

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya perairan merupakan usaha yang paling menjanjikan dan potensial untuk dikembangkan di kalangan masyarakat Indonesia, dilihat dari potensi alam Indonesia yang merupakan Negara kepulauan terbesar di dunia dengan jumlah pulau kurang lebih 17.000-an pulau besar dan kecil dan memiliki panjang pantai terpanjang kedua di dunia (Kordi,2004).

Saat ini masyarakat Indonesia sudah mulai bergerak di bidang budidaya perikanan baik budidaya perikanan tawar, payau, dan laut. Seiring dengan meningkatnya usaha dalam budidaya perikanan ini, maka semakin besar juga tantangan yang akan dihadapi oleh para pelaku usaha ini, misalnya budidaya secara intensif, Kegiatan budidaya secara intensif dengan padat tebar tinggi diharapkan dapat meningkatkan hasil panen. Namun, ternyata penerapan budidaya secara intensif dapat memicu timbulnya permasalahan penyakit (Graaf dan Janssen, 1996). Timbulnya serangan penyakit merupakan hasil interaksi yang tidak seimbang antara lingkungan, kondisi inang (ikan) dan pathogen (penyakit). Interaksi yang tidak seimbang ini menyebabkan stres pada ikan, sehingga mekanisme pertahanan tubuh menjadi lemah dan akhirnya mudah diserang penyakit (Prajitno, 2005).

Menurut Irianto (2005), manajemen pengelolaan yang buruk seringkali menjadi faktor utama munculnya wabah penyakit. Penanganan yang kasar atau kurang hati-hati dapat menyebabkan rusaknya kulit atau lapisan mukus yang akan mempermudah invasi agensia patogenik. Sebagian besar bakteri patogen pada ikan memiliki sel berbentuk batang pendek dan bersifat gram negatif. Penyakit yang ditimbulkannya menunjukkan tanda-tanda tipikal seperti septicemia dan borok, salah satunya adalah *Vibrio alginoliticus*.

Sementara ini pengobatan terhadap hama dan penyakit ikan masih bergantung pada penggunaan antibiotik dan desinfektan. Secara keseluruhan, penggunaan bahan-bahan kimia banyak menimbulkan dampak negatif seperti resistensi bakteri terhadap bahan kimia, akumulasi residu bagi komoditas perikanan dan juga pencemaran lingkungan (Iqbal, *et al.*, 2012). Sehingga perlu dicari alternatif lain yang aman dan ramah lingkungan, dengan memanfaatkan produk alam.

Daun jati (*Tectona grandis*) yang sering dianggap sebagai sampah, ternyata memiliki kandungan bahan aktif yang berperan dalam aktivitas antimikroba. Dalam berbagai literatur, disebutkan bahwa pada tanaman jati terkandung berbagai senyawa kimia aktif antara lain tanin, musilago, kafein, β sitosterol, friedelin, *kaueronic acid*, flavonoid, saponin, antioksidan proanthocyanidin, dan lain sebagainya (Utomo 2008). Flavonoid yang terkandung pada daun jati adalah senyawa fenol alam yang terdapat dalam hampir semua tumbuhan. Sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, anti radang, anti alergi, dan anti kanker. Efek antioksidan senyawa ini disebabkan oleh penangkapan radikal bebas melalui donor atom hidrogen dari gugus hidroksil flavonoid. Berdasarkan informasi diatas, maka kandungan senyawa bioaktif pada daun jati dapat dimanfaatkan sebagai antibakteri pada bakteri *Vibrio alginolyticus*.

1.2 Rumusan Masalah

Faktor yang mempengaruhi keberhasilan suatu usaha budidaya perikanan adalah infeksi dari penyakit, salah satu bakteri patogen yang sering menyerang ikan budidaya adalah bakteri *Vibrio alginolyticus*. Bakteri *Vibrio alginolyticus* muncul di perairan payau. Penggunaan antibiotik pun saat ini tidak diperkenankan dalam kegiatan budidaya, salah satunya dalam pencegahan

penyakit bakterial. Penelitian yang ada saat ini dikhususkan dalam mencari bahan aktif yang dapat digunakan sebagai alternatif antibakteri yang terkandung pada bahan-bahan alami seperti tanaman, daun-daunan, dan buah-buahan. Pemanfaatan daun jati (*Tectona grandis*) yang dianggap sebagai sampah mempunyai kandungan flavonoid yang digunakan sebagai antibakteri. Berkaitan dengan hal tersebut, maka didapatkan rumusan masalah pada penelitian ini adalah:

- a. Apakah pemberian ekstrak kasar flavonoid daun jati (*Tectona grandis*) berpengaruh pada daya hambat bakteri *Vibrio alginolyticus*?
- b. Berapa dosis terbaik dalam pemanfaatan ekstrak kasar flavonoid daun jati (*Tectona grandis*) sebagai antibakteri *Vibrio alginolyticus*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui peranan ekstrak kasar daun jati (*Tectona grandis*) dalam pertumbuhan bakteri *Vibrio alginolyticus* dan untuk mengetahui dosis terbaik dalam pemberian ekstrak kasar flavonoid daun jati (*Tectona grandis*) sebagai antibakteri.

1.4 Hipotesa

H_0 : Diduga penggunaan ekstrak kasar flavonoid daun jati (*Tectona grandis*) sebagai antibakteri tidak berpengaruh dalam daya hambat bakteri *Vibrio alginolyticus*.

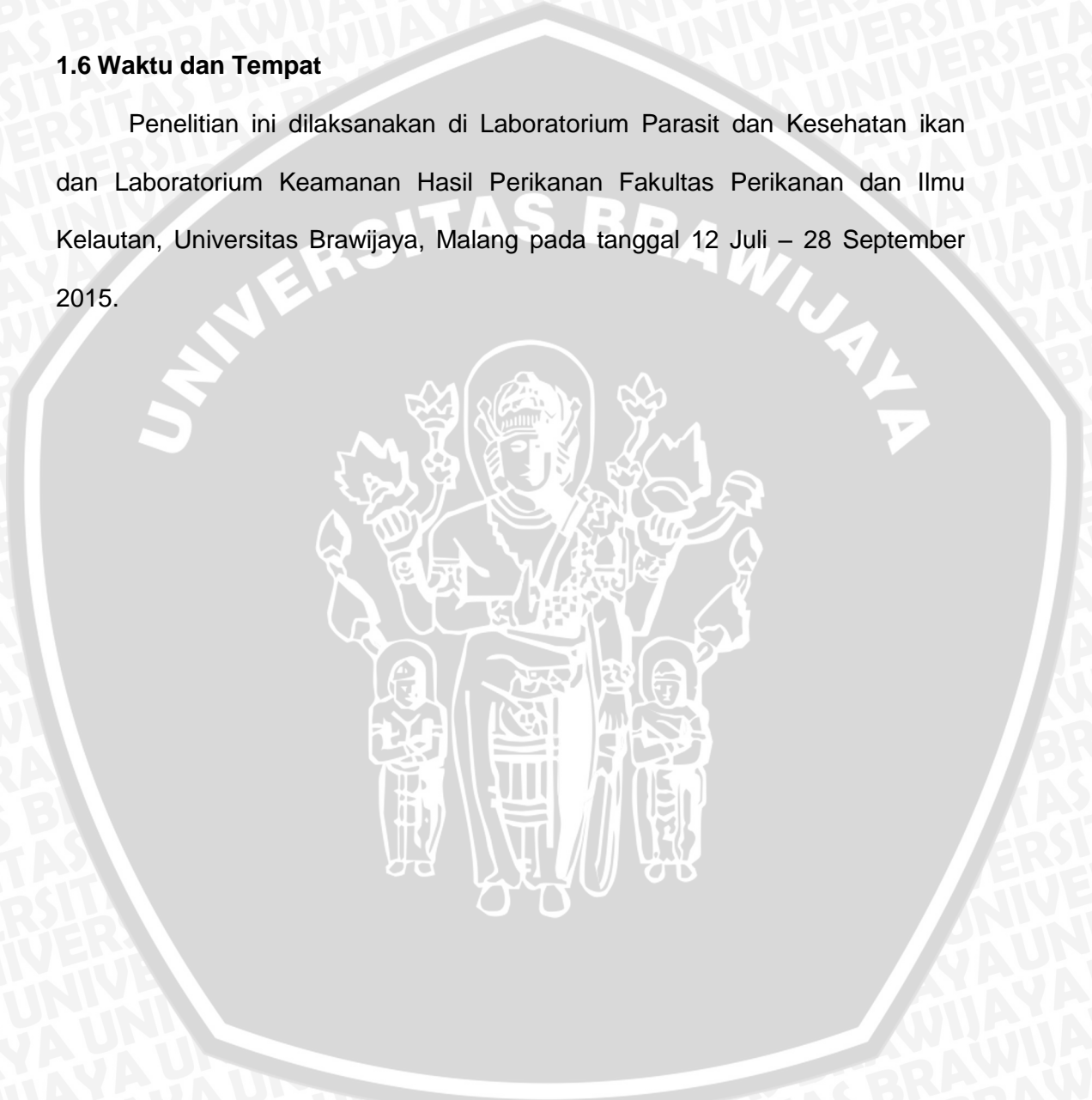
H_1 : Diduga penggunaan ekstrak kasar flavonoid daun jati (*Tectona grandis*) sebagai antibakteri berpengaruh dalam daya hambat bakteri *Vibrio alginolyticus*.

1.5 Kegunaan

Dari hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pemanfaatan ekstrak kasar flavonoid daun jati (*Tectona grandis*) sebagai antibakteri pada bakteri *Vibrio alginolyticus* dan mudah diaplikasikan.

1.6 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Kesehatan ikan dan Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada tanggal 12 Juli – 28 September 2015.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Pohon Jati (*Tectona grandis*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Mintarno (2008), secara taksonomi pohon jati diklasifikasikan sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Angiospermae
Sub-kelas	: Dicotilodeneae
Ordo	: Verbenales
Famili	: Verbenaceae
Genus	: <i>Tectona</i>
Spesies	: <i>Tectona grandis</i> .

Secara morfologis, tanaman jati memiliki tinggi yang dapat mencapai sekitar 30-45 m. mempunyai batang yang bebas cabang bila dilakukan pemangkasan. Pohon jati yang baik, diameter pohonnya dapat mencapai 220 cm. kulit kayu jati berwarna kecoklatan atau abu-abu dan sifatnya mudah terkelupas. Pangkal batang berakar papan dan dapat bercabang. Daun jati berbentuk *opposite* (berbentuk jantung membulat dengan ujung meruncing), berukuran panjang 20-50 cm dan lebar 15-40 cm, permukaan daunnya berbulu. Daun muda pohon jati berwarna hijau kecoklatan, sedangkan yang tua berwarna hijau tua keabu-abuan (Siregar, 2005).

Tini dan Amri (2002) menyatakan bahwa jati merupakan jenis tanaman yang tidak selalu hijau atau biasa disebut *deciduous*, yakni ada saatnya mengalami gugur daun. Terjadinya proses gugur daun ini tidak sama antara jati yang ada di Indonesia dan jati yang ada di negara lain. Hal ini sangat tergantung dari kondisi iklim, musim, variasi hujan dan panas, serta komposisi tanah yang

berbeda akibat perbedaan geologis dan geografis. Sebagai contoh, gugur daun atau daun lepas ini di Thailand terjadi mulai Nopember - Januari. Selama musim tersebut, jati tidak akan berdaun. Daun baru akan mulai tampak pada bulan April sampai Juni dan biasanya sangat tergantung dari keadaan setempat.

