

**PENGARUH PENGGUNAAN MADU DENGAN DOSIS YANG  
BERBEDA TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila*  
SECARA IN VITRO**

**SKRIPSI  
MANAJEMEN SUMBER DAYA PERAIRAN  
BUDIDAYA PERAIRAN**

**OLEH:  
HERY YULIANTO  
9801080260-85**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
FAKULTAS PERIKANAN  
MALANG  
2005**

**PENGARUH PENGGUNAAN MADU DENGAN DOSIS YANG  
BERBEDA TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila*  
SECARA IN VITRO**

*Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Perikanan di  
Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang*

**OLEH:  
HERY YULIANTO  
9801080260-85**

**MENYETUJUI,**

**DOSEN PENGUJI I,**

**DOSEN PEMBIMBING I,**

**(Ir. Maheno Sri Widodo, MS)**

**(Ir. Arief Prajitno, MS)**

**Tanggal:**

**Tanggal:**

**DOSEN PENGUJI II,**

**DOSEN PEMBIMBING II,**

**(Ir. Rasyid Fadholi, MSi)**

**(Ir. M. Fadjar, MSc)**

**Tanggal:**

**Tanggal:**

**MENGETAHUI,**

**KETUA JURUSAN**

**(Ir. Maheno Sri Widodo, MS)**

**Tanggal:**

## KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Tuhan Yang Maha Esa atas segala karunia-Nya yang telah melimpahkan kekuatan dan kesabaran kepada penulis sehingga akhirnya penulis dapat menyelesaikan tugas akhir ini.

Kami sadar sepenuhnya karena bantuan, bimbingan, serta dukungan dari berbagai pihak yang dengan tulus dan ikhlas telah meluangkan waktu, tenaga, dan pikirannya maka tugas akhir ini dapat terselesaikan. Untuk itu, dengan segenap kerendahan hati, penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Ir. Arief Prajitno, MS, selaku Dosen Pembimbing I,
2. Bapak Ir. Mohamad Fadjar, MSc, selaku Dosen Pembimbing II,
3. Bapak Ir. Maheno Sri Widodo, MS, selaku Dosen Penguji I,
4. Bapak Ir. M. Rasyid Fadholi, MSi, selaku Dosen Penguji II,
5. Bapak Ir. Abdul Qoid, MS, selaku Ketua Jurusan Manajemen Sumber Daya Perairan (MSP) Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang,
6. Orang tua, saudara, dan kerabat yang senantiasa memberikan dukungan doa,
7. Semua pihak yang tidak bisa kami sebutkan satu-persatu, terima kasih atas segala perhatian, saran, dan kritik, serta dukungannya selama ini.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ini masih jauh dari sempurna, untuk itu penulis sangat mengharapkan adanya masukan yang dapat meningkatkan kualitas tugas akhir ini, terima kasih.

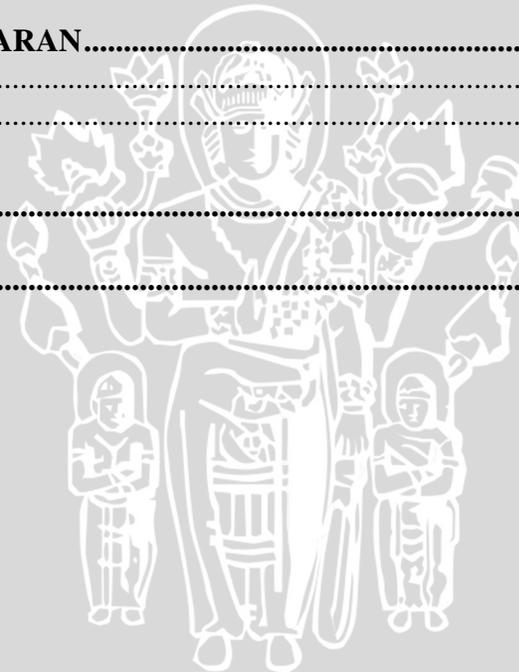
Malang, Juli 2005

Penulis

## DAFTAR ISI

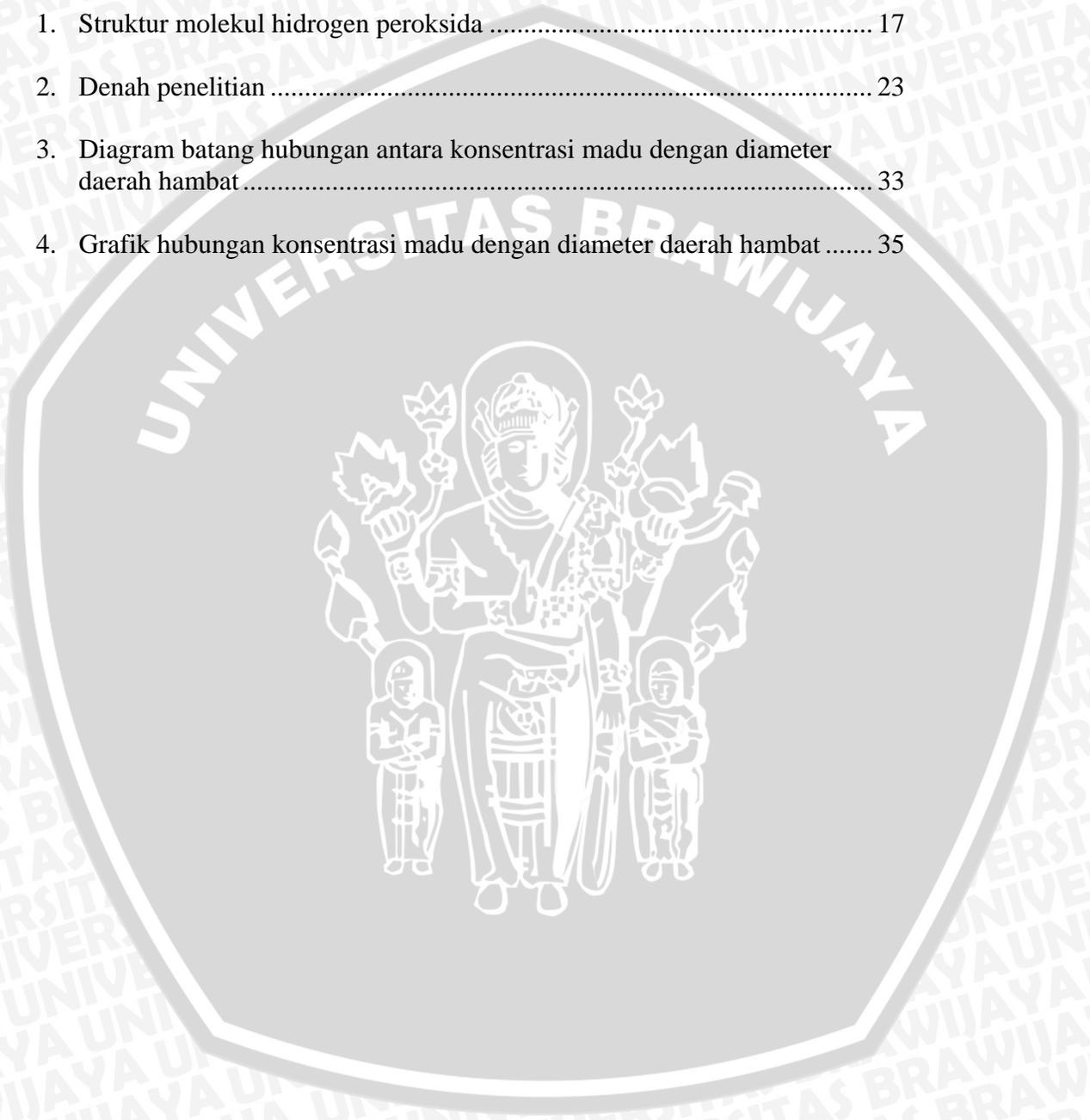
|  | Halaman     |
|--|-------------|
| <b>RINGKASAN .....</b>                         | <b>iii</b>  |
| <b>KATA PENGANTAR.....</b>                     | <b>v</b>    |
| <b>DAFTAR ISI.....</b>                         | <b>vi</b>   |
| <b>DAFTAR TABEL .....</b>                      | <b>viii</b> |
| <b>DAFTAR GAMBAR.....</b>                      | <b>ix</b>   |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN.....</b>                    | <b>x</b>    |
| <b>1. PENDAHULUAN .....</b>                    | <b>1</b>    |
| 1.1 Latar Belakang .....                       | 1           |
| 1.2 Perumusan Masalah .....                    | 3           |
| 1.3 Tujuan Penelitian .....                    | 5           |
| 1.4 Manfaat Penelitian .....                   | 5           |
| 1.5 Hipotesis .....                            | 5           |
| 1.6 Tempat dan Waktu .....                     | 5           |
| <b>2. TINJAUAN PUSTAKA.....</b>                | <b>6</b>    |
| 2.1 Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> .....  | 6           |
| 2.1.1 Klasifikasi dan morfologi .....          | 6           |
| 2.1.2 Habitat dan penyebarannya .....          | 7           |
| 2.1.3 Metabolisme dan perkembangan .....       | 8           |
| 2.1.4 Infeksi dan tanda-tanda penyerangan..... | 8           |
| 2.2 Madu .....                                 | 10          |
| 2.2.1 Komposisi kimia madu .....               | 10          |
| 2.2.2 Morfologi dan kegunaan .....             | 13          |
| 2.2.3 Aktivitas Antibakteri.....               | 14          |
| 2.3 Uji efektifitas antimikroba in vitro.....  | 17          |
| 2.3.1 Metode cakram .....                      | 18          |
| <b>3. MATERI DAN METODE PENELITIAN.....</b>    | <b>20</b>   |
| 3.1 Materi penelitian .....                    | 20          |
| 3.1.1 Bahan penelitian .....                   | 20          |
| 3.1.2 Alat penelitian .....                    | 20          |
| 3.2 Metode dan rancangan penelitian .....      | 21          |
| 3.2.1 Metode penelitian .....                  | 21          |
| 3.2.2 Rancangan penelitian.....                | 22          |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 3.3       | Prosedur Penelitian .....  | 23        |
| 3.3.1     | Persiapan penelitian .....                                       | 23        |
|           | a. Sterilisasi alat dan bahan .....                              | 23        |
|           | b. Pembuatan media .....   | 24        |
|           | c. Pembuatan biakan murni bakteri .....                          | 25        |
| 3.3.2     | Pelaksanaan penelitian .....                                     | 26        |
| 3.4       | Parameter .....  | 27        |
| 3.4.1     | Parameter Uji .....  | 27        |
| 3.4.2     | Parameter Penunjang .....  | 27        |
| 3.5       | Analisa Data .....   | 28        |
| <b>4.</b> | <b>HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN.....</b>                      | <b>30</b> |
| 4.1       | Pembiakan kultur murni bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> ..... | 30        |
| 4.2       | Kadar hambat minimum madu dengan metode cakram .....             | 30        |
| 4.3       | Daya antibakterial madu (Metode Cakram) .....                    | 31        |
| 4.4       | Lingkungan Hidup Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> .....       | 35        |
| <b>5.</b> | <b>KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>                                 | <b>36</b> |
| 5.1       | Kesimpulan .....   | 36        |
| 5.2       | Saran .....  | 36        |
|           | <b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>                                       | <b>37</b> |
|           | <b>LAMPIRAN .....</b>  | <b>40</b> |



## DAFTAR GAMBAR

| Gambar   | Halaman |
|--|---------|
| 1. Struktur molekul hidrogen peroksida .....   | 17      |
| 2. Denah penelitian .....  | 23      |
| 3. Diagram batang hubungan antara konsentrasi madu dengan diameter daerah hambat ..... | 33      |
| 4. Grafik hubungan konsentrasi madu dengan diameter daerah hambat .....                | 35      |



