

**UJI SENSITIVITAS EKSTRAK KASAR KULIT
JERUK LEMON (*Citrus limonum*) TERHADAP DAYA HAMBAT
BAKTERI *Aeromonas hydrophila* SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI
MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
(BUDIDAYA PERAIRAN)**

**OLEH :
RAFIQA HANUM
NIM. 0410852016**



**UNIVERSITAS BRAWIJAYA
FAKULTAS PERIKANAN
MALANG**

2007

**UJI SENSITIVITAS EKSTRAK KASAR KULIT
JERUK LEMON (*Citrus limonum*) TERHADAP DAYA HAMBAT
BAKTERI *Aeromonas hydrophila* SECARA *IN VITRO***

**Skripsi Sebagai Salah Satu Prasyarat untuk Memperoleh Gelar Sarjana Perikanan
pada Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang**

**OLEH :
RAFIQA HANUM
NIM. 0410852016**

DOSEN PENGUJI I

**(Ir. ARIEF PRAYITNO, MS)
TANGGAL :**

DOSEN PENGUJI II

**(Dr. Ir. MAFTUCH, MSi)
TANGGAL :**

**MENYETUJUI,
DOSEN PEMBIMBING I**

**(Ir. MARSOEDI, Ph. D)
TANGGAL :**

DOSEN PEMBIMBING II

**(Ir. SOELISTYOWATI)
TANGGAL :**

**MENGETAHUI,
KETUA JURUSAN**

**(Ir. ABDUL QOID, MS)
TANGGAL :**

RINGKASAN

RAFIQA HANUM. Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limonum*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro*. Di bawah Bimbingan **Ir. MARSOEDI Ph. D** dan **Ir. SOELISTYOWATI**.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Juni sampai September 2006. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak kasar kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* melalui daya hambat ekstrak kasar kulit jeruk lemon pada konsentrasi yang berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil dan rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), menggunakan 5 perlakuan konsentrasi ekstrak kasar kulit jeruk lemon yaitu : konsentrasi 0% (kontrol) (A), konsentrasi 3% (B), konsentrasi 6% (C), konsentrasi 9% (D) dan konsentrasi 12% (E), masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak kasar kulit jeruk lemon memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, yaitu 0% memberikan daerah hambatan sebesar 6,1 mm, konsentrasi 3% sebesar 9,0 mm, konsentrasi 6% sebesar 9,0 mm, konsentrasi 12% sebesar 10,1 mm. Hubungan antara konsentrasi ekstrak kasar kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) dengan diameter daerah hambatan yang terbentuk berpola linier, dengan

persamaan linier $y = 7,1731 + 0,2567x$ dengan nilai r sebesar 0,98 dan konsentrasi ekstrak kasar kulit jeruk lemon memberikan daerah hambatan terbesar sebesar 10,25mm.

Kesimpulan hasil penelitian adalah ekstrak kasar kulit jeruk lemon dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* dan konsentrasi yang paling baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah konsentrasi 12%.

Saran dari hasil penelitian ini adalah perlu penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak kasar kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) secara langsung terhadap ikan air tawar yang terinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* dan melakukan uji fitokimia agar bisa mengetahui besar kandungan asam sitrat dan zat-zat lain yang teradapat dalam ekstrak kasar kulit jeruk lemon untuk menghambat pertumbuhan bakteri.



KATA PENGANTAR

Puji dan syukur penulis panjatkan kepada ALLAH SWT yang telah memberikan rahmat dan kasih sayang-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi dengan judul “Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limonum*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *In Vitro*” yang merupakan salah satu syarat untuk mendapatkan gelar sarjana di Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya.

Pada kesempatan kali ini penulis mengucapkan terima kasih kepada :

- Bapak Ir. Marsoedi, Ph.D selaku Dosen Pembimbing I.
- Ibu Ir. Soelistyowati selaku Dosen Pembimbing II.
- Bapak Ir. Syamsuddin Dalimunthe selaku Kepala Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan beserta staff.
- Semua pihak yang tidak bisa disebutkan satu per satu yang telah membantu dalam penyelesaian skripsi ini.

Penulis menyadari skripsi ini jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang sifatnya membangun sebagai bekal di kemudian hari dan kiranya semoga ini bermanfaat khususnya bagi penulis dan umumnya bagi para pembaca.

Malang, September 2006

Penulis

DAFTAR ISI

RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Kegunaan Hipotesis	4
1.5 Hipotesis	4
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	
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 Infeksi dan Tanda-tanda Penyerangan	8
2.2 Jeruk Lemon (<i>Citrus limonum</i>)	9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	9
2.2.2 Habitat dan Kegunaan	9
2.2.3 Komposisi Kimia	10
2.2.4 Aktivitas Antimikroba	11
2.2.5 Mekanisme Kerja Antimikroba	11
2.3 Efektifitas Antimikroba <i>In Vitro</i>	12
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	14
3.1.1 Bahan yang Digunakan dalam Penelitian	14
3.1.2 Alat yang Digunakan dalam Penelitian	14
3.2 Metode Penelitian dan Rancangan Percobaan	15
3.2.1 Metode Penelitian	15
3.2.2 Rancangan Penelitian	16
3.3 Prosedur Penelitian	17
3.3.1 Persiapan Penelitian	17
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian	20
3.4 Parameter	24

3.4.1 Parameter Utama.....	24
3.4.2 Parameter Penunjang.....	24
3.5 Analisa Data.....	24
4. HASIL PENELITIAN DAN PEMBAHASAN	
4.1 Pembiakan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	25
4.2 Daya Antibakterial Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon	26
4.2.1 Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>).....	26
4.2.2 Uji Cakram.....	28
4.3 Suhu Inkubator dan pH media	37
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	38
5.2 Saran.....	38
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	43



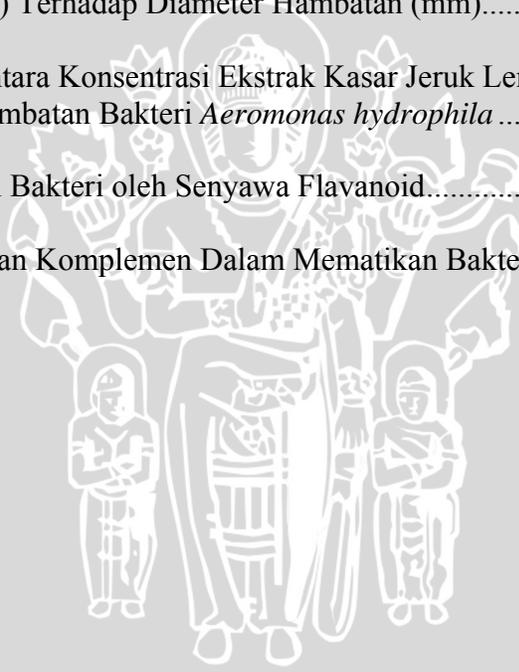
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Komposisi Kandungan Buah Jeruk Lemon dalam 100 gram	11
2. Hasil Uji MIC Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon.....	27
3. Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Kasar <i>Citrus limonum</i> terhadap Diameter hambatan (mm) Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	29
4. Daftar Analisis Ragam Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon Terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	31
5. Uji BNT Pengaruh Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon Terhadap Pertumbuhan <i>Aeromonas hydrophila</i>	31
6. Daftar Analisis Ragam Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon Terhadap Pertumbuhan Bakteri <i>Aeromonas hydrpohila</i>	32



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Reaksi antara fosfolipid dan flavonoid	12
2. Denah atau Tata Letak Percobaan.....	17
3. Biakan Murni <i>Aeromonas hydrophila</i> Metode <i>Streak</i> (Gores).....	26
4. Uji MIC (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>).....	28
5. Hasil Uji Cakram	29
6. Diagram Batang Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon (<i>Citrus limonum</i>) (%) Terhadap Diameter Hambatan (mm).....	30
7. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Ekstrak Kasar Jeruk Lemon terhadap Diameter Daerah Hambatan Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	33
8. Proses Perusakan Sel Bakteri oleh Senyawa Flavanoid.....	35
9. Pengaruh Antibodi dan Komplemen Dalam Mematikan Bakteri	36