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Tumbuhan Jati berasal dari Hindia Barat (kecuali Bahamas) dari Cuba sampai Trinidad dan Tobago serta dikembangkan di Hindia Belanda Barat. Serta dari Mexico hingga Ecuador, Peru, Argentina Utara, Paraguay, dan Brazil. Di Indonesia tanaman Jati tumbuh secara liar di daerah tertentu seperti pulau Jawa dengan penyebaran tumbuh pada daerah daratan rendah hingga ketinggian 800 mdpl (Jaka, 2005).

Penyebaran pohon jati di Indonesia terdapat di beberapa daerah yakni pulau Jawa, pulau Muna, Maluku (Wetar) dan Nusa Tenggara sedangkan di luar Indonesia terdapat di India, Thailand dan Vietnam. Pertumbuhan pohon jati sangat baik pada tanah sarang yang mengandung kapur. Pohon jati tumbuh pada daerah dengan musim kering nyata. Umumnya pohon jati mempunyai pola pertumbuhan yang mengelompok. Pada daerah dengan tipe curah hujan S-F Schmidt and Ferguson dengan curah hujan rata-rata 1200 sampai dengan 2000 mm per tahun dan umumnya tumbuh pada dataran rendah yakni pada ketinggian 0 – 700 mdpl (Novendra, 2008).

Menurut Lemmens dan Soerienegara (2002), jati tumbuh paling baik dalam suatu iklim tropika lembab, tetapi pohon ini memerlukan satu musim kemarau yang jelas. Hutan jati umumnya terletak pada daerah berbukit-bukit atau bergelombang, Tanah yang paling cocok adalah tanah aluvial-koluvial subur berdrainase baik dan dalam, serta tanah tersebut mempunyai pH sekitar 6,5 – 8,0 dan kandungan Ca dan P yang relatif tinggi.

2.1.3 Manfaat dan Kandungan Daun Jati

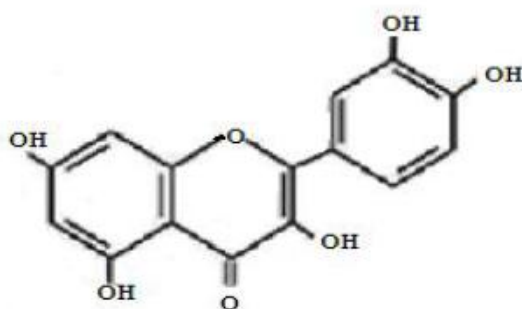
Menurut Puspitarus *et al.* (2013), daun jati untuk sekarang ini masih jarang dimanfaatkan, masih banyak yang menganggapnya sebagai sampah, padahal daun jati ini dapat dimanfaatkan sebagai zat pewarna dan dapat pula digunakan sebagai film kaca non permanen untuk makanan.

Menurut Lamid *et al.* (2013), daun jati dapat dimanfaatkan sebagai pakan ternak. Daun jati mengandung tannin, flavonoid. Kandungan tannin yang tidak berlebihan dapat berdampak positif yaitu sebagai senyawa untuk menghindari bloat pada ternak dan dapat membantu usus dalam memproses pencernaan dan penyerapan protein dengan cara membuat ikatan tannin-protein yang dapat mencegah proses degradasi protein pada rumen.

Seluruh bagian tanaman jati mengandung senyawa aktif seperti tanin dan mucilago. Kulit batang mengandung 10% zat lendir, 9,3% damar-damaran, 2,7% tanin, beberapa zat pahit, glukosa dan asam lemak. Kandungan utama daun jati (*Tectona grandis*) adalah flavonoid dan musilago. Flavonoid bersifat sebagai astringen. Musilago bersifat sebagai pelicin atau pelumas (Jamaluddin, 2008).

2.1.4 Flavonoid

Menurut Neldawati *et al.* (2013), Flavonoid adalah senyawa fenol alam yang terdapat dalam hampir semua tumbuhan. Sejumlah tanaman obat yang mengandung flavonoid telah dilaporkan memiliki aktivitas antioksidan, antibakteri, antivirus, antiradang, antialergi, dan antikanker. Efek antioksidan senyawa ini disebabkan oleh penangkapan radikal bebas melalui donor atom hidrogen dari gugus hidroksil flavonoid. Beberapa penyakit seperti arterosklerosis, kanker, diabetes, parkinson, alzheimer, dan penurunan kekebalan tubuh telah diketahui dipengaruhi oleh radikal bebas dalam tubuh manusia. Flavonoid menjadi perhatian karena peranannya bersifat obat dalam pencegahan kanker dan penyakit kardiovaskular.



Gambar 1. Struktur Umum Flavonoid
(Neldawati, *et al.*, 2013)

Dari gambar diatas dapat dijelaskan bahwa struktur flafonoid terdiri dari ikatan 15 atom C dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh 3 karbon.

Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenolik di samping fenol sederhana, fenilpropanoid, dan kuinon fenolik (Harborne 1996). Sebanyak 2% dari seluruh karbon yang difotosintesis oleh tanaman diubah menjadi flavonoid atau senyawa yang berhubungan erat. Dalam tumbuhan, aglikon flavonoid terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Semuanya mengandung 15 atom C dalam inti dasarnya yang tersusun dalam konfigurasi C6-C3-C6, yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh 3 karbon yang dapat atau tidak dapat membentuk cincin ketiga (Umar,2008).

2.1.5 Ekstraksi

Ekstraksi adalah pemisahan suatu zat dari campurannya dengan pembagian sebuah zat terlarut antara dua pelarut yang tidak dapat tercampur untuk mengambil zat terlarut tersebut dari satu pelarut ke pelarut yang lain. Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Sudjadi, 1986).

Proses ekstraksi terdiri dari penghancuran bahan, penimbangan, perendaman dengan pelarut, penyaringan, dan tahap pemisahan. Perendaman yang dilakukan dengan cara maserasi. Maserasi merupakan cara penyarian sederhana yang dilakukan dengan cara merendam serbuk simplisia (bahan alami) dalam cairan penyari selama beberapa hari pada temperatur kamar dengan atau tanpa adukan dan terlindung dari cahaya. Metode maserasi digunakan untuk menyaring simplisia yang mengandung komponen kimia yang mudah larut dalam cairan penyaring (Suryandari, 1981).

2.2 Bakteri *Vibrio alginoliticus*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *Vibrio alginoliticus* menurut Fahri (2009), adalah sebagai berikut:



Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Order	: Vibrionales
Famili	: Vibrionaceae
Genus	: Vibrio
Spesies	: <i>Vibrio alginoliticus</i>

Bakteri vibrio adalah bakteri gram negatif yang berbentuk batang bengkok, ukuran panjang antara 2-3 μm , fakulatif anaerobik, memfermentasikan glukosa tanpa menghasilkan gas dan mempunyai flagel polar. Ada dua bakteri yang diketahui menyerang ikan laut yaitu: *Vibrio alginoliticus* dan *Vibrio parahaemolyticus* (Desrina, et al.,2006).

Koloni bakteri *V.alginolyticus* berukuran 0.8-1.2 μm yang bewarna kuning pada media TCBSA. Ciri lain merupakan gram negative, motil, bentuk batang

bengkok, memiliki flagella yang bercabang ke samping dan bergerombol dalam media (Noel, *et al.*, 1984).

2.2.2 Infeksi Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Penyakit pada budidaya ikan air payau dan air laut yang disebabkan bakteri *Vibrio* dinamakan dengan penyakitnya *vibriosis*. Berkembangnya bakteri *Vibrio* di suatu perairan ditandai dengan kondisi perairan yang kurang menguntungkan bagi ikan dengan kandungan nutrisi yang tinggi yang berasal dari penumpukan sisa pakan. Penularan penyakit *vibriosis* ini dapat melalui air atau kontak langsung antar ikan dan menyebar sangat cepat pada ikan-ikan yang dipelihara dengan kepadatan tinggi. *Vibrio* sp. merupakan salah satu bakteri patogen yang tergolong dalam famili *Vibrionaceae* yang tergolong dalam gram negatif (Austin, 1988 *dalam* Rinawati, 2011).

Bakteri patogen utama yang sering menyerang udang maupun ikan terutama ikan kerapu adalah bakteri *Vibrio alginolyticus*. Kasus *vibriosis* pada udang di Indonesia ditemukan pertama sekitar awal 1980. Menurut Johnny, *et al.* (2002), di Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut Gondol, Bali, kasus penyakit borok pada ikan kerapu dapat menyebabkan kematian masal ikan dan bakteri penyebab infeksi ini adalah *V. alginolyticus*.

2.3 Uji Daya Hambat Antibakteri *In - Vitro*

Menurut Tortoa (2001), pengujian aktivitas bahan antimikroba secara *in-vitro* dapat dilakukan dengan dua cara yaitu: metode dilusi dan metode difusi agar. Metode dilusi biasa digunakan untuk menentukan KHM (kadar hambat minimum) dan KMM (kadar mematikan minimum) dari bahan antimikroba. Prinsip dari metode dilusi adalah menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi medium cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Selanjutnya masing masing tabung diisi dengan bahan antimikroba yang telah diencerkan secara

serial, kemudian seri tabung diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan konsentrasi terendah bahan antimikroba pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan bakteri adalah merupakan konsentrasi hambat minimum). Biakan dari semua tabung yang jernih ditumbuhkan pada medium agar padat, diinkubasi selama 24 jam, dan diamati ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan pada medium padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri adalah merupakan konsentrasi bunuh minimum bahan antimikroba terhadap bakteri uji.

Metode difusi agar dilakukan dengan cara menempatkan kertas filter yang sudah mengandung bahan antimikroba tertentu pada medium lempeng padat yang telah dicampur dengan bakteri yang akan diuji. Medium ini kemudian diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18-24 jam, selanjutnya diamati adanya area (zona) jernih disekitar kertas filter. Daerah jernih yang tampak disekeliling kertas filter menunjukkan tidak adanya pertumbuhan mikroba bakteri yang sensitif terhadap bahan antimikroba akan ditandai dengan adanya daerah hambatan sekitar filter, sedangkan bakteri yang resisten terlihat tetap tumbuh pada tepi kertas cakram (Mulyadi, *et al.*,2013).

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat-alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1.

Di bawah ini adalah tabel alat-alat yang digunakan, sedangkan gambarnya dapat dilihat pada Lampiran 1.