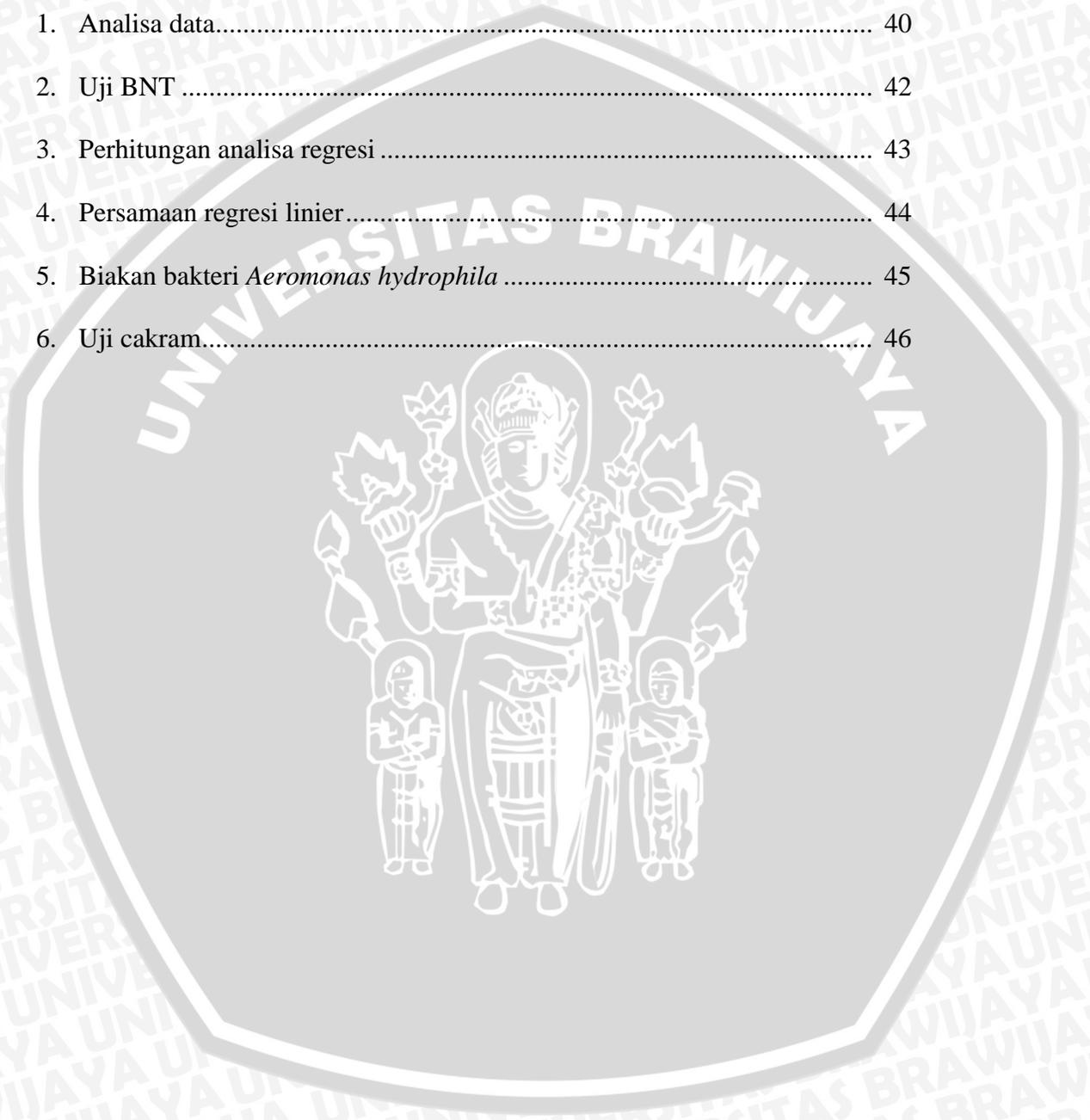
## DAFTAR TABEL

| Tabel  | Halaman |
|--|---------|
| 1. Komposisi kimia madu .....  | 12      |
| 2. Konsentrasi minimum madu terhadap beberapa spesies bakteri .....                | 15      |
| 3. Penentuan dosis perlakuan madu untuk uji anti bakteri dengan metode cakram..... | 28      |
| 4. Kadar hambat minimum madu terhadap bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> ..       | 31      |
| 5. Diameter daerah hambat pada masing – masing perlakuan.....                      | 32      |
| 6. Daftar uji BNT .....  | 33      |



## DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran  | Halaman |
|---|---------|
| 1. Analisa data.....                                | 40      |
| 2. Uji BNT .....                                    | 42      |
| 3. Perhitungan analisa regresi .....                | 43      |
| 4. Persamaan regresi linier.....                    | 44      |
| 5. Biakan bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> ..... | 45      |
| 6. Uji cakram.....                                  | 46      |



## RINGKASAN

**HERY YULIANTO. 9801080260. PENGARUH PENGGUNAAN MADU DENGAN DOSIS YANG BERBEDA TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila*. Di bawah bimbingan Ir. Arief Prajitno, MS dan Ir. M. Fadjar, MSc**

---

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Hama dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang, 1 Maret 2005 sampai dengan 1 Mei 2005. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui daya hambat madu terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Diharapkan penelitian ini dapat dijadikan salah satu informasi dalam usaha pencegahan dan pengobatan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan menggunakan bahan anti mikrobal alami dari madu.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dimana rancangan yang dipergunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL) dengan lima perlakuan, masing-masing perlakuan diulang sebanyak tiga kali. Perlakuan tersebut adalah konsentrasi dari madu, yaitu 30%, 35%, 40%, 45%, 50% dan 0% sebagai kontrol.

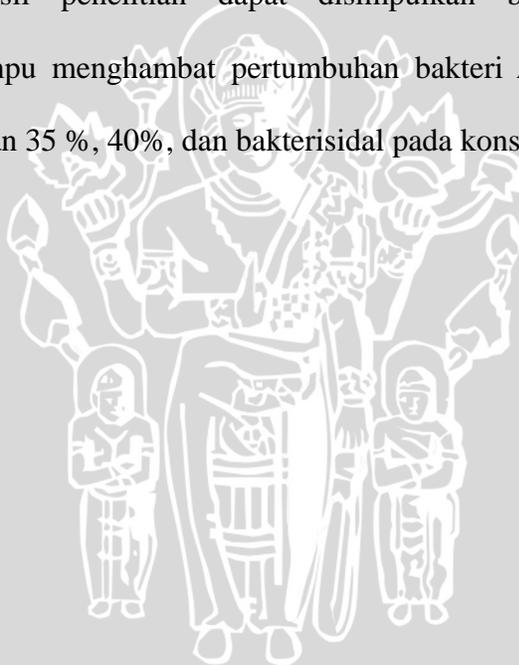
Parameter uji dalam penelitian ini adalah diameter daerah hambatan yang terbentuk di sekitar kertas cakram yang mengandung madu, dengan memperlihatkan daerah bening di sekitar kertas cakram. Sedangkan parameter penunjangnya adalah pH media dan suhu inkubator.

Dari hasil penelitian menunjukkan bahwa perbedaan konsentrasi madu mempengaruhi daerah hambatan yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Semakin besar konsentrasi madu, maka semakin besar daerah hambatan yang terbentuk. Diameter daerah hambatan terbesar diperoleh pada perlakuan E konsentrasi 50% dengan rata-rata diameter daerah hambat sebesar 13,00 mm, diikuti perlakuan D konsentrasi 45% dengan

rata-rata diameter daerah hambatan 12,00 mm, perlakuan C konsentrasi 40% dengan rata-rata diameter daerah hambatan 10,33 mm, perlakuan B konsentrasi 35% dengan rata-rata diameter daerah hambatan 8,67 mm, perlakuan A konsentrasi 30% dengan rata-rata diameter daerah hambatan 7,67 mm.

Hubungan antara madu dengan diameter daerah hambatan memiliki persamaan  $Y = - 2,6 + 0,84x$  dengan nilai  $r = 0,991$ . Dari hasil uji MIC diperoleh hasil bahwa konsentrasi minimal yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah 30%.

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa madu bersifat bakteriostatik atau mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada konsentrasi 30% dan 35%, 40%, dan bakterisidal pada konsentrasi 45% dan 50%.



## I PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Sub sektor perikanan sebagai salah satu komponen pendukung pembangunan ekonomi perlu terus ditingkatkan produksi dan produktivitasnya. Berpedoman pada Kebijakan Pembangunan baik secara Nasional maupun regional Jawa Timur, maka tujuan pembangunan Sub Sektor Perikanan di Jawa Timur dalam Repelita VII adalah meningkatkan produktivitas usaha perikanan dan nilai tambah komoditas perikanan untuk meningkatkan penghasilan nelayan atau petani ikan, meningkatkan produksi dan mutu hasil perikanan untuk memenuhi kebutuhan pangan dan gizi, agro industri serta meningkatkan hasil perikanan, memperluas kesempatan kerja dan kesempatan berusaha, meningkatkan pembinaan kelestarian sumberdaya perikanan dan lingkungan hidup serta meningkatkan devisa non migas melalui peningkatan ekspor hasil perikanan dan mengurangi impor (Lesmana dan Dermawan, 2001).

Usaha budidaya ikan sebenarnya sudah dimulai sejak dahulu dan masih terus dikembangkan baik teknik maupun teknologinya, karena selain untuk memenuhi kebutuhan pangan (sebagai sumber protein) juga untuk mempertinggi devisa negara melalui ekspor non migas untuk meningkatkan kuantitas dan kualitas ikan dapat melalui usaha budidaya secara intensif (Fadjar, 1989).

Menurut Lesmana dan Dermawan (2001), penyakit dapat dikategorikan sebagai berikut: (1) penyakit akibat lingkungan, (2) penyakit akibat bakteri, (3) penyakit akibat cendawan / jamur, dan (4) penyakit akibat parasit, (5) penyakit akibat hama. Penyakit akibat lingkungan diantaranya meliputi oksigen, karbondioksida, amonia, nitrit, suhu, dan pH. Penyakit akibat bakteri meliputi penyakit *columnaris* yang disebabkan oleh

*Cytophaga* dan *Flexibacter columnaris*, penyakit *Bacterial Septicaemia* yang disebabkan oleh *Pseudomonas* dan *Aeromonas*, dan *Tuberculosis* oleh bakteri *Mycobacterium*. Sedangkan Moeller (2005) mengemukakan bahwa terdapat berbagai jenis penyakit *Septicaemia*, antara lain *Haemorrhagic Septicaemia* yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Pseudomonas fluorescens*, *Vibrio septicaemia* yang disebabkan oleh *Vibrio alginolyticus* dan *Vibrio anguillarum*, *Edwardsiella septicaemia* yang disebabkan oleh *Edwardsiella tarda*, dan *Streptococcus septicaemia* yang disebabkan oleh *Streptococcus iniae*. Selain itu terdapat beberapa penyakit lain yang juga disebabkan oleh bakteri seperti penyakit *Furunculosis* yang disebabkan oleh *Aeromonas salmonicida*, *Red Mouth* yang disebabkan oleh *Yersinia ruckeri*, *Gill Disease* yang disebabkan oleh *Flavobacterium* dan *Cytophagy psychrophila*, serta *Kidney Disease* yang disebabkan oleh *Renibacterium salmoninarum*.

Masalah penyakit khususnya yang disebabkan oleh bakteri menjadi penyebab turunnya produksi ikan. Pada akhir tahun 2002, misalnya, total ikan yang diserang oleh bakteri *Aeromonas* di kabupaten Bandung, Jabar, mencapai berat 442,4 ton. Jenis ikan yang diserang adalah ikan mas. Hal yang sama juga dialami oleh para peternak ikan di Blitar, Batu, dan sebagainya, dimana total kerugian yang diderita mencapai milyaran rupiah (Sukanda, 2002).

Untuk mengatasi penyakit ini dapat dilakukan dengan 2 cara, yakni pencegahan (preventif) dan pengobatan (kuratif). Pencegahan dapat dilakukan dengan menjaga kebersihan kolam atau wadah pemeliharaan, peralatan lainnya, serta menjaga kualitas air dan pakan. Sedangkan, pengobatan mutlak dilakukan terhadap ikan yang sakit, baik secara kimiawi maupun tradisional (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Pengobatan tradisional dengan menggunakan bahan-bahan alami (natural) memiliki kelebihan dibanding kimiawi karena tidak terlalu berbahaya dan lebih mudah diterima oleh ikan yang sakit karena relatif tidak mempunyai efek samping (Lesmana dan Dermawan, 2001).