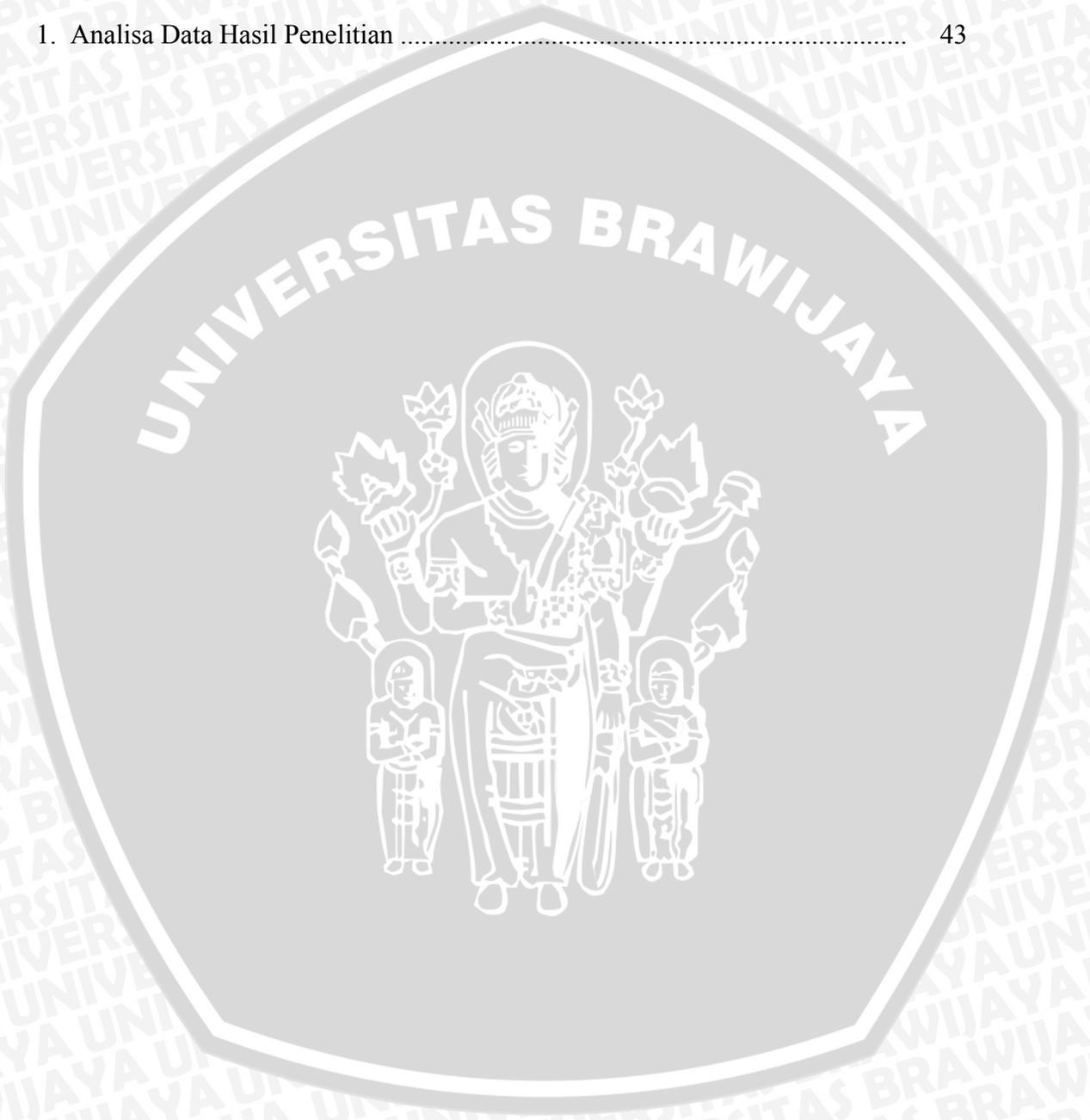


DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran

Halaman

1. Analisa Data Hasil Penelitian 43



1 PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perkembangan Produk Domestik Bruto (PDB) sektor perikanan selama periode 1999 s/d 2002 telah menunjukkan peningkatan rata-rata yang cukup besar, yakni 19,8 % per tahun, melebihi rata-rata peningkatan PDB Nasional yang besarnya 13,2 % per tahun. Namun demikian, dilihat dari kontribusinya masih relatif kecil, yakni sekitar Rp.46,6 triliun atau 2,9 % dari total PDB Nasional. Akan tetapi dibandingkan dengan potensi sumberdaya yang dimiliki, maka PDB perikanan masih relatif kecil, apalagi bila dibandingkan lagi dengan negara-negara lain yang potensinya jauh lebih kecil dari pada yang kita miliki. Oleh karena itu, melalui Gerakan Pembangunan Mina Bahari (GPMB) yang telah dicanangkan oleh Presiden RI pada tanggal 11 Oktober 2003, pembangunan sektor kelautan dan perikanan, termasuk pembangunan perikanan budidaya akan lebih dipacu untuk meningkatkan pemulihan ekonomi melalui peningkatan devisa negara. Melalui GPMB diharapkan pada akhir tahun 2009, produksi perikanan budidaya dapat mencapai 5 juta ton dan ekspor US \$ 6,75 milyar.

Untuk memenuhi harapan itu, pengembangan usaha budidaya ikan untuk peningkatan produksi sering mengalami kegagalan. Penyebab utama kegagalan tersebut diakibatkan serangan wabah hama dan penyakit ikan yang dapat menyebabkan kematian ikan secara massal.

Berbagai peristiwa yang dilaporkan, menggambarkan bahwa ikan di Indonesia mulai terjangkiti penyakit sejak tahun 1932 dengan masuknya parasit *Ich* pada ikan Guppies. Sejak saat itu penyakit berdatangan yaitu *Lerneae* (1970), *Myxobolus* (1978),

Myxosoma (1972) dan *Aeromonas hydrophila* (1980) semua pada ikan mas (Sukadi, 2004).

Penyakit ikan air tawar banyak yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*, yang belakangan ini menjadi momok yang menakutkan bagi para petani dan pemilik budidaya ikan sejumlah daerah penghasil ikan di Jawa Barat. Pasalnya dalam waktu relatif singkat, ratusan ribu ton ikan air tawar dari jenis ikan Mas yang dibudidayakan petani di jaring terapung, kolam deras dan kolam biasa mendadak mati sehingga kerugian mencapai miliaran rupiah (Sukanda, 2002).

Usaha pengendalian penyakit bakterial dapat dilakukan dengan cara pencegahan dan pengobatan. Cara penanggulangan penyakit sampai sekarang masih memakai antibiotik baik secara tunggal maupun campuran. Penggunaan antibiotik yang tidak terkontrol berakibat terjadinya resistensi bakteri patogen terhadap antibiotik tersebut. Oleh sebab itu penggunaan antibiotik untuk pengobatan penyakit ikan perlu diwaspadai, apalagi *Aeromonas hydrophila* ternyata patogen pada manusia (Angka, Yulita dan Utama, 2002).

Hingga saat ini antibiotik masih merupakan bahan impor dan mahal harganya, maka diusahakan pengobatan dengan bahan lokal yang lebih murah. Pencemaran, keracunan dan banyak hal yang disebabkan oleh penggunaan bahan – bahan kimiawi diharapkan dapat ditekan seminimal mungkin.

Jeruk lemon merupakan salah satu bahan alami dimana yang dimanfaatkan yaitu sari buahnya untuk membuat minuman penyegar, di dalam jeruk ini juga mengandung sitrat yang tinggi yaitu 48,6 gram/kilogram (Anonymous, 2004a) yang memiliki sifat kimiawi dan efek farmakologis yang berfungsi sebagai antibakterial.

Kandungan nutrisi dan vitamin paling tinggi justru di bagian kulit jeruk dibandingkan pada dagingnya atau sari buah jeruk. Pemanfaatan kulit jeruk sebagai sumber makanan alternatif, dapat menunjang peningkatan gizi dan kesehatan bagi orang yang mengkonsumsinya (Anonymous, 2000a).

1.2 Perumusan Masalah

Timbulnya serangan penyakit ikan di kolam merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, kondisi lingkungan dan organisme penyakit. Interaksi yang tidak serasi ini telah menyebabkan stres pada ikan, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah diserang oleh penyakit (Prajitno, 2005).

Ikan yang terserang akan menunjukkan tanda-tanda warna tubuh akan menjadi gelap, tubuh lebih pucat, ikan tampak menyendiri, gerakan ikan menjadi tidak normal (berputar-putar), bercak-bercak peradangan pada kulit, sirip koyak-koyak, peradangan berdarah pada mulut dan organ dalam, kepuccatan dan eksudat (cairan radang) di dalam rongga perut dan ginjal mengalami pembengkakan yang disertai pendarahan (Nabib *et al.*, 1989).

Manusia mempunyai peranan penting bagi pengobatan dan pemeliharaan ikan pada usaha budidaya untuk mencegah adanya suatu penyakit. Berbagai jenis antibiotik maupun bahan kimia lainnya telah sering digunakan dengan harga yang lebih mahal, untuk itu diusahakan pengobatan dengan bahan lokal yang lebih murah dan alami.

Untuk mengatasinya, pengobatan tradisional dengan fitofarmaka mulai menjadi perhatian dunia sekarang (Angka *et al.*, 2002). Salah satu cara yang dapat dilakukan dengan memanfaatkan bahan – bahan alami antara lain menggunakan ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*). Jeruk lemon banyak digunakan dalam kegiatan medis, karena

mempunyai peranan mempercepat pencernaan, antiescorbutic, antimigran, antibakterial, mencegah rematik, kolesterol, memperlancar saluran pencernaan, sistim sirkulasi, anti kanker, bau mulut, rematik dan memperindah kulit (Anonymous, 2005a).

Jeruk lemon ini belum banyak digunakan untuk pencegahan penyakit ikan terutama yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*, oleh karena itu perlu dilakukannya penelitian dengan menggunakan ekstrak kasar kulit jeruk lemon untuk menghambat pertumbuhan bakteri tersebut.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) terhadap daya hambat bakteri *Aeromonas hydrophila* pada konsentrasi yang berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi informasi ilmiah bagi mahasiswa untuk mengetahui pencegahan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan menggunakan ekstrak kasar kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*).

1.5 Hipotesis

H₀ : Diduga penggunaan ekstrak kasar kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) dengan konsentrasi yang berbeda tidak berpengaruh daya hambat bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*.

H1 : Diduga penggunaan ekstrak kasar kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh nyata terhadap daya hambat bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Juni sampai September 2006.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



2 TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Aeromonas hydrophila*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* menurut Holt (1979) dalam Dwijoseputro (1989) adalah sebagai berikut :

Divisio	: Protophyta
Class	: Schizomycetes
Ordo	: Pseudomonadales
Sub Ordo	: Pseudomonadinae
Famili	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>

Bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah bakteri yang berbentuk batang dengan ukuran $0,7 - 0,8 \mu\text{m} \times 1,0 - 1,5 \mu\text{m}$, bergerak dengan flagel monotrich pada ujung sel (Kabata, 1985). Bakteri ini membentuk koloni pada media yang sesuai. Media yang digunakan adalah TSA (*Tryptic Soy Agar*) dimana koloni tampak berwarna kuning kecoklatan (Volk dan Wheeler, 1988). Bakteri *Aeromonas* termasuk dalam kelompok bakteri gram negatif (Hazen *et al.*, 1978 dalam Hayes, 2000). Menurut Kabata (1985), bakteri gram negatif adalah organisme yang tidak dapat menahan zat pewarna setelah dicuci dengan alkohol 95 %. Bakteri *Aeromonas hydrophila* berukuran panjang 1-4 μm dan dapat bergerak. Morfologi koloninya serupa dengan koloni batang enterik gram negatif dan bakteri ini menyebabkan hemolisis yang luas pada agar darah.

Bakteri *Aeromonas hydrophila* termasuk bakteri fakultatif Patogen (Paperna, 1980) dikatakan bakteri fakultatif anaerob akan tumbuh tersebar di seluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair (Dwidjoseputro, 1989).

