

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR BUAH BELIMBING  
WULUH (*Averrhoa bilimbi*) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI  
*Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO**

**SKRIPSI  
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :

**MARIATI**

**NIM. 115080513111004**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2015**

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR BUAH BELIMBING  
WULUH (*Averrhoa bilimbi*) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI  
*Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO**

**SKRIPSI  
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan  
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan  
Universitas Brawijaya**

**Oleh :**

**MARIATI  
NIM. 115080513111004**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2015**

**SKRIPSI**  
**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR BUAH BELIMBING**  
**WULUH (*Averrhoa bilimbi*) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI**  
***Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO**

Oleh :  
**MARIATI**  
**NIM. 115080513111004**

Telah dipertahankan di depan penguji  
pada tanggal  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat  
SK Dekan No. :  
Tanggal :

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, M.Si)  
NIP. 19671010 199702 1 001  
Tanggal:

(Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS)  
NIP. 19550213 198403 1 001  
Tanggal:

Dosen Penguji II

Dosen Pembimbing II

(Ir. Ellana Sanoesi, MP)  
NIP. 19630924 199803 2 002  
Tanggal:

(Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc)  
NIP. 19621014 198701 1 001  
Tanggal:

Mengetahui,  
Ketua Jurusan  
Manajemen Sumberdaya Perairan

(Dr.Ir. Arning W. Ekawati, MS)  
NIP. 19620805 198603 2 001  
Tanggal:



**PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI**

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar – benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang ditulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, 6 Mei 2015

Mahasiswa

Mariati



## UCAPAN TERIMAKASIH

Syukur Alhamdulillah kami ucapkan ke hadirat Allah SWT, karena atas limpahan rahmat serta karunia-Nya, sehingga kami dapat menyelesaikan laporan hasil Skripsi dengan baik dan tepat waktu tanpa ada halangan yang berarti. Penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Suami tercinta yang senantiasa memberikan motivasi, doa dan dukungan demi kelancaran penyelesaian laporan Skripsi ini dari awal hingga akhir penyelesaian laporan.
2. Kakakku yang selalu memberikan motivasi dan doa demi kelancaran penyelesaian laporan skripsi ini
3. Terima kasih juga saya ucapkan kepada ibu titin dan ibu heni selaku laboran Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan yang selalu membimbing kami mulai dari kita belum mengerti tentang alat dan bahan serta cara pengerjaannya hingga kami dapat menyelesaikan penelitian kami serta laporan skripsi kami
4. Teman – teman seperjuangan yaitu teman – teman anggota parasit juga saya ucapkan banyak terima kasih yang selalu memberikan bantuan dari awal hingga akhir demi terselesaikannya laporan skripsi ini
5. Teman-teman kuliah serta teman-teman satu rumah yang telah banyak memberikan bantuan ikut berperan dalam memperlancar penelitian dan penulisan laporan ini.



## RINGKASAN

**MARIATI.** Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara *In Vitro*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.** dan **Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M. Sc**

---

Akuakultur saat ini menjadi penting dan strategis bagi peningkatan produksi perikanan Indonesia. Salah satu kendala dalam kegiatan perikanan adalah timbulnya penyakit. Penyakit dapat menimbulkan kematian pada ikan budidaya yang menyebabkan kerugian besar pada kegiatan budidaya. Bakteri *P. fluorescens* merupakan salah satu bakteri yang menimbulkan berbagai penyakit pada ikan air tawar seperti penyakit *red skin* yang ditandai dengan perdarahan, sisik terlepas dan ulserasi pada sirip. Penggunaan antibiotik serta obat-obat kimia untuk mengatasi hal tersebut dapat bersifat resisten terhadap bakteri serta dapat membahayakan lingkungan perairan. Oleh karena itu diperlukan suatu bahan alami sebagai pengganti antibiotik yang lebih aman bagi lingkungan perairan yaitu dengan menggunakan ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) yang mengandung senyawa flavonoid dan fenol yang merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari sampai bulan Maret 2015. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui daya hambat ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental yaitu dengan menguji hubungan suatu sebab (*cause*) dengan akibat (*effect*) yang dilakukan dalam suatu sistem tertutup yang kondisinya terkontrol dan teknik pengambilan datanya dengan cara observasi langsung yaitu pengamat merekam apa yang tengah terjadi pada saat itu juga. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), menggunakan 4 perlakuan konsentrasi ekstrak kasar buah belimbing wuluh yaitu : konsentrasi (A) 10% ; (B) 20% ; (C) 30% ; (D) 40%. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan rata-rata diameter daya hambat terbesar yaitu pada konsentrasi 40% yaitu sebesar 13,27 mm. Hubungan antara perbedaan konsentrasi ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap diameter daya hambat bakteri *P. fluorescens* menghasilkan hubungan atau grafik secara linear, dimana persamaannya didapatkan  $y = 0,215x + 3,256$  dengan nilai koefisien determinasi  $R^2 = 0,825$ .

Kesimpulan dari hasil penelitian ini bahwa hasil uji efektifitas antibakterial dengan menggunakan uji cakram menunjukkan konsentrasi ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* dengan konsentrasi maksimalnya yaitu sebesar 40%.

## KATA PENGANTAR

Puji Syukur kami panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga kami dapat menyusun laporan skripsi dengan judul pengaruh pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* secara *in viitro* dengan baik dan tepat waktu tanpa ada halangan suatu apapun.

Laporan ini disusun berdasarkan hasil penelitian pendahuluan yang dilakukan pada bulan Desember 2014 sampai Januari 2015 dengan bantuan dari beberapa pihak. Oleh karena itu, kami mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS dan Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M. Sc selaku pembimbing saya yang telah memberikan motivasi dan membantu dalam penyusunan laporan ini. Ucapan terima kasih juga saya sampaikan kepada Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, M.Si dan Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku penguji yang telah membantu dalam penyempurnaan laporan skripsi ini.

Kami sudah berusaha semaksimal mungkin untuk menyelesaikan laporan ini. Namun, kritik dan saran yang bersifat membangun masih kami harapkan dari pembaca untuk penyempurnaan laporan ini. Akhir kata semoga laporan ini dapat memberikan manfaat bagi kita semua.