## 1.2 Perumusan Masalah

Serangan penyakit pada ikan-ikan air tawar dapat disebabkan oleh berbagai jenis parasit, bakteri dan virus. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri yang menyerang ikan-ikan air tawar biasanya jenis *Aeromonas hydrophila*, dan hingga saat ini masih menjadi ancaman dalam usaha budidaya air tawar. Lebih lanjut dijelaskan Nabib dan Pasaribu (1989) bahwa penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* merupakan salah satu penyakit yang sulit ditangani pada usaha budidaya intensif. Beberapa jenis penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* yaitu busung perut infeksius (*Infectious abdominal dropsy*) pada ikan mas, penyakit bercak-bercak (*Spot pest*) selain menyerang ikan mas juga menyerang ikan lele, *Furonculosis*, banyak ikan air tawar yang terserang penyakit ini, penyakit merah (*Red Disease*) dan penyakit peradangan umum, *Bacterial Haemorrhagic Septicaemia*, sering ditemukan dalam rongga perut ikan air tawar di daerah panas, misalnya pada ikan lele, dapat menyebabkan kematian massal.

Untuk mengatasi penyakit yang diakibatkan oleh serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* ada dua cara yang bisa dilakukan yaitu dengan pencegahan (*preventif*) dan pengobatan (*kuratif*). Pencegahan dapat dilakukan dengan upaya pembersihan secara berkesinambungan baik terhadap kolam pemeliharaan, ikan peliharaan maupun semua peralatan yang digunakan. Jika ikan sudah terserang penyakit maka tidak ada cara yang

lebih baik selain segera melakukan pengobatan yang tepat (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Gerakan kembali ke alam (*back to nature*) banyak didengung-dengungkan. Penggunaan bahan-bahan alami menjadi tujuan utama gerakan itu. Keserasian dan keselarasan dengan alam akan membuat hidup menjadi lebih indah. Pencemaran, polusi, keracunan dan banyak hal lain yang disebabkan oleh penggunaan bahan-bahan kimiawi diharapkan dapat ditekan seminimal mungkin. Pengobatan tradisional dengan bahan-bahan alami memiliki banyak kelebihan, misalnya tingkat bahaya lebih rendah dari pada obat-obatan kimia. Penerimaan tubuh terhadap obat dari bahan-bahan alami ternyata lebih mudah (Muhlisah, 1999).

Salah satu jenis bahan alami yang telah lama dikenal di masyarakat dan dipergunakan sebagai obat adalah madu. Madu mengandung zat aktif yang dapat melawan berbagai jenis jamur dan bakteri yang menyebabkan infeksi. Aktivitas antibakteri yang utama di dalam madu disebabkan adanya hidrogen peroksida yang dihasilkan secara enzimatis di dalam madu. Pada madu yang bercampur air aktivitas enzim justru meningkat sedemikian rupa sehingga melepaskan antiseptik secara perlahan pada tingkat antibakteri namun tidak merusak jaringan, sehingga bakteri dapat mati namun organisme yang terinfeksi tetap hidup (Anonymous, 1996).

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh madu terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Selain itu juga untuk mengetahui seberapa besar daya hambat madu dengan konsentrasi yang berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

#### 1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan mampu memberikan hasil yang dapat digunakan sebagai informasi baru untuk mengobati ikan yang telah terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan menggunakan obat tradisional berbahan dasar madu.

#### 1.5 Hipotesis

Ho: Diduga bahwa penggunaan madu dengan konsentrasi yang berbeda tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

H1: Diduga bahwa penggunaan madu dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

#### 1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan, Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Maret s/d Mei 2005.

## II TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri *Aeromonas hydrophila*

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* menurut Holt (1979) adalah:

|          |                               |
|----------|-------------------------------|
| Divisio  | : Protophyta                  |
| Class    | : Schizomycetes               |
| Ordo     | : Pseudomonadales             |
| Sub Ordo | : Pseudomonadineae            |
| Family   | : Vibrionaceae                |
| Genus    | : <i>Aeromonas</i>            |
| Species  | : <i>Aeromonas hydrophila</i> |

Bakteri adalah organisme bersel tunggal yang mempunyai karakteristik sendiri dengan bentuk yang berbeda menurut generanya. Sel bakteri terdiri dari 3 lapisan, dari luar berturut-turut yaitu sel lendir, dinding sel dan membran sitoplasma. Sitoplasma sendiri merupakan koloid yang banyak mengandung karbohidrat, protein dan enzim (Dwidjoseputro, 1982). Dinding sel bakteri gram negatif mengandung lebih sedikit peptidoglikan, tetapi di luar lapisan peptidoglikan ada struktur membran kedua yang tersusun dari protein, fosfolipida dan lippopolisakarida (Volk *et al*, 1988).

*Aeromonas hydrophila* adalah suatu bakteri gram negative berbentuk batang. *Aeromonas hydrophila* termasuk bakteri anaerob fakultatif dengan ukuran panjang sekitar 1,0 sampai 4,0 mm, mempunyai satu polar flagella dengan panjang gelombang 1,7 mm. *Aeromonas hydrophila* menghasilkan 1-3 mm koloni dalam 24 jam pada

medium agar. Koloninya biasanya berwarna merah di bagian tengah. Pada kondisi pertumbuhan umumnya *Aeromonas* bersifat *mesophilic* yang menyukai kisaran temperatur 100<sup>0</sup>C hingga 400<sup>0</sup>C, *neutrophilic* yang menyukai kisaran pH antara 4,5 hingga 9,0, dan *non-halophilic* yang membutuhkan konsentrasi NaCl antara 0% sampai 4% untuk pertumbuhannya. Pada umumnya, *Aeromonas hydrophila* bersifat resisten terhadap penicillin dan ampicillin (Altwegg, 1994 dalam Hogan, 1999).

*Aeromonas hydrophila* adalah termasuk ke dalam spesies bakteri gram negatif. Organisme ini bersifat oksidasi positif. *Aeromonas hydrophila* merupakan anggota dari famili *Aeromonadaceae* dan bersifat pathogen pada ikan. *Aeromonas hydrophila* adalah organisme heterotrof, yakni dapat hidup di lingkungan aerob maupun anaerob (Anonymous, 2005).

Bakteri membentuk koloni pada media yang sesuai. Media yang digunakan adalah TSA di mana koloni akan tampak dan dapat dilihat dengan mata biasa. Dapat meragikan glukosa, maltosa, fruktosa dan tetrahalosa menjadi asam atau asam dengan gas. Bakteri ini juga dapat mereduksi nitrat menjadi nitrit (Bonang dan Koeswardono, 1982). Dinding sel bakteri gram negatif mengandung lebih sedikit peptidoglikan, tetapi di luar lapisan peptidoglikan ada struktur membran kedua yang tersusun dari protein, fosfolipida dan lippopolisakarida (Volk *et al*, 1988).

### 2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada umumnya hidup pada air tawar terutama yang mengandung bahan organik tinggi. Bakteri ini diakui sebagai patogen dari hewan akuatik yang berdarah dingin (Afrianto *et al*, 1992).

*Aeromonas hydrophila* dapat ditemukan di lingkungan perairan apapun. Bakteri ini dapat hidup pada lingkungan yang bersuhu rendah maupun berhawa hangat, tumbuh pada kisaran suhu  $25^{\circ}$  -  $37^{\circ}$ . *Aeromonas hydrophila* bersifat resisten terhadap *chlorine* (Chopra and Houston, 1999 dalam Anonymous, 2005).

Keberadaan *Aeromonas hydrophila* di suatu perairan erat hubungannya dengan jumlah kandungan bahan organik di perairan atau sedimen dasar. Bakteri *Aeromonas hydrophila* lebih banyak menyerang ikan di daerah tropis dan daerah sub tropis dibandingkan dengan daerah dingin. Karena daerah tropis dan daerah sub tropis kandungan bahan organiknya lebih tinggi dibandingkan dengan daerah dingin. Di daerah tropis dan sub tropis penyakit *haemorrhagic septicemia* pada umumnya muncul pada musim panas (kemarau) di mana pada saat itu kandungan bahan organiknya tinggi. Pada ikan, *Aeromonas hydrophila* dapat menyebabkan *hemorrhagic septicemia*, *ulcer disease*, *red-sore disease*, *motile Aeromonas septicemia* (MAS), dan/atau *ulcerative disease syndrome* (UDS). Ciri – ciri utama penyakit yang disebabkan oleh jenis bakteri ini pada ikan adalah luka borok yang dalam yang timbul melalui infeksi luka (McGarey, 1990 dalam Hogan, 1999). Di daerah tropik dan sub tropik penyakit *haemorrhagic septicemia* yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Pada umumnya muncul musim panas dimana pada saat kandungan bahan organiknya tinggi. *Aeromonas hydrophila*

banyak ditemukan pada insang, kulit, hati dan ginjal. Ada juga yang berpendapat bahwa bakteri ini dapat hidup pada saluran pencernaan (Holt, 1979).

### 2.1.3 Metabolisme dan Perkembangan

Bakteri *Aeromonas hydrophila* termasuk bakteri fakultatif anaerob, yaitu bakteri yang dapat hidup dengan atau tanpa adanya oksigen. Bakteri fakultatif anaerob akan tumbuh tersebar di seluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair (Dwijoseputro, 1987).

Bakteri ini akan tumbuh maksimal pada kisaran suhu 38 - 41°C, sedangkan pertumbuhan minimalnya pada suhu 0-5°C (Buchanan dan Gibbson, 1974 dalam Prajitno, 1996). Bakteri *Aeromonas hydrophila*. tumbuh dengan baik pada kisaran pH 5,5 - 9,0 (Afrianto dan Liviawaty, 1992). Pembiakan bakteri ini secara aseksual yaitu membiak dengan memanjangkan sel diikuti dengan pembelahan inti yang disebut pembelahan binner. Waktu untuk pembelahan satu sel menjadi dua sel kurang lebih 10 menit (Volk *et al*, 1988).

### 2.1.4 Infeksi dan Tanda -Tanda Penyerangan

Infeksi bakteri timbul secara tidak langsung sebagai akibat dari kondisi ikan yang lemah. Kondisi ini disebabkan oleh adanya penurunan kandungan oksigen, kurangnya pemberian pakan, padat penebaran yang tinggi, kualitas air yang buruk dan serangan virus atau hama sehingga ikan menjadi lemah dan mudah terinfeksi bakteri akibat menurunnya daya tahan tubuh ikan (Prajitno, 1996). Infeksi bakteri timbul secara tidak langsung, artinya timbul sebagai akibat keadaan ikan yang lemah karena stress. Faktor-faktor penyebab keadaan stress pada ikan antara lain penurunan kandungan

oksigen, kekurangan gizi, padat penebaran tinggi, penanganan yang kurang cermat, kualitas air yang kurang baik serta akibat serangan virus atau parasit sehingga ikan mudah terkena infeksi bakteri (Koesumadinata, 1978). Bakteri *Aeromonas hydrophila* dapat menyerang semua jenis ikan air tawar dengan jenis penyakitnya disebut *Motile Aeromonas Septicaemia* (MAS) atau disebut juga *haemorrhagic septicemia*. Serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* bersifat laten (berkepanjangan), jadi tidak memperlihatkan gejala penyakit meskipun telah dijumpai pada tubuh ikan. Serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* terlihat apabila ketahanan tubuh ikan menurun akibat stress yang disebabkan oleh penurunan kualitas air, kekurangan pakan atau penanganan yang kurang cermat (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Penyakit *Bacterial Hemorrhagic Septicemia* disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* yang menginfeksi banyak spesies ikan air tawar yang biasanya timbul ketika ikan dalam keadaan stress akibat kepadatan yang terlalu tinggi. Tanda klinis dan lukanya bervariasi. Tanda yang paling umum berupa pendarahan pada kulit, sirip, rongga mulut dan otot dengan borok yang tidak terlalu dalam di bagian epidermis. Terkadang juga terdapat borok yang dalam. Ginjal, limpa, hati, dan jantung mengalami pembengkakan. Penyakit ini ditularkan melalui air yang telah terkontaminasi atau ikan yang sakit Anonymous (2005).