Alat	Fungsi
Gunting	Sebagai alat untuk memotong daun jati sebelum dijemur
Toples 5 liter	Sebagai tempat penampung saat maserasi dengan menggunakan etanol 70%
Pengaduk bambu	Sebagai alat pengaduk saat maserasi daun jati
<i>Autoclave</i>	Sebagai alat untuk sterilisasi alat-alat dan media penelitian
Micropipet	Sebagai alat untuk mengambil larutan dalam skala micrometer saat pembuatan dosis ekstrak
Pipet volume	Sebagai alat untuk mengambil larutan dengan volume
Cawan petri	Sebagai tempat media pembiakan bakteri dan Uji Cakram
Tabung reaksi	Sebagai tempat saat uji MIC dan pengenceran dalam penentuan dosis serta sebagai wadah saat peremajaan bakteri
Tabung <i>Erlemeyer</i>	Sebagai tempat saat sterilisasi media pertumbuhan bakteri dan tempat penampungan ekstrak daun jati.
Jarum osse	Sebagai alat untuk mengambil bakteri dan mengkultur pada media
<i>Bunsen</i>	Sebagai alat untuk pengkondisian <i>aseptis</i> saat penelitian
Timbangan Digital	Sebagai alat untuk mengukur berat bahan yang digunakan
<i>Inkubator</i>	Sebagai alat untuk menginkubasi dengan suhu 37°C
<i>Water Bath</i>	Sebagai alat untuk memanaskan ekstrak agar didapatkan ekstrak berupa pasta.
<i>Rotary evaporator</i>	Sebagai alat untuk mendapatkan ekstrak daun jati
Botol sprayer	Sebagai wadah alcohol 70%
Spektrofotometer	Sebagai alat untuk mengukur serapan cahaya pada sampel perlakuan saat uji MIC dengan panjang gelombang 370 nm
Gelas ukur 50 ml	Sebagai wadah untuk mengukur volume larutan dan cairan
Corong	Sebagai alat bantu penyaringan ekstrak kasar daun jati
<i>Spatula</i>	Sebagai alat untuk mengaduk saat pembuatan ekstrak dan media pertumbuhan bakteri <i>V. alginolyticus</i>
Botol Sampel	Sebagai tempat sampel terakhir
Rak tabung reaksi	Sebagai tempat tabung reaksi

3.1.2 Bahan-bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2. Di bawah ini adalah tabel bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian adalah sebagai berikut:

Tabel 2. Bahan yang Digunakan dalam Penelitian

Bahan	Fungsi
Daun Jati	Sebagai bahan yang akan diuji kemampuan daya hambatnya
Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	Sebagai bahan uji daya hambat
Kapas	Sebagai bahan untuk menutup lubang <i>Erlenmeyer</i> serta tabung reaksi saat inkubasi
Tissue	Sebagai bahan untuk membersihkan sisa air pada alat setelah dicuci
Ethanol 70%	Sebagai pelarut saat maserasi daun jati
Kertas saring	Sebagai penyaring ekstrak setelah di maserasi
Kertas label	Untuk menandai setiap perlakuan
Alkohol 70%	Sebagai bahan pengkondisian aseptis pada tangan dan meja
<i>Aluminium foil</i>	Sebagai bahan untuk menutup <i>Erlenmeyer</i> dan tabung reaksi saat inkubasi
Aquades	Sebagai larutan untuk pembuatan media
<i>Cotton swap</i>	Sebagai bahan untuk menanam bakteri dengan metode gores pada media TCBSA
TCBSA	Sebagai media agar pertumbuhan bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>
Na-fisiologis	Sebagai larutan isotonis dalam pengenceran bakteri
NB (<i>Nutrien Brooth</i>)	Sebagai media cair
Kertas Koran	Sebagai pembungkus alat-alas saat sterilisasi
Tali Kasur	Sebagai pengikat alat yang terbungkus Koran saat sterilisasi
Spiritus	Sebagai bahan bakar Bunsen
kertas cakram 6 mm	Sebagai bahan untuk mengetahui besarnya daya hambat ekstrak Kasar daun jati pada bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i>
3 Garam (NaCl, MgSO ₄ , KCl)	Sebagai bahan tambahan pembuatan media

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental, metode ini bertujuan mengetahui bagaimana pengaruh suatu perlakuan terhadap objek pengamatan. Dimana metode ini merupakan metode penelitian yang memungkinkan peneliti memanipulasi variabel dan meneliti akibatnya. Menurut Atmodjo (2011), penelitian eksperimen adalah suatu penelitian yang meneliti hubungan sebab akibat dengan memanipulasikan satu (lebih) variabel pada satu atau lebih kelompok eksperimen dan membandingkannya dengan kelompok lain yang tidak mengalami manipulasi.

3.3 Teknik Pengambilan Data

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu menyelidik mengadakan pengamatan terhadap gejala-gejala subyek yang diselidiki baik secara langsung dalam situasi yang sebenarnya maupun dalam situasi buatan atau dengan perantara sebuah alat, baik alat yang sudah ada maupun yang sengaja dibuat untuk keperluan khusus mempermudah proses penelitian (Surachmad, 1998).

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca dan peternakan. Karena media homogen, maka media atau tempat percobaan tidak mempengaruhi pada respon yang diamati (Sastrosupadi, 2000).

Model untuk RAL adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Keterangan:

Y_{ij} = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = nilai rata-rata

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i

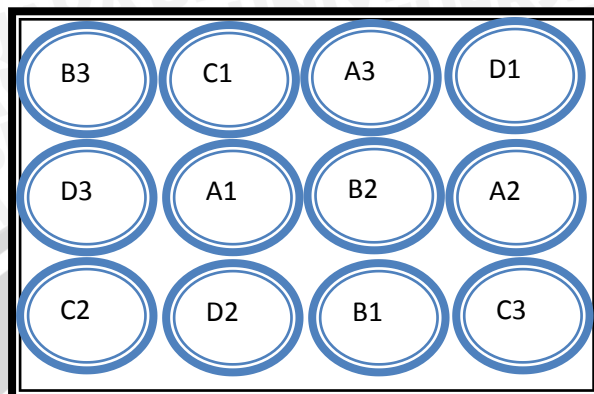
ϵ_{ij} = pengaruh kesalahan (galat) percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Dalam penelitian invitro yang akan dilakukan, perlakuan yang diamati adalah pengaruh perbedaan dosis ekstrak kasar daun jati (*Tectona grandis*) terhadap perkembang bakteri *Vibrio alginolyticus* pada *petridisk* yang diamati setelah 24 jam diinkubasi dengan suhu 32°C. Pengamatan didasarkan pada besarnya daerah hambatan yang diukur dengan satuan milimeter (mm). Tingkatan dosis yang digunakan adalah 4 perlakuan dan 1 kontrol, yaitu dengan menggunakan perbandingan antara ekstrak dengan pelarut, dosis yang digunakan adalah MIC ppt (A), MIC+50 ppt (B), MIC+100 ppt(C), dan MIC+150 ppt (D). Pada dosis 0 ppt digunakan sebagai kontrol tanpa ulangan. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali, sehingga jumlah sampel yang diamati adalah sebanyak 12 sampel. Rancangan perlakuan In vitro dapat dilihat pada Tabel 3. berikut :

Tabel 3. Rancangan Perlakuan *In-Vitro*

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A (MIC ppt)	A ₁	A ₂	A ₃
B (MIC+50 ppt)	B ₁	B ₂	B ₃
C (MIC+100 ppt)	C ₁	C ₂	C ₃
D (MIC+150 ppt)	D ₁	D ₂	D ₃

Untuk denah penelitian yang dipergunakan dalam uji daya hambat pengaruh ekstrak kasar Daun Jati terhadap Bakteri *V. alginolyticus* secara in vitro yang digunakan ditunjukkan pada Gambar 2.



Gambar 2. Rencana Denah Penelitian

Keterangan :
ABCD = Perlakuan dengan Perbedaan Konsentrasi ekstrak kasar daun jati
1, 2, 3 = Pengulangan Perlakuan

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat dan bahan yang akan digunakan dalam penelitian harus disterilisasi terlebih dahulu menggunakan autoklaf agar terhindar dari kontaminasi lingkungan luar yang dapat mempengaruhi hasil dari penelitian. Alat-alat yang disterilisasi antara lain, cawan petri, tabung reaksi, *Erlenmeyer*, gelas kur, spatula dan corong. Sedangkan bahan yang disterilisasi adalah Na-Fisiologis dan media NB. Mekanisme penggunaan autoklaf adalah sebagai berikut:

- Alat-alat yang akan disterilisasi dicuci terlebih dahulu hingga bersih, kemudian dikeringkan dengan tisu, ditutup lubang-lubang alat dengan menggunakan kapas, lalu dibungkus dengan Koran dan diikat menggunakan tali kasur

- Autoklaf dibuka dan diisi aquades hingga perbatasan kemudian dipasang penyaringnya dan dimasukkan alat-alat dan media yang telah di bungkus dengan Koran ke dalam autoklaf
- Penutup autoklaf dipasang dengan baut secara simetri
- Tombol ON ditekan dan ditunggu hingga suhu 121°C dan tekanan mencapai 1 atm, kemudian ditutup klep uap dan ditunggu sampai 15 menit,
- Tombol OFF ditekan untuk mematikan autoklaf
- Klep uap dibuka agar tekanan dalam autoklaf keluar, tunggu hingga tekanan kembali ke angka nol
- Tutup autoklaf dibuka bautnya secara simetri
- Diambil alat-alat dan bahan yang sudah disterilisasi

3.5.2 Sterilisasi Tempat Penelitian

Bukan hanya alat dan bahan yang digunakan untuk penelitian yang harus steril, tetapi tempat dilaksanakannya penelitian ini juga harus dikondisikan steril. Oleh karena itu pada proses perlakuan penelitian, tangan peneliti harus diaseptiskan terlebih dahulu dengan cara penyemprotan alcohol 70%, dan peneliti harus menggunakan sarung tangan karet beserta masker untuk menghindari kontaminasi dari luar yang akan mempengaruhi hasil dari penelitian. Setiap perlakuan juga harus dilakukan didekat api *Bunsen* agar tetap tidak terkontaminasi.

3.5.3 Ekstraksi

Proses Ekstraksi pada daun jati (*Tectona grandis*) meliputi langkah-langkah sebagai berikut:

- Daun jati basah sebanyak 4,6 Kg, dipotong kecil-kecil dan dikeringkan hingga didapatkan berat daun jati sebanyak 600 gr

- Daun jati kering sebanyak 600 gr dimasukkan ke dalam toples kapasitas 5 Liter dan dimaserasi menggunakan ethanol 70% dengan perbandingan 1:5 (600 gram daun jati kering ke dalam 1,8 liter ethanol 70%) selama 24 jam dan dilakukan pengadukan pada 3 jam sekali
- Dilakukan penyaringan dengan menggunakan corong dan kertas saring dan didapatkan ekstrak cair sebanyak 1,4 Liter
- Larutan tersebut kemudian diuapkan dengan menggunakan *Vacum Rotary Evaporator* hingga didapatkan ekstrak semi cair sebanyak 126 gr
- Karena ekstrak masih terlalu cair maka dilanjutkan dengan penguapan menggunakan *Water Bath* selama 4 jam dengan suhu 40°C sehingga didapatkan ekstrak kental sebanyak 46 gr
- Kemudian dilakukan pembuatan dosis ekstrak daun jati. Perhitungan pembuatan ekstrak ada pada Lampiran 2.

3.5.4 Pembuatan Media Hidup Bakteri *Vibrio alginolyticus*

A. TCBS (*Thiosulfat Citrat Bile-salt Sucrose Agar*) Miring

Media TCBSA miring digunakan untuk peremajaan bakteri *Vibrio alginolyticus*. Langkah-langkah pembuatannya adalah sebagai berikut:

- Media TCBSA ditimbang sebanyak 1,32 gr dengan menggunakan timbangan digital dan dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer* yang berisi aquades sebanyak 15 ml, dan dicampurkan dengan 0,28 gr NaCl, 0,1 gr MgSO₄ serta 0,01 gr KCl.
- Kemudian *Erlenmeyer* ditutup dengan menggunakan kapas dan alumunium foil lalu dihomogenkan dengan cara dipanaskan menggunakan hotplat dibantu dengan *Magnetic stirrer* selama 15 menit.
- Media dipindahkan ke dalam tabung reaksi hingga dingin agar bakteri tidak mati saat diinokulasi dan diletakkan miring.