Malang, 6 Mei 2015

Penulis

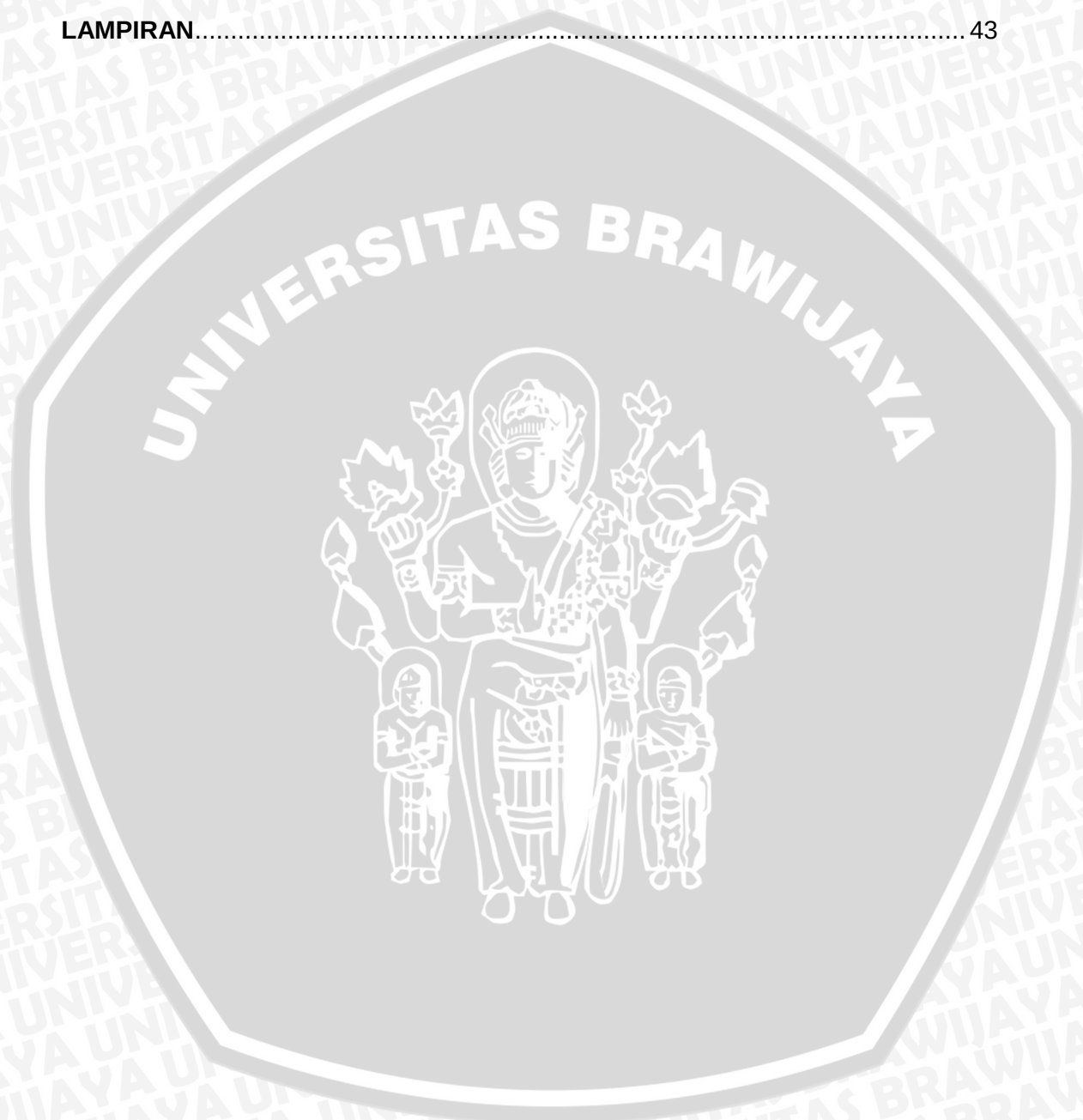


## DAFTAR ISI

|                                                                                | Halaman |
|--------------------------------------------------------------------------------|---------|
| <b>RINGKASAN</b> .....                                                         | vi      |
| <b>KATA PENGANTAR</b> .....                                                    | vii     |
| <b>DAFTAR ISI</b> .....                                                        | viii    |
| <b>DAFTAR TABEL</b> .....                                                      | x       |
| <b>DAFTAR GAMBAR</b> .....                                                     | xi      |
| <b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....                                                   | xii     |
| <b>1. PENDAHULUAN</b>                                                          |         |
| 1.1 Latar Belakang .....                                                       | 1       |
| 1.2 Perumusan Masalah .....                                                    | 3       |
| 1.3 Tujuan Penelitian .....                                                    | 4       |
| 1.4 Manfaat Penelitian .....                                                   | 4       |
| 1.5 Hipotesis .....                                                            | 4       |
| 1.6 Waktu dan Tempat penelitian .....                                          | 4       |
| <b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b>                                                     |         |
| 2.1 Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....                               | 5       |
| 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi .....                                          | 5       |
| 2.1.2 Habitat dan Penyebaran .....                                             | 6       |
| 2.1.3 Pertumbuhan .....                                                        | 7       |
| 2.1.4 Infeksi bakteri <i>P. fluorescens</i> dan Gejalanya .....                | 8       |
| 2.2 Buah Belimbing Wuluh ( <i>Averrhoa bilimbi</i> ) .....                     | 9       |
| 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi .....                                          | 9       |
| 2.2.2 Bahan Aktif Buah Belimbing Wuluh ( <i>A. bilimbi</i> ) .....             | 10      |
| 2.2.3 Aktivitas Antimikroba .....                                              | 11      |
| 2.3 Uji Efektifitas Antibakteri dengan Uji Cakram .....                        | 12      |
| <b>3. METODE PRAKTEK KERJA LAPANG</b>                                          |         |
| 3.1 Materi Penelitian .....                                                    | 14      |
| 3.1.1 Alat penelitian .....                                                    | 14      |
| 3.1.2 Bahan Penelitian .....                                                   | 15      |
| 3.2 Metode Penelitian .....                                                    | 15      |
| 3.3 Pengambilan data .....                                                     | 16      |
| 3.4 Rancangan Penelitian .....                                                 | 16      |
| 3.5 Prosedur Penelitian .....                                                  | 17      |
| 3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan .....                                         | 17      |
| 3.5.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan .....                                       | 19      |
| 3.5.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Buah Belimbing Wuluh ( <i>A. bilimbi</i> ) ..... | 19      |
| 3.5.4 Pembuatan Media .....                                                    | 20      |
| 3.6 Pelaksanaan Penelitian .....                                               | 23      |
| 3.6.1 Uji Cakram .....                                                         | 23      |
| 3.6.2 Parameter Uji .....                                                      | 24      |
| 3.6.3 Analisa Data .....                                                       | 25      |
| <b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN</b>                                                 |         |
| 4.1 Daya Antibakterial Ekstrak Kasar Buah Belimbing Wuluh .....                | 26      |



|                                          |    |
|------------------------------------------|----|
| 4.2 Hasil dari Parameter Penunjang ..... | 36 |
| <b>5. KESIMPULAN DAN SARAN</b>           |    |
| 5.1 Kesimpulan .....                     | 38 |
| 5.2 Saran .....                          | 38 |
| <b>DAFTAR PUSTAKA</b> .....              | 39 |
| <b>LAMPIRAN</b> .....                    | 43 |