Bakteri *Aeromonas* spp terdiri dari 3 spesies utama yaitu *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas punctata*, *Aeromonas liquefaciens* yang bersifat patogen (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Bakteri *Aeromonas hydrophila* hidup di lingkungan dengan suhu berkisar antara 15° – 30° C dan pH 5,5 – 9,5. *Aeromonas hydrophila* tidak akan berkembang penyebarannya pada suhu air di bawah 7° – 8°C. Penyerangan akan terjadi bila suhu meningkat di atas 12° – 14° C (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Menurut Prajitno (2001), genus *Aeromonas* mempunyai habitat di lingkungan perairan tawar dimana keberadaannya berhubungan dengan jumlah kandungan bahan organik di perairan atau sedimen dasar. Semakin tinggi kandungan bahan organik dalam suatu perairan maka semakin banyak ditemukan bakteri *Aeromonas* spp.

Penularan ataupun penyebaran penyakit oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* dapat melalui air, bagian tubuh ikan dan juga peralatan (Angka, Yulita dan Utama, 2002).

Kabata (1985), menyatakan bahwa daerah tropik dan sub tropik penyakit *Haemorrhagic septicaemia* yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila* pada umumnya muncul pada musim kemarau dimana pada saat itu kandungan bahan organik tinggi. *Aeromonas hydrophila* banyak ditemukan pada insang, kulit, hati, ginjal dan jantung. Bakteri ini akan kelihatan patogenitasnya bila berada pada usus ikan.

2.1.3 Infeksi dan Tanda – Tanda Penyerangan.

Aeromonas hydrophila umumnya menyebabkan infeksi pada seluruh tubuh seperti : timbulnya bercak – bercak merah pada permukaan tubuh, kulit meradang yang akhirnya terjadi ulkus – ulkus seperti bisul, pendarahan pada hati, pendarahan sirip, pendarahan otot, lendir berdarah pada rectum serta pembentukan cairan –cairan berdarah. Bakteri *Aeromonas hydrophila* ini juga cepat menyebar pada padat penebaran tinggi dan sering ditemukan dalam rongga perut ikan air tawar di daerah panas. Ikan yang terinfeksi jenis penyakit ini biasanya mati dalam waktu satu minggu. Bakteri ini sangat patogenik bagi ikan mas (Nabib *et. al.*, 1989).

Menurut Kabata (1985), tanda-tanda terserangya ikan oleh penyakit bakterial adalah sebagai berikut :

- Busung perut (*abdominal dropsy*), penyakit ini paling ditakuti oleh ikan mas. Tanda-tanda penyakit busung perut adalah penimbunan cairan yang bening, galatinus bercampur darah atau cairan encer bercampur nanah dalam rongga perut sehingga perutnya membesar, insangnya pucat, bercak-bercak pendarahan atau pembendungan pada kulit, hatinya pucat, organ-organ dalam dan jaringan otot basah serta terlihat kerusakan-kerusakan pada sirip. Pada tipe yang kronis, terlihat ulkus-ulkus yang berdarah pada kulit atau bercak-bercak peradangan pada kulit, pendarahan pada dinding gelembung renang dan jaringan otot.
- Borok (tukak), ditandai dengan luka pada kulit dan otot.
- Bakterial *Haemorrhagic septicaemia* yang disebut juga *infecticus dropsy*, *red disease* dan *red pest*. Penyakit ini terpadat pada berbagai penyakit, sebagai septicemia umum dan merupakan tanda-tanda permulaan dari bercak-bercak peradangan dan ulkus.

Akibat dari penyakit *Haemorrhagic septicaemia* ini adalah warna ikan menjadi lebih gelap atau lebih pucat, ikan tampak menyendiri, gerakan ikan menjadi tidak normal (berputar – putar), bercak – bercak peradangan pada kulit, sirip koyak – koyak, peradangan berdarah pada mulut dan organ – organ dalam, kepuatan dan eksudat (cairan radang) di dalam rongga perut serta ginjal mengalami pembengkakan yang disertai pendarahan (Prajitno, 2005).

2.2 Jeruk Lemon (*Citrus limonum*)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Rukmana (2003), jeruk lemon berdasarkan taksonominya termasuk dalam :

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Spermatophyta
Anak Divisio	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Anak Kelas	: Dialypetales
Ordo	: Rutales
Famili	: Rutacea
Genus	: Citrus
Spesies	: <i>Citrus limonum</i> Linne Fillut Burman.



2.2.2 Habitat dan Kegunaan

Buah jeruk lemon tak asing lagi di kalangan masyarakat Indonesia. Buah yang berasal dari India ini, di Indonesia tumbuh baik di dataran rendah sampai pegunungan dengan ketinggian 1.000 meter di atas permukaan laut. Kelompok *Citrus medica* dengan bentuk daun tidak bersayap dan bunganya berwarna ungu (Rukmana, 2003).

Kulit jeruk dapat dibagi menjadi dua bagian utama yaitu flavedo (kulit bagian luar yang berbatasan dengan epidermis) dan albedo (kulit bagian dalam yang berupa jaringan busa). Albedo memiliki fungsi mensuplai air dan nutrisi dari pohon untuk pertumbuhan dan perkembangan buah.

Albedo merupakan jaringan yang berhubungan dengan inti di tengah – tengah buah, berfungsi untuk mensuplai air dan nutrisi untuk pertumbuhan dan perkembangan buah pada albedo tidak terdapat kloroplas sehingga bagian ini berwarna putih dimana bagian albedo banyak mengandung selulosa, hemiselulosa, lignin, senyawa pektat, hesteperiodes serta senyawa – senyawa limonum yang menyebabkan timbulnya rasa pahit pada produk sari buah jeruk. Flavonoid banyak terdapat pada bagian albedo (Davis, 1947 dalam Monang, 2005).

Air , buah, kulit dan minyak jeruk lemon banyak digunakan untuk bumbu dapur dan berhubungan untuk pengobatan, karena jeruk lemon mengandung vitamin C yang tinggi (Anonymous, 2005b). Tanaman ini tersebar luas ke seluruh dunia disertai dengan perkembangan variasi dan merupakan turunan dari *Citrus medica L* dari India (Anonymous, 2005a).

2.2.3 Komposisi Kimia

Jeruk Lemon ini mengandung senyawa flavonoid, asam ascorbic, cafeic pada buah, minyak essensial yang kaya isopulegol, alpa-bergamotene, alpa pinene, alpa-tujene, beta-bisolobene, beta-bergamotene, beta-phelandrene, citral, lemone dan sabinene (khusus pada buah lemon dari California), pada daun mengandung cafein, pectin berupa patois dan kalsium (Anonymous, 2005b). Jeruk lemon banyak digunakan industri rumah tangga dalam bentuk jus. Komposisi buah jeruk lemon beserta vitamin dan mineral disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Komposisi Kandungan Buah Jeruk Lemon dalam 100 gram (Anonymous, 2005b)

Komposisi	Jumlah
Air	91 gram
Protein	0,38 gram
Kalori	24 kalori
Serat	0,5 gram
Potassium	124 mg
Kalsium	7 mg
Phospor	6 mg
Magnesium	6 mg
Vitamin C	46 mg

2.2.4 Aktivitas Antimikroba

Antimikroba adalah suatu zat yang mampu mengganggu pertumbuhan dan aktivitas metabolisme mikroba. Khusus untuk bakteri dinamakan antibakteri. Mekanisme kerja antimikroba antara lain dengan jalan merusak dinding sel mikroorganisme, merusak membran sitoplasma, mendenaturasi protein sel dan menghambat kerja enzim dalam sel (Pelczar dan Chan, 1986).

Semua senyawa flavonoid, menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon dan semuanya mempunyai sejumlah sifat yang sama flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air dan berupa senyawa fenol (Harborne, 1987).

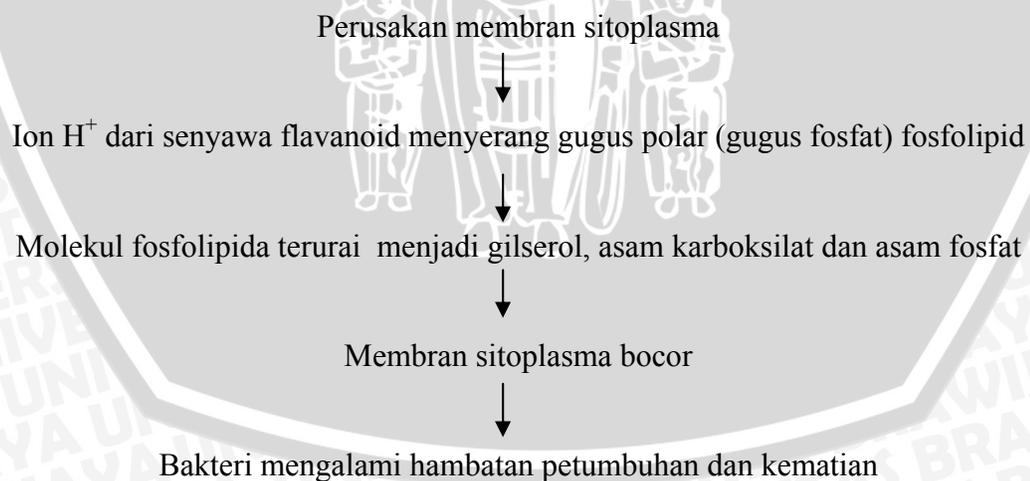
2.2.5 Mekanisme Kerja Antimikroba

Secara umum antimikroba yang mempengaruhi pembentukan dinding sel atau permeabilitas membran sel bekerja bakteriosidal sedangkan pada sintesis protein bekerja bakteriostatik. Istilah bakteriosid digunakan untuk zat yang dapat membunuh bakteri dan bakteriostatik adalah suatu keadaan yang mencegah pertumbuhan bakteri sehingga populasi bakteri tetap (Pelczar dan Chan, 1986).

Menurut Gilman *et. al* (1991) dalam Hariyono (2005) pada perusakan membran sitoplasma, ion H^+ dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipida akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Hal mengakibatkan fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma akibatnya membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan dan bahkan kematian.

Persenyawaan fenol sebagai desinfektan bersifat aktif terhadap sel vegetatif bakteri, tetapi tidak aktif terhadap spora bakteri. Persenyawaan bersifat fungisida dan antivirus. Keaktifannya menurun dengan adanya pengenceran, kecuali heksaklorofan, keaktifan ini juga berkurang akibat reaksi dengan dengan berbagai senyawa organik lain (Prajitno, 2005).