Ikan yang terserang bakteri *Aeromonas hydrophila* secara morfologis maupun fisiologis akan menunjukkan tanda-tanda sebagai berikut : warna tubuh menjadi agak gelap, kulit menjadi kasar dan timbul pendarahan yang selanjutnya akan menjadi borok (*ulcer*), kemampuan berenang menurun dan sering megap-megap di permukaan air, terjadi pendarahan pada organ bagian dalam seperti hati, ginjal, maupun limpa, perutnya

agak kembang, sirip rusak dan insangnya menjadi berwarna keputih-putihan, mata rusak dan agak menonjol (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Floyd (2002) menyatakan bahwa ikan yang terinfeksi *Aeromonas* tidak menunjukkan satu tanda khusus baik secara fisik maupun perilaku namun umumnya menunjukkan tanda – tanda yang beragam, seperti pendarahan kecil pada pangkal sirip atau di kulit, perut mengembung, dan mata melotot. Tanda – tanda internal menunjukkan adanya cairan di dalam perut, hati dan limpa bengkak, dan usus mengembung karena berisi cairan.

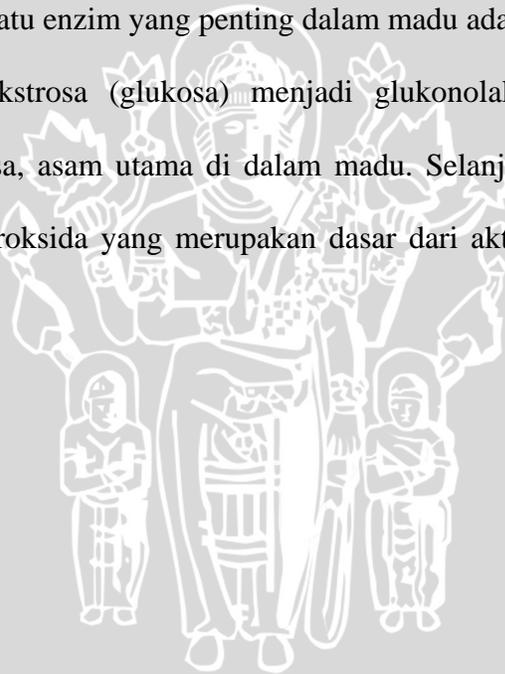
## **2.2 Madu**

### **2.2.1 Komposisi kimia madu**

Madu terdiri dari glukosa dan fruktosa, selain itu madu juga mengandung berbagai macam vitamin dan mineral dengan beragam asam amino dan zat antioksidan. Vitamin yang terdapat di dalam madu adalah vitamin A, betakarotin, vitamin B kompleks, vitamin C, D, E, dan K. Sedangkan mineral yang terkandung di dalam madu adalah magnesium, sulfur, fosfor, besi, kalsium, klorin, potassium, iodine, sodium, cuprum, dan mangan (Anonymous, 2004).

Madu adalah larutan air berkonsentrasi tinggi yang terdiri atas 2 jenis gula, dekstrosa dan fruktosa. Selain itu di dalam madu juga terdapat 22 jenis gula kompleks lain di antaranya sukrosa (gula meja) dan maltosa yang merupakan campuran dari berbagai gula kompleks. Sebenarnya masih terdapat komponen-komponen lain di dalam madu, namun gula merupakan komponen yang terbesar (Withe,1980).

Bagian zat kering terbesar di dalam madu adalah gula. Larutan berkonsentrasi sangat tinggi ini menyebabkan sifat-sifat fisik madu, yakni viskositas tinggi, lengket, densitas tinggi, cenderung berglanulasi, cenderung menyerap uap air dari udara, dan imun terhadap beberapa tipe kerusakan. Secara detail komposisi madu disajikan pada Table 1. Salah satu komponen penting madu adalah enzim. Adanya enzim-enzim ini membuat madu memiliki sifat yang jauh berbeda dengan senyawa-senyawa pemanis lainnya. Enzim-enzim ini terdapat di dalam lebah, tepung sari, nectar, atau bahkan yeast di dalam madu. Enzim sendiri merupakan bahan protein kompleks yang menyebabkan perubahan kimia. Salah satu enzim yang penting dalam madu adalah glukosa oksidase. Enzim ini merubah dekstrosa (glukosa) menjadi glukonolaktona, yang kemudian membentuk asam glukosa, asam utama di dalam madu. Selanjutnya glukosa oksidase membentuk hidrogen peroksida yang merupakan dasar dari aktivitas antibakteri madu (Anonymous, 1998).



**Tabel 1.** Komposisi Kimia Madu

| Komponen              | Jumlah     |
|-----------------------|------------|
| • Air                 | 25%        |
| • Gula                | 85% solid  |
| - Monosakarida        |            |
| - Glukosa (dekstrosa) |            |
| - Fruktosa (levulosa) |            |
| - Polisakarida        | 0,8%       |
| - Sukrosa             |            |
| - Maltosa             |            |
| - Isomaltosa          |            |
| - Maltulosa           |            |
| - Nigerosa            |            |
| - Turanosa            |            |
| - Kojibiosa           |            |
| - Laminaribiosa       |            |
| - B-trehalosa         |            |
| - Gentibiosa          |            |
| - Trisakarida         |            |
| - Melezitosa          |            |
| - Isomaltosylglukosa  |            |
| - Maltotriosa         |            |
| - L-kestosa           |            |
| - Panosa              |            |
| - Isomaltotriosa      |            |
| - Erlosa              |            |
| - Theanderosa         |            |
| - Centosa             |            |
| - Isopanosa           |            |
| • Asam                | 0,5% solid |
| - asam glukosa        |            |
| - asam format         |            |
| - asam asetat         |            |
| - asam butirat        |            |
| - asam laktat         |            |
| - asam oksalat        |            |
| - asam succinat       |            |
| - asam tartarat       |            |
| - asam maleat         |            |
| - asam piruvat        |            |
| - asam piroglutamat   |            |
| - asam ketoglutarat   |            |
| - asam glikolat       |            |
| - asam sitrat         |            |
| - asam malat          |            |

|   |  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>- asam 2-3-fosfoglisarat</li> <li>- asam B-gliserofosfat</li> <li>- asam glukosa 6-fosfat</li> <li>• Asam Amino dan Protein             <ul style="list-style-type: none"> <li>- nitrogen</li> <li>- prolin</li> <li>- glutamat</li> <li>- alanin</li> <li>- fenilalanin</li> <li>- tirosin</li> <li>- leusin</li> <li>- isoleusin</li> </ul> </li> <li>• Mineral             <ul style="list-style-type: none"> <li>- potassium</li> <li>- klorin</li> <li>- sulfur</li> <li>- calsium</li> <li>- sodium</li> <li>- fosfor</li> <li>- magnesium</li> <li>- silica</li> <li>- ferum</li> <li>- mangan</li> </ul> </li> <li>• Enzim             <ul style="list-style-type: none"> <li>- invertase (sukrase/sakarase)</li> <li>- diastase(amylase)</li> <li>- glukosa oksidase</li> <li>- katalase</li> <li>- asam fosfatase</li> </ul> </li> </ul> | <p>60% dalam protein dan 40% dalam asam amino</p> <p>0,17%</p> |
|---|--|

(Anonymous, 2002)

### 2.2.2 Morfologi dan kegunaan

Madu adalah suatu larutan gula yang jenuh atau sangat jenuh yang merupakan gabungan antara fruktosa dan glukosa. Madu mengandung bahan-bahan anti mikroba yang telah dikenal sejak seabad yang lalu. Namun, meski telah digunakan sebagai obat

sejak zaman kuno oleh berbagai bangsa di dunia, pada saat itu tidak diketahui kandungan antibakterinya. Kala itu madu hanya diketahui sebagai suatu obat yang mujarab. Hal ini tidaklah mengherankan mengingat bahwa ada sejumlah penyakit yang disebabkan infeksi oleh mikroorganisme baru diketahui pada akhir abad silam. Kini, telah ditemukan bahwa efektifitas madu dalam banyak penggunaan medis sangat mungkin sekali karena aktifitas antibakterinya dan terbukti telah menghambat berbagai jenis bakteri (Anonymous, 1996).

### 2.2.3 Aktivitas Antibakteri

Selain merupakan senyawa antifungi, madu juga mempunyai aktifitas antibakteri. Madu bersifat aktif melawan berbagai jenis jamur dan bakteri yang menyebabkan infeksi. Madu tidak sesuai sebagai media hidup atau tumbuh bakteri karena 2 alasan utama, yakni sifatnya yang sangat asam dan kandungan gulanya yang sangat tinggi.

Ada 2 tipe mekanisme pembunuhan bakteri. Pertama, pembunuhan bakteri yang disebabkan oleh kadar gula madu yang tinggi, yang disebut sebagai efek osmosis atau secara sederhana dapat dijelaskan sebagai pembunuhan bakteri dengan jalan pengeringan bakteri. Ke dua, penghambatan tumbuh bakteri oleh madu yang dikenal dengan istilah efek inhibine (daya hambat). Efek inhibine ini disebabkan oleh adanya hidrogen peroksida yang dihasilkan dan terakumulasi di dalam madu yang ditambah air (diluted honey). Zat yang dikenal dengan daya antiseptiknya ini merupakan suatu hasil samping dari pembentukan asam glukosa oleh enzim glukosa oksidase. Peroksida dapat menghambat pertumbuhan bakteri tertentu dalam madu yang sudah dicampur air. Besar peroksida tergantung pada banyak faktor seperti aktivitas enzim, ketersediaan oksigen,

dan kadar materi yang merusak peroksida itu sendiri. Sedangkan kadar inhibine (akumulasi peroksida) dalam menghambat bakteri sangat tergantung pada tipe tanaman, umur madu, dan panas (Withe, 1980).

Anonymous (2005) menyebutkan bahwa tujuh spesies bakteri yang umumnya terlibat dalam infeksi luka telah diuji sensitivitasnya terhadap aktivitas antibakteri madu. Dua bentuk aktivitas antibakteri yang utama diteliti secara terpisah: madu dengan tingkat rata-rata karena hidrogen peroksida dan madu tanpa aktivitas peroksida; juga madu manuka dengan tingkat rata-rata tanpa aktivitas peroksida, dengan tambahan katalis penghilang hidrogen peroksida. Hasil dari penelitian ini disajikan pada **Tabel 2**.