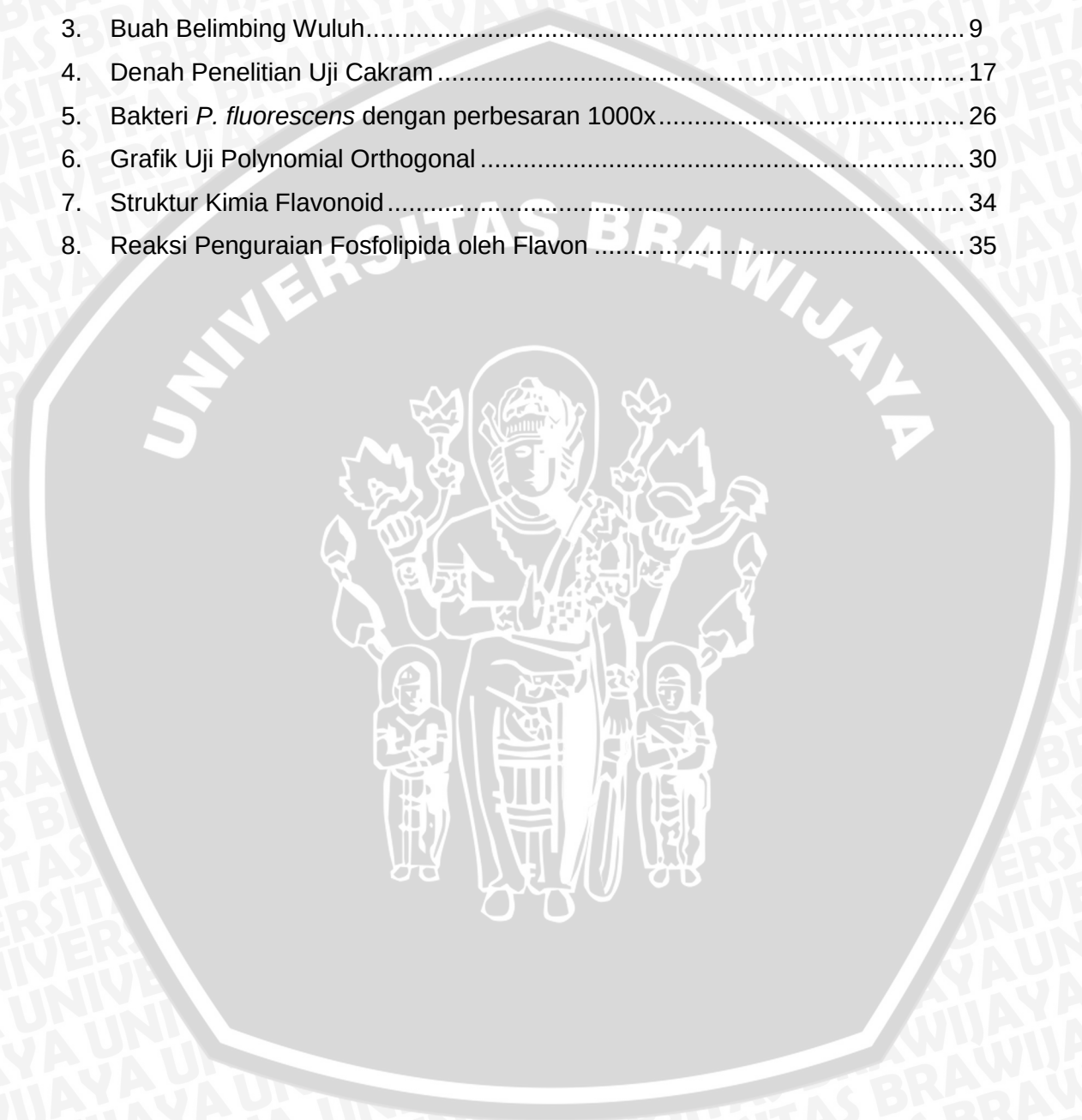
## DAFTAR TABEL

| Tabel                                                           | Halaman |
|-----------------------------------------------------------------|---------|
| 1. Data Hasil Rata – Rata Pengukuran Diameter Daya Hambat ..... | 28      |
| 2. Sidik Ragam Diameter Daya Hambat.....                        | 29      |
| 3. Uji Perbandingan BNT .....                                   | 29      |



## DAFTAR GAMBAR

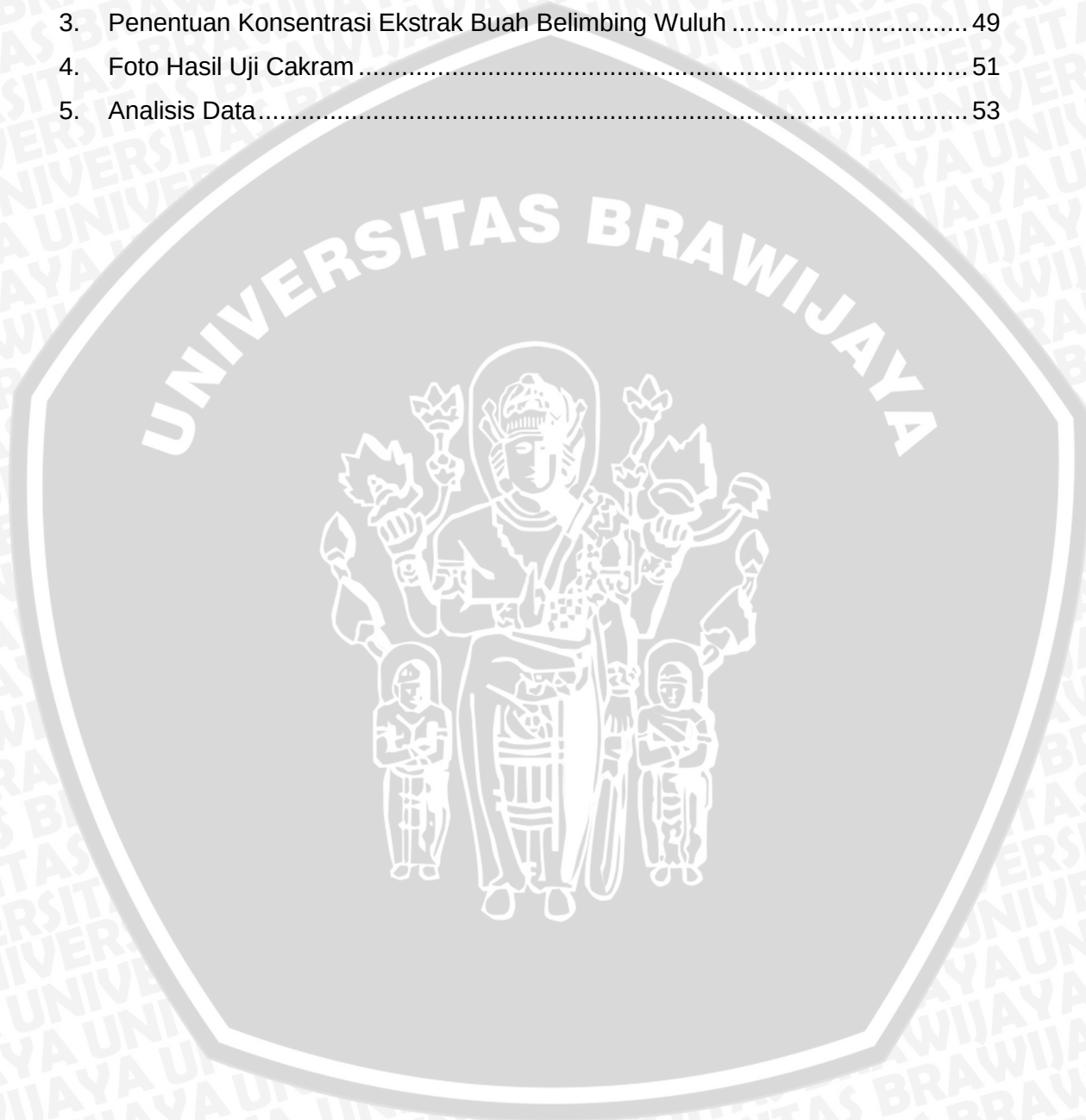
| Gambar                                                        | Halaman |
|---------------------------------------------------------------|---------|
| 1. Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....               | 5       |
| 2. Bagian-bagian bakteri <i>P. fluorescens</i> .....          | 6       |
| 3. Buah Belimbing Wuluh.....                                  | 9       |
| 4. Denah Penelitian Uji Cakram.....                           | 17      |
| 5. Bakteri <i>P. fluorescens</i> dengan perbesaran 1000x..... | 26      |
| 6. Grafik Uji Polynomial Orthogonal.....                      | 30      |
| 7. Struktur Kimia Flavonoid.....                              | 34      |
| 8. Reaksi Penguraian Fosfolipida oleh Flavon.....             | 35      |





## DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran                                                   | Halaman |
|------------------------------------------------------------|---------|
| 1. Foto Alat Penelitian.....                               | 43      |
| 2. Foto Kegiatan Penelitian.....                           | 47      |
| 3. Penentuan Konsentrasi Ekstrak Buah Belimbing Wuluh..... | 49      |
| 4. Foto Hasil Uji Cakram.....                              | 51      |
| 5. Analisis Data.....                                      | 53      |



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia adalah negara kepulauan terbesar di dunia dengan jumlah pulau kurang lebih 17.000-an pulau besar dan kecil, juga memiliki panjang pantai terpanjang kedua di dunia setelah Australia. Sebagai negara kepulauan yang dikelilingi laut, Indonesia mempunyai sumber daya alam laut yang besar, baik sumber daya hayati maupun non-hayati. Sebagaimana perairan laut, perairan tawar pun menyimpan potensi sumber daya alam yang tidak sedikit, yang dapat dimanfaatkan untuk kesejahteraan penduduk Indonesia (Kordi, 2004).