- Setelah media menjadi agar lalu media digunakan untuk inokulasi bakteri *Vibrio alginolyticus* dengan cara jarum ose dipanaskan pada api Bunsen sampai berpijar lalu ditunggu hingga dingin kemudian digoreskan pada biakan murni bakteri lalu digoreskan pada media TCBSA miring.
- Media TCBSA yang telah diinokulasi bakteri kemudian diinkubasi dalam incubator selama 24 jam.

B. Media NB (*Nutrien Broth*)

Langkah pembuatan media NB adalah sebagai berikut:

- Ditimbang media NB sebanyak 0,42 gr, kemudian tuang pada *Erlenmeyer* yang telah berisi aquades sebanyak 10 ml dan ditambahkan 0,184 gr NaCl, 0,069 gr MgSO₄, serta 0,007 gr KCl.
- Kemudian *Erlenmeyer* ditutup dengan menggunakan kapas dan dilapisi aluminium foil kemudian di homogenkan dengan hotplat dan *magnetic stirrer* selama 15 menit.
- Kemudian media di sterilisasi basah dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Setelah media dingin kemudian dituang pada tabung reaksi. Proses penuangan dilakukan didekat api Bunsen agar tetap steril dan siap untuk dilakukan inokulasi bakteri *Vibrio alginolyticus* dari media TCBSA miring.

C. Media TCBS (*Thiosulfat Citrat Bile-salt Sucrose Agar*) untuk Uji Cakram

Media TCBSA digunakan untuk bakteri *Vibrio alginolyticus* pada Uji Cakram. Langkah-langkah pembuatannya adalah sebagai berikut:

- Media TCBSA ditimbang sebanyak 26,4 gr dengan menggunakan timbangan digital dan dimasukkan ke dalam *Erlenmeyer* yang berisi aquades sebanyak 300 ml, dan dicampurkan dengan 5,52 gr NaCl, 2,08 gr MgSO₄ serta 0,22 gr KCl.

- Kemudian *Erlenmeyer* ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil lalu dihomogenkan dengan cara dipanaskan menggunakan hotplate dibantu dengan *Magnetic stirrer* selama 15 menit.
- Setelah itu media yang setengah dingin kemudian dituang pada cawan petri, masing-masing cawan petri diisi media sebanyak 20 ml lalu ditunggu hingga dingin dan padat.

3.5.5 Pembiakan Bakteri *V. alginolyticus*

Bakteri *V. alginolyticus* diperoleh dari BBPAP Situbondo dengan kepadatan 10^8 sel/ml sebanyak 10 ml. Langkah-langkah yang harus dilakukan dalam pembiakan bakteri *V. alginolyticus* adalah sebagai berikut:

- Jarum Osse dipanaskan pada api Bunsen sampai berpijar lalu ditunggu sampai dingin
- Jarum osse kemudian disentuh pada biakan murni bakteri *V. alginolyticus* pada media agar miring
- Jarum Osse dicelupkan pada media NB dan dibiarkan selama 24 jam dalam incubator dengan suhu 32°C
- Setelah itu untuk mengetahui kepadatan bakteri, hasil pembiakan bakteri tadi dilakukan pengukuran dengan larutan pembanding Mac Farland, jika kepadatan belum sesuai maka harus dilakukan pengenceran bertingkat hingga kepadatan yang dikehendaki yaitu 10^7

3.5.6 Cara Memperoleh Bakteri *V. alginolyticus* dengan Kepadatan 10^7

Untuk mendapatkan bakteri *V. alginolyticus* dengan kepadatan 10^7 dapat diperoleh dengan cara sebagai berikut:

- Kultur bakteri pada media NB dengan kepadatan 10^8 disiapkan dan di vortex
- Na Fisiologis dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml dan ditambahkan bakteri sebanyak 1 ml dengan kepadatan 10^8

- Didapatka bakteri *V. alginolyticus* dengan kepadatan 10^7

3.5.7 Uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) Pendahuluan

Langkah-langkah yang harus dilakukan dalam uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) adalah sebagai berikut:

- 7 tabung reaksi masing-masing diisi dengan 3 ml media NB dan di beri tanda menggunakan kertas label sesuai perlakuan konsentrasi ekstrak yaitu dengan menggunakan skala Log. 0,1 ppt, 1 ppt, 10 ppt, 100 ppt, 1000 ppt, serta kontrol positif dan kontrol negatif
- Ekstrak kasar daun jati (*Tectona grandis*) diberikan pada setiap tabung 1 ml sesuai dosis perlakuan
- Setiap tabung di beri isolate bakteri sebanyak 1 ose
- Media diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 32°C
- Media diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer
- Pengamatan MIC dilakukan dengan pengamatan kualitatif yakni dengan melihat adanya kekeruhan pada media uji yang menandakan bahwa bakteri tersebut tumbuh dan bila media bening berarti menandakan bahwa tidak adanya pertumbuhan bakteri
- Hasil dari Uji MIC Pendahuluan digunakan sebagai dosis minimum pada MIC ke-2

Tabel 4. Hasil nilai Absorbansi dari Uji MIC Pendahuluan

Dosis	Nilai Absorbansi	Kebeningan
0,1 ppt	2,491	Keruh
1 ppt	2,083	Keruh
10 ppt	1,876	Keruh
100 ppt	1,046	Bening
1000 ppt	0,325	Bening
(-)	2,497	Keruh
(+)	0,977	Bening

Dari Tabel diatas didapatkan nilai Uji MIC Pendahuluan adalah 100 ppt karena nilai absorbansinya mendekati control positif, kemudian dilanjutkan Uji MIC Inti.

3.5.8 Uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) Inti

Langkah-langkah yang harus dilakukan dalam uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) adalah sebagai berikut:

- 7 tabung reaksi masing-masing diisi dengan 3 ml media NB dan di beri tanda menggunakan kertas label sesuai perlakuan konsentrasi ekstrak yaitu 200 ppt, 300ppt, 400 ppt, 500ppt, 600ppt serta control positif dan control negative
- Ekstrak kasar daun jati (*Tectona grandis*) diberikan pada setiap tabung 1 ml sesuai dosis perlakuan
- Setiap tabung di beri isolate bakteri sebanyak 1 ose
- Media diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 32°C
- Media diukur nilai absorbansinya dengan menggunakan spektrofotometer
- Pengamatan MIC dilakukan dengan pengamatan kualitatif yakni dengan melihat adanya kekeruhan pada media uji yang menandakan bahwa bakteri tersebut tumbuh dan bila media bening berarti menandakan bahwa tidak adanya pertumbuhan bakteri. Setelah didapatkan nilai MIC maka nilai ini akan digunakan sebagai nilai dosis terkecil pada perlakuan Uji Cakram.

3.5.8 Uji Cakram

Uji cakram merupakan pengujian untuk antibakteri dengan mengukur diameter daerah hambatnya di sekitar kertas cakram yang sudah diberi antibakteri sesuai dengan kosentrasi perlakuan (Pelczar dan Chan, 1986). Kertas cakram diletakkan pada pada cawan petri yang telah ditumbuhi bakteri. Tujuan dari uji cakram adalah untuk mengetahui daya hambat antibakteri terhadap bakteri yang diujikan.

Prosedur pelaksanaan uji cakram adalah menyiapkan media TCBSA pada cawan petri kemudian bakteri *V. alginolyticus* dioleskan secara merata pada media TCBSA dengan *Cotton swap*. Selanjutnya dibuat dosis ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) sesuai dengan kebutuhan. Pertama ditentukan dosis ekstrak stok, selanjutnya dilarutkan dengan larutan DMSO. Dari dosis ekstrak stok tersebut kemudian dibuat dosis perlakuan yaitu MIC ppt, MIC+50 ppt, MIC+100 ppt, dan MIC+150 ppt yang dilarutkan dengan DMSO dengan rumus

$$V1.N1=V2.N2$$

Keterangan:

- V1 : Volume dosis yang dibutuhkan
- N1 : Dosis stok awal
- V2 : Volume dosis yang akan dibuat
- N1 : Dosis ekstrak yang akan dibuat

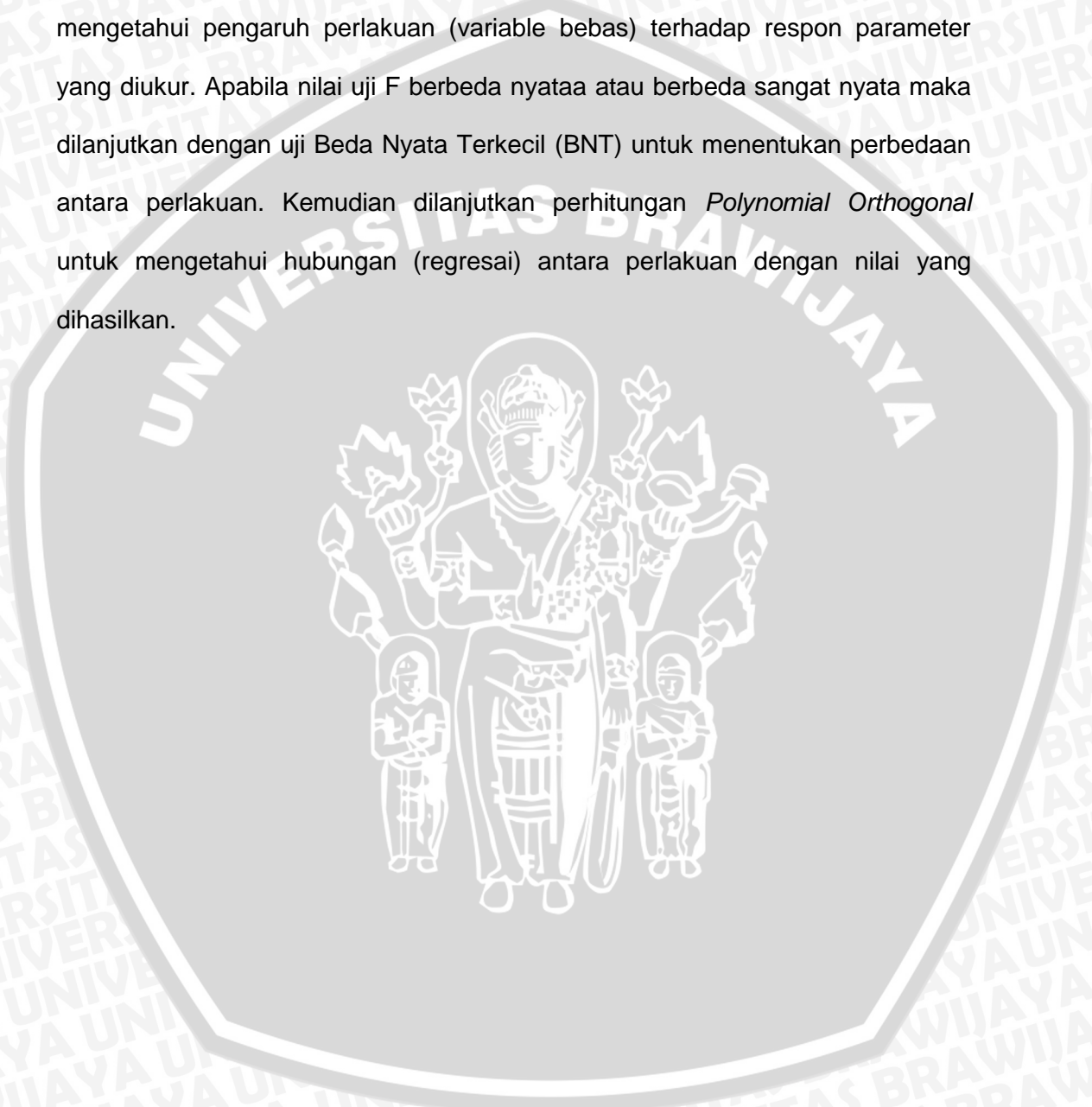
Selanjutnya kertas cakram steril ukuran 6 mm direndam ke dalam ekstrak daun jati pada tiap konsentrasi yang telah ditentukan selama 15 menit. Setelah itu ditiriskan dan diletakan pada media TCBSA dan diberi kertas label pada masing-masing cawan petri sebagai penanda konsentrasi, kemudian diinkubasi pada suhu ruang 32°C selama 24-48 jam. Setelah itu diukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka kosong. Jarak kertas dengan tepi cawan petri tidak boleh kurang dari 15 mm dan saat meletakan kerta cakram tidak boleh bergeser karena akan mengurangi validitas pengukuran.

