlah perlakuan P; s = jumlah perlakuan S (sumber: Gomez dan Gomez, 2010)

3.4. Pelaksanaan percobaan

3.4.1. Sterilisasi alat

Seluruh peralatan dicuci dengan menggunakan sabun cuci, dibilas, kemudian dikeringkan. Alat-alat yang sudah kering dibungkus dengan kertas koran/alumunium foil. Semua alat dan bahan (hanya *aquadest*) tersebut disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C dan tekanan 1,5 Psi (kg/cm²) selama 45 menit (Setiawan, 2015). Alat-alat yang tidak tahan dengan suhu panas cukup disterilisasi dengan menggunakan alkohol.

3.4.2. Persiapan sampel

Buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) diperoleh dari petani manggis di Kecamatan Puspahiang Kabupaten Tasikmalaya. Buah manggis yang diperoleh tersebut kemudian masing-masing diberi perlakuan yang telah ditentukan, yaitu berdasarkan lama penyimpanan dan suhu penyimpanan yang berbeda. Suhu penyimpanan dikondisikan sedemikian rupa pada taraf 0 °C, 13,5 °C, dan 27 °C. Buah manggis yang telah melewati masa penyimpanannya langsung dikeluarkan dari tempat penyimpanan untuk proses selanjutnya. Kemudian buah manggis tersebut dipisahkan antara kulit dan daging buahnya sehingga diperoleh kulit buah manggis sebanyak 500 g untuk setiap perlakuan. Bobot kulit buah manggis tersebut ditentukan dengan berdasarkan standar rendemen sebesar 16,68% (Martin, 2016). Kulit buah dipotong-potong dan dikeringkan menggunakan oven dengan suhu 50 °C sampai kadar air kurang lebih 8-10% (Miryanti dkk., 2011). Setelah kering, kulit buah manggis diblender hingga berbentuk serbuk (Noviyani, 2015).

3.4.3. Pembuatan ekstrak kulit buah manggis

Metode yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kulit buah manggis (*Garcinia mangostana* L.) ialah metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Proses maserasi dilakukan di Laboratorium Teknologi Pangan Fakultas Pertanian Universitas Jenderal Soedirman. Kulit buah manggis kering tiap-tiap perlakuan yang telah dihaluskan dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan direndam dalam etanol 95% selama 5 hari sambil sesekali dilakukan

pengadukan/penggojogan minimal 3 kali dalam sehari (Raharjati dan Puspawati, 2013). Hasil maserasi kemudian disaring menggunakan kertas saring. Ekstrak dievaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 55 °C sampai tidak terjadi lagi pengembunan pelarut pada kondensor (Noviyani, 2015). Untuk mencegah terjadinya degradasi senyawa bioaktif, ekstrak yang dihasilkan disimpan terlebih dahulu di dalam *refrigerator* hingga waktunya pengujian.

3.4.4. Pembuatan media NA (*Nutrient Agar*) dan NB (*Nutrient Broth*)

Media *Nutrient Agar* (NA) digunakan untuk media uji aktivitas antibakteri. Media ini dibuat dengan cara *Nutrient Agar* ditimbang sebanyak 20 gram dan dilarutkan dalam *aquadest* hingga 1 liter. Larutan tersebut kemudian dipanaskan di atas panci menggunakan kompor sambil diaduk hingga homogen. Media NA disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C. Kemudian media NA dituang ke dalam cawan petri masing-masing ± 10 mL dan dibiarkan hingga memadat (Rustanti, 2007 dalam Pratiwi, 2015).

Media NB (*Nutrient Broth*) digunakan untuk media perbanyakan bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Media ini dibuat dengan cara menimbang *Nutrient Broth* sebanyak 8 gram, kemudian ditambahkan *aquadest* hingga 1 liter lalu dipanaskan di atas panci menggunakan kompor sambil diaduk sampai homogen. Selanjutnya media NB disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C (Pratiwi, 2015).

3.4.5. Regenerasi bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo)

Pembuatan stok bakteri ini dilakukan untuk memperbanyak dan meremajakan bakteri Xoo, dengan cara mengambil 1 ose biakan murni bakteri Xoo lalu diinokulasikan ke dalam media *Nutrient Broth* (NB). Inokulasi dilakukan secara steril di dalam *laminar air flow*. Kemudian diinkubasi selama 24 - 48 jam pada suhu ruangan di dalam inkubator. Kerapatan bakteri (jumlah koloni) dalam suspensi tersebut diatur sebesar 10^6 - 10^8 CFU/mL (Poeloengan dan Pratiwi, 2010).

Jumlah koloni diukur menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC). Metode ini dilakukan dengan membuat seri pengenceran bakteri. Suspensi bakteri diencerkan dalam larutan fisiologis pada 5 faktor pengenceran terdiri dari 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , dan 10^5 . Kemudian suspensi bakteri masing-masing faktor pengenceran diinokulasikan ke dalam media *Plate Count Agar* (PCA) dalam cawan petri, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C . Jumlah koloni bakteri per mL (CFU/mL) merupakan hasil perkalian antara jumlah koloni yang tumbuh di dalam media dengan faktor pengenceran. Cawan petri yang memenuhi syarat perhitungan ialah yang memiliki koloni sejumlah 30 - 300.