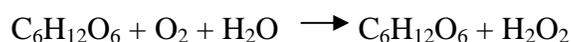
**Tabel 2.** Konsentrasi minimum madu (% v/v) dalam medium pertumbuhan yang diperlukan untuk sepenuhnya menghambat pertumbuhan berbagai spesies bakteri yang menginfeksi luka.

| Species Bakteri               | Madu Manuka | Madu lain |
|-------------------------------|-------------|-----------|
| <i>Escherichia coli</i>       | 3.7         | 7.1       |
| <i>Proteus mirabilis</i>      | 7.3         | 3.3       |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 10.8        | 6.8       |
| <i>Salmonella typhimurium</i> | 6.0         | 4.1       |
| <i>Serratia marcescens</i>    | 6.3         | 4.7       |
| <i>Staphylococcus aureus</i>  | 1.8         | 4.9       |
| <i>Streptococcus pyogenes</i> | 3.6         | 2.6       |

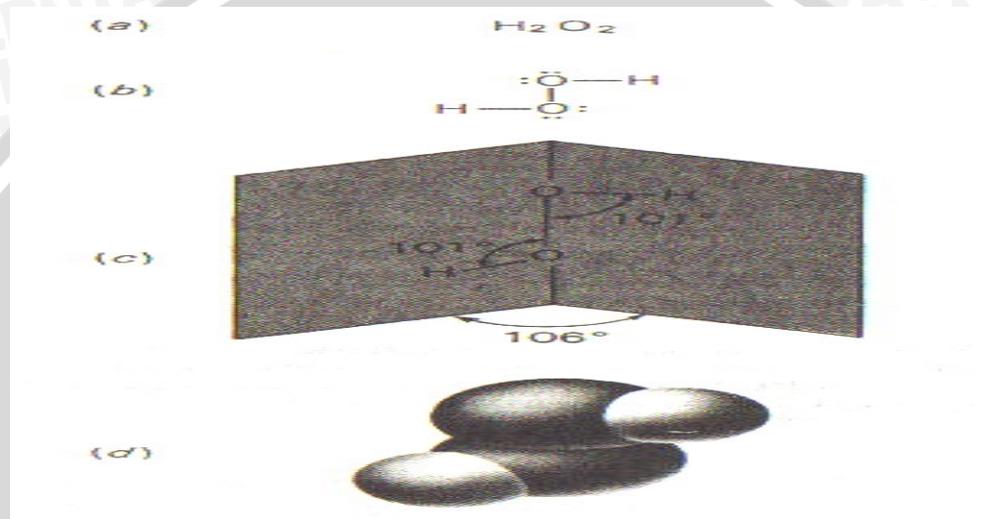
Secara keseluruhan terdapat sedikit perbedaan antara kedua tipe aktivitas antibakteri dalam hal efektivitasnya, meski sejumlah spesies lebih sensitive terhadap aksi salah satu tipe aktivitas antibakteri madu dibanding tipe aktivitas madu yang lain.

Hasil ini oleh karenanya menunjukkan bahwa madu-madu ini sekalipun dicairkan sampai sepuluh kali masih dapat sepenuhnya menghambat pertumbuhan semua spesies bakteri utama yang menginfeksi luka. Bahkan perlu diketahui bahwa madu manuka, dengan tingkat aktivitas anti bakteri rata-rata, meski dilarutkan sampai 54 kali volum cairannya masih dapat sepenuhnya menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*, salah satu spesies penginfeksi luka yang utama yang terkenal resisten terhadap antibiotik. Jadi, madu dapat digunakan sebagai obat alami yang lebih berkasiat untuk menghambat pertumbuhan sejumlah bakteri yang bersifat resisten terhadap antibiotik dan antiseptik. Lebih jauh lagi madu dikenal mempunyai aktivitas antibakteri yang tidak menyebabkan kerusakan jaringan sama sekali, bahkan malah dapat mempercepat proses kesembuhan luka (Anonymous, 2005).

Mekanisme aktivitas antibakteri madu disebabkan adanya hidrogen peroksida yang dihasilkan secara enzimatik di dalam madu. Hidrogen peroksida dan asam yang dihasilkan melalui reaksi: glukosa + H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub> → asam glukosa + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> berfungsi untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan juga untuk melindungi madu agar tidak rusak. Pada madu yang bercampur air aktivitas enzim justru meningkat menurut faktor 2.500 - 50.000 sedemikian rupa sehingga melepaskan antiseptik secara perlahan pada tingkat antibakteri namun tidak merusak jaringan (Anonymous, 1996). Menurut Fessenden *et al* (1986) menyebutkan bahwa glukosa yang bercampur air dan oksigen akan bereaksi menjadi asam glukosa dan hidrogen peroksida menurut reaksi di bawah ini:



Menurut Keenan *et al* (1996) Hidrogen peroksida berbentuk cair ( liquid ) tak berwarna dengan titik beku  $-0,41^{\circ}\text{C}$  dan titik didih  $151^{\circ}\text{C}$  serta mempunyai bobot molekul sebesar 34.015 sma. Zat ini bersifat larut di dalam air. Struktur umum molekul hidrogen peroksida disajikan pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Struktur Molekul Hirogen Peroksida

### 2.3 Uji efektivitas antimikroba secara *in vitro*

Beberapa bahan antimikrobia bersifat menghambat bila digunakan dalam konsentrasi kecil dan dapat membunuh bila digunakan dalam konsentrasi rendah dan dapat membunuh bila digunakan dalam konsentrasi tinggi, oleh karena itu MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MKC (*Minimum Killing Concentration*) bahan antimikrobia terhadap mikroorganisme perlu diketahui lebih dulu (Lay, 1994).

Kepekaan mikroorganisme ditentukan berdasarkan nilai MIC, yakni nilai konsentrasi minimal untuk menghambat pertumbuhan bakteri dan MKC, yakni konsentrasi minimal untuk membunuh bakteri. Penentuan kepekaan bakteri terhadap

suatu obat adalah penentuan kadar obat terkecil yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara *in vitro*. Pada prinsipnya metode penentuan kepekaan bakteri terhadap antibiotik meliputi dua metode dasar yang dapat digunakan yaitu metode difusi disk agar atau yang lebih sering dikenal dengan metode cakram dan metode pengenceran tabung (Bonang dan Koeswardono, 1982).

### 2.3.1 Metode difusi disk agar atau metode cakram

Uji ini diperkenalkan oleh William Kirby dan Alfred Bauer pada tahun 1966. Pada uji ini lempengan agar disemai dengan mikroorganisme penguji. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba dapat dilihat sebagai wilayah bening di sekeliling pertumbuhan mikroorganisme (Djaya, 2001).

Cara cakram ini menghasilkan kategori sensitivitas terhadap antimikroba berdasarkan difusi antimikroba dari cakram kertas ke dalam agar. Nilainya dilaporkan dalam istilah organisme yang sensitif (S), resisten (R) dan intermediate atau tidak dapat ditentukan (I), yang didasarkan atas parameter penghambatan (Edberg *at al*, 1986).

Menurut Bonang dan Koeswardono (1982) bahwa lebar daerah hambatan ini tergantung pada daya resap obat ke dalam agar dan kepekaan kuman terhadap obat tersebut, sedangkan kategori sensitivitas antibiotik terhadap bakteri adalah sebagai berikut :

- Sensitif : Jika lebar daerah hambatan berikut kertas cakram lebih besar dari 7 mm

- Intermediate : Jika lebar daerah hambatan berikut kertas cakram sama dengan 7 mm
- Resisten : Jika lebar daerah hambatan berikut kertas cakram lebih kecil dari 7mm.



### III MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Bahan penelitian

- Biakan murni bakteri *Aeromonas hydrophila*
- Madu
- TSA (Tryptic Soy Agar)
- NB (Nutrient Broth)
- Alkohol
- Aquades
- Kertas perkamen
- Benang
- Kapas
- Tissue
- Kertas cakram (paper disc) berdiameter 6 mm
- Spiritus
- Kertas label

##### 3.1.2 Alat penelitian

- Petri dish
- Tabung reaksi + rak
- Pinset
- Timbangan analitik
- Inkubator

- Penggaris
- Jarum ose
- Pipet tetes
- Pipet volum
- Karet Penghisap
- Erlenmeyer
- Bunsen
- Autoclave
- Mikroskop
- Object glass
- Cover glass
- Gelas ukur
- Lemari es
- Botol film
- Kompor gas

### **3.2 Metode Penelitian dan Rancangan Percobaan**

#### **3.2.1 Metode Penelitian**

Metode Penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen, yakni suatu metode penelitian dengan melakukan percobaan untuk memperoleh suatu hasil. Hasil yang diperoleh menjelaskan bagaimana hubungan kausal (sebab-akibat) antara variable-variabel yang diselidiki sekaligus untuk mengetahui seberapa besar hubungan kausal tersebut dengan cara memberi perlakuan-perlakuan tertentu pada sejumlah kelompok eksperimen dan menyediakan faktor kontrol sebagai bahan perbandingan.

Teknik pengumpulan data (Data Collecting) dilakukan melalui observasi langsung, yakni suatu teknik pengumpulan data dengan menggunakan mata tanpa menggunakan bantuan alat standar yang lain (Nazir, 1988)

Pengambilan sampel dilakukan secara acak, yakni pengambilan sampel yang dilakukan sedemikian rupa sehingga tiap anggota populasi atau individu memiliki kemungkinan yang sama untuk terpilih sebagai anggota sampel (Sastrosupadi, 1977).

Pembacaan efektivitas madu dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah dengan mengukur diameter daerah hambatan di sekitar kertas cakram yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan atau aktivitas bakteri ( berwarna bening).

### **3.2.2 Rancangan penelitian**

Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan penelitian ini digunakan karena media yang digunakan bersifat homogen, artinya keragaman antara satuan percobaan kecil, sehingga yang berpengaruh terhadap hasil penelitian hanyalah perlakuan dan faktor kebetulan.

Penelitian pendahuluan terdiri atas 5 faktor perlakuan ditambah dengan 1 faktor control dengan 3 kali ulangan. Perlakuan berupa perbedaan konsentrasi ekstrak madu, yakni:

A= konsentrasi madu 30%

B= konsentrasi madu 35%

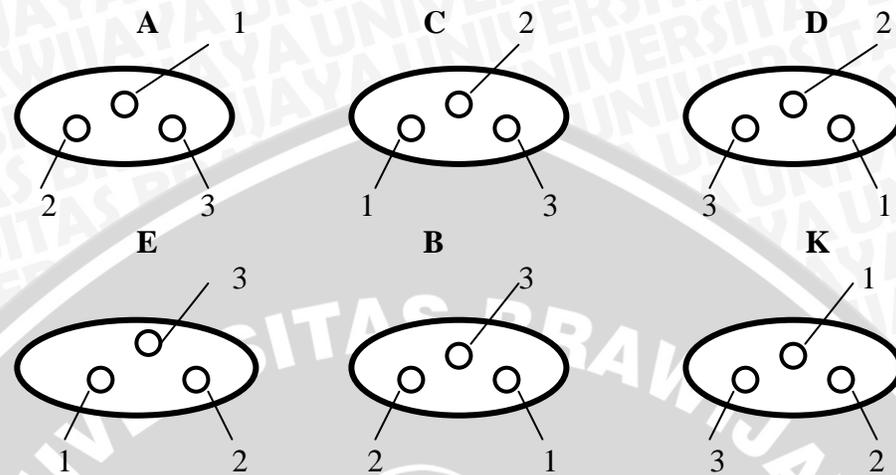
C= konsentrasi madu 40%

D= konsentrasi madu 45%

E= konsentrasi madu 50%

K= konsentrasi madu 0% (kontrol)

Ulangan dilakukan sebanyak 3 kali untuk setiap perlakuan. Penempatan perlakuan secara acak diperoleh denah penelitian disajikan pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Denah Penelitian

Keterangan :

- ✓ A,B,C,D,E = Konsentrasi perlakuan
- ✓ 1,2,3 = Ulangan
- ✓ K = Kontrol

### 3.3 Prosedur penelitian

#### 3.3.1 Persiapan penelitian

##### a. Sterilisasi alat dan bahan (Dwijosoeputro, 1987):

- Alat-alat yang akan disterilkan dibungkus dengan kertas perkamen, kemudian diikat dengan benang.
- Air dituangkan secukupnya ke dalam autoclave, kemudian bahan-bahan dan peralatan yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam autoclave.
- Autoclave ditutup kemudian baut-baut dikencangkan dengan rapat.
- Autoclave dihubungkan dengan sumber listrik, kemudian tombol autoclave dihidupkan dengan cara ditekan sampai lampu indikator menyala.

- Bila lampu indikator menyala secara otomatis, maka hal ini merupakan tanda bahwa tekanan di dalam autoclave telah mencapai titik jenuh. Selanjutnya kran pada autoclave dibuka untuk mengurangi tekanan udara. Bila tekanan udara dirasa tidak jenuh, tekan tombol sehingga lampu indicator kembali menyala, kemudian tutup lagi kran pipa uap.
- Keadaan tekanan uap jenuh dapat terjadi berulang kali hingga suhu mencapai  $121^{\circ}\text{C}$  dan manometer menunjukkan angka tekanan 1 atm. Keadaan ini dipertahankan hingga  $\pm 15$  menit.
- Aliran listrik pada autoclave dilepaskan, kemudian kran uap air dibuka sampai manometer menunjukkan angka nol.
- Autoclave dibuka dengan cara memutar baut yang ada pada tutup autoclave.
- Alat dan bahan yang sudah steril diambil dan disimpan dalam incubator, bahan yang sudah steril disimpan dalam almari pendingin.