Reaksi antara fosfolipid dan flavanoid berupa proses kematian bakteri yang disebabkan oleh adanya zat antimikroba flavonoid dapat digambarkan dalam bagan pada Gambar 1.



Gambar 1. Reaksi antara fosfolipid dan flavonoid

2.3 Efektifitas Antimikroba *in vitro*

Beberapa bahan antimikroba tidak membunuh tetapi hanya menghambat pertumbuhan mikroorganisme, oleh karena itu perlu diketahui MIC (*Minimum Inhibitor Concentration*) dan MKC (*Minimum Killing Concentration*) bahan anti mikrobal terhadap mikroorganisme (Lay, 1994).

Edberg (1986) menyarankan bahwa sebelum dilakukan uji kerentanan, mikroba sebaiknya diisolasi langsung dalam kultur murni pada media buatan, karena uji yang dilakukan secara langsung dari contoh bahan klinik mempunyai insiden hasil palsu yang tinggi.

Bonang dan Koeswardono (1982), menyebutkan bahwa sekarang ini telah banyak ditemukan cara – cara dalam uji efektifitas antimikroba dan masing – masing memiliki kelebihan dan kekurangan. Dalam hal ini WHO telah menetapkan suatu standar yang memungkinkan semua laboratorium meninjau cara – cara mereka, sehingga hasil pemeriksaan yang dilaporkan memiliki suatu dasar yang sama.

3 MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan yang digunakan dalam penelitian

- Biakan murni *Aeromonas hydrophila* didapat dari Universitas Airlangga
- Ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*)
- TSA (*Tryptic Soy Agar*)
- NB (*Nutrient Broth*)
- Alkohol
- Akuades
- Kertas pekamen
- Benang
- Kapas
- Tissue
- Kertas saring sebagai cakram disk dengan diameter 5 mm
- Spritus
- Kertas label
- Bahan untuk pewarnaan gram

3.1.2 Alat yang digunakan dalam penelitian

- Petri disk
- Tabung reaksi dan rak
- Pinset
- Timbangan analitik
- Inkubator
- *Incase*
- Jarum ose
- Pipet tetes

- Erlenmeyer
- Gelas ukur
- Pembakar bunsen
- *Autoclave*
- Obyek Glass
- Pipet ukur
- Lemari pendingin
- Spatula
- Kompor gas
- Penggaris
- Karet penghisap

3.2 Metode Penelitian dan Rancangan Percobaan

3.2.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil. Hasil yang didapat menegaskan bagaimana hubungan kausal antara variabel – variabel dengan teknik pengumpulan data yang dilakukan secara observasi langsung yaitu mengadakan pengamatan secara langsung terhadap gejala – gejala subyek yang diselidiki, baik pengamatan itu dilakukan dalam situasi sebenarnya maupun dilakukan dalam situasi buatan khusus dibuat untuk penelitian tersebut (Surachmad, 1980). Cara mengetahui efektifitas ekstrak kulit jeruk lemon dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah dengan mengukur daerah hambatan di sekitar kertas cakram yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri.

Penelitian eksperimen bertujuan untuk menyelidiki kemungkinan saling hubungan sebab akibat dengan cara memberikan perlakuan – perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimen dan menyediakan kontrol untuk perbandingan.

3.2.2 Rancangan penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) karena media yang digunakan bersifat homogen sehingga yang mempengaruhi hasil penelitian hanyalah faktor perlakuan dan faktor kebetulan saja.

Rumus umum Rancangan Acak Lengkap (RAL) :

$$Y_{ij} = \mu + T + \sum_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} = Nilai observasi taraf perlakuan ke-i pada ulangan ke-j

μ = Rata – rata umum / konstanta

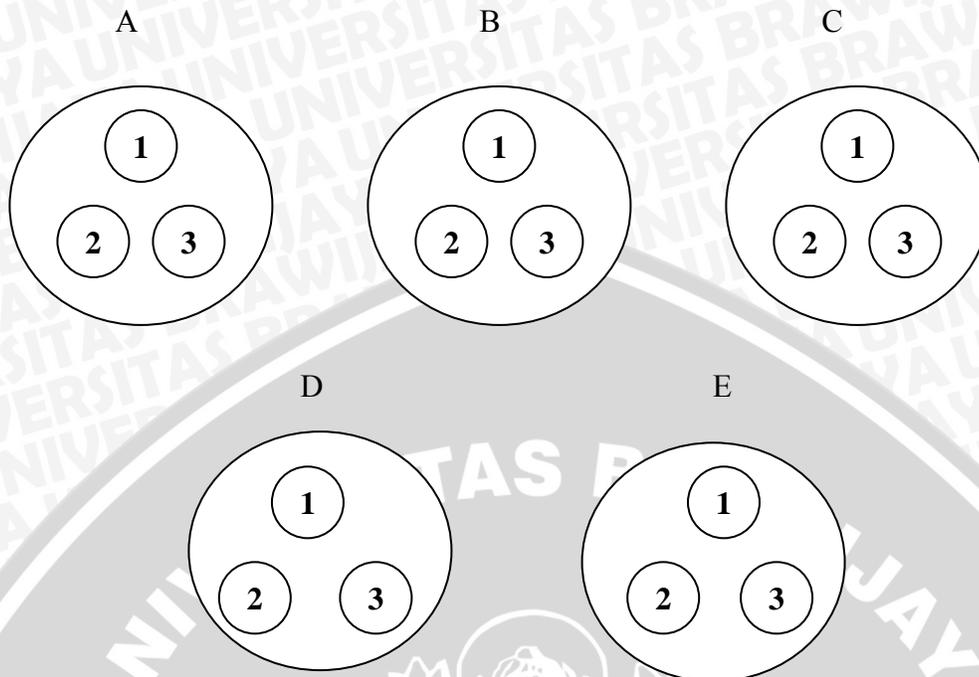
T = Pengaruh taraf perlakuan

\sum_{ij} = Acak nilai observasi taraf perlakuan ke-i pada ulangan ke-j

Penelitian ini terdiri dari lima perlakuan (termasuk perlakuan kontrol) dengan tiga kali ulangan. Perlakuannya adalah pemberian ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) dengan konsentrasi yang berbeda dimana konsentrasi minimum didapat dari penelitian pendahuluan yang telah dilakukan, yaitu :

- Perlakuan A = Konsentrasi 0%
- Perlakuan B = Konsentrasi 3%
- Perlakuan C = Konsentrasi 6%
- Perlakuan D = Konsentrasi 9%
- Perlakuan E = Konsentrasi 12%

Penempatan perlakuan didapatkan, dengan denah seperti pada Gambar 2.



Gambar 2. Denah atau Tata Letak Percobaan

Keterangan gambar :

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

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Penelitian

A. Sterilisasi Alat dan Bahan

Menurut Murachman dan Nursyam (1987), sterilisasi adalah usaha untuk membebaskan alat-alat atau bahan-bahan dari semua bentuk kehidupan, terutama mikroba. Ada tiga cara utama yang umum dipakai dalam sterilisasi yaitu penggunaan panas, penggunaan bahan kimia dan penyaringan (filtrasi). Proses sterilisasi alat dan bahan adalah sebagai berikut :

- Alat – alat yang akan disterilisasi dicuci kemudian dibungkus dengan kertas pekamen atau kertas koran kemudian diikat dengan benang.

- Autoclave diisi air secukupnya kemudian alat yang telah dibungkus kertas pekamen dimasukkan ke dalam autoclave.
- Autoclave ditutup kemudian mengencangkan baut – baut sampai rapat.
- Kompor pemanas dinyalakan, ditunggu hingga monometer menunjukkan angka 1 atm, jika terjadi kelebihan tekanan, kran udara dibuka hingga monometer menunjukkan angka 1 kembali.
- Keadaan tekanan uap jenuh dapat terjadi berulang kali sampai suhu 121° C dan monometer menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit.
- Kompor dimatikan dan buka kran untuk mengurangi tekanan, tunggu beberapa saat sampai termometer dan monometer menunjukkan angka 0 lalu buka penutup autoclave.
- Alat yang disterilkan disimpan dalam incase, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

B. Pembuatan media (Lay, 1994)

TSA (*Tryptic Soy Agar*)

- Media TSA ditimbang sebanyak 4 gram dan dilarutkan dengan 70 ml aquades dalam erlenmeyer.
- Media dipanaskan dan diaduk hingga larut sempurna.
- Media yang telah dilarutkan dalam erlenmeyer disterilkan dahulu dengan menggunakan autoclave.
- Media yang disterilkan dituangkan ke dalam cawan petri steril masing – masing sebanyak 12,5 ml.

- Media dibiarkan dingin dan memadat kemudian disimpan dalam lemari pendingin.

NB (Nutrient Broth)

- NB sebanyak 1,3 gram dilarutkan dalam 100 ml aquades dalam erlenmeyer kemudian diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kuning.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan aluminium foil lalu dibungkus dengan kertas perkamen dan diikat, kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121° C selama 15 menit.
- Media yang akan digunakan untuk pembiakan bakteri dibiarkan dingin karena bakteri akan mati bila diinokulasi pada media yang masih panas.
- Media yang tidak langsung digunakan, disimpan dalam lemari pendingin sehingga dapat bertahan lama.

C. Pembiakan Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Media agar

- Disiapkan petri disk yang berisi media TSA yang telah disterilkan.
- Jarum ose dipanaskan di atas pembakar bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum ose disentuhkan pada permukaan biakan murni bakteri *Aeromonas hydrophila*.
- Jarum ose yang telah terisi bakteri digoreskan pada permukaan media TSA.
- Petridisk ditutup rapat serta dan dipanaskan di atas bunsen pada bagian tepinya dan jarum ose dipanaskan kembali.
- Media yang telah terisi bakteri *Aeromonas hydrophila* diinkubasi pada suhu 35°C selama 18 – 24 jam.

Media cair

- Media NB disiapkan dan disterilkan dengan autoclave.
- Setelah media dingin, dimasukkan bakteri *Aeromonas hydrophila* dari biakan murni sebanyak 4 ose.
- Media yang telah mengandung bakteri diinkubasi pada suhu 30°C selama 18-24 jam.
- Hasil biakan disimpan dalam lemari pendingin.

D. Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Lemon

Menurut Guenther (1990) dalam Monang (2005) bahwa dinding sel jeruk lemon tidak mudah pecah oleh karena itu dalam pembuatan ekstrak ini kulit harus dipotong – potong atau diblender agar bahan yang terkandung didalamnya dapat keluar, nantinya bahan tersebut akan digunakan untuk antibakteri dalam melakukan penelitian ini.

Pembuatan ekstrak kulit jeruk lemon dilakukan dengan cara memblender 1 gr kulit jeruk lemon segar ditambah dengan 100 mililiter aquades, setelah itu disaring agar benar- benar bersih. Konsentrasi awal 100 ppm, konsentrasi ini yang digunakan dalam perlakuan.

3.3.2 Pelaksanan Penelitian

Salah satu cara untuk pengujian antimikrobia agar dapat diperoleh konsentrasi terendah dilakukan uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*), sedangkan untuk mengetahui konsentrasi terbaik dilakukan uji cakram, yaitu pengujian anti mikrobia dengan mengukur bahan anti mikrobia sesuai dengan dosis perlakuan (Pelczar dan Chan, 1986). Dengan demikian dapat diketahui efektifitas atau pengaruh perlakuan

terhadap daya hambat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*. Pelaksanaan penelitian sebagai berikut :

a. Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) adalah konsentrasi hambat minimum dari suatu bahan yang mengandung zat atau senyawa anti mikroorganisme terhadap pertumbuhan bakteri, yang mana selain untuk efektifitas bahan juga merupakan tujuan dari pemberian obat yaitu untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Edberg, 1986).

Pengujian MIC ini dilakukan dengan konsentrasi 0,013 – 50 %, dalam penelitian digunakan konsentrasi 1 gram ekstrak kasar kulit jeruk lemon dalam 100 ml aquades.

Tahapan pelaksanaan uji MIC ini adalah sebagai berikut :

- Penyiapan tabung reaksi yang telah disterilkan sebanyak 15 buah dan masing – masing diberi label 50 %; 25 %; 12,5 %; 6,25 %; 3,13 %; 1,56 %; 0,78 %; 0,391 %; 0,195 %; 0,098 %; 0,049 %; 0,025 % dan 0,013 % serta kontrol positif (K^+) dan kontrol negatif (K^-), yang masing – masing tabung diisi dengan 5 ml media cair (NB).
- Kemudian pada tabung pertama (50 %) ditambahkan ekstrak kasar kulit jeruk lemon dengan dihomogenkan, setelah itu dilakukan pengenceran berseri dengan cara mengambil 5 ml dari tabung pertama dan diletakkan pada tabung kedua selanjutnya dilakukan terus menerus hingga pada tabung akhir (0,013 %) terdapat 10 ml larutan.
- Pengujian ini dilakukan dengan memasukkan inokulum sebanyak 2 tetes dari media cair yang telah ditumbuhi bakteri ke dalam masing – masing konsentrasi.
- Tabung ke-14 adalah kontrol negatif yang berisi NB dan inokulum.

- Tabung ke-15 adalah kontrol positif yang berisi larutan NB dan ekstrak kasar kulit jeruk lemon.
- Keseluruhan tabung reaksi tersebut diinkubasi dalam inkubator pada suhu 37° C selama 24 jam.
- Setelah 24 jam dilakukan pengamatan keseluruhan tabung reaksi terhadap kekeruhan media dengan melihat kontrol positif dan negatif. Untuk uji MIC ini diambil konsentrasi yang mendekati kontrol positif sebagai konsentrasi minimum.
- Pengamatan dilakukan dengan menggunakan Spektrofotometer DR 2000 dengan panjang gelombang pengamatan sebesar 620 nm.

b. Uji Cakram

Menurut Pelczar dan Chan (1986) pada prinsipnya uji ini adalah mengukur daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan anti mikrobial dengan konsentrasi sesuai dengan perlakuan. Cakram tersebut kemudian ditanam pada media bakteri *Aeromonas hydrophila* yang akan diuji. Kemudian diinkubasi pada suhu 37° C selama 24 jam. Setelah masa inkubasi, diamati area hambatan yang terbentuk di daerah sekitar cakram untuk mengetahui ada tidaknya pertumbuhan bakteri.

Pada medium agar yang telah disebar bakteri diletakkan beberapa kepingan kertas masing – masing mengandung zat antimikroba dalam konsentrasi tertentu. Jika dalam 24 jam tidak nampak pertumbuhan bakteri di sekitar kertas maka hal ini menunjukkan bahwa bakteri terhambat pertumbuhannya oleh zat antimikroba yang terdapat dalam kepingan kertas tersebut (Dwidjoseputro, 1989).

Cara cakram ini menghasilkan kategori sensitivitas terhadap antimikroba berdasarkan difusi antimikroba dari cakram kertas ke dalam agar. Nilainya dilaporkan dalam istilah yang Sensitif (S) menunjukkan bahwa MIC organismenya lebih rendah daripada kadar darah rata-rata yang dapat dicapai oleh antimikroba itu, Resisten (R) menunjukkan bahwa MIC organisme ini di atas kadar darah rata – rata yang dapat dicapai oleh antimikroba, dan Intermediate (I) menunjukkan bahwa MIC organisme ini sekitar kadar darah rata – rata yang dapat dicapai, yang didasarkan atas parameter penghambatan dari pada antimikroba (Edberg, 1986).

Proses uji cakram sebagai berikut :

- Hasil dari uji MIC, yaitu konsentrasi minimum yang berpengaruh.
- Disiapkan media agar TSA dalam cawan petri yang masing-masing berisi 12 ml larutan TSA.
- Menyiapkan konsentrasi uji cakram sesuai dengan konsentrasi yang didapat dari uji MIC.
- Kertas cakram steril dicelupkan ke dalam masing – masing konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon.
- Penanaman bakteri pada media TSA dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri dari media NB dengan menggunakan pipet tetes, kemudian ditetaskan dalam media agar sebanyak 2 tetes dan diratakan pada seluruh permukaan media agar dan dibiarkan selama 10 – 15 menit.
- Kertas cakram yang telah dicelupkan dalam ekstrak kulit jeruk lemon diletakkan di atas media agar yang telah mengandung biakan bakteri. Jarak cakram dari tepi plate tidak boleh kurang dari 15 mm, jarak antara cakram tidak boleh kurang dari

24 mm dan sekali cakram sudah ditempelkan pada media agar tidak boleh dipindahkan atau digeser. Tekan cakram agar ekstrak kulit jeruk lemon dapat meresap dalam media agar dengan baik.

- Pembacaan hasil dilakukan setelah inkubasi pada suhu 37° C selama 18 – 24 jam dengan cara mengukur daerah hambatan yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan mistar transparan.
- Pencatatan data hasil pengamatan uji cakram.

3.4 Parameter

3.4.1 Parameter Utama

Parameter utama adalah diameter daerah hambatan dari ekstrak kulit jeruk lemon terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

3.4.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah suhu inkubator dan pH media, yang keduanya merupakan faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri.

3.5 Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur (variabel tak bebas) digunakan analisa keragaman atau uji F. Apabila nilai F berbeda 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 mempengaruhi digunakan analisa regresi yang bertujuan untuk menentukan sifat dan fungsi regresi yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan yang terbaik pada respon.

4 HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembiakan Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat murni yang diperoleh dari Laboratorium Bakteriologi dan Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya. Selanjutnya dilakukan peremajaan kembali terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* yang telah ada. Media yang digunakan untuk pembiakan bakteri *Aeromonas hydrophila* selama penelitian ada dua jenis yaitu media agar TSA (*Triptic Soy Agar*) untuk pembiakan dengan metode gores dan media cair NB (*Nutrient Broth*) untuk pembiakan dengan metode tuang.

Untuk memperbanyak dan peremajaan kembali bakteri *Aeromonas hydrophila*, maka dilakukan inokulasi bakteri dengan melakukan pemindahan atau penanaman sampel dari satu biakan murni ke dalam media tumbuh secara aseptik untuk mencegah terjadinya kontaminasi. Metode penanaman pada media padat dilakukan dengan cara metode penggoresan (*streak*). Metode pembiakan streak (gores) dilakukan pada media agar yang diletakkan pada cawan petri dengan cara menggesekkan jarum ose yang telah mengandung bakteri dengan arah gerakan ke kiri dan ke kanan secara sinambung sampai meliputi seluruh permukaan agar sehingga akan diperoleh koloni yang menggerombol hingga mengecil. Bakteri *Aeromonas hydrophila* yang dibiakkan pada media TSA membentuk koloni berwarna kuning. Pembiakan dengan metode *streak* (gores) dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Biakan murni *Aeromonas hydrophila* Metode Streak (Gores)

Dalam penelitian digunakan pembiakan bakteri dengan kepadatan 10^6 bakteri/ml. Untuk mendapatkan kepadatan bakteri ini, dilakukan pembiakan bakteri dengan kepadatan sebesar 1 Mc. Farland (1 Mc. Farland = 10^6 bakteri/ml). Dengan melakukan penanaman bakteri uji kedalam media tanam TSA, yang diambil sedikit dan dimasukkan ke dalam tabung berisi NB, sampai didapat kekeruhan yang sama dengan standart Mc. Farland 1, selanjutnya dari bakteri dengan kepadatan Mc. Farland 1 tersebut diambil 0,5 ml dan dimasukkan ke dalam 45 ml NB lagi. Dengan demikian telah didapatkan kepadatan 10^6 bakteri/ml (Jatmikoningtyas, 2001).