3.4.6. Pengujian aktivitas antibakteri secara *in-vitro*

Metode yang digunakan dalam pengujian ini ialah metode difusi cakram (tes Kirby & Bauer). Suspensi bakteri *Xoo* sebanyak 100 μL diinokulasikan ke dalam cawan petri berisi media NA menggunakan pipet mikro hingga merata. Kemudian kertas cakram steril yang telah ditetesi sebanyak 20 μL ekstrak kulit buah manggis masing-masing perlakuan diletakkan di atas permukaan media NA secara higienis di dalam *laminar air flow*. Lalu media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C (Anindya, 2012). Diameter zona bening diukur menggunakan jangka sorong, lalu dibandingkan dengan standar antibiotik kloramfenikol konsentrasi 100 mg/L.

Sampel yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri kemudian diuji kembali untuk menentukan Kadar Hambat Minimum (KHM)/*Minimum Inhibitory Concentration* (MIC). Pengujian dilakukan menggunakan metode dilusi, yaitu: Disediakan 10 tabung steril, pada tabung 2 s/d 10 diisi dengan masing-masing 0,5 ml larutan fisiologis (NaCl 0,85%). Pada tabung nomor 1 diisi 1 mL antibiotik kloramfenikol (100 mg/L) sebagai kontrol negatif. Tabung nomor 10 diisi 1 mL *aquadest* sebagai kontrol positif. Kemudian tambahkan 0,5 mL ekstrak murni kulit buah manggis ke dalam tabung no 2 yang sebelumnya telah diisi 0,5 mL NaCl 0,85% lalu diaduk rata, kemudian diambil 0,5 mL dipindahkan pada tabung nomor 3. Tabung nomor 3 diaduk rata dan dipindahkan sebanyak 0,5 mL ke tabung nomor 4, demikian seterusnya sampai tabung 9. Sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak kulit buah manggis berturut-turut sebanyak 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,13%, 1,56%, 0,78% dan 0,39% (lihat Tabel 7).

Langkah selanjutnya ialah mengambil 10 buah cawan petri, kemudian pindahkan isi dari setiap tabung tadi ke dalam masing-masing cawan petri, lalu diisi media NA. Selanjutnya inokulasikan sebanyak 0,1 mL suspensi bakteri *Xoo* dengan kerapatan setara standar Mc Farland 0.5 (1×10^8 CFU/mL) di setiap cawan petri tersebut. Cawan petri kemudian digoyang agar media, bakteri dan ekstrak tercampur merata. Setelah itu dilakukan inkubasi masing-masing 24 jam pada suhu 37 °C. Diamati adanya tidaknya pertumbuhan bakteri dengan mengamati tumbuh/tidaknya koloni bakteri pada media (Rahayu, 2013).

3.5. Parameter pengamatan

3.5.1. Pengamatan penunjang

a. Pengamatan hasil ekstraksi

Pengamatan dilakukan setelah ekstrak kulit buah manggis tiap perlakuan dihasilkan. Parameter pengamatan meliputi jumlah serta bobot masing-masing ekstrak yang dihasilkan. Hasil pengamatan dijelaskan secara deskriptif.

b. Pengamatan regenerasi bakteri *Xoo*

Pengamatan dilakukan terhadap hasil regenerasi bakteri *Xoo* yang telah dilakukan. Parameter pengamatan meliputi jumlah bakteri dalam media dan tingkat kontaminasi yang terjadi. Data pengamatan disajikan dalam bentuk uraian deskriptif ataupun menggunakan tabel.

3.5.2. Pengamatan utama

a. Pengamatan zona hambat bakteri *Xoo*

Pengamatan dilakukan setelah 24 - 48 jam masa inkubasi media hasil difusi cakram. Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter zona bening yang muncul di sekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong. Pengukuran bisa dilakukan dari beberapa sudut dan kemudian dirata-ratakan. Data pengamatan disajikan dalam bentuk tabel dan diuji statistik menggunakan RAL faktorial.

b. Pengamatan kadar hambat minimum (KHM)/*minimum inhibitory concentration (MIC)*

Pengamatan dilakukan berdasarkan hasil dari metode dilusi yang terdiri dari serial pengenceran ekstrak kulit buah manggis dalam cawan petri yang masing-masing diinokulasi dengan bakteri *Xoo*. Pertumbuhan bakteri dinyatakan negatif (-) jika terdapat ≤ 10 koloni bakteri dalam cawan petri, dan positif (+) jika terdapat > 10 koloni bakteri dalam cawan petri. Bila koloni tumbuh menyatu dihitung 1 (satu). Pengenceran konsentrasi ekstrak terendah dimana koloni yang tumbuh ≤ 10 kemudian ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimum (KHM)/*Minimum Inhibitory Concentration (MIC)* (Rahayu, 2013).