

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan waktu penelitian

Penelitian ini telah dilaksanakan di Laboratorium Dasar Fakultas Pertanian Universitas Siliwangi Tasikmalaya pada bulan Juli sampai Agustus 2019.

3.2. Alat dan bahan

Alat-alat yang digunakan adalah: gelas ukur, tabung reaksi, *warter bath*, beaker gelas, erlenmeyer, jarum ose, drigalski, sedotan, boks plastik, kain kasa, alumunium foil, cawan petri, spatula, pinset, mikropipet, timbangan elektrik, bunsen, kompor gas, blender, *laminar air flow*, *refrigerator*, termometer, autoklaf, pisau, *paper disc*, corong, kertas saring dan software imageJ.

Bahan-bahan yang digunakan adalah: biji pangi yang diperoleh dari Desa Mekarlaksana, Kabupaten Tasikmalaya, daun padi, media *nutrient agar* (NA), media *nutrient broth* (NB), media *plate count agar* (PCA), *aquadest*, biakan murni *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), NaCl, alkohol 70%, etanol 96% dan antibiotik kloramfenikol.

3.3. Metode penelitian

Penelitian ini menggunakan metode eksperimental dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) terdiri dari 6 perlakuan yaitu:

1. A (ekstrak biji dengan konsentrasi 1%)
2. B (ekstrak biji dengan konsentrasi 3%)
3. C (ekstrak biji dengan konsentrasi 5%)
4. D (ekstrak biji dengan konsentrasi 7%)
5. E (ekstrak biji dengan konsentrasi 9%)
6. F (kloramfenikol dengan konsentrasi 25 μ g/50 μ L sebagai kontrol positif)

Kemudian 6 perlakuan tersebut diulang sebanyak 4 kali ulangan, sehingga menghasilkan 24 unit percobaan. Berikut ini ialah tabel analisis ragam dan kaidah pengambilan keputusan.

Tabel 2. Tabel analisis sidik ragam (ANOVA)

Sumber ragam	db	JK	KT	F hit.	$\frac{F \text{ tab.}}{5\%}$
Perlakuan	5	$\Sigma T^2/r - FK$	JK_P/db_P	KT_P/KT_G	2,77
Galat	18	$JK_{total} - JK_P$	JK_G/db_G		
Total	23	$\Sigma X^2 - FK$			

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

Bila nilai F_{hitung} menunjukkan perbedaan yang nyata, maka dilakukan uji lanjut menggunakan uji jarak berganda Duncan pada taraf nyata 5 % dengan rumus sebagai berikut:

$$LSR(y, dBg, p) = S_x \times SSR(y, dBg, p).$$

LSR = Least Significant Range

SSR = Student zed Significant Range

dBg = derajat bebas galat

y = taraf nyata

p = jarak

S_x = Simpangan baku rata-rata perlakuan

Nilai S_x dapat dicari dengan rumus sebagai berikut :

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

Keterangan : KT Galat = kuadrat tengah galat; r = jumlah ulangan. (sumber: Gomez dan Gomez, 2010)

3.4. Pelaksanaan penelitian

3.4.1. Sterilisasi alat

Sterilisasi alat dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a. Seluruh peralatan dicuci dengan menggunakan sabun cuci, dibilas, kemudian dikeringkan
- b. Alat-alat yang sudah kering dibungkus dengan kertas koran/aluminium foil.
- c. 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)
- d. Alat-alat yang tidak tahan dengan suhu panas disterilisasi dengan menggunakan alkohol.

3.4.2. Persiapan sampel

Daging biji pangi yang digunakan dalam penelitian ini adalah biji pangi yang sudah matang. Untuk mendapatkan sampel biji pangi maka dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- a. Buah pangi yang telah matang diambil bijinya, kemudian dibersihkan dari daging buah yang masih menempel lalu dicuci bersih .
- b. Setelah itu, biji direbus selama 15 menit dengan suhu 80°C dengan tujuan agar mempermudah daging biji dikeluarkan.
- c. Daging biji dikeluarkan dengan cara memecahkan cangkang biji pangi dan selanjutnya ditampung pada wadah plastik.
- d. Daging biji dicuci bersih kemudian diletakkan pada wadah untuk diredam selama 24 jam dengan sesekali diganti airnya.
- e. Kemudian irisan daging biji pangi ini dikeringkan di dalam oven dengan suhu 50 °C selama 5 hari.
- f. Setelah kering, daging biji pangi diserbukkan dengan menggunakan *grinder* atau blender.
- g. Setelah itu disimpan pada wadah tertutup sebelum diekstraksi.