4.2 Daya Antibakterial Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon

4.2.1 Uji MIC

Dari hasil uji MIC diperoleh dosis minimum ekstrak kasar kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) sebesar 3,13 %. Dosis ini diperoleh melalui metode pengenceran berseri 50 % dari ekstrak kasar kulit jeruk lemon pada 12 tabung reaksi. Pengukuran yang digunakan adalah pengukuran kuantitatif, yaitu mengukur nilai kekeruhan sampel dengan menggunakan *Spektrofotometer* DR 2000 dengan panjang gelombang 620 nm

kemudian membandingkannya dengan kontrol positif dan negatif. Kontrol positif berisi media cair NB dengan bakteri *Aeromonas hydrophila*, sedangkan kontrol negatif berisi ekstrak kasar kulit jeruk lemon dengan media cair NB. Hasil Uji MIC ekstrak kasar kulit jeruk lemon ini dapat dilihat pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Uji MIC Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon

Konsentrasi (%)	Panjang gelombang (nm)	Tingkat kekeruhan
50	82	Keruh
25	72	Keruh
12,5	70	Keruh
6,25	68	Keruh
3,13	66	Keruh
1,56	60	Tidak Keruh
0,78	58	Tidak Keruh
0,39	49	Tidak Keruh
0,19	45	Tidak Keruh
0,09	40	Tidak Keruh
0,04	34	Tidak keruh
0,02	31	Tidak keruh
K ⁺ (NB + Inokulum)	69	Keruh
K ⁻ (NB + Ekstrak kulit jeruk lemon)	55	Tidak keruh

Tingkat kekeruhan pada uji MIC (Gambar 4) tampak terbaca dengan jelas, dengan panjang gelombang yang lebih kecil dari panjang gelombang yang ada pada *Spektrofotometer*. Hal ini disebabkan karena ekstrak kasar kulit jeruk lemon tidak mengalami perubahan warna yang begitu pekat yaitu hasilnya berwarna kuning bening pada hampir setiap tabungnya. Konsentrasi yang diambil untuk melakukan uji cakram didasarkan pada acuan kontrol positif dengan panjang gelombang 69 adalah konsentrasi 3,13% dengan hasil panjang gelombang 66.

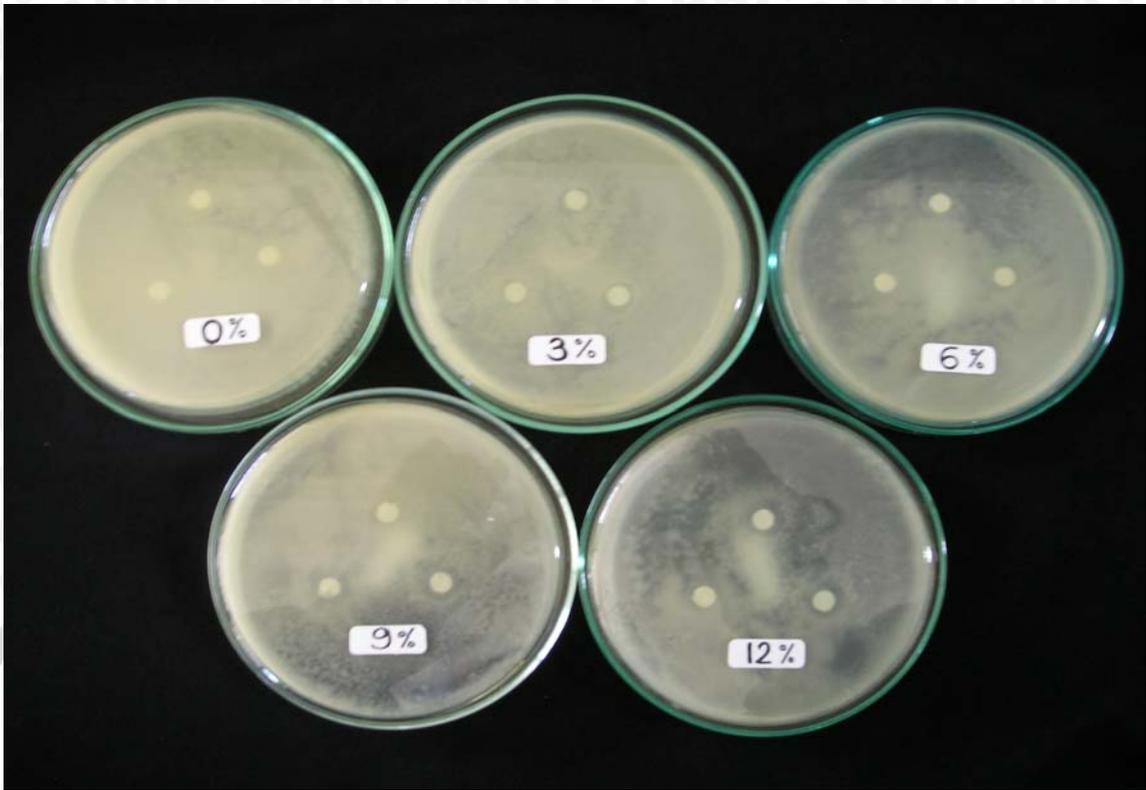


Gambar 4. Uji MIC (*Mimum Inhibitory Concentration*)

4.2.2 Uji Cakram

Untuk mengetahui kepekaan desinfektan dalam menghambat pertumbuhan bakteri dapat digunakan uji cakram. Menurut Sommers (1994), zona hambatan yang terbentuk ditunjukkan sebagai daerah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri di sekitar cakram kertas saring.

Pada penelitian ini, daerah hambatan ditunjukkan dengan adanya wilayah jernih di sekitar kertas cakram terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, dimana kertas cakram yang berukuran 5 mm tersebut telah mengandung ekstrak kasar kulit jeruk lemon sesuai dengan dosis masing-masing perlakuan. Hasil dari uji cakram dapat dilihat pada Gambar 5.



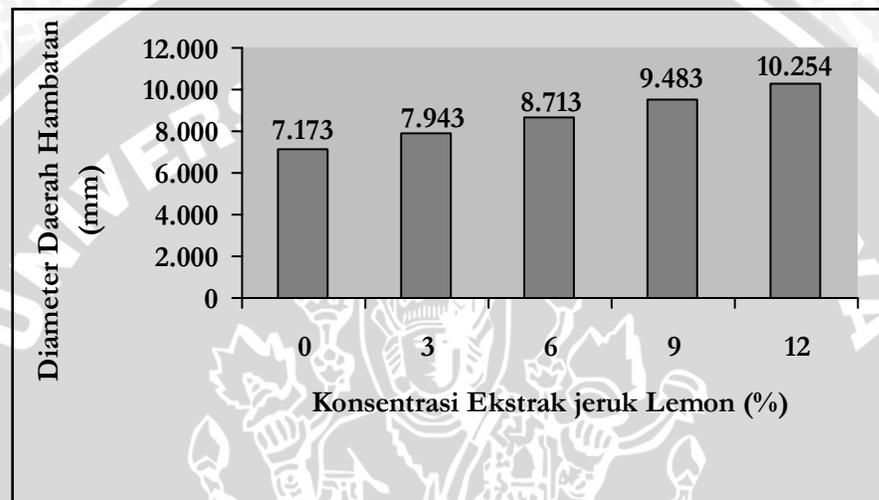
Gambar 5. Hasil Uji Cakram

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh juga data diameter daya hambatan (daerah yang tidak ditumbuhi bakteri) nampak pada setiap perlakuan dan menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar kulit jeruk lemon mampu menghambat laju pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Hasil pengamatan daerah hambatan ini dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Kasar *Citrus limonum* terhadap Diameter Hambatan (mm) Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Perlakuan (%)	Ulangan			Total (mm)	Rerata (mm)
A = 0 (kontrol)	6,1000	6,1000	6,1000	18,3000	6,1000
B = 3	9,0000	10,0000	9,0000	28,0000	9,3333
C = 6	9,0000	9,0000	9,0000	27,0000	9,0000
D = 9	9,0000	9,1000	9,0000	27,1000	9,0333
E = 12	10,1000	10,1000	10,1000	30,3000	10,1000
Total				130,7000	

Berdasarkan Tabel 3 di atas, konsentrasi ekstrak kasar kulit jeruk lemon 12 % memberikan diameter daya hambat terbesar dan menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kasar kulit jeruk lemon, maka diameter hambatan juga semakin lebar. Untuk mengetahui lebih jelas, disajikan data dalam bentuk diagram batang yang dapat dilihat pada Gambar 6.



Gambar 6. Diagram Batang Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limonum*) (%) Terhadap Diameter Daerah Hambatan (mm)

Dari Gambar 6 terlihat lebar daerah hambatan yang terbentuk pada daerah kertas cakram pada setiap perlakuan konsentrasi yang berbeda dari ekstrak kulit jeruk lemon. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* maka dilakukan analisis ragam. Berdasarkan hasil analisa sidik ragam, ternyata perlakuan konsentrasi ekstrak kasar kulit jeruk lemon berbeda sangat nyata terhadap daerah hambatan, seperti yang terlihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Daftar Analisis Ragam Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sumber keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	27,9640	6,9910	103,8267**	3,48	5,99
Acak	10	0,6733	0,0673			
Total	14	28,6373				

Keterangan : ** berbeda sangat nyata

Menurut Gomez dan Gomez (1995) apabila nilai F hitung lebih besar daripada nilai F tabel pada taraf nyata 1 %, perbedaan perlakuan dikatakan berbeda sangat nyata.

Tabel 7 menunjukkan bahwa nilai F hitung lebih besar daripada F tabel, baik dalam taraf 5 % maupun 1% yang berarti menerima H_1 dan menolak H_0 .