3.6 Parameter Uji

Parameter uji terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama yaitu diameter daerah hambatan yang diukur dengan menggunakan kertas cakram yang dinyatakan dengan mm. Parameter penunjangnya adalah suhu inkubasi yakni sebesar 32°C.

3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dianalisa secara statistic dengan menggunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variable bebas) terhadap respon parameter yang diukur. Apabila nilai uji F berbeda nyataa atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk menentukan perbedaan antara perlakuan. Kemudian dilanjutkan perhitungan *Polynomial Orthogonal* untuk mengetahui hubungan (regresai) antara perlakuan dengan nilai yang dihasilkan.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi Bakteri *V. alginolyticus*

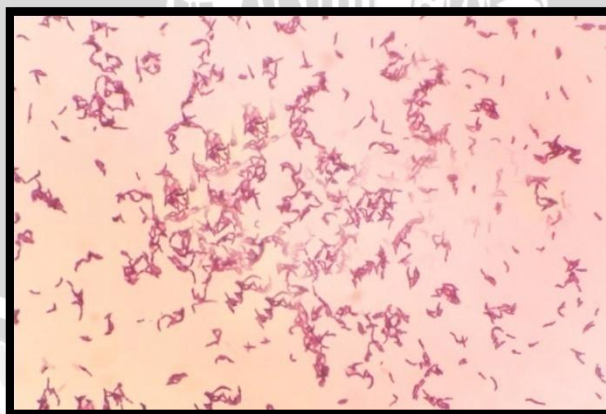
Identifikasi bakteri dilakukan dengan tujuan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah bakteri *V. alginolyticus*. Beberapa cara yang dapat digunakan untuk melakukan uji indentifikasi, diantaranya yaitu pengujian biokimia yang terdiri atas uji oksidase, uji motilitas dan uji O/F (Oksidasi/Fermentatif). Berdasarkan penelitian Luturnas dan Pattirasarany (2010), dapat diketahui bahwa spesies *V. alginolyticus* bersifat fermentatif, mampu menghasilkan enzim oksidase dan katalase, system pernapasannya secara anaerob, indol terdapat cincin merah pada batasan reagen ini menunjukkan bahwa bakteri ini bersifat gram positif. Hasil pengujian gula dapat dilihat bahwa bakteri ini mampu memfermentasikan sebagian media gula diantaranya glukosa, sukrosa dan maltosa.

Selain itu, untuk identifikasi bakteri dapat dilakukan dengan uji pewarnaan gram. Pewarnaan gram digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri serta untuk membedakan antara bakteri gram positif dan bakteri gram negative. Teknik pewarnaan gram menurut Pratita dan Putra (2012), yaitu dengan mengambil 1 ose isolate bakteri dan digoreskan pada preparat steril, kemudian dilakukan fiksasi. Kristal violet sebanyak 1 tetes ditambahkan ke permukaan preparat yang terdapat isolate bakteri tersebut dan didiamkan selama 1 menit. Setelah 1 menit preparat dibilas dengan air sampai zat warna luntur dan dikeringkan diatas Bunsen. Setelah kering, larutan iodin sebanyak satu tetes ditambahkan ke permukaan dan diamkan selama 1 menit selanjutnya dibilas dengan alcohol 96% sampai semua zat warna luntur dan dikeringkan diatas api Bunsen, selanjutnya ditetesi pewarna safranin sebanyak 1 tetes dan didiamkan

selama 45 detik, lalu preparat dibilas dengan air mengalir dan dikeringkan. Preparat diamati menggunakan mikroskop dengan perbesaran 400x.

Hasil yang didapatkan pada pewarnaan gram akan ditentukan dari komposisi dinding sel pada bakteri. Hal ini sesuai dengan pernyataan Fitri dan Yasmin (2011), bakteri gram positif pada pewarnaan gram bersifat ungu karena kompleks zat Kristal violet-iodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat aseton alcohol, sedangkan bakteri gram negative kompleks warna Kristal violetnya luntur saat pemberian larutan pemucat sehingga mengikat pewarna safranin. Perbedaan warna pada bakteri gram positif dan negative ini menandakan bahwa adanya perbedaan struktur dinding sel antara kedua bakteri tersebut. Bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tebal, sedangkan bakteri gram negatif dinding selnya memiliki struktur dengan kandungan lipid yang tinggi.

Berdasarkan hasil pewarnaan gram pada penelitian ini dapat diketahui bahwa bakteri ini berbentuk batang dan menyerap warna merah dari safranin sehingga termasuk dalam golongan bakteri gram negative. Hasil dari pewarnaan bakteri dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *Vibrio alginolyticus*

4.2 Uji MIC

Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) digunakan untuk mengetahui konsentrasi minimum ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*. Uji MIC diterapkan pada beberapa dosis dengan kontrol positif (media NB+isolate bakteri+ekstrak murni daun jati) dan kontrol negatif (media NB+isolate bakteri 1 ose). Dalam uji MIC yang menggunakan parameter kejernihan serta nilai spektrofotometer dengan panjang gelombang 370 nm dari masing-masing perlakuan konsentrasi yang dengan perbandingan dari hasil control positif dan negatif dapat dilihat pada Tabel 4.

Tabel 5. Hasil Uji MIC dengan Spektrofotometer

Perlakuan	Absorbansi	Kejernihan
1. 200 ppt	1,009	Keruh
2. 300 ppt	0,976	Bening
3. 400 ppt	0,906	Bening
4. 500 ppt	0,836	Bening
5. 600 ppt	0,760	Bening
6. Kontrol +	0,977	Bening
7. Kontrol -	2,492	Keruh

Keterangan : Hasil Uji MIC

Nomer 1-5 : media NB+Bakteri+Ekstrak kasar daun jati sesuai dengan dosisnya.

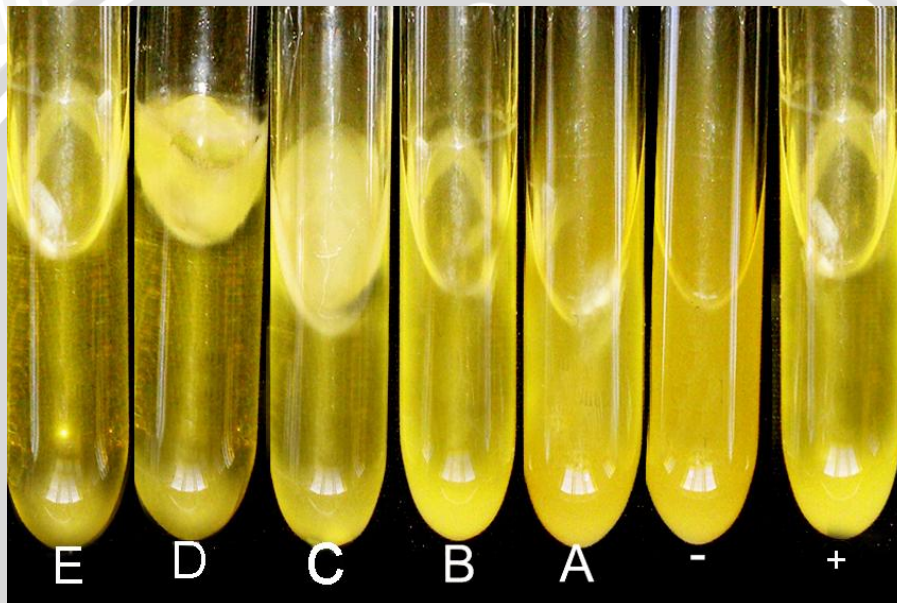
kontrol - : media NB+isolate bakteri (-)

kontrol + : media NB+isolate bakteri+ekstrak murni daun jati (+).

Berdasarkan data tersebut dapat diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka nilai absorbansinya semakin rendah (berbanding terbalik). Hal ini sesuai pernyataan Tristante *et al.* (2014), bahwa dosis yang digunakan berbanding terbalik dengan nilai absorbansi yang dihasilkan, atau semakin tinggi dosis yang digunakan maka nilai absorbansi yang didapatkan semakin rendah. Sebaliknya semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun jati maka hasil perlakuannya semakin bening. Hasil ini didukung oleh pernyataan Benson (2002), dalam Sumayani *et al.*(2008), yang menyatakan bahwa ada hubungan antara jumlah sel bakteri dengan nilai absorban. Dengan demikian

maka dapat ditarik kesimpulan bahwa semakin keruh media maka nilai absorbansi semakin tinggi yang artinya bakteri didalamnya semakin banyak, dan sebaliknya jika media jernih maka nilai absorbansinya rendah atau diartikan bahwa kandungan bakteri didalamnya sedikit.

Berdasarkan Uji MIC pada dosis ekstrak 300 ppt nilai absorbansinya paling mendekati dengan kontrol positif yaitu 0,976 Hasil Uji MIC dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Uji MIC dengan dosis 600 ppt (E), dosis 500 ppt (D), dosis 400 ppt (C), dosis 300 ppt (B), dosis 200 ppt (A), kontrol negatif media NB+isolate bakteri (-), dan kontrol positif media NB+isolate bakteri+ekstrak murni daun jati (+).

4.3 Uji Cakram

Untuk mengetahui ekstrak kasar daun jati (*Tectona grandis*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* maka perlu dilakukan uji difusi kertas cakram. Menurut Kusmyati dan Agustini (2006), metode cakram kertas yaitu dengan meletakkan kertas cakram kertas yaitu dengan meletakkan kertas cakram yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah dinokulasi bakteri. Setelah diinkubasi selama 24 jam pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya zona hambatan (zona bening) yang terbentuk di sekeliling

cakram. Cara menentukan daya hambat adalah mengurangi diameter zona bening yang terbentuk dengan ukuran kertas cakram yang digunakan yaitu 6 mm.