Menurut Kordi (2010), akuakultur menjadi penting dan strategis bagi peningkatan produksi perikanan Indonesia. Akuakultur diharapkan dapat menjadi industri dalam penyediaan pangan, terutama protein hewani. sebagai industri, akuakultur dapat membuka lapangan kerja dan menghasilkan devisa, serta menggerakkan perekonomian bangsa. Dari sisi lingkungan, akuakultur menjadi penyeimbang bagi kegiatan penangkapan.

Salah satu kendala dalam kegiatan marikultur atau budidaya adalah penyakit pada biota budidaya. Timbulnya penyakit dapat disebabkan karena kondisi perairan yang kurang baik, kualitas pakan yang kurang, maupun kualitas induk yang kurang baik. Selain itu, penggunaan teknik budidaya yang kurang tepat dan kontaminasi dari alat - alat budidaya maupun pekerjaanya juga dapat menyebabkan timbulnya penyakit (Hatmanti, 2003).

Penyakit pada ikan dalam kondisi alami dapat timbul akibat adanya interaksi antara inang, jasad patogen dan kondisi lingkungan. Apabila interaksi antara ketiga komponen tersebut tidak seimbang, dapat mengakibatkan penyakit pada ikan. Ikan mudah terserang penyakit terutama disebabkan oleh kondisi ikan yang lemah (semakin turunnya daya tahan ikan) akibat dari beberapa faktor

seperti kepadatan yang tinggi, makanan yang kurang baik, fluktuasi suhu yang besar, penanganan yang buruk serta adanya pembendungan atau polusi yang dapat menyebabkan perubahan ekosistem perairan. Selain itu lemahnya kondisi ikan juga disebabkan oleh perkembangan alat produksi atau pemijahan (Prajitno, 2007).

Menurut Mastan (2013), penyakit lebih sering terjadi dalam sistem budidaya modern. Dalam sistem budidaya intensif, kolam dipupuk menggunakan bahan kimia anorganik, menggunakan suplemen pakan buatan, dan stok ikan dengan kepadatan yang sangat tinggi. Semua kegiatan yang bertujuan untuk meningkatkan produksi ikan dari ekosistem tertentu, pada saat yang bersamaan juga menyebabkan kondisi stress pada ikan. Ikan rentan terhadap berbagai infeksi. Kualitas air yang buruk, bahan organik tinggi, pakan yang terkontaminasi dan kondisi yang tidak higienis adalah beberapa faktor timbulnya penyakit bakteri pada hewan air. *Pseudomonas fluorescens* merupakan komponen dominan pada ekosistem air tawar. *P. fluorescens* terkait dengan kondisi septicemia dan ulcerative pada ikan. *P. fluorescens* biasanya ditemukan dalam air, tanah dan pada tubuh ikan. Bakteri ini merupakan patogen budidaya yang dapat menginfeksi banyak spesies ikan, termasuk ikan koi India, ikan mas dan ikan flounder Jepang. Infeksi *Pseudomonas* pada ikan menyebabkan penyakit *Red Skin*, yang terjadi sepanjang tahun terutama ketika ikan terluka oleh penanganan yang kurang tepat serta luka fisik selama transportasi. Karena kurangnya sarana yang efektif untuk pengendalian penyakit yang sering menyebabkan kematian yang tinggi, sehingga dapat menyebabkan kerugian yang besar.

Menurut Yulvizar (2014), permasalahan penyakit yang disebabkan bakteri patogen dapat diatasi dengan pemberian antibiotik sebagai upaya kemoterapi untuk menghilangkan penyakit. Peningkatan penggunaan antibiotik dapat diikuti oleh bertambahnya penyakit patogenik, karena meningkatnya resistensi bakteri



patogen terhadap bahan kimia (antibiotik). Antibiotik menyebabkan mutasi kromosom patogen atau akuisisi plasmid.

Berdasarkan permasalahan tersebut, maka diperlukan suatu obat alternatif sebagai antibakteri untuk menggantikan penggunaan antibiotik yang lebih aman untuk lingkungan serta tidak bersifat resisten terhadap bakteri. Salah satu alternatif pemecahannya yaitu dengan menggunakan obat tradisional. Penggunaan obat tradisional ini diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri tanpa harus menggunakan bahan – bahan kimia yang berbahaya bagi lingkungan. Kelebihan menggunakan obat tradisional yaitu aman bagi lingkungan, bersifat antibakteri, murah dan mudah untuk didapatkan. Salah satu obat tradisional yang bersifat antibakteri yaitu buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi*). Sari buah belimbing wuluh ini mengandung senyawa antibakteri alami seperti flavonoid dan fenol. Penggunaan sari buah belimbing wuluh diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* sebagai patogen ikan air tawar.

## 1.2 Perumusan Masalah

Penyakit merupakan salah satu kendala dalam kegiatan budidaya dan salah satu penyebabnya yaitu adanya patogen penyakit seperti bakteri. *P. fluorescens* merupakan salah satu bakteri yang menimbulkan berbagai penyakit pada ikan air tawar. Penggunaan antibiotik serta obat – obat kimia untuk mengatasi hal tersebut dapat bersifat resisten terhadap bakteri serta dapat membahayakan lingkungan perairan. Oleh karena itu diperlukan suatu bahan alami sebagai pengganti antibiotik yang lebih aman bagi lingkungan perairan yaitu dengan menggunakan ekstrak buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) yang mengandung senyawa flavonoid dan fenol yang merupakan senyawa yang dapat

menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan latar belakang di atas maka didapatkan perumusan masalah sebagai berikut:

Apakah pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*

### 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu untuk mengetahui daya hambat ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*

### 1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap daya hambat dari bakteri *P. fluorescens*

### 1.5 Hipotesis

Hipotesis yang dapat diambil dari penelitian ini antara lain:

$H_0$  : Diduga pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) dengan konsentrasi yang berbeda tidak mempengaruhi daya hambat dari bakteri *P. fluorescens*

$H_1$  : Diduga pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) dengan konsentrasi yang berbeda dapat mempengaruhi daya hambat dari bakteri *P. fluorescens*

### 1.6 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada tanggal 5 Januari 2015 sampai dengan 6 Maret 2015 di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Kartika (2009), bakteri *P. fluorescens* memiliki klasifikasi sebagai berikut:

|         |                         |
|---------|-------------------------|
| Kingdom | : Bacteria              |
| Phylum  | : Proteobacteria        |
| Class   | : Gamma Proteobacteria  |
| Order   | : Pseudomonadales       |
| Family  | : Pseudomonadaecae      |
| Genus   | : Pseudomonas           |
| Species | : <i>P. fluorescens</i> |