Untuk mengetahui perbedaan antara perlakuan satu dengan yang lainnya maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan nilai BNT 5 % (3,48) dan BNT 1 % (5,99), secara lengkap perhitungan uji BNT dapat dilihat pada Lampiran 1, sedangkan hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji BNT Pengaruh Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon Terhadap Pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*

Perlakuan (%)	Rerata (mm)	Notasi
A = 0 (kontrol)	6,1000	a
C = 6	9,0000	b
D = 9	9,0333	b
B = 3	9,3333	b
E = 12	10,1000	c

Ket : Notasi sama berarti tidak berbeda nyata

Hasil uji BNT Tabel 5 dapat diketahui perbedaan dari masing-masing perlakuan uji yang disimbolkan dengan notasi, yaitu perlakuan A (konsentrasi ekstrak kasar kulit jeruk lemon 0%) berbeda dengan perlakuan C, D, B dan E. Perlakuan yang terbaik adalah perlakuan E (12%) yang mampu memberikan daya hambatan terbesar dengan

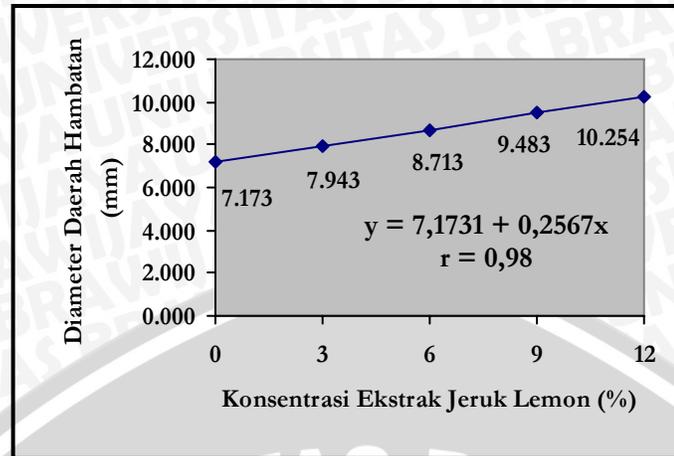
rata-rata 10,100 mm, diikuti oleh perlakuan B (3%). Selanjutnya perlakuan D (9%) dan perlakuan C dengan nilai rata-rata 9,000 mm yang merupakan daerah hambatan terkecil. Daftar analisis ragam regresi pengaruh ekstrak kasar kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Daftar Analisis Ragam Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5 %	F 1 %
1. Perlakuan	4	27,9640				
Linear	1	17,7870	17,7870	264,163**	4,96	10,00
Kuadratik	1	3,3717	3,3717	50,074**		
Kubik	1	6,3480	6,3480	94,277**		
Kuartik	1	0,4573	0,4573	6,792*		
2. Acak	10	0,6733	0,0673			
Total	14					

Keterangan : ** = Berbeda Sangat Nyata
* = Berbeda Nyata

Berdasarkan analisa regresi didapat bahwa R^2 linier $>$ R^2 kubik $>$ R^2 kuadratik $>$ R^2 kuartik, sehingga regresi yang sesuai adalah regresi linier dengan persamaan $y = 7,1731 + 0,2567x$ dengan nilai $r = 0,98$ yang memberikan diameter hambatan tertinggi terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* sebesar 10,2535 mm pada konsentrasi ekstrak kasar kulit jeruk lemon sebesar 12 %. Grafik hubungan konsentrasi ekstrak kasar jeruk lemon terhadap diameter daerah hambatan perkembangan *Aeromonas hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 7.



Gambar 7. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Ekstrak Kasar Jeruk Lemon terhadap Diameter Daerah Hambatan Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Grafik tersebut menunjukkan hubungan antara dosis pemberian ekstrak kasar kulit jeruk lemon dari konsentrasi 0 %, 3 %, 9 %, 6 % hingga 12 % terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* berupa daerah hambatan yang dihasilkan semakin lebar. Hal ini menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi yang diberikan maka semakin besar daya hambat bakteri. Daerah hambatan terbesar dapat pada konsentrasi 12% sebesar 10,2535 mm. Hal ini kemungkinan dapat disebabkan karena pada dosis ini, ekstrak kasar kulit jeruk lemon mengeluarkan senyawa flavonoid secara maksimal sehingga hasil yang efektif dan zat aktif tersebut yang akan berperan sebagai senyawa antibakteri.

Berdasarkan hasil uji MIC, didapatkan konsentasi minimum ekstrak kasar kulit jeruk lemon yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah pada konsentrasi 3 %, kemudian dilakukan uji cakram dengan masa inkubasi 24 jam dan memperoleh hasil adanya pengaruh ekstrak kasar kulit jeruk lemon terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Adanya kandungan asam sitrat yang terdapat di dalam ekstrak kasar kulit jeruk lemon akan menyebabkan protein mengalami denaturasi didahului dengan perubahan

struktur molekulnya, dimana akan menyebabkan protein tidak dapat melakukan fungsinya sehingga sel bakteri akan mengalami kematian. Selain itu senyawa flavonoid dapat merusak membran sitoplasma yang dapat menyebabkan bocornya metabolit penting dan menginaktifkan sistem bakteri. Kerusakan pada membran ini memungkinkan nukleotida dan asam amino merembes keluar sel, dikarenakan membran sitoplasma dapat juga mengendalikan pengangkutan aktif kedalam sel. Hal ini yang dapat menyebabkan kematian sel bakteri atau menghambat pertumbuhan bakteri (Volk dan Wheeler, 1993).

Menurut Harbone (1987) ekstrak kasar memiliki banyak kandungan senyawa yang terdapat di dalamnya, dimana senyawa flavonoid yang terdapat di dalam ekstrak tersebut kandungannya sedikit dibandingkan dengan pencampurnya yaitu air. Daya kerja bahan anti mikroba akan menjadi kurang maksimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini dapat menyebabkan kecilnya daya serap bahan antimikroba pada konsentrasi yang lebih tinggi dari 12 %, sehingga pangaruh bahan antimikroba kurang meluas pada kertas cakram. Luasan daerah hambatan selanjutnya juga semakin kecil dibandingkan dengan konsentrasi 12 %.

Untuk mengetahui sifat dari suatu antimikroba apakah bersifat bakteriostatik atau bakteriosidal maka inkubasi dapat dilakukan selama 48 jam. Menurut Pelczar dan Chan (1986) secara umum antimikroba yang mempengaruhi pembentukan dinding sel atau permeabilitas membran sel bekerja bakteriosidal sedangkan pada sintesis protein bekerja bakteriostatik. Istilah bakteriosid digunakan untuk zat yang dapat membunuh bakteri dan bakteriostatik adalah suatu keadaan yang mencegah pertumbuhan bakteri sehingga populasi bakteri tetap.

Dari hasil penelitian diketahui bahwa senyawa flavonoid pada ekstrak kasar kulit jeruk lemon memiliki sifat bakteriostatik terhadap bakteri *Aeromonas hydrophilla*. Hal ini dapat diketahui dari uji cakram yang telah diinkubasi selama 48 jam, di sekitar kertas cakram terlihat keruh dan hal ini berarti telah ditumbuhi oleh bakteri.

4.3 Suhu Inkubator dan pH media

Pertumbuhan bakteri, dapat diketahui dari beberapa parameter penunjang yang dipakai untuk kehidupan bakteri, diantaranya : pH dan suhu inkubator. Parameter ini sangat penting untuk katalisator agar bakteri dapat tumbuh dengan baik.

Seperti halnya makhluk hidup tingkat tinggi, untuk pertumbuhannya bakteri memerlukan suhu tertentu. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa suhu inkubator yaitu 37° C. Menurut Hayes (2000) suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah 28° C, sedangkan suhu minimum dan suhu maksimalnya adalah 4° C dan 37° C. Menurut Lederberg (1992), sebagian besar bakteri *Aeromonas hydrophila* dapat tumbuh pada suhu antara 20° – 35° C, dan sebagian spesies dapat tumbuh pada suhu 5° C. Dari kisaran diatas, bakteri *Aeromonas hydrophila* dapat digolongkan dalam kelompok bakteri psikrofil yaitu bakteri yang tumbuh pada kisaran suhu 0° C – 20° C dan mesofil yaitu bakteri yang dapat tumbuh pada kisaran suhu 25° – 40° C.

Pada umumnya bakteri dapat tumbuh pada pH media 7,7 – 8,5. Apabila bakteri berada pada kondisi yang asam sedangkan kisarannya tidak memungkinkan, maka pertumbuhannya akan terhambat. Bakteri juga peka terhadap pH basa akan tetapi efek secara umum tidak merusak dibandingkan dengan pH asam (Dwidjoseputro, 1989).

5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian tentang “Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limonum*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro*” diperoleh beberapa kesimpulan sebagai berikut :

- Ekstrak kasar kulit jeruk lemon dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*.
- Hasil uji cakram, ternyata konsentrasi ekstrak kasar kulit jeruk lemon berpengaruh sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan maka semakin lebar daerah hambatan yang terbentuk. Hubungan antara konsentrasi ekstrak kasar kulit jeruk lemon dengan diameter zona hambatan berpola linear dengan persamaan garis $y = 7,1731 + 0,2567x$ dengan nilai $r = 0,98$. Dari hasil penelitian didapat konsentrasi yang paling baik dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah konsentrasi 12 %.
- Suhu inkubator yaitu 37°C, sesuai dengan kisaran suhu pertumbuhan bakteri sedangkan pH yang cocok untuk media bakteri yaitu pada kisaran 7,7-8,5.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian ini disarankan :

- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut konsentrasi diatas 12 %, untuk mengetahui konsentrasi maksimum daya hambat bakteri *Aeromonas hydrophila*.
- Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak kasar kulit jeruk lemon secara langsung pada ikan air tawar yang terserang *Aeromonas hydrophila*.

- Perlu dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui besar kandungan asam sitrat dan zat-zat lain yang terdapat dalam ekstrak kasar kulit jeruk lemon yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous,2005a. *Citrus limonum* (L.) Burm. F. [//www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Citrus 1.html](http://www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Citrus1.html). Diakses April 2006
- _____,2005b. **Citrus Limonum Riso** [www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Citrus 1.html](http://www.plantnames.unimelb.edu.au/Sorting/Citrus1.html). Diakses April 2006
- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 1992. **Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan**. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 89 hal.
- Angka, S.L., I. Yulita dan I. K. J. Utama. 2002. **Aktivitas Antibakteri dari Fitofarmaka secara In Vitro dan In Vivo terhadap *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo**. Jurnal Mikrobiologi Indonesia. CV Sinar Jaya. Bogor. 19 hal.
- Bonang, G dan E. S. Koeswardono. 1982. **Mikrobiologi Kedokteran untuk Laboratorium dan Klinik**. Penerbit PT. Gramedia. Jakarta. 199 hal.
- Dwidjoseputro, D. 1989. **Dasar-Dasar Mikrobiologi**. Penerbit Djambatan. Jakarta. 125 hal.
- Edberg, S.C. 1986. **Tes Kerentanan Antimikroba In Vitro dalam Egberg, S. C and S.A Berger. 1986. Antibiotik dan Infeksi**. Alih Bahasa : Sanusi, C. CV.G.C. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 219 hal
- Gomez, K. A dan A. Gomez. 1995. **Prosedur Statistik Untuk Penelitian Pertanian**. Penerbit Universitas Indonesia (UI-Press). Jakarta. 698 hal.
- Harbone, J. B. 1987. **Metode Fitokimia. Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan**. Terbitan kedua Alih Bahasa : K. Padmawinata dan Iwang S. Penerbit ITB. Bandung. 354 hal.
- Hariyono, E. 2005. **Pengaruh Pemberian Mahkota Dewa (*Phaleria macrocarpa*) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara In Vitro**. Skripsi. Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 46 hal.
- Hayes,J.2000.*Aeromonashydrohila*.www.hmsc.oregonstate.edu/classes/MB92/hydrophilayes/. Diakses tanggal 27 November 2005. 5 hal.
- Jatmikoningtyas, W. 2001. **Uji Efek Anti Bakteri Dekokta Daun Jambu Biji (*Psidium gujava*) Terhadap Bakteri Intestinal (*Escherichia coli*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*) Penyebab Diare Akut**. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Malang. 50 hal.