Dosis yang digunakan dalam uji cakram pada penelitian ini didasarkan dari hasil uji MIC yang telah dilakukan yaitu 300 ppt, 350 ppt, 400ppt, dan 450 ppt yang diulang sebanyak 3 kali untuk setiap perlakuan. Berdasarkan hasil penelitian pada setiap dosisi dapat menghasilkan zona hambatan dengan ukuran yang berbeda. Nilai dosis ekstrak kasar daun jati yang digunakan berbanding lurus dengan diameter zona hambatan (zona bening). Semakin tinggi dosis ekstrak kasar daun jati maka semakin besar ukuran zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram, sebaliknya semakin rendah dosis ekstrak kasar daun jati maka semakin kecil zona bening yang terbentuk hal tersebut disebabkan oleh perbedaan jumlah zat aktif yang terkandung pada ekstrak kasar daun jati. Hal ini sesuai dengan pernyataan Yani *et al.* (2005), luas zona hambatan merupakan petunjuk kepekaan mikroorganisme terhadap zat anti bacterial, peningkatan konsentrasi dapat menyebabkan zona hambat semakin besar. Menurut Alfath *et al.* (2013), beberapa faktor yang mempengaruhi zona hambat antara lain kemampuan difusi bahan anti bakteri kedalam media dan interaksinya dengan mikroorganisme yang diuji, kepadatan mikroorganisme yang digunakan, kecepatan tumbuh mikroorganisme serta sensitifitas mikroorganisme terhadap bahan anti bakteri yang diuji. Hasil uji cakram setelah diinkubasi selama 24 jam dapat dilihat dalam Tabel 5.

Tabel 6. Hasil Uji Cakram

Perlakuan (ppm)	Zona Hmbatan			Total (mm)	Rata-rata (mm)
	1	2	3		
A (300ppt)	2,5	3,72	2,1	8,32	2,77
B (350ppt)	4,7	2,9	3,45	11,05	3,68
C (400ppt)	4,72	5,03	3,97	13,72	4,57
D (450ppt)	5,3	6,56	5,9	17,76	5,92

Hasil yang didapatkan dari pengamatan tersebut diklasifikasikan dalam katagori kekuatan anti bakteri yang dilihat dari ukuran daerah hambatan. Menurut Sari dan Sari (2010), daerah hambatan 20 mm atau lebih berarti sangat kuat, daerah hambatan 10-20 mm berarti kuat, 5-10 mm berarti sedang dan daerah hambatan 5 mm atau kurang berarti lemah. Berdasarkan ketentuan tersebut dalam hasil penelitian, perlakuan A, B, C dikatagorikan memiliki daya hambat kecil sedangkan perlakuan D memiliki daya hambat sedang. Perlakuan A (300 ppt) memiliki daya hambat paling kecil yaitu dengan rata-rata diameter zona hambat 2,77 sedangkan perlakuan D (450 ppt) memiliki daya hambat paling besar dengan rata-rata diameter zona bening sebesar 5,92 mm. hasil uji cakram setelah diinkubasi selama 24 jam dapat dilihat pada Lampiran 3.

Selanjutnya dilakukan analisa sidik ragam untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan hasil analisa sidik ragam zona hambatan yang dihasilkan dari beberapa perlakuan dosis ekstrak kasar daun jati dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 7. Analisis Sidik Ragam Zona Hambatan

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	16,19	5,396	9,567**	3,39	5,00
Acak	8	4,514	0,564			
Total	11	20,7				

Perhitungan sidik ragam menunjukkan bahwa dosisi ekstrak kasar daun jati memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap diameter zona hambat bakteri *V. Alginolyticus*. Hal ini disebabkan oleh nilai F hitung sebesar 9,657 lebih besar daripada nilai F tabel 5% yaitu 3,39 dan F tabel 1% yaitu 5,00. Selanjutnya dilakukan perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan seperti dilihat pada Tabel 7.

Tabel 8. Hasil Uji BNT terhadap Pertumbuhan Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	Notasi
		2,77	3,68	4,57	5,92	
A(300 ppt)	2,77	-				a
B(350 ppt)	3,68	0,91**	-			b
C(400 ppt)	4,57	1,8**	0,89*	-		c
D(450 ppt)	5,92	3,15**	2,24**	1,35**	-	d

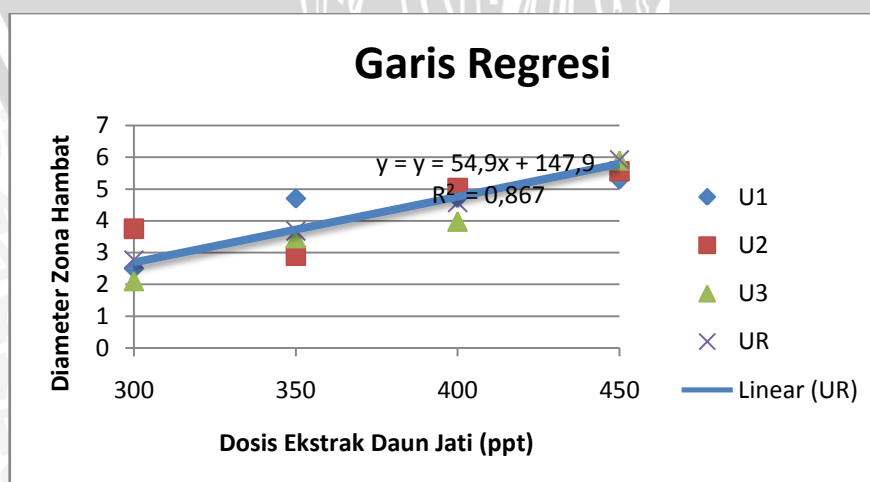
Keterangan : ns (tidak berbeda nyata)

* (berbeda nyata)

** (berbeda sangat nyata)

Berdasarkan tabel tersebut perlakuan A tidak memberikan pengaruh terhadap perlakuan B, C, D sehingga diberi notasi a. perlakuan B berpengaruh terhadap perlakuan A sehingga diberi notasi b. perlakuan C berpengaruh sangat nyata terhadap perlakuan a dan berpengaruh terhadap perlakuan B sehingga diberi notasi c. perlakuan D berpengaruh sangat nyata terhadap perlakuan A, B dan C sehingga diberi notasi b.

Selanjutnya untuk mengetahui hubungan regresi antara perlakuan dengan parameter yang diuji maka dilakukan perhitungan uji Polinomial Orthogonal pada lampiran 3. Kemudian dari hasil penelitian didapatkan grafik regresi yang dihasilkan dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 5. Garis Regresi Hubungan Pengaruh Ekstrak Daun Jati terhadap Diameter Zona Hambatan Pertumbuhan Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Gambar 5 menunjukkan hubungan antara dosis ekstrak kasar daun jati terhadap diameter zona hambat membentuk pola linier dengan persamaan $y = 54,9x + 147,9$ dan koefisien $R^2 = 0,867$. Berdasarkan grafik tersebut diketahui bahwa ukuran diameter zona hambat meningkat, seiring penambahan dosis ekstrak kasar daun jati terhadap tiap perlakuan. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin banyak senyawa aktif yang terkandung sehingga daya hambat juga semakin besar. Hasil perhitungan uji statistik dapat dilihat pada Lampiran 3.

Berdasarkan hasil dari uji MIC dan uji cakram, ekstrak kasar daun jati terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* hal ini disebabkan oleh kandungan senyawa aktif pada ekstrak daun jati diantaranya flavonoit dan tannin. Hal ini sesuai dengan pernyataan Nurwahida (2010), bahwa kandungan dari daun jati diantaranya adalah alkaloid, saponin, flavonoid, steroid, tannin dan kuninon.

Mekanisme anti bakteri senyawa flavonoid ini adalah dengan pembentukan senyawa kompleks protein ekstraseluler yang dapat mengganggu pertumbuhan dari sel bakteri. Flavonoid juga merupakan senyawa fenol yang dapat bersifat koagulasi terhadap protein (Dwidjoseputro, 1994).

Secara umum sifat anti bakteri dapat dibagi menjadi dua yaitu bakteriostatik dan bakterisidal. Bakteriostatik merupakan anti bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan bakterisidal merupakan anti bakteri yang dapat membunuh bakteri. Untuk mengetahui sifat anti bakteri dari ekstrak daun jati maka dilanjutkan pengamatan zona bening setelah 24 jam. Dari hasil pengamatan setelah 24 jam diketahui bahwa zona hambatan pada tiap perlakuan mengecil sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun jati bersifat bakteriostatik terhadap *V. alginolyticus*.

5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian tentang “Pengaruh Ekstrak Kasar Daun Jati (*Tectona grandis*) Sebagai Antibakteri Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Vibrio alginolyticus* secara *In-Vitro*” diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut :

- Ekstrak kasar daun jati terbukti dapat berperan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* dalam penelian *In-vitro*.
- Hasil penelitian didapat konsentrasi yang paling baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah konsentrasi 450 ppt.
- Dosis optimum dalam menghambat bakteri *V. alginoliticus* belum diperoleh, oleh karena itu perlu diadakan penelitian lanjutan.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian ini disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut konsentrasi diatas 450 ppt untuk mengetahui konsentrasi optimum ekstrak daun jati terhadap daya hambat bakteri *Vibrio alginolyticus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Alfath, C. R.V. Yuliana dan Sunnanti. 2013. Antibacterial Effect of *Granati fructus* cortex extract on *Streptococcus mutan* in vitro. *Jurnal Of Dentistry Indonesia*.
- Atmodjo, J.T. 2011. Jenis Metode Penelitian. Universitas Mercubuana. Jakarta. 19 Hlm.
- Desrina, A. Taslihan, Ambariyanto, S. Suryaningrum. 2006. Uji Keganasan Bakteri *Vibrio* Pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*)
- Dwidjoseputro D. 1994. Dasar-dasar Mikrobiologi. Djambatan, Jakarta. Robinson, T., 1991. Kandungan Organik Tumbuhan Tingkat Tinggi. ITB. Bandung: 132-6.
- Fitri dan Yasmin. 2005. Akuakultur, Tumpuan Harapan Masa Depan Bangsa. Masyarakat Perikanan Nusantara. Taman Mini Indonesia Indah. Jakarta. 415 Ha
- Irianto, K. 2005. Mikrobiologi. Menguak Dunia Mikroorganisme. CV.Yrama Widya. Bandung.
- Iqbal., Selvaraj, V., K. Sampath, V. Sekar, 2012. Adjuvant And Immunostimulatory Effects Of B-Glucan Administration In Combination With Lipopolysaccharide Enhances Survival And Some Immune Parameters In Carp Challenged With *Aeromonas Hydrophila*. *Veterinary Immunology And Immunopathology* **114**. P : 15–24. 42
- Johnny, F., Prisdininggo, dan D. Roza. 2002. Kasus Penyakit Infeksi Bakteri Pada Ikan Kerapu di Karamba Jaring Apung Teluk Ekas, Desa Batunampar, Lombok Timur, NTB. Laporan Hasil Penelitian Balai Besar Riset Perikanan Budidaya laut Gondol. Bali.
- Kordi, M. G. H. 2004. Mrikultur. Prinsip dan Praktek Budidaya Laut. Lily Publisher. Yogyakarta.
- Kusmiyati dan N. W. S. Agustin. 2006. Uji Semyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. 8(1):48-53.
- Lamid M., A.F.E. Julita, dan Made Ray Wijaya. Inokulasi Bakteri *Actinobacilus* sp. Asal Rumen pada Daun Jati Menurunkan Seat Kasar dan Meningkatkan Protein Kasar. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.
- Lemmens,R. H.M.J. dan I. Soerianegara.2002. Sumber Daya Nabati Manusia Tenggara No. 5 (1) Pohon Penghasil Kayu Perdagangan Utama. PT Balai Pustaka Indonesia. Bogor.