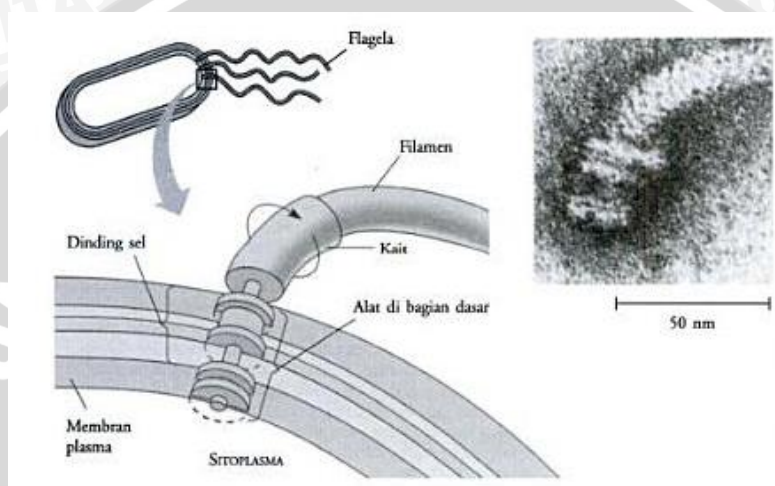


**Gambar 1.** Bakteri *P. fluorescens* (Google image, 2015)

Menurut Dowson (1957), spesies *P. fluorescens* merupakan genus bakteri tanpa spora, termasuk bakteri Gram-negatif, memiliki batang panjang, motil dengan flagella polar dan merupakan fermentor yang lemah terhadap senyawa karbon. Kebanyakan spesies dari *Pseudomonas* tampak putih ketika



dilihat pada media padat dan ketika masih muda semua spesies motil dengan kutub flagel bervariasi dengan jumlah satu sampai tujuh. Biasanya dalam persiapan pereparasi, flagel dapat dilihat pada kedua tiang penyangga sel dalam organisme lophotrichous, tetapi *Pseudomonas* menunjukkan sel – sel yang membagi setiap sel karena dilengkapi dengan kutub flagel sebelum pemisahannya.



**Gambar 2.** Bagian-bagian bakteri *P.fluorescens* (Campbell, Reece dan Mitchell, 2003)

Menurut Salle (1961), bakteri *Pseudomonas* berbentuk lurus, melengkung atau spiral, kaku dan berbentuk batang. Bakteri ini jarang membentuk pasangan atau rantai. Pada beberapa spesies, sel – sel membentuk ellipsoid dan sering membentuk coccoid atau bahkan dalam bentuk bola. Diameternya biasanya sekitar  $1,0\ \mu$ , tetapi dalam beberapa spesies sel individu bakteri lebih besar dari normal yaitu mencapai ukuran diameter  $3,0$  sampai  $14,0\ \mu$ , dan panjangnya  $100\mu$ .

### 2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Irianto (2005), *P. fluorescens* merupakan bakteri berbentuk batang pendek, motil dengan flagella polar dan bersifat Gram-negatif. *P. fluorescens* menyerang ikan air tawar dan merupakan pathogen oportunistik.

Secara umum tanda-tanda klinis infeksi *P. fluorescens* mirip dengan *Aeromonas hydrophila* antara lain terjadinya haemoragik septicemia, hemoragik pada insang dan ekor, dan borok pada kulit.

Menurut Salle (1961), banyak spesies *Pseudomonas* terdapat pada perairan pantai, rawa, kolam dan di tanah. Terdapat pula pada parasit, beberapa bahkan patogen, yang dapat menyebabkan penyakit pada ikan dan vertebrata berdarah dingin lainnya. beberapa spesies menyebabkan penyakit jantung pada mammalia, termasuk manusia.

Menurut Tortora, Funke dan Case (2001), *Pseudomonas* sangat umum ditemukan di tanah dan lingkungan alam lainnya. Bakteri ini sangat kurang efisien daripada beberapa bakteri heterotrof lainnya dalam memanfaatkan nutrisi, tetapi mereka mengimbangnya dengan cara yang lain. Misalnya, *Pseudomonas* mampu mensintesis jumlah enzim yang sangat besar dan dapat melakukan metabolisme dalam berbagai substrat. Oleh karena itu, mereka mungkin memberikan kontribusi yang signifikan terhadap dekomposisi bahan kimia seperti pestisida yang ditambahkan ke tanah. Banyak *Pseudomonas* dapat tumbuh pada temperatur yang rendah. Karakteristik ini dikombinasikan dengan kemampuan bakteri untuk menggunakan protein dan lipid sehingga berperan penting dalam pembusukan makanan.

### 2.1.3 Pertumbuhan

Menurut Arwiyanto, Maryudani dan Azizah (2007), semua isolat *P. fluorescens* tumbuh baik pada kisaran pH 6-7 serta suhu antara 20°C - 41°C. Pada medium yang mengandung NaCl semua bakteri tumbuh sampai pada konsentrasi NaCl 2%.

Menurut Sastrahidayat (1990), fase – fase pertumbuhan populasi bakteri terdiri dari fase penyesuaian, fase logaritmis, fase statis dan fase penurunan/kematian. Pada fase penyesuaian, pertumbuhan populasi bakteri



cukup pelan karena bakteri harus menyesuaikan diri dengan lingkungan barunya. Selanjutnya pada fase berikutnya, bakteri membelah dengan cepat karena telah sesuai dengan kondisi lingkungan dan persaingan diantara setiap individu relatif belum terjadi. Pada fase statis, bakteri mengalami hambatan – hambatan di dalam pertumbuhannya oleh sebab ketidaksesuaian lingkungannya dengan kebutuhan populasi yang ada (persaingan, kekurangan makanan, adanya racun – racun dan sebagainya), sehingga pertumbuhan populasi relatif konstan atau statis. Setelah populasi tidak dapat lagi mentolerir keadaan pada saat tersebut, terjadilah kemudian fase penurunan jumlah populasi yang relatif cepat karena banyak sel – sel yang mati.

#### **2.1.4 Infeksi Bakteri *P. fluorescent* dan Gejalanya**

Bakteri patogen menghasilkan berbagai enzim yang pada dasarnya tidak toksik tetapi berperan penting dalam proses infeksi. Beberapa bakteri patogen memproduksi enzim hidrolitik seperti protease dan hialuronidase, yang mendegradasi komponen matrik ekstraseluler sehingga dapat merusak struktur jaringan inang. Enzim hidrolitik ini digunakan oleh bakteri untuk memperoleh sumber karbon dan energi dengan menghancurkan polimer inang menjadi gula sederhana dan asam amino (Salyers dan Whitt, 1994 dalam Baehaki, Suhartono, Palupi dan Nurhayati, 2008).

Menurut Attia, Mesalhy, Galil dan Fathi (2012), penyakit bakteri antara ikan disebabkan oleh berbagai patogen dan merupakan masalah ekonomi yang signifikan pada kegiatan akuakultur. *P. fluorescens* adalah bakteri Gram-negatif keluarga Pseudomonadaceae, umumnya bakteri patogen yang terkait dengan spesies akuakultur yang dipelihara. *P. fluorescens* adalah patogen untuk berbagai jenis ikan termasuk grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), black carp (*Mylopharyngodon piceus*), dan ikan nila (*Oreochromis*). Infeksi ikan oleh *P. fluorescens* akan membentuk penyakit yang disebut *Red Skin* yang ditandai



dengan pendarahan, sisik terlepas, dan ulserasi pada sirip. Wabah penyakit ini sering timbul ketika terjadi kondisi stress.

Menurut Hardi, Pebrianto dan Saptiani (2014), ikan *Labeo rohita* dan *Cyprinus carpio* yang diinjeksi dengan *Pseudomonas* sp. menunjukkan gejala seperti sirip gripis, pendarahan pada kulit dan luka pada permukaan tubuh, sisik lepas, produksi mukus berlebih dan pada infeksi yang parah tampak adanya luka dalam atau tukak (ulkus).