- Kabata, Z. 1985. **Parasite and Disease of Fish Culture in Tropic**. Taylor and Francis Ltd. London. 317p.
- Lederberg, J. 1992. **Encyclopedia of Microbiology**. Volume 3. Academic Press, Inc. New York. 535 hal.
- Lay, B. W. 1994. **Analisa Mikroba di Laboratorium**. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 168 hal.
- Monang, M. 2005. **Penggunaan Ekstrak Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limonum*) dengan Konsentrasi yang Berbeda Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In Vitro**. Skripsi. Jurusan Budidaya Perairan Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. Hal 11 – 21.
- Murachman dan H Nursyam. 1987. **Buku Penuntun Praktikum Mikrobiologi**. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 40 hal.
- Nabib, R., Pasaribu dan. Fachriyan. 1989. **Patologi dan Penyakit Ikan**. Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Direktorat Jenderal Perikanan Tinggi Pusat Antar Universitas Bioteknologi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 158 hal.
- Paperna. I, 1980. **Paracites, Infection and Disease of Fish In Africa. Food and Agricultered Organization of The United Nations**. New York. 234p.
- Pelczar, M. J. dan E.C.S Chan. 1986. **Dasar-dasar Mikrobiologi**. Alih bahasa = R.S. Hadioetomo, T. Imas, S. S. Tjitrosomo dan S.I. Angka. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 997 hal.
- Prajitno, A. 2005. **Diktat Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan**. Universitas Brawijaya. Fakultas Perikanan. Malang. 105 hal.
- Rukmana, R. 2003. **Usaha Tani Jeruk Purut dalam Pot dan di Kebun**. Kanisius. Yogyakarta. Hal 10 – 13.
- Sukadi, F. 2004. **Kebijakan Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan Dalam Mendukung Akselerasi Pengembangan Perikanan Budidaya**. Prosiding. Seminar Nasional Penyakit Ikan dan Udang IV. Universitas Jenderal Soedirman. Purwokerto. Hal 2 – 7.
- Sukanda, N. 2002. **Pembudidayaan Ikan Mas di Jawa Barat Yang Nyaris Musnah Akibat Serangan Penyakit Mendadak “*Aeromonas* Sejenis Bakteri Garam Negatif, Bukan Virus**. <http://www.kompas.com>. Diakses April 2006. 2 hal.
- Sommers, H.M. 1994. **Uji Kerentanan Obat Invitro dan Monitor Pengobatan Antimikroba**, dalam : Sommers, H.M., Shulman dan Phair (Ed). **Dasar**

Biologis dan Klinis Penyakit Infeksi. Edisi Keempat. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. Hal 581 – 594.

Volk, W.A and M.F.Wheeler, 1993. **Mikrobiologi Dasar.** Alih Bahasa : Markham. Edisi 5. Penerbit Erlangga. Jakarta. 396 hal.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Analisa Data Diameter Daerah Hambatan

a. Data Diameter Daerah Hambatan

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A = 0% (kontrol)	6,1000	6,1000	6,1000	18,3000	6,1000
B = 3%	9,0000	10,0000	9,0000	28,0000	9,3333
C = 6%	9,0000	9,0000	9,0000	27,0000	9,0000
D = 9%	9,0000	9,1000	9,0000	27,1000	9,0333
E = 12%	10,1000	10,1000	10,1000	30,3000	10,1000
Total				130,7000	

Perhitungan :

$$\text{Faktor Koreksi} = G^2/N = 130,7000^2/15 = 17082,4900/15 = \mathbf{1138,8327}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Total} &= [(A1)^2 + (A2)^2 + (A3)^2 + \dots + (E3)^2] - \text{FK} \\ &= [(6,1000)^2 + (6,1000)^2 + (6,1000)^2 + \dots + (10,1000)^2] - 1138,8327 \\ &= \mathbf{28,6373} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Perlakuan} &= \frac{[(TA)^2 + (TB)^2 + (TC)^2 + (TD)^2 + (TE)^2] - \text{FK}}{r} \\ &= \frac{[(18,3000)^2 + (28,0000)^2 + (27,0000)^2 + (27,1000)^2 + (30,3000)^2] - 1138,8327}{3} \\ &= \mathbf{27,9640} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{JK Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 28,6373 - 27,9640 = \mathbf{0,6733} \end{aligned}$$

b. Tabel Sidik Ragam

Sumber keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	27,9640	6,9910	103,8267**	3,48	5,99
Acak	10	0,6733	0,0673			
Total	14	28,6373				

Keterangan : ** berbeda sangat nyata

- db = n - 1
- KT = JK/db

Lampiran 1 (Lanjutan)

➤ F hitung = $\frac{KT \text{ Perlakuan}}{KT \text{ Acak}}$

c. Perhitungan Beda Nyata Terkecil (BNT)

SED = $\sqrt{\frac{2 \times KT \text{ acak}}{\text{Ulangan}}} = \sqrt{\frac{2 \times 0,0673}{3}} = 0,2118$

BNT 5% = t tabel 5% (db acak) x SED
 = 2,228 x 0,2118
 = **0,4719**

BNT 1% = t tabel 1% (db acak) x SED
 = 3,169 x 0,2118
 = **0,6712**

d. Tabel Uji BNT

Perlakuan	A = 6,1000	C = 9,0000	D = 9,0333	B = 9,3333	E = 10,1000	Notasi
A = 6,1000	-					a
C = 9,0000	2,9000**	-				b
D = 9,0333	2,9333**	0,0333 ^{ns}	-			b
B = 9,3333	3,2333**	0,3333 ^{ns}	0,3000 ^{ns}	-		b
E = 10,1000	4,0000**	1,1000 ^{xx}	1,0667 ^{xx}	0,7667 ^{xx}	-	c

e. Tabel Polinomial Orthogonal

Perlakuan (%)	Data (Ti)	Pembanding untuk Regresi (Ci)			
		Linear	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A = 0	18,3000	-2	2	-1	1
B = 3	28,0000	-1	-1	2	-4
C = 6	27,0000	0	-2	0	6
D = 9	27,1000	1	-1	-2	-4
E = 12	30,3000	2	2	1	1
Q=ΣCiTi		23,1000	-11,9000	13,8000	-9,8000
Kr=(Σci^2)*r		30,0000	42,0000	30,0000	210,0000
JK=Q^2/Kr		17,7870	3,3717	6,3480	0,4573

Keterangan :
 r = jumlah ulangan

Lampiran 1 (Lanjutan)

f. Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5 %	F 1 %
1. Perlakuan	4	27,9640				
Linear	1	17,7870	17,7870	264,1634 ^{xx}	4,96	10,00
Kuadratik	1	3,3717	3,3717	50,0743 ^{xx}		
Kubik	1	6,3480	6,3480	94,2772 ^{xx}		
Kuartik	1	0,4573	0,4573	6,7921 ^{xx}		
2. Acak	10	0,6733	0,0673			
Total	14					

Berdasarkan hasil sidik ragam regresi maka regresi yang paling sesuai adalah regresi linier, karena R^2 linier > R^2 kubik > R^2 kuadratik > R^2 kuartik

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{\text{JK regresi linear}}{\text{JK total terkoreksi}} = \frac{17,7870}{17,7870 + 0,6733} = \mathbf{0,9635}$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{\text{JK regresi kuadratik}}{\text{JK total terkoreksi}} = \frac{3,3717}{3,3717 + 0,6733} = 0,8335$$

$$R^2 \text{ Kubik} = \frac{\text{JK regresi kubik}}{\text{JK total terkoreksi}} = \frac{6,3480}{6,3480 + 0,6733} = 0,9041$$

$$R^2 \text{ Kuartik} = \frac{\text{JK regresi kuartik}}{\text{JK total terkoreksi}} = \frac{0,4573}{0,4573 + 0,6733} = 0,4045$$

R^2 Linier > R^2 Kubik > R^2 Kuadratik > R^2 Kuartik, jadi regresi linier lebih sesuai dengan kurva respon

g. Mencari Persamaan Regresi Linier: $y = b_0 + b_1x$

$$b_1 = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$b_0 = y - b_1x$$

Lampiran 1 (Lanjutan)

x	y	xy	x ²
0	6,1000	0,000	0
3	9,3333	28,0000	9,0000
6	9,0000	54,0000	36,0000
9	9,0333	81,3000	81,0000
12	10,1000	121,2000	144,0000
$\Sigma x = 30,0000$	$\Sigma y = 43,5667$	$\Sigma xy = 284,5000$	$\Sigma x^2 = 270,0000$
$X = 6,0000$	$Y = 8,7133$		

$$b_1 = \frac{\Sigma xy - \Sigma x \Sigma y / n}{\Sigma x^2 - (\Sigma x)^2 / n} = \frac{284,5000 - (30,0000)(43,5667) / 5}{270,0000 - 900,0000 / 5} = \mathbf{0,2567}$$

$$b_0 = Y - b_1 X = 8,7133 - (0,2567)(6,0000) = \mathbf{7,1731}$$

sehingga persamaan Regresi Liniernya menjadi: **y = 7,1731 + 0,2567x**

- x = 0 \Rightarrow y = 7,1731
- x = 3 \Rightarrow y = 7,9432
- x = 6 \Rightarrow y = 8,7133
- x = 9 \Rightarrow y = 9,4834
- x = 12 \Rightarrow y = 10,2535

$$R^2 = \mathbf{0,9635}$$

$$r = \sqrt{0,9635} = \mathbf{0,98}$$