**b. Pembuatan media**

- Pembuatan media cair Nutrient Broth (NB)
- NB sebanyak 2 gram dilarutkan dalam 250 ml aquades dalam sebuah Erlenmeyer selanjutnya diaduk sampai larut sempurna atau hingga berwarna bening.
- Erlenmeyer ditutup kapas dan dibungkus dengan kertas perkamen lalu diikat dan disterilkan di dalam autoclave pada suhu  $121^{\circ}$  dan tekanan 1 atm selama  $\pm 15$  menit.

- Media yang akan digunakan untuk biakan murni bakteri *Aeromonas hydrophilla* dibiarkan sampai dingin sebab media yang masih panas dapat membuat bakteri yang diinokulasi mati.
- Media kemudian disimpan dalam lemari pendingin agar dapat bertahan lama.
- Pembuatan Media Tryptic Soy Agar (TSA)
  - 40 gram TSA dilarutkan dalam 1 L aquades.
  - Dididihkan sampai larut sempurna dan disterilkan dalam autoclave.
  - Dituang ke dalam cawan Petri (petridish) steril masing-masing 12,5 ml.
  - Dibiarkan dingin dalam bentuk padat kemudian disimpan dalam lemari pendingin.

**c. Pembuatan biakan murni *Aeromonas hydrophila***

- Jarum ose dipanaskan di atas pembakar Bunsen sampai berpijar kemudian setelah dingin disentuh pada koloni bakteri *Aeromonas hydrophila* untuk diambil sebanyak 1 jarum ose.
- Dioleskan pada permukaan media TSA kemudian petridish ditutup sambil sekelilingnya dipanaskan di atas Bunsen dan jarum ose dipanaskan lagi agar senantiasa steril.
- Media berisi bakteri *Aeromonas hydrophila* selanjutnya diinkubasi pada suhu 28<sup>0</sup> C.

### 3.3.2 Pelaksanaan penelitian

Salah satu cara untuk menguji antimikrobia dapat dilakukan dengan uji cakram. Metode ini digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

#### Uji cakram

Uji cakram dilakukan untuk mengetahui seberapa besar daya hambat yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung madu dengan konsentrasi yang sesuai dengan perlakuan. Langkah-langkah uji cakram adalah sebagai berikut:

- Biakan murni *Aeromonas hydrophila* ditanam sebanyak 5 inokulum dalam 4 ml media cair (NB) dan diinkubasi pada suhu 35<sup>0</sup> C selama 2-5 jam hingga terbentuk kekeruhan yang sama dengan standar Mc Farland II atau setara dengan 6 x 10<sup>8</sup> sel / ml.
- Biakan cair yang mengandung bakteri dicelupi kapas steril dan ditekan di dinding tabung reaksi untuk memeras kelebihan cairan kemudian diusapkan pelan-pelan pada seluruh permukaan TSA secara merata dan dibiarkan selama 15-30 menit.
- Kertas cakram yang telah dicelup madu dengan konsentrasi yang berbeda (Tabel II) diletakkan pada media TSA dengan menggunakan pinset sambil ditekan agar meresap pada agar dengan baik.
- Pembacaan hasil dilakukan setelah diinkubasi pada suhu 30<sup>0</sup> C selama 18-24 jam dengan cara mengukur diameter daerah hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram.

**Tabel 3.** Penentuan Dosis Perlakuan Madu untuk Uji Daya Antibakteri dengan Metode Cakram.

| Dosis (%) | Larutan Madu (ml) | Aquades (ml) |
|-----------|-------------------|--------------|
| Kontrol   | 0                 | 10           |
| 5         | 0,5               | 9,5          |
| 10        | 1,0               | 9,0          |
| 15        | 1,5               | 8,5          |
| 20        | 2,0               | 8,0          |
| 25        | 2,5               | 7,5          |
| 30        | 3,0               | 7,0          |
| 35        | 3,5               | 6,5          |
| 40        | 4,0               | 6,0          |

### 3.4 Parameter

#### 3.4.1 Parameter uji

Parameter uji yang digunakan disini adalah parameter kuantitatif, yakni data diperoleh dengan mengukur diameter daerah hambatan madu terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

#### 3.4.2 Parameter penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini adalah suhu inkubator dan pH media yang juga merupakan faktor yang berpengaruh pada pertumbuhan bakteri.

### 3.5 Analisa data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variable bebas) terhadap respon parameter yang diukur (variable tak bebas) digunakan analisa keragaman atau uji F. Apabila nilai F berbeda nyata dan berbeda sangat nyata dilanjutkan dengan uji BNT (Beda nyata terkecil) untuk menentukan perlakuan yang memberikan respon terbaik pada taraf 0,05 (derajat kepercayaan 95%).

Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil yang dipengaruhi digunakan analisa regresi yang bertujuan untuk menentukan sifat dan fungsi regresi yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan yang terbaik pada respon.



## IV HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Pemiakan kultur murni bakteri *Aeromonas hydrophila*

Pada penelitian ini bakteri *Aeromonas hydrophila* dikultur dengan jalan sebagai berikut:

- Jarum ose dipanaskan di atas pembakar Bunsen sampai berpijar kemudian setelah dingin disentuh pada koloni bakteri *Aeromonas hydrophila* untuk diambil sebanyak 1 jarum ose.
- Dioleskan pada permukaan media TSA kemudian petridish ditutup sambil sekelilingnya dipanaskan di atas bunsen dan jarum ose dipanaskan lagi agar tetep steril.
- Media berisi bakteri *Aeromonas hydrophila* selanjutnya diinkubasi pada suhu 28<sup>0</sup> C selama 18-24 jam kemudian dapat disimpan dalam lemari es agar tidak terkontaminasi.

### 4.2 Kadar hambat minimum madu dengan metode cakram

Lorian (1980) dalam Rochani (2000) menyatakan bahwa apabila pada media TSA yang sudah terkena obat masih ditumbuhi bakteri, maka dosis tersebut masih bersifat bakteriostatik sedangkan apabila tidak terlihat pertumbuhan bakteri maka bersifat bakterisidal. Dari hasil uji kadar hambat minimum dengan metode cakram, didapatkan bahwa konsentrasi minimal madu yang mampu menghambat bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah 40 % dimana mulai dosis ini bakteri tidak tumbuh lagi sedang konsentrasi 5 % sampai dengan 35 % bakteri masih tumbuh pada media TSA. Namun, mulai dosis 30 % sudah terlihat adanya diameter daerah hambat yakni lingkaran bening

di sekitar kertas cakram. Hasil uji kadar hambat minimum madu terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 4.** Kadar Hambat Minimum Madu Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*

| Dosis (%) | Pertumbuhan bakteri |
|-----------|---------------------|
| 5         | +                   |
| 10        | +                   |
| 15        | +                   |
| 20        | +                   |
| 25        | +                   |
| 30        | -                   |
| 35        | -                   |
| 40        | -                   |
| K         | +                   |

Keterangan :

- + : ada pertumbuhan bakteri
- : tidak ada pertumbuhan bakteri
- K : kontrol media dan bakteri

#### 4.3 Daya antibakterial madu (Metode Cakram)

Percobaan daya antibakterial madu terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan metode cakram menunjukkan bahwa madu dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Hal ini dapat dilihat dengan munculnya daerah hambat di sekitar kertas cakram yang telah diberi madu. Diameter daerah hambat yang terbentuk dari berbagai dosis madu terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* disajikan pada Tabel 5.

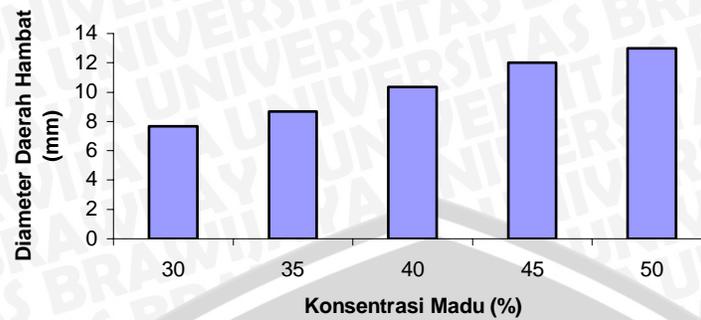
Resistensi kuman terhadap madu belum ada standarnya sehingga belum dapat ditentukan apakah bakteri *Aeromonas hydrophila* termasuk dalam kategori resisten, intermediate, ataukah sensitif terhadap madu. Namun demikian, dari penelitian ini dapat dilihat bahwa madu dengan konsentrasi yang berbeda terbukti berpengaruh terhadap lebar

daerah hambat yang terbentuk sebagaimana disajikan pada Lampiran 1 melalui analisa sidik ragam.

**Tabel 5.** Diameter Daerah Hambat untuk Masing-Masing Perlakuan

| Konsentrasi Madu (%) | Diameter Daerah Hambat (mm) |
|----------------------|-----------------------------|
| 0 (kontrol)          | 0,000                       |
| 30                   | 7,667                       |
| 35                   | 8,667                       |
| 40                   | 10,333                      |
| 45                   | 12,000                      |
| 50                   | 13,000                      |

Berdasarkan Tabel 5 di atas diketahui bahwa semakin tinggi konsentrasi madu maka semakin besar diameter daerah hambatnya. Peningkatan diameter daerah hambat bakteri *Aeromonas hydrophila* oleh madu ini terutama dikarenakan madu mempunyai kandungan gula yang tinggi sehingga semakin pekat madu atau semakin tinggi dosis madu yang digunakan maka semakin besar daya hambatnya. Selain itu, kandungan hidrogen peroksida di dalam madu dapat mengambil alih peran gula madu dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* apabila gula madu dilarutkan oleh cairan tubuh sel bakteri (Withe, 1980). Nilai peningkatan diameter daerah hambat dapat dilihat melalui diagram batang hubungan antara konsentrasi madu dengan diameter daerah hambat sebagaimana disajikan pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Diagram Batang Hubungan antara Konsentrasi Madu dengan Diameter Daerah Hambat

Pada Gambar 3 ditunjukkan diameter daerah hambat yang berbeda-beda pada perlakuan konsentrasi madu yang berbeda. Untuk mengetahui perlakuan yang terbaik dilakukan uji beda nyata terkecil dan hasilnya ditunjukkan oleh notasi. Perbedaan notasi tiap-tiap perlakuan disajikan pada Tabel 5.