## 2.2 Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*)

### 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Kumar, Gousia, Anupama dan Latha (2013), klasifikasi dari buah belimbing wuluh seperti di bawah ini:

|            |                        |
|------------|------------------------|
| Kingdom    | : Plantae              |
| Subkingdom | : Tracheobionta        |
| Division   | : Magnoliophyta        |
| Class      | : Dicotyledonae        |
| Order      | : Oxalidaceae          |
| Family     | : Oxalidaceae          |
| Genus      | : Averrhoa             |
| Species    | : <i>A. bilimbi</i> L. |



**Gambar 3.** Buah Belimbing Wuluh (Roy, Geetha dan Lakshmi, 2011)

Buahnya memiliki rasa asam sering digunakan sebagai bumbu masakan dan campuran ramuan jamu. Bunganya kecil, muncul langsung dari batang dengan tangkai bunga berambut. Buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L) berbentuk elips hingga seperti torpedo, dengan panjang 4-20 cm. Warna buah ketika muda hijau, dengan sisa kelopak bunga menempel diujungnya. Jika masak buahnya berwarna kuning atau kuning pucat. Daging buahnya berair dan sangat asam. Kulit buah berkilap dan tipis. Bijinya kecil (6 mm), berbentuk pipih, dan berwarna coklat, serta tertutup lender (Rahayu, 2013).

### 2.2.2 Bahan Aktif Buah Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L.)

Menurut Kumar *et al.* (2011) dalam Sutrisna, Ermawati, Mulyadin dan Agung (2012), belimbing wuluh banyak digunakan dalam mengobati berbagai keluhan antara lain antibakteri, antiskorbut, astringent, mengobati demam, mumps, diabetes, sipilis, batuk, hipertensi, ulkus lambung. Sedangkan menurut Roy *et al.* (2011) dalam Sutrisna *et al.* (2012), vitamin dan mineral yang terdapat dalam buah belimbing antara lain riboflavin, vitamin B1, niacin, asam askorbat, carotene, vitamin A, sedang mineralnya antara lain phosphor, kalsium dan besi.

Menurut Kumar (2013), berbagai macam ekstrak buah dan daun belimbing memiliki aktivitas antidiabetes, antimikroba, anti-inflamasi, aktifitas sitotoksik, aktivitas antioksidan, antifertilitas dan antibakteri. Buah *A. bilimbi* banyak mengandung saponin, tannin dan flavonoid.

Secara menyeluruh senyawa tannin menurun selama proses pematangan dan pendewasaan. Senyawa tannin selalu mengalami perubahan sesuai dengan perkembangan tanaman atau buah. Secara umum tannin mencapai kandungan tertinggi pada waktu masih muda dan menurun setelah tua (Winarno dan Aman, 1981 dalam Savitri, 2014). Sedangkan menurut Purwantiningsih, Suranindyah dan Widodo (2014), hasil test terhadap senyawa fenol dan flavonoid menunjukkan bahwa ekstrak buah mengkudu mentah, mengkal dan matang



mempunyai kandungan senyawa flavonoid serta fenol dan buah mengkudu matang yang memiliki kadar fenol paling tinggi.

Tanaman belimbing wuluh telah dimanfaatkan sebagai obat tradisional. Adapun kandungan baham kimia alami dari buah belimbing wuluh yang diketahui mempunyai efek antibakteri yaitu, flavonoid dan fenol (Hembing, 2008 *dalam* Prayogo, Rahardja dan Putri, 2011).

### 2.2.3 Aktivitas Antimikroba

Antimikroba adalah suatu zat yang mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroba. Apabila zat tersebut mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri disebut antibakteri. Mekanisme kerja antimikroba antara lain dengan jalan merusak dinding sel, merusak membran sitoplasma, mendenaturasi protein sel dan menghambat kerja enzim dalam sel (Prajitno, 2007).

Menurut Hembing (2008) *dalam* Prayogo *et al.* (2011), buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) memiliki zat antibakteri diantaranya flavonoid dan fenol. Senyawa aktif flavonoid di dalam sari buah belimbing wuluh memiliki kemampuan membentuk kompleks dengan protein sel bakteri melalui ikatan hidrogen. Struktur dinding sel dan membrane sitoplasma bakteri yang mengandung protein, menjadi tidak stabil karena struktur protein sel bakteri menjadi rusak karena adanya ikatan hidrogen dengan flavonoid, sehingga protein sel bakteri menjadi kehilangan aktivitas biologinya, akibatnya fungsi permeabilitas sel bakteri terganggu dan sel bakteri akan mengalami lisis yang berakibat pada kematian sel bakteri (Harborne, 1987). Pertumbuhan sel bakteri dapat terganggu oleh komponen fenol dari sari buah belimbing wuluh, yaitu dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri. Akibat terdenaturasinya protein sel bakteri, maka semua aktivitas metabolisme sel bakteri dikatalisis oleh enzim yang merupakan protein (Lawrence dan Block, 1968). Menurut Marcus, Daniel, Huang,



James, Emil dan Nicholas (1991) dalam Prayogo *et al.* (2011), fenol juga dapat menyebabkan kerusakan dinding sel. Fenol berikatan dengan protein melalui ikatan hidrogen, sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Sebagian besar struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak.

Flavonoid merupakan senyawa aktif yang berfungsi untuk mengganggu sintesis dinding bakteri sehingga terjadi kebocoran plasma yang diakhiri dengan lisisnya bakteri, selain itu flavonoid berfungsi untuk menghambat DNA gyrase dan menghambat aktivitas enzim ATPase bakteri. Flavonoid juga dapat menghambat metabolisme energi bakteri. Alkaloid merupakan senyawa yang lebih berefek pada bakteri Gram positif dibanding pada bakteri Gram negatif. Alkaloid bekerja sebagai DNA interkalator dan penghambat sintesis DNA dengan cara menghambat topoisomerase. Saponin dan steroid pada ekstrak belimbing wuluh berfungsi sebagai perusak protein bakteri dengan cara berinteraksi yang nonspesifik dengan protein bakteri (Dewi, Joharman dan Budiarti, 2013).

### 2.3 Uji Efektivitas Antibakteri dengan Uji Cakram

Menurut Hermawan, Hana dan Wiwiek (2007) dalam Dewi (2010), uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. *Disk diffusion test* atau uji difusi disk dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak. Syarat jumlah bakteri untuk uji kepekaan/ sensitifitas yaitu  $10^5$ - $10^8$  CFU/mL. sedangkan menurut Kusmayaitu dan Agustini (2007), metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan. Metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, metode lubang/ sumuran dan metode cakram kertas.

Menurut Harmita dan Radji (2008), metode cakram merupakan cara yang mudah untuk menetapkan kerentanan organisme terhadap antibiotik adalah dengan menginokulasi pelat agar dengan biakan dan membiarkan antibiotik berdifusi ke media agar. Cakram yang telah mengandung antibiotik diletakkan di permukaan pelat agar yang mengandung organisme yang diuji. Konsentrasi menurun sebanding dengan luas bidang difusi. Pada jarak tertentu pada masing – masing cakram, antibiotik terdifusi sampai pada titik antibiotik tersebut tidak lagi menghambat pertumbuhan mikroba. Efektivitas antibiotik ditunjukkan oleh zona hambatan. Zona hambatan tampak sebagai area jernih atau bersih yang mengelilingi cakram tempat zat dengan aktivitas antimikroba terdifusi. Diameter zona dapat diukur dengan penggaris dan hasil dari eksperimen ini merupakan satu antibiogram.