3.4.3. Pembuatan ekstrak biji pangi

Ekstrak daging biji pangi diperoleh dengan cara sebagai berikut:

- a. Ekstrak biji pangi dibuat dengan cara maserasi. Sebanyak 100 g serbuk biji pangi dimasukkan kedalam gelas ukur.
- b. Kemudian direndam dengan etanol 500 ml selama 24 jam dengan beberapa kali pengadukan.
- c. Setelah dimaserasi selama 24 jam, kemudian larutan tersebut dipisahkan antara filtrat dan ampasnya menggunakan *sentrifuge*.
- d. Filtratnya kemudian diuapkan pada *warter bath* sehingga diperoleh ekstrak biji pangi.

3.4.4. Pembuatan larutan uji

Penelitian ini menggunakan lima taraf konsentrasi larutan ekstrak daging biji pangi, yaitu 1, 3, 5, 7 dan 9% v/v (v/v = ml/10 ml suspensi). Pembuatan konsentrasi dimulai dengan membuat larutan konsentrasi induk 40% b/v dengan mencampurkan 4 g ekstrak biji pangi dengan 2,5% *tween* 20 dan 10 ml aquadest. Untuk membuat lima taraf konsentrasi larutan ekstrak daging biji pangi tersebut menggunakan rumus sebagai $V_1 \times M_1 = V_2 \times M_2$ dengan V= Volume (ml) M= konsentrasi v/v. Cara pembuatan lima tara konsentrasi dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 4. Formulasi konsentrasi larutan ekstrak uji

Konsentrasi larutan ekstrak biji pangi (%)	Volume ekstrak biji pangi (ml)	Volume pengencer (ml)	Volume Larutan Uji Total (ml)
1	0,25	9,75	10
3	0,75	9,25	10
5	1,25	8,75	10
7	1,75	8,25	10
9	2,25	7,75	10

Pembuatan larutan uji kontrol positif

- a. Kontrol positif dibuat dari sediaan obat kapsul kloramfenikol 250 mg.
- b. Satu kapsul kloramfenikol dibuka cangkang kapsulnya kemudian ditimbang serbuk dalam kapsul tersebut sebanyak 25 μ g.
- c. Kemudian serbuk dilarutkan dalam etanol 5 ml untuk memperoleh larutan stok kloramfenikol 25 μ g/50 μ L (Defny, S.W *dkk*, 2014)

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

Media *Nutrient Agar* (NA) dipakai untuk media agar miring dan media uji efektifitas antibakteri.

Media agar miring dibuat dengan cara:

- a. Nutrient Agar (NA) sebanyak 0,8 g dilarutkan dalam 40 ml akuades (20g/1000 ml) menggunakan erlenmeyer.
- b. Setelah itu dihomogenkan dengan stirer di atas penangas air sampai mendidih.
- c. Sebanyak 5 ml dituangkan masing-masing pada 4 tabung reaksi steril dan ditutup dengan aluminium foil.
- d. Kemudian media tersebut disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit, kemudian dibiarkan pada suhu ruangan selama \pm 30 menit sampai media memadat pada kemiringan. Media Agar miring digunakan untuk inokulasi bakteri (Lay, 1994 dalam Mpilla dkk, 2012).

Media uji efektifitas antibakteri dibuat dengan cara:

- a. *Nutrient Agar* ditimbang sebanyak 20 g dan dilarutkan dalam *aquadest* hingga 1 L.
- b. Larutan tersebut kemudian dipanaskan di atas panci menggunakan kompor sambil diaduk hingga homogen.
- c. Kemudian media NA disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C.
- d.
- e. Media NA yang telah steril dituang ke dalam cawan petri masing-masing \pm 10 ml dan dibiarkan hingga memadat (Rustanti, 2007 dalam Pratiwi, 2015).

Media NB (*Nutrient Broth*) dipakai untuk media perbanyakan bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Media ini dibuat dengan cara:

- a. Menimbang *Nutrient Broth* sebanyak 8 g
- b. Kemudian ditambahkan *aquadest* hingga 1 L, lalu dipanaskan di atas panci menggunakan kompor sambil diaduk sampai homogen.

- c. Selanjutnya media NB disterilisasi dengan autoklaf selama 15 menit dengan suhu 121 °C (Pratiwi, 2015).

3.4.6. Peremajaan bakteri *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo).

Pembuatan stok bakteri ini dilakukan untuk memperbanyak, meremajakan dan sebagai suspensi bakteri Xoo, dengan cara:

Inokulasi bakteri pada media agar miring.

- a. Bakteri uji diambil dengan jarum ose steril, lalu ditanamkan pada media agar miring dengan cara menggores.
- b. Selanjutnya diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37°C selama 24 jam

Pembuatan suspensi bakteri:

- a. mengambil 1 ose biakan bakteri Xoo
- b. Lalu diinokulasikan ke dalam media *Nutrient Broth* (NB)
- c. Inokulasi dilakukan secara steril di dalam *laminar air flow*
- d. Kemudian diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruangan 37°C di dalam inkubator.