**Tabel 6.** Daftar Uji BNT Daya Hambat Madu dengan Konsentrasi Berbeda Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*

| Konsentrasi (%) | Diameter Daerah Hambat (mm) | Notasi |
|-----------------|-----------------------------|--------|
| 30              | 7,667                       | a      |
| 35              | 8,667                       | a      |
| 40              | 10,333                      | ab     |
| 45              | 12,000                      | b      |
| 50              | 13,000                      | b      |

Dari hasil uji dapat diketahui bahwa perlakuan A, yaitu dosis 30% memberikan pengaruh yang sama dengan perlakuan B dan C, yaitu berturut-turut 35% dan 40%. Sedangkan perlakuan D dengan dosis 45% memberikan pengaruh yang sama dengan

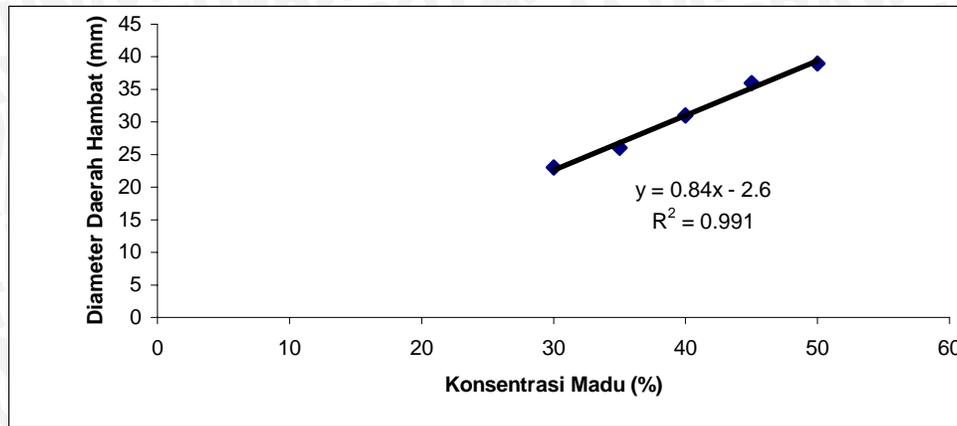
perlakuan E dengan dosis 50%. Beberapa faktor yang menyebabkan persamaan ini antara lain adalah :

1. Peletakan kertas cakram yang kurang ditekan sehingga obat (madu) kurang meresap dalam media agar.
2. Daya tumbuh bakteri *Aeromonas hydrophilla* yang belum optimal
3. Kepekaan / sensitifitas bakteri terhadap obat karena bakteri mempunyai kisaran ketahanan tertentu terhadap antimikroba.

Konsentrasi 30%, 35% dan 40% tidak berbeda satu sama lain yakni hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophilla* (bakteriostatik) dalam jangka waktu tertentu. Sedangkan kemampuan madu dengan dosis 45% dan 50% dapat menghentikan pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophilla* sehingga bersifat bakterisidal atau mampu merusak sel bakteri.

Sel bakteri sebagian besar tersusun atas protein, dan semua reaksi metabolisme sel dipercepat oleh katalis berupa enzim. Kandungan asam glukosa yang tinggi di dalam madu (pH 3,2-4,5) sedangkan kisaran pH tumbuhnya bakteri adalah 7,2-7,4 menyebabkan protein mengalami proses denaturasi melalui perubahan struktur molekul madu sehingga protein sel bakteri tidak dapat melakukan aktivitas dan akhirnya mati. Di samping itu, efek osmosis yang ditimbulkan oleh kadar gula madu yang tinggi menyebabkan pengeringan bakteri.

Hubungan antara konsentrasi madu dengan diameter daerah hambat dengan analisa regresi linier disajikan pada Lampiran 3. Dari hasil analisa ini didapatkan persamaan garis linier  $Y = -2,6 + 0,84x$  dan koefisien korelasi  $r = 0,991$ . grafik hubungan konsentrasi madu dengan diameter daerah hambat disajikan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Grafik Hubungan antara Konsentrasi Madu dengan Diameter Daerah Hambat

#### 4.4 Lingkungan hidup Bakteri *Aeromonas hydrophila*

- **Derajat Keasaman**

pH merupakan ukuran aktivitas ion hidrogen ( $H^+$ ). Pada larutan encer, koefisien aktifitasnya mendekati 1 sedangkan aktivitas ion  $H^+$  merupakan konsentrasinya (Sugianto, 1992). Dari hasil pengukuran pH media dengan pH paper, pH media pada saat cair adalah 7. Kondisi ini sesuai untuk pertumbuhan bakteri dimana pH 5 sampai 9 merupakan kisaran pH yang baik untuk pertumbuhan bakteri (Dwijoseputro, 1987).

- **Suhu**

Suhu inkubasi sangat mempengaruhi laju pertumbuhan bakteri karena mempengaruhi laju semua reaksi selular dan pola metabolik, nutrisi dan komposisi sel bakteri (Sugianto, 1992). Volk dan Wheeler (1988) menyatakan bahwa bakteri *Aeromonas hydrophilla* tergolong ke dalam bakteri mesophilia, yaitu bakteri yang dapat hidup pada kisaran suhu  $5^{\circ}C$  sampai  $50^{\circ}C$ . Pada penelitian ini suhu inkubator dibuat  $37^{\circ}C$  sedangkan suhu maksimum untuk perkembangan bakteri ini adalah  $38^{\circ}C$  sampai  $41^{\circ}C$  dan kisaran suhu minimum untuk pertumbuhannya adalah  $0^{\circ}$  sampai  $5^{\circ}$ .



## V KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh madu dengan konsentrasi yang berbeda terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*, maka dapat disimpulkan hal - hal sebagai berikut:

- Madu dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* secara in vitro.
- Semakin tinggi konsentrasi madu maka semakin besar pula diameter daerah hambatnya.
- Konsentrasi madu 30% sampai dengan 40% mampu menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* (bakteriostatis) sedangkan konsentrasi 45% sampai dengan 50% mampu membunuh bakteri *Aeromonas hydrophila* (bakterisidal).
- Hubungan antara konsentrasi madu dengan diameter daerah hambat digambarkan melalui persamaan regresi  $Y = - 2,6 + 0,84 X$  dengan koefisien korelasi  $r = 0,991$ .

### 5.2 SARAN

Berdasarkan hasil penelitian ini disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian madu secara langsung terhadap ikan yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* ( in vivo). Di samping itu, perlu dilakukan pula penelitian tentang sensitivitas bahan - bahan alami terhadap bakteri.

## DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 1996. **Honey Ancient Cure**.<http://www.woundcare.org>. 12 hal
- 1996. **Potential Uses of Honey as an Antimicrobial Agent**.  
[http://www.healinghoney.co.nz/potential\\_uses.cfm](http://www.healinghoney.co.nz/potential_uses.cfm). 2 hal.
- 1998. **Wound Healing Honey**.  
[http://www.weeksmd.com/articles/aphitheraphy/Honey and Wound Healing 3 articles.html](http://www.weeksmd.com/articles/aphitheraphy/Honey%20and%20Wound%20Healing%20articles.html). 18 hal.
- 2002. **Honey as an Antimicrobial Agent**. <http://www.honey.bio.waikato.ac.nz> .  
23 hal.
- 2004. **What is The Chemical Composition of Honey?.** <http://www.thenaturalshopper.com/beeproductinfo/honey.htm>. 27 hal.
- 2005. **Effectiveness against Wound - Infecting Species of Bacteria**.  
<http://www.healinghoney.co.nz/woundinfection.cfm>. 2hal.
- Afrianto, E. dan E. Liviawaty, 1992. **Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 89 hal.
- Bonang, G. dan Koeswardono E.S. 1982. **Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik**. PT Gramedia. Jakarta. 199 hal.
- Djaya, A.G. 2001. **Studi Pengaruh Penggunaan Rhodobacter spp Terhadap Vibrio spp Sebagai Bahan Alternatif Probiotik Secara In Vitro**. Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 167 hal.
- Dwijoseputro. D. 1987. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Penerbit Djambatan. Malang. 214 hal.
- Edberg. S.C. 1986. **Tes Kerentanan Antimikroba In Vitro dalam Edberg,S.C. and Berger, S.A. 1986. Antibiotik dan Infeksi**. Alih Bahasa : Sanusi, C. CV.G.C. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 219 hal.
- Fadjar, M. 1989. **Budidaya Perairan Intensif**. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 83 hal.
- Fessenden, R. J. dan F. Junior. 1986. **Kimia Organik**. Jilid 2. Penerbit Erlangga. Jakarta. 525 hal.

- Floyd, R. F. 2002. **Aeromonas Infections**. IFAS Extension Veterinarian, Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences. University of Florida. 5 hal
- Holt. J.G. 1979. **The Shorter Bergeys Manual of Determinative Bacteriology**. The Williams and Willans Company. New York. 356 hal.
- Keenan, C. W., D. Kleinfelter, and J. Wood . 1996. **Ilmu Kimia untuk Universitas**. Penerbit Erlangga. Jakarta. 691 hal.
- Koesumadinata, S. 1978. **Pengantar Dasar-Dasar Cara Pemberantasan dan Pencegahan Hama dan Penyakit Ikan**. Bogor. 55 hal.
- Lorian. 1980. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. William and Wilkins. Baltimore. Dalam Rochani, 2000. **Pemanfaatan Rimpang Kunyit (*Curcuma domestika*) Bagi Alternatif Pengendalian Penyakit *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)**. Tesis, Program Pascasarjana. Universitas Brawijaya. Malang. 79 hal.
- Lay, W., Babiana dan H. Sugyo. 1994. **Analisis Mikroba di Laboratorium**. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 168 hal.
- Lesmana, S.D. dan I. Dermawan. 2001. **Budidaya Ikan Hias Air Tawar Populer**. Penerbit PT Penebar Swadaya. Jakarta. 160 hal.
- Moeller, R.B. 2005. **Bacterial Diseases of Fish**. [http://www.chiclid\\_forum.com/articles/diseases\\_bacterial.php](http://www.chiclid_forum.com/articles/diseases_bacterial.php). 7 hal.
- Muhlisah, F. 1999. **Taman Obat Keluarga**. Penebar Swadaya. Jakarta. 68 hal.
- Nazir. 1988. **Metode Penelitian**. Penerbit Graha Indo. 661 hal.
- Prajitno, A. 1996. **Penggunaan Vaksin *Aeromonas hydrophila* Terhadap Ikan Mas Koki (*Cyprinus carpio*)**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 22 hal.
- Rochani, 2000. **Pemanfaatan Rimpang Kunyit (*Curcuma domestika*) Bagi Alternatif Pengendalian Penyakit *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*)**. Tesis, Program Pascasarjana. Universitas Brawijaya. Malang. 79 hal.
- Sastrosupadi, A. 1977. **Statistik Percobaan Lembaga Penelitian Tanaman Industri Badan Penelitian dan Pengembangan Pertanian**. Departemen Pertanian. Malang. 67 hal.

Sukanda, N. 2002. **Pembudidayaan Ikan Mas di Jawa Barat Yang Nyaris Punah Akibat Serangan Penyakit Mendadak, Aeromonas sejenis Bakteri Gram Negatif, bukan Virus.** <http://www.kompas.com>. 5 hal.

Volk, W.A. and F. Wheeler. 1988. **Mikrobiologi Dasar.** Alih Bahasa: Markham. Edisi 5. Penerbit Erlangga. Jakarta. 396 hal.

Wattiheluw, N. 2002. **Studi Pembudidayaan Usaha Budidaya Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepenus*) dan Budidaya Ikan Gurami (*Ospronemus gouramy*) di Desa Dukuh Tengah Kecamatan Bududan Kabupaten Sidoarjo Propinsi Jawa Timur.** Universitas Brawijaya. Malang. 67 hal.

Withe, J.W. and L. Doner, 1980. **Honey Composition and Properties.** <http://www.beesource.com/pov/usda/beeep USA82.htm>. 27 hal.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Analisa data

#### 1. Data Diameter Hambatan

| Perlakuan (%) | Ulangan |    |    | Total | Rata-rata |
|---------------|---------|----|----|-------|-----------|
|               | 1       | 2  | 3  |       |           |
| A=30          | 8       | 7  | 8  | 23    | 7,667     |
| B=35          | 9       | 10 | 7  | 26    | 8.667     |
| C=40          | 10      | 12 | 9  | 31    | 10,333    |
| D=45          | 9       | 14 | 13 | 36    | 12,000    |
| E=50          | 13      | 14 | 12 | 39    | 13,000    |
| Jumlah        |         |    |    | 155   |           |

#### 2. Perhitungan Jumlah Kuadrat (JK)

- Faktor Koreksi (FK) =  $G^2 / N = (155)^2 / 15 = 1601,667$
- JK Total =  $(A_1)^2 + \dots + (E_3)^2 - FK$   
 $= (8)^2 + \dots + (12)^2 - 1601,667$   
 $= 1687 - 1601,667$   
 $= 85,333$
- JK Perlakuan =  $\{ (\Sigma A)^2 + \dots + (\Sigma E)^2 \} / 3 - FK$   
 $= \{ (23)^2 + \dots + (39)^2 \} / 3 - 1601,667$   
 $= 1661 - 1601,667 = 59,333$
- JK Acak = JK Total - JK Perlakuan  
 $= 85,333 - 59,333$   
 $= 26$

**Lampiran 1. (lanjutan)**

## 3. Daftar Sidik Ragam

| Sumber Keragaman | db | JK     | KT     | F hit  | F tabel |      |
|------------------|----|--------|--------|--------|---------|------|
|                  |    |        |        |        | 5%      | 1%   |
| Perlakuan        | 4  | 59,333 | 14,833 | 5,705* | 3,48    | 5,99 |
| Acak             | 10 | 26     | 2,6    |        |         |      |
| Total            | 14 | 85,333 |        |        |         |      |

Keterangan:

- \* Menunjukkan berbeda nyata
- $db = n - 1$
- $KT = JK / db$
- $F \text{ hit} = KT \text{ Perlakuan} / KT \text{ Acak}$

Karena  $F \text{ hitung} > F 5\%$  maka perlakuan pemberian madu dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Oleh karena itu dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perlakuan yang berbeda.