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro* antara lain:

- Timbangan digital
- Vortex mixer
- Nampan
- Oven
- Erlenmeyer
- Spatula
- Gelas ukur
- Corong
- Rotary vacuum evaporator
- Botol Film
- Tabung reaksi
- Rak tabung reaksi
- Hotplate
- Inkubator
- Lemari pendingin
- Beaker glass
- Cawan petri
- Pinset
- Bunsen
- Autoclave
- Korek gas
- Micropipet
- Blue tip
- Jarum osse
- Gunting
- Laminar Air Flow



### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut:

- Buah Belimbing Wuluh (*A. bilimbi*)
- Kertas label
- Etanol 96%
- Aquades
- Bakteri *P. fluorescens*
- PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)
- TSB (*Tryptic Soy Broth*)
- TSA (*Tryptic Soy Agar*)
- Alumunium foil
- Alkohol 70%
- Kapas
- Tali
- NaCl
- Tissue
- Kertas saring
- Kertas cakram
- Spiritus

### 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan metode eksperimen. Menurut Hartanto (2003), penelitian eksperimental pada dasarnya adalah ingin menguji hubungan suatu sebab (*cause*) dengan akibat (*effect*). Pengujian dilakukan dalam suatu sistem tertutup, yang kondisinya terkontrol. Terdapat beberapa unsur dalam penelitian eksperimental, yaitu adanya situasi (kelompok) kontrol dan kelompok uji atau kelompok perlakuan, serta adanya intervensi peneliti (perlakuan). Kegunaan dari rancangan eksperimental adalah mendapatkan informasi yang relevan dengan permasalahan penelitian secara maksimal, dengan materi, biaya dan waktu yang minimal. Sehingga penelitian menjadi lebih efektif dan efisien dalam hal waktu, biaya, tenaga dan analisa statistiknya.

### 3.3 Pengambilan Data

Teknik pengambilan data pada penelitian ini dengan cara observasi langsung. Menurut Wibisono (2013), observasi langsung dapat memberikan suatu rekaman yang sangat mendetail tentang kejadian atau apa yang dilakukan oleh seseorang pada saat itu juga. Dengan observasi langsung ini, tidak akan ada usaha untuk mengawasi atau memanipulasi situasi. Pengamat merekam apa yang tengah terjadi pada saat itu juga. Ada banyak tipe data yang dapat diperoleh secara lebih akurat melalui pengamatan langsung dibandingkan melalui pertanyaan seperti yang diajukan dalam wawancara. Seorang peneliti menggunakan metode observasi langsung untuk menyusun data dengan mencatat peristiwa yang tengah terjadi.

### 3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian pengaruh pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap bakteri *P. fluorescens* secara in vitro ini adalah rancangan acak lengkap (RAL). Menurut Sampurna dan Nindhia (2013), syarat penggunaan Rancangan Acak Lengkap (RAL) adalah hanya ada satu peubah bebas (*independent variable*) yang disebut perlakuan, jadi tidak ada peubah lain selain perlakuan yang mempengaruhi respons hasil penelitian (*dependent variable*).

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan variabel bebas yang digunakan yaitu pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) dengan perlakuan perbedaan pemberian konsentrasi ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap bakteri *P. fluorescens*. Dasar dari penelitian ini yaitu penelitian pendahuluan untuk menentukan dosis yang tepat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Penelitian ini menggunakan empat perlakuan dan satu kontrol (+) dan satu kontrol (-). Masing – masing

perlakuan diulang sebanyak tiga kali sehingga ada 14 unit percobaan. Untuk denah penelitian disajikan pada Gambar 4. berikut:

|                |                |                |                |   |
|----------------|----------------|----------------|----------------|---|
| D <sub>1</sub> | B <sub>3</sub> | C <sub>2</sub> | A <sub>1</sub> | E |
| C <sub>3</sub> | D <sub>2</sub> | A <sub>2</sub> | B <sub>2</sub> | F |
| B <sub>1</sub> | A <sub>3</sub> | C <sub>1</sub> | D <sub>3</sub> |   |

**Gambar 4.** Denah penelitian uji cakram

Gambar diatas menunjukkan denah percobaan yang digunakan pada penelitian. Huruf A, B, C, dan D menunjukkan perlakuan perbedaan konsentrasi yang digunakan dimana huruf A merupakan perlakuan dengan konsentrasi 10%, perlakuan B merupakan perlakuan dengan konsentrasi 20%, perlakuan C merupakan perlakuan dengan konsentrasi 30% dan perlakuan D merupakan perlakuan dengan konsentrasi 40%. Sedangkan E dan F menunjukkan kontrol dimana E merupakan kontrol (+) sedangkan F merupakan kontrol (-). Sementara angka 1, 2, dan 3 menunjukkan banyaknya ulangan yang digunakan.

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi merupakan hal penting yang harus dilakukan sebelum dimulai percobaan yang bertujuan untuk membunuh semua mikroorganisme yang tidak dikehendaki yang menempel pada alat maupun bahan. Adapun langkah-langkah dalam sterilisasi yaitu:



- Pertama mencuci semua alat – alat dengan menggunakan sabun dan ditunggu hingga kering.
- Setelah kering, alat dibungkus dengan menggunakan plastik tahan panas atau dibungkus dengan menggunakan kertas koran. Sterilisasi bahan dilakukan dengan cara memasukkan bahan ke dalam erlenmeyer atau ke dalam tabung reaksi.
- Mulut tabung reaksi ataupun erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas hingga benar – benar rapat lalu dibungkus dengan menggunakan kertas aluminium foil dan dirapatkan dengan menggunakan tali.
- Alat dan bahan yang sudah siap disterilisasi, dimasukkan ke dalam keranjang sterilisasi.
- Memasukkan aquades ke dalam ruang sterilisasi sampai menutup sistem pemanas (*heater*), untuk mencegah penimbunan kapur pada elemen pemanas.
- Keranjang yang sudah berisi alat maupun bahan yang akan disterilisasi dimasukkan ke dalam *autoclave*.
- *Autoclave* ditutup dengan cara menutup tuas secara diagonal agar seimbang kekuatannya pada saat penutupan.
- Klep keluarnya uap (*safety valve*) dipastikan pada posisi berdiri atau tegak.
- *Autoclave* dinyalakan pada posisi ON (ke atas), dan temperatur diputar pada posisi maksimal.
- Ditunggu hingga keluar uap air lalu klep ditutup atau arah ke samping.
- Ditunggu sampai jarum menunjukkan suhu sterilisasi ( $121^{\circ}\text{C}$ ).
- Temperatur diturunkan sampai lampu pada *sterilizing* berwarna kuning dan timer diatur pada posisi 15 menit.

- Setelah alarm berbunyi maka pertanda sterilisasi berakhir dan temperatur diturunkan minimal.
- *Autoclave* dimatikan pada posisi OFF, lalu klep dibuka secara perlahan sampai jarum menunjukkan angka 0 dan tutup *autoclave* dapat dibuka.

### 3.5.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan

Selain alat dan bahan, sterilisasi tempat perlakuan juga penting dilakukan karena bertujuan untuk menghindari terjadinya kontaminasi dengan mikroorganisme lain yang tidak diinginkan. Tempat perlakuan seperti meja dan semua barang yang akan digunakan untuk penelitian maupun tangan laboran yang bersinggungan dengan penelitian harus benar – benar dalam kondisi aseptis. Sterilisasi tempat perlakuan ini dapat dilakukan dengan cara sterilisasi kimia menggunakan alkohol 70% serta dapat dilakukan dengan sterilisasi fisika menggunakan pemijaran dengan api bunsen maupun menggunakan penyinaran dengan sinar UV.

### 3.5.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Buah Belimbing Wuluh (*A. bilimbi*)

Proses pembuatan ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- Menyiapkan buah belimbing wuluh dan dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci dengan air sampai bersih kemudian ditiriskan.
- Selanjutnya, buah dipotong tipis – tipis untuk mempercepat proses pengovenan. Suhu yang digunakan pada saat pengovenan yaitu 40-50°C. Pengovenan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air dari buah sehingga mudah untuk mendapatkan senyawa antibakterinya.
- Setelah buah belimbing wuluh kering, dilakukan maserasi dengan merendam buah belimbing wuluh ke dalam bejana maserasi yang terbentuk dari toples kaca dan diberi larutan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 7,5.