- Mintarno, Bagus. 2008. Pengaruh Penggunaan Guguran Daun Jati sebagai Pengganti Hijauan dalam Pakan Lengkap terhadap Kecernaan secara In Vitro. SKRIPSI. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang.
- Mulyadi, M., Wuryanti, Purbowatiningrum Ria S.2013. Konsentrasi Hambat Minimum Kadar Sampel Alang-alang dalam Etanol Dengan Metode Difusi Cakram. *Chem Info*.1(1):35-4.
- Noel, A.M.S Dan K.R. Gustafson.1984.Marine Pharmacologyin 2003 – 2004: Antitumor And Cytotoxic Compounds. *European Journal Of Cancer*. **42**: 2357 – 2387.
- Neldawati, Ratna, dan Gusnaedi. 2013. Analisis Nilai Absorbansi dalam Penentuan Kadar Flavonoid Untuk Berbagai Jenis Daun Tanaman Obat. *Pilar Of Physics*.(2): 76-83
- Novendra, I. Y. 2008. Karakteristik Biometri Pohon Jati (*Tectona grandis*). Departemen Manajemen Hutan Fakultas Kehutanan. Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Pratita dan Putra S. 2012. Pusat Riset Perikanan Budidaya. [Http//Budidaya Perikanan.Htm](http://BudidayaPerikanan.Htm). (26 Juli 2011).
- Prajitno, A. 2005. Diktat Parasit Dan Penyakit Ikan .Fakultas Perikanan.Universitas Brawijaya,105 Hlm.
- Puspitarum, D. L. Sriatun, A. Yulianto dan Sulhadi. 2013. Aplikasi Ekstrak Daun Jati sebagai Film Kaca Non Permanen. UNNES. Semarang.
- Risnawati, N. 2011. Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia Cujete L.*) Terhadap Bakteri *Vibrio Alginolyticus*. Skripsi. FMIPA. Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya. 63 Hlm.
- Sari, F. P dan S. M.. 2011. Pengaruh Pemberian Imunostimulan Ekstrak Kasar Fenol *Gracilaria Verrucosa* Terhadap Histopatologi Insang Ikan Mas (*Cyprinus Carpio*) Yang Diinfeksi *Aeromonas Hydrophila*. Skripsi. Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya. Malang.92 Hlm. Tidak Dipublikasikan.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi. Kanisius. Yogyakarta. 276 Hlm
- Sudjadi, 1986. Metode Pemisahan. UGM Press. Yogyakarta Pustaka.
- Sumayani R. Kusdawati dan Y. Cahyoko.2009. Daya Antibakteri Perasan Rimpang Lengkuas (*Alphina galangal*) dengan Konsentrasi Berbeda terhadap Pertumbuhan *Aeromonas hydrophylla* secara In Vitro. *Berkala Ilmiah Perikanan*. 3(1):83-87.
- Surachmad, W. 1998. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar. Penerbit Tarsito. Bandung. 118 Hlm.

Suryandari, S., 1981. Pengambilan Oleoresin Jahe Dengan Cara Solvent Extraction. Buletin IHP I. BBIHP. Bogor.

Tini, N. dan Amri, K. 2002 Mengembangkan Jati Unggul Pilihan Investasi Prospektif. Agromedia. Jakarta.

Totoa, E, Widodo, F, Delianis P. 2001. Kajian Aktivitas Bioaktif Ekstrak Teripang Pasir (*Holothuria Sp Scabra*) Terhadap Jamur *Candida Albicans*. Jurusan Perikanan, Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan, Universitas Diponegoro

Umar, Farah. 2008. Optimalisasi Ekstrak Flavonoid Total Daun Jati. Institut Pertanian Bogor. Bogor.

Utomo A. W. 2008. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Alkohol Daun Jati Belanda (*Guazuma ulmifolia* Lamk) Pada Tikus Wistar. Fakultas Kedokteran. Universitas Diponegoro. Semarang.

Yani, M. E. M. Riauwati, dan I. Lukistyowati. 2005. Sensitivitas Temulawak (*Curcum xanthorrhizha*) terhadap Pertumbuhan *Aeromonas Hydrophylla*. Universitas Riau. Pekanbaru



LAMPIRAN

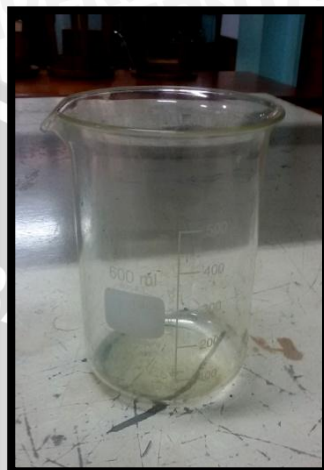
Lampiran 1. Alat-alat Penelitian



Timbangan Digital



Autoklaf



Beaker Glass



Bola Hisap dan pipet Volume



Botol Sprayer



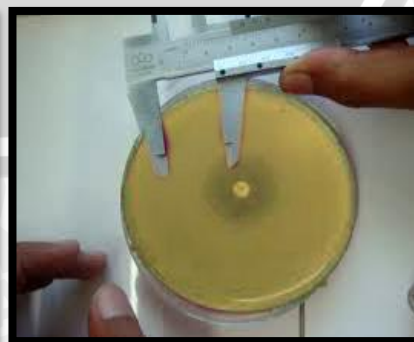
Gelas Ukur



Autoklaf



pipet tetes



Cawan Petri dan jangka sorong



Vacum Rotary Evaporation



Rak Tabung Reaksi



Spatula



Lap



Nampan



Vortex

Lampiran 2. Perhitungan Pembuatan Ekstrak

Dari hasil maserasi diperoleh ekstrak daun jati (*Tectona grandis*) sebanyak 4,6 gram yang kemudian akan dilakukan pembuatan dosis ekstrak. Pertama dibuat dosis ekstrak sebanyak 1000 ppt sebagai dosis stok yang dilarutkan ke dalam larutan DMSO.

a. Dosis MIC

- Dosis Stok 1000 ppt

$$=1.000 \times 0,007 \text{ L}$$

=7 gram ekstrak kasar daun jati dilarutkan ke dalam 7 ml DMSO 10%, maka akan menghasilkan dosis 1000 ppt

- 200 ppt

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 1000 = 1 \times 200$$

$$V1 = 0,2 \text{ ml}$$

0,2 ml dari dosis stok 1000 ppt dilarutkan ke dalam 0,8 ml DMSO akan menghasilkan ekstrak 200 ppt

- 300 ppt

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 1000 = 1 \times 300$$

$$V1 = 0,3 \text{ ml}$$

0,3 ml dari dosis stok 1000 ppt dilarutkan ke dalam 0,7 ml DMSO akan menghasilkan ekstrak 300 ppt

- 400 ppt

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 1000 = 1 \times 400$$

$$V1 = 0,4 \text{ ml}$$



0,4 ml dari dosis stok 1000 ppt dilarutkan ke dalam 0,6 ml DMSO akan menghasilkan ekstrak 400 ppt

- 500 ppt

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 1000 = 1 \times 500$$

$$V1 = 0,5 \text{ ml}$$

0,5 ml dari dosis stok 1000 ppt dilarutkan ke dalam 0,5 ml DMSO akan menghasilkan ekstrak 500 ppt

- 600 ppt

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 1000 = 1 \times 600$$

$$V1 = 0,6 \text{ ml}$$

0,6 ml dari dosis stok 1000 ppt dilarutkan ke dalam 0,4 ml DMSO akan menghasilkan ekstrak 600 ppt

b. Dosis Uji Cakram

- Dosis Stok 1000 ppt

$$= 1.000 \times 0,007 \text{ L}$$

= 7 gram ekstrak kasar daun jati dilarutkan ke dalam 7 ml DMSO 10%, maka akan menghasilkan dosis 1000 ppt

- 300 ppt

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 1000 = 2 \times 200$$

$$V1 = 0,4 \text{ ml}$$

0,4 ml dari dosis stok 1000 ppt dilarutkan ke dalam 1,6 ml DMSO akan menghasilkan ekstrak 300 ppt



- 350 ppt

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 1000 = 2 \times 350$$

$$V1 = 0,7 \text{ ml}$$

0,7 ml dari dosis stok 1000 ppt dilarutkan ke dalam 1,3 ml DMSO akan menghasilkan ekstrak 350 ppt

- 400 ppt

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 1000 = 2 \times 400$$

$$V1 = 0,8 \text{ ml}$$

0,8 ml dari dosis stok 1000 ppt dilarutkan ke dalam 1,2 ml DMSO akan menghasilkan ekstrak 400 ppt

- 450 ppt

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$V1 \times 1000 = 2 \times 450$$

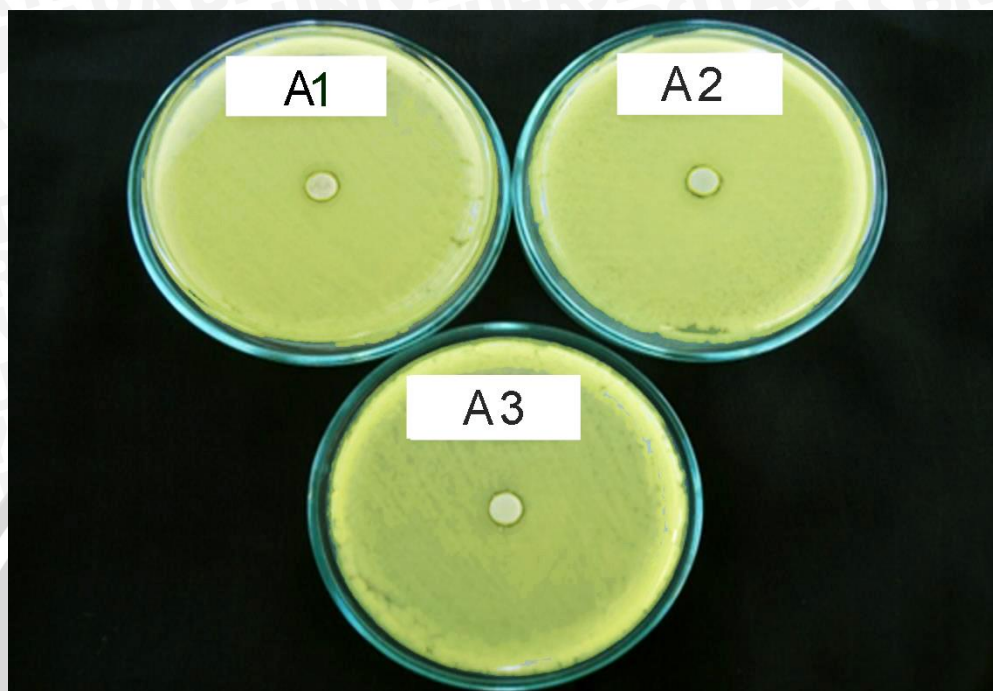
$$V1 = 0,9 \text{ ml}$$

0,9 ml dari dosis stok 1000 ppt dilarutkan ke dalam 1,1 ml DMSO akan menghasilkan ekstrak 450 ppt