## Lampiran 2. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

### 1. Perhitungan BNT

$$\text{BNT} = \sqrt{(2KT \text{ Acak} / R)} = \sqrt{(2 \times 2,6 / 3)} = \sqrt{1,733} = 1,316$$

$$\text{BNT } 5\% = t \text{ table } 5\% (\text{db acak}) \times \text{BNT}$$

$$= 2,228 \times 1,316$$

$$= 2,933$$

$$\text{BNT } 1\% = t \text{ table } 1\% (\text{db acak}) \times \text{BNT}$$

$$= 3,169 \times 1,316$$

$$= 4,170$$

### 2. Daftar Mean Different

| Mean       | A = 7,667           | B = 8,667           | C = 10,333          | D=12,000            | E=13,000 | Notasi |
|------------|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------|----------|--------|
| A = 7,667  | -                   |                     |                     |                     |          | a      |
| B = 8,667  | 1,000 <sup>ns</sup> | -                   |                     |                     |          | a      |
| C = 10,333 | 2,666 <sup>ns</sup> | 1,666 <sup>ns</sup> | -                   |                     |          | a      |
| D = 12,000 | 4,333 <sup>**</sup> | 3,333 <sup>*</sup>  | 1,667 <sup>ns</sup> | -                   |          | ab     |
| E = 13,000 | 5,333 <sup>**</sup> | 4,333 <sup>**</sup> | 2,667 <sup>ns</sup> | 1,000 <sup>ns</sup> | -        | ab     |

Keterangan:

ns = Tidak berbeda nyata

\* = Berbeda nyata

\*\* = Berbeda sangat nyata

Urutan perlakuan yang terbaik adalah perlakuan E / D → C / B / A

### Lampiran 3. Perhitungan Analisa Regresi

Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dengan hasil yang dipengaruhi digunakan perhitungan analisa regresi, yang bertujuan untuk menentukan sifat regresi yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan yang terbaik pada respon.

#### 1. Daftar Polinomial Ortogonal

| Perlakuan (%)        | Data (Ti) | Pembanding Untuk Regresi (Ci) |           |       |         |
|----------------------|-----------|-------------------------------|-----------|-------|---------|
|                      |           | Linier                        | Kuadratik | Kubik | Kuartik |
| A = 30               | 23        | -2                            | 2         | -1    | 1       |
| B = 35               | 26        | -1                            | -1        | 2     | -4      |
| C = 40               | 31        | 0                             | -2        | 0     | 6       |
| D = 45               | 36        | 1                             | -1        | -2    | -4      |
| E = 50               | 39        | 2                             | 2         | 1     | 1       |
| $Q = \sum (CiTi)$    |           | 42                            | 0         | -14   | -4      |
| $Kr = \sum (Ci^2) r$ |           | 30                            | 42        | 30    | 210     |
| $Jk = Q^2 / Kr$      |           | 58,800                        | 0         | 6,533 | 0,076   |

r = jumlah ulangan

#### 2. Daftar Sidik Ragam Regresi

| Sumber Keragaman | db | JK     | KT     | F hit               | F tabel |       |
|------------------|----|--------|--------|---------------------|---------|-------|
|                  |    |        |        |                     | 5%      | 1%    |
| Perlakuan        | 4  | 59,333 | 14,833 |                     |         |       |
| - Linier         | 1  | 58,800 | 58,800 | 22,615**            | 4,96    | 10,04 |
| - Kuadratik      | 1  | 0      | 0      | 0 <sup>ns</sup>     |         |       |
| - Kubik          | 1  | 6,533  | 6,533  | 2,513 <sup>ns</sup> |         |       |
| - Kuartik        | 1  | 0,076  | 0,076  | 0,029 <sup>ns</sup> |         |       |
| Acak             | 10 | 26     | 2,6    | -                   |         |       |

Berdasarkan Daftar Sidik Ragam Regresi, maka regresi yang paling sesuai adalah regresi linier karena F hitungnya > F 5%.

**Lampiran 4. Persamaan Regresi Linier, dengan rumus  $y = b_0 + b_1x$**

| Konsentrasi (%)<br>X       | Total (mm)<br>Y            | X - X<br>x | Y - Y<br>y | x * y | x <sup>2</sup> | y <sup>2</sup> |
|----------------------------|----------------------------|------------|------------|-------|----------------|----------------|
| 30                         | 23                         | -10        | -8         | 80    | 100            | 64             |
| 35                         | 26                         | -5         | -5         | 25    | 25             | 25             |
| 40                         | 31                         | 0          | 0          | 0     | 0              | 0              |
| 45                         | 36                         | 5          | 5          | 25    | 25             | 25             |
| 50                         | 39                         | 10         | 8          | 80    | 100            | 64             |
| $\sum X = 200$<br>$X = 40$ | $\sum Y = 155$<br>$Y = 37$ | 0          | 0          | 210   | 250            | 178            |

$$b_1 = \frac{\sum XY}{\sum X^2}$$

$$= 210 / 250 = 0,84$$

$$b_0 = Y - b_1X$$

$$= 31 - 0,84 (40)$$

$$= 31 - 33,6 = -2,6$$

Sehingga Persamaan Regresinya menjadi

$$Y = 0,84 x - 2,6$$

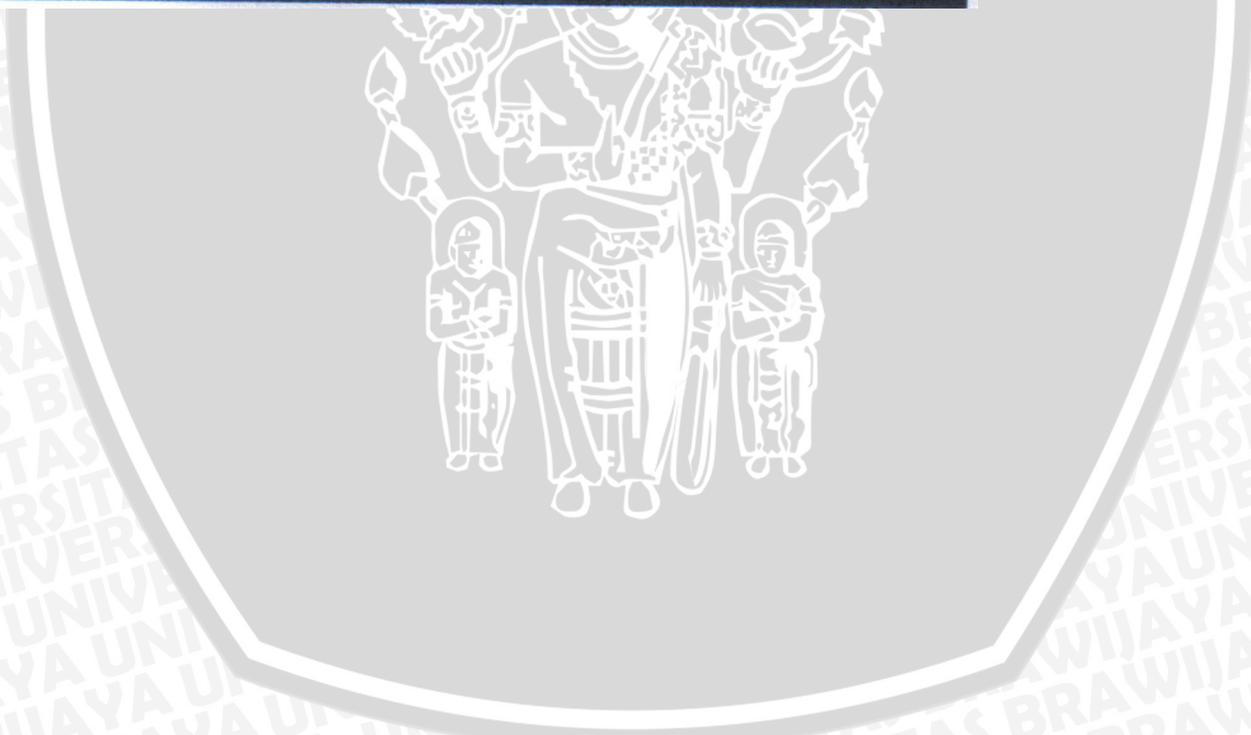
$$r = \frac{\sum XY - (\sum X * \sum Y) / n}{\sqrt{(\sum X^2 - (\sum X)^2 / n) (\sum Y^2 - (\sum Y)^2 / n)}}$$

$$= \frac{6410 - (200 * 155) / 10}{\sqrt{(\sum 8250 - 40000 / 5) (\sum 4983 - 24025 / 5)}}$$

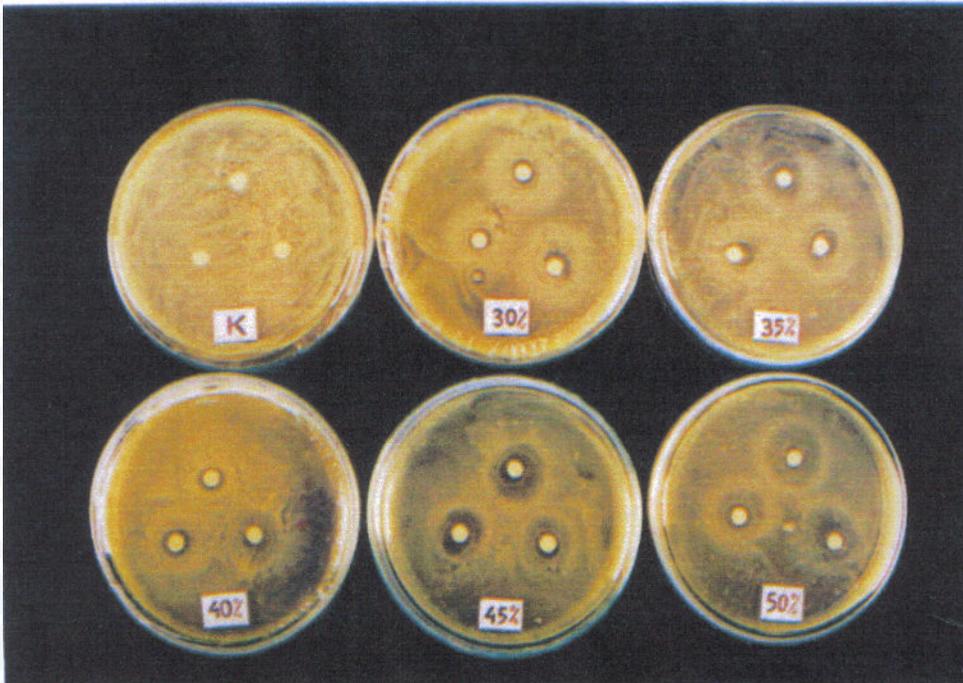
$$= 210 / 210,937 = 0,995$$



Lampiran 5. Biakan Murni *Aeromonas hydrophila* pada Media TSA



### Lampiran 6. Hasil Uji Cakram



Keterangan : A = Konsentrasi 30 %  
B = Konsentrasi 35 %  
C = Konsentrasi 40 %  
D = Konsentrasi 45 %  
E = Konsentrasi 50 %  
K = Konsentrasi 0 % (kontrol)