Jumlah koloni diukur menggunakan metode *Total Plate Count* (TPC).

Metode ini dilakukan dengan cara:

- a. Membuat seri pengenceran bakteri. Suspensi bakteri diencerkan dalam larutan NaCl fisiologis pada 8 faktor pengenceran terdiri dari 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8}
- b. Kemudian suspensi bakteri masing-masing faktor pengenceran sebanyak 100 µL diinokulasikan ke dalam media *Plate Count Agar* (PCA) dalam cawan petri, lalu diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C
- c. Cawan petri yang memenuhi syarat perhitungan ialah yang memiliki koloni sejumlah 30 sampai 300 dengan kerapatan 10^{-6} sampai 10^{-8} cfu/ml (Poeloengan dan Pratiwi, 2010).
- d. Jumlah koloni bakteri per ml (CFU/ml) merupakan hasil perkalian antara jumlah koloni yang tumbuh di dalam media dengan faktor pengenceran.

Rumus perhitungan jumlah mikroba:

Jumlah mikroba (cfu/ml) = jumlah koloni x faktor pengenceran*

$$\text{*Faktor pengenceran} = \frac{1}{\text{tingkat pengenceran}}$$

3.4.7. Pengujian efektivitas antibakteri ekstrak biji pangi secara *in-vitro*

Metode yang digunakan dalam pengujian ini ialah metode difusi cakram (tes Kirby & Bauer) dengan cara:

- a. Suspensi bakteri *Xoo* dengan konsentrasi yang telah memenuhi syarat sebelumnya diambil sebanyak 100 μL diinokulasikan ke dalam cawan petri berisi media NA menggunakan mikro pipet dan kemudian di ratakan menggunakan drigalski hingga merata
- b. Kertas cakram steril yang telah direndam selama 10 detik di dalam ekstrak biji pangi dan kelarutan kloramfenikol masing-masing perlakuan diletakkan di atas permukaan media NA secara aseptik di dalam *laminar air flow*
- c. Lalu media diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37 °C.
- d. Lebar zona bening diukur menggunakan software imageJ, lalu dibandingkan dengan standar antibiotik kloramfenikol konsentrasi 25 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$.

3.4.8. Pengujian efektivitas antibakteri ekstrak biji pangi secara *in-vivo*

Uji *in-vivo* ini mengikuti metode yang dilakukan Annisa (2014) dengan beberapa modifikasi dengan cara sebagai berikut:

- a. Uji ini dilakukan dengan menggunakan 72 helai daun padi dengan panjang 5 cm yang berumur 5 minggu
- b. Setiap perlakuan dan ulangan berisi 3 helai daun padi yang ujung bawahnya di tancapkan pada sedotan yang berisi agar-agar.
- c. Berikutnya mencelupkan daun padi pada ekstrak biji pangi dengan konsentrasi yang berbeda setiap perlakuannya selama 30 detik, kemudian keringkan
- d. Setelahnya daun dicelupkan pada suspensi bakteri dengan kerapatan 10^8 CFU/ml selama 30 detik, kemudian keringkan
- e. Terakhir celupkan kembali daun padi pada ekstrak biji pangi kemudian simpan di boks plastik yang telah dialasi tisu lembab, kemudian inkubasi selama 7 hari.

3.5. Parameter pengamatan

3.5.1. Pengamatan penunjang

a. Hasil ekstraksi biji pangi

Pengamatan dilakukan terhadap hasil ekstraksi biji pangi dengan pelarut etanol 96%. Parameter pengamatan ini meliputi warna dan berat akhir yang dihasilkan dari proses ekstraksi. Data pengamatan disajikan dalam bentuk uraian deskriptif beserta gambar.

b. Pengamatan peremajaan 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 beserta gambar.

3.5.2. Pengamatan utama

a. Pengamatan zona hambat bakteri *Xoo*

Pengamatan dilakukan setelah 24 jam masa inkubasi media hasil difusi cakram. Pengamatan dilakukan dengan cara mengukur diameter zona bening yang muncul di sekitar kertas cakram dengan menggunakan aplikasi ImageJ. Data pengamatan disajikan dalam bentuk tabel yang diuji dengan uji fisher.

b. Pengamatan luas gejala serangan *Xoo*

Pengamatan dilakukan setelah 7 hari masa inkubasi hasil inokulasi patogen pada daun padi. Pengamatan dilakukan dengan mengukur luas gejala serangan hawar daun yang timbul akibat patogen. Data pengamatan disajikan dalam bentuk tabel yang diuji dengan uji fisher.