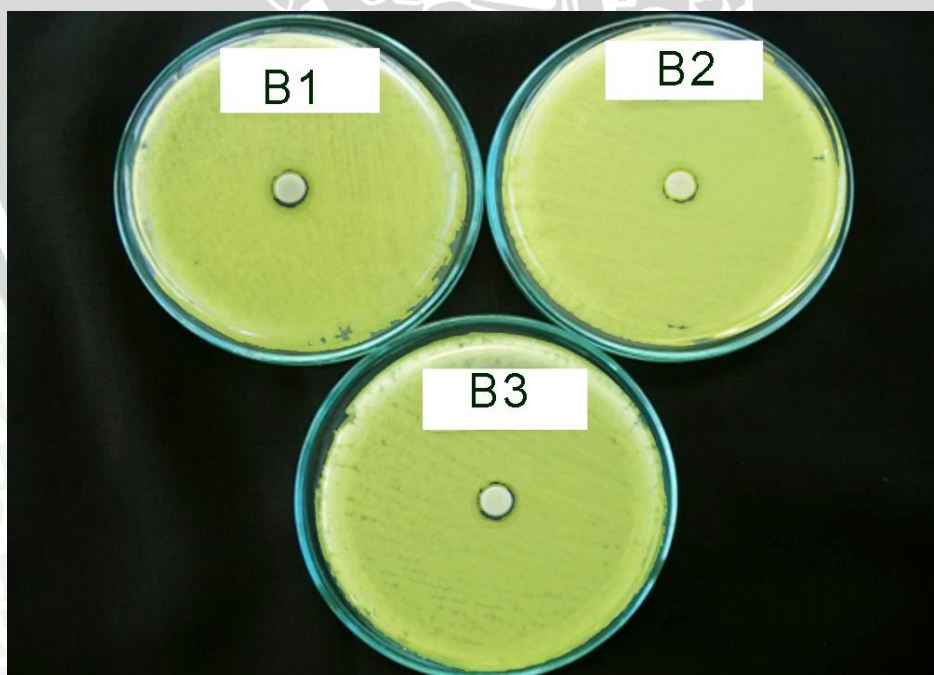


Lampiran 3

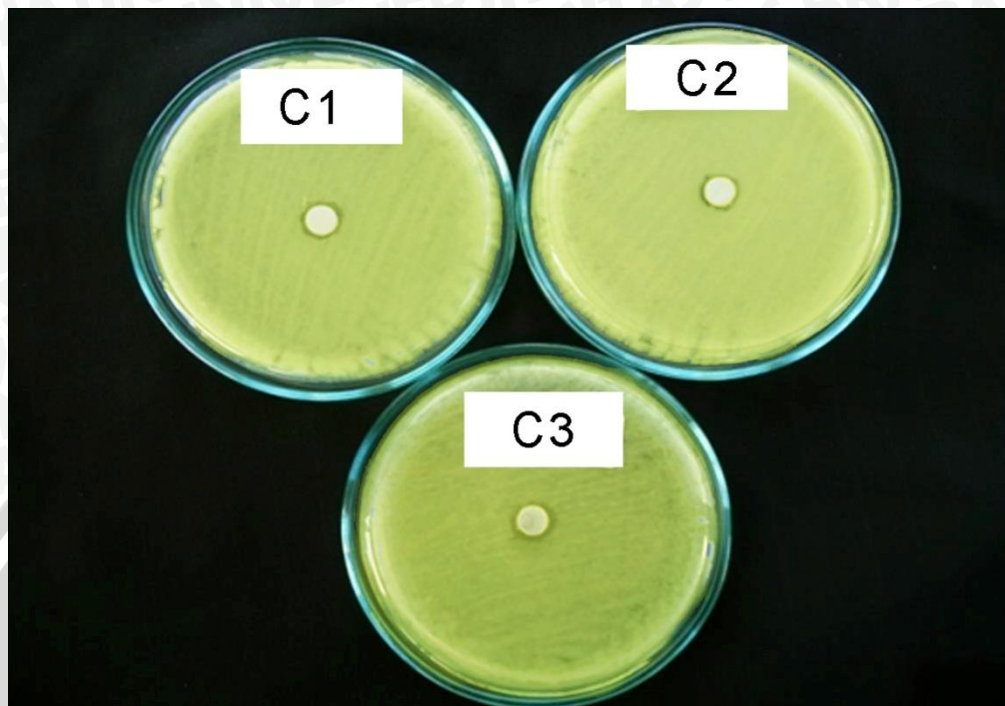
A. Uji Cakram Perlakuan Dosis 300 ppt



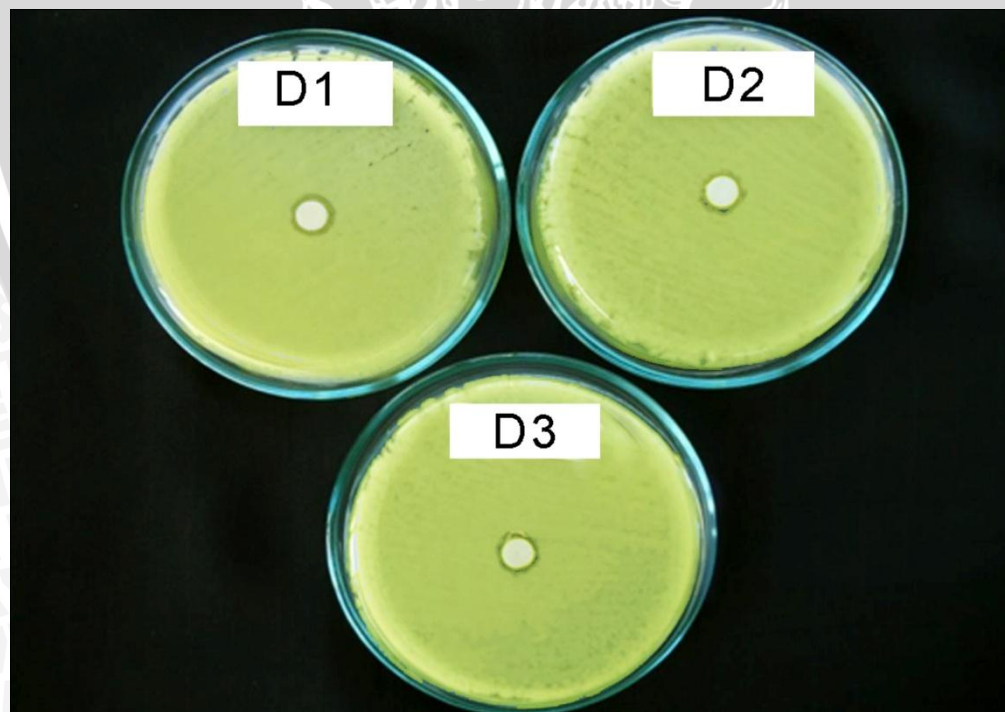
B. Uji Cakram Perlakuan Dosis 350 ppt



C. Uji Cakram Perlakuan Dosis 400 ppt



D. Uji Cakram Perlakuan Dosis 450 ppt



Lampiran 4. Analisa Derajat Penetasan

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	Total ²
	1	2	3			
A	2,50	3,75	2,10	8,32	2,77	69,22
B	4,70	2,90	3,45	11,05	3,68	122,10
C	4,72	5,03	3,97	13,72	4,57	188,23
D	5,30	5,56	5,90	17,76	5,92	315,47
Total				50,85		695,02

Perhitungan :

Faktor Koreksi (FK)	215,47
JK Total	20,7
JK Perlakuan	16,19
JK Acak	4,514

$$\text{Faktor Koreksi} = \frac{\text{Total}^2}{\sum \text{perlakuan}} = \frac{2.585,72}{12} = 215,47$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total} &= (A1^2+A2^2+A3^2+B1^2+B2^2+B3^2+C1^2+C2^2+C3^2+D1^2+D2^2+ D3^2) - \text{FK} \\ &= 236,17-215,47 \\ &= 20,7 \end{aligned}$$

$$\text{JK Perlakuan} = \frac{(\sum A^2+\sum B^2+\sum C^2+\sum D^2)}{3} - \text{FK} = \frac{695,02}{3} - 215,47 = 16,19$$

$$\text{JK Acak} = \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} = 20,7-16,19 = 4,514$$

$$\text{KT Perlakuan} = \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db}} = \frac{16,19}{3} = 5,3967$$

$$\text{KT Acak} = \frac{\text{JK Acak}}{\text{db}} = \frac{4,514}{8} = 0,564$$

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	16,19	5,3967	9,567	3.39	5.00
Acak	8	4,514	0,564	**		
Total	11					

$$F \text{ hitung} = \frac{KT \text{ Perlakuan}}{KT \text{ Acak}} = \frac{5,3967}{0,564} = 9,567$$

$$F 5\% = 3.39 \quad F 1\% = 5.00$$

Karena F hitung lebih besar dari F 1% dan F 5%, yang menunjukkan bahwa hasil perlakuan tersebut berbeda sangat nyata, maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

Uji BNT

$$SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{\sum \text{ulangan}}} = \sqrt{\frac{2 \times 0,564}{3}} = 0,6131$$

$$BNT 5\% = db \text{ acak } t \text{ tabel} \times SED = 1.860 \times 0,6131 = 1,1402$$

$$BNT 1\% = db \text{ acak } t \text{ tabel} \times SED = 2.896 \times 0,6131 = 1,7753$$

Notasi

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	Notasi
		2,77	3,68	4,57	5,92	
A	2,77	-				a
B	3,68	0,91 ^{ns}	-			a
C	4,57	1,8 ^{**}	0,89 ^{ns}	-		ba
D	5,92	3,5 ^{**}	2,24 ^{**}	1,35 [*]	-	c

Uji Polinomial Orthogonal

Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil atau berapa perubahan hasil per satuan perlakuan maka dilanjutkan dengan tabel polynomial orthogonal :

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)		
		Linier	Kuadratik	Kubik
A	8,32	-3	1	-1
B	11,05	-1	-1	3
C	13,72	1	-1	-3
D	17,76	3	1	1
Q= Σci*Ti		42,04	1,31	1,43
Hasil Kuadrat		20	4	20



$Kr = (\sum ci^2) \cdot r$		60	12	60
$JK = Q^2 / Kr$		29,45	0,143	0,034
JK REGRESI	29,627			

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	16,19			3.39	5.00
Linier	1	29,45	29,45	51,757		
Kuadratik	1	0,143	0,143	0,246		
Kubik	1	0,034	0,034	0,059		
Acak	8	4,514	0,569			
Total	11	20,7				

$$R^2 \text{ Linier} = JK \text{ Linier} / (JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak})$$

$$= 0.867$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = JK \text{ Kuadratik} / (JK \text{ Kuadratik} + JK \text{ Acak})$$

$$= 0.030$$

$$R^2 \text{ Kubik} = JK \text{ Kubik} / (JK \text{ Kubik} + JK \text{ Acak})$$

$$= 0.008$$

Nilai regresi Linier lebih besar dari nilai regresi Kuadratik, dan kubik.

Persamaan regresi Linier : $y = 54,9x + 147,9$