- Bejana maserasi ditutup dengan rapat dan dibiarkan selama 2 hari dengan sesekali diaduk.
- Setelah 2 hari, filtrat disaring dan dipisahkan dengan residu.
- Residu direndam kembali dengan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 4 selama 2 hari.
- Setelah 2 hari, filtrat disaring kembali dari residu dan digabungkan dengan hasil rendaman yang pertama.
- Gabungan kedua filtrat diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental.

#### 3.5.4 Pembuatan Media

##### A. PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)

Penelitian ini menggunakan bakteri *P. fluorescens*, sehingga media yang digunakan yaitu PSA (*Pseudomonas Selective Agar*). Dosis yang digunakan dalam pembuatan PSA sebesar 25 gram/L. Langkah – langkah dalam pembuatan PSA sebagai berikut:

- Ditimbang PSA sebanyak 7 gram,
- PSA dilarutkan ke dalam erlenmeyer yang berisi aquades sebanyak 280 ml.
- PSA diaduk dengan menggunakan spatula hingga benar-benar larut secara homogen.
- Setelah larut sempurna, erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas sampai rapat, lalu ditutup lagi dengan kertas alumunium foil dan dirapatkan dengan penali.
- Media yang sudah tertutup rapat, disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Media ditunggu hingga hangat kuku lalu dituang ke dalam cawan petri dalam kondisi steril.



- Media ditunggu hingga mengeras dan siap untuk digunakan. Apabila media tidak langsung digunakan, maka media diberi label dan disimpan dalam lemari pendingin agar tidak terkontaminasi.

### **B. TSB (*Tryptic Soy Broth*)**

TSB (*Tryptic Soy Broth*) merupakan media yang digunakan untuk kultur bakteri *P. fluorescens*. Langkah yang dilakukan dalam pembuatan media TSB yaitu:

- Ditimbang TSB sebanyak 0,6 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml.
- Ditambahkan aquades sebanyak 20 ml, diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kekuningan.
- Erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas hingga rapat lalu dibungkus dengan menggunakan kertas aluminium foil dan diikat dengan menggunakan benang kasur agar benar – benar tertutup rapat.
- Media disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- Setelah sterilisasi selesai, media dibiarkan dingin karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.

### **C. Pemiakan Bakteri *P. fluorescens***

Penelitian ini menggunakan bakteri *P. fluorescens* yang didapat dari isolat murni berasal dari Balai Besar Budidaya Air Payau Jepara. Isolat murni ini kemudian diremajakan pada media agar miring yaitu dengan menggunakan media TSA (*Tryptic Soy Agar*). Hal ini sesuai dengan pernyataan Hudayanti (2004) dalam Wuryanti dan Murnah (2009), sebelum dipakai dalam uji antibakteri, bakteri yang akan dipakai setiap kali harus diregenerasi terlebih dahulu. Langkah pertama yang dilakukan adalah membuat biakan agar miring

yaitu menggoreskan biakan dari stok bakteri ke media *Nutrient Agar* (NA) miring yang masih baru. Kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Jadi biakan tersebut merupakan aktivitas awal dari stok bakteri yang dapat disimpan pada suhu 4-5°C.

Untuk mendapatkan bakteri dalam bentuk cair, maka bakteri diremajakan kembali dengan metode gores menggunakan media cair yaitu TSB (*Tryptic Soy Broth*). Langkah yang dilakukan pada pembiakan bakteri *P. fluorescens* yaitu:

- Menyiapkan larutan media TSB yang telah dingin.
- Jarum ose dipanaskan di atas bunsen hingga berpijar untuk menghindari terjadinya kontaminasi.
- Setelah dingin, jarum ose disentuhkan pada biakan murni bakteri *P. fluorescens* dan dicelupkan pada media TSB yang sudah dingin.
- Media TSB dibiarkan selama 24 jam di dalam inkubator dengan suhu 30°C.
- Setelah 24 jam, media TSB akan berubah menjadi keruh yang menandakan bahwa bakteri telah tumbuh.
- Bakteri ini kemudian dilihat kepadatannya dengan Metode Mc. Farland dengan cara mencocokkan kekeruhannya berdasarkan kepadatan bakteri pada Mc. Farland. Kepadatan bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu  $10^7$  CFU/ml. Kepadatan bakteri  $10^7$  CFU/ml didapatkan dengan cara mencocokkan kepadatan bakteri pada media cair TSB dengan Mc. Farland berdasarkan kekeruhannya. Hasil dari Mc Farland yaitu  $10^8$  CFU/ml, sehingga untuk mendapatkan bakteri dengan kepadatan  $10^7$  CFU/ml, maka diambil 1 ml bakteri dari media cair TSB dan diencerkan dengan menggunakan Nafis sebanyak 6 ml lalu didapatkan bakteri dengan kepadatan  $10^7$  CFU/ml. Menurut Savitri (2014), suspensi standar 0,5 Mc Farland adalah suspensi yang menunjukkan konsentrasi kekeruhan bakteri



sama dengan  $10^8$  CFU/ml (Mutia, 2010). Maka suspensi bakteri dibuat terlebih dahulu kemudian disesuaikan kekeruhannya dengan 0,5 Mc Farland.

- Disiapkan petridisk yang sudah berisi media PSA.
- Bakteri dibiakkan dengan menyelupkan cotton swap pada bakteri yang sudah diencerkan.
- Digoreskan bakteri pada media agar pada cawan petri dengan metode gores supaya bakteri tidak terlalu menumpuk pada media agar pada cawan petri.
- Media PSA diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu  $30^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam.

Menurut Irianto (2005), teknik isolasi bakteri dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu secara goresan (*streaking*), atau secara sebar ulas (*spread plating*) pada media padat dalam cawan petri. Kedua cara tersebut memiliki kekurangan dan kelebihan. Pada cara sebar ulas, kemungkinan memperoleh pathogen lebih besar karena sampel yang diambil dari hewan yang sakit atau air paling tidak sebanyak 1 gram atau 1 ml. Adapun secara goresan dilakukan hanya dengan menyentuhkan ujung *jarum osse*, jarum inokulasi atau *cotton bud* steril pada bagian – bagian tertentu hewan yang diteliti (misalnya lembar insang, bagian luka atau borok, mucus atau *ascites*) selanjutnya digoreskan pada media.

### 3.6 Pelaksanaan Penelitian

#### 3.6.1 Uji Cakram

Menurut Harmita dan Radji (2008), metode cakram merupakan cara yang mudah untuk menetapkan kerentanan organisme terhadap antibiotik adalah dengan menginokulasi pelat agar dengan biakan dan membiarkan antibiotik berdifusi ke media agar. Efektivitas antibiotik ditunjukkan oleh zona hambatan. Zona hambatan tampak sebagai area jernih atau bersih yang mengelilingi cakram tempat zat dengan aktivitas antimikroba terdifusi.



Prosedur pelaksanaan uji cakram adalah:

- Disiapkan cawan petri yang sudah terdapat media PSA sebanyak 20 ml.
- Disiapkan berbagai konsentrasi ekstrak kasar buah belimbing wuluh yang akan diujikan untuk mengetahui daya hambatnya.
- Disiapkan bakteri pada media TSB dengan kepadatan  $10^8$  dan diencerkan dengan menggunakan Nafis untuk mendapatkan bakteri *P. fluorescens* dengan kepadatan  $10^7$ .
- Penanaman bakteri pada media PSA dilakukan dengan mencelupkan cotton swap pada bakteri yang sudah diencerkan ke Nafis.
- Bakteri digoreskan pada media PSA dengan metode zig-zag. Penanaman bakteri ini dilakukan pada *Laminar Air Flow* dengan kondisi yang tetap steril agar tidak terkontaminasi.
- Merendam kertas cakram pada masing – masing konsentrasi yang ditentukan selama 15 menit.
- Kertas cakram ditiriskan dan diletakkan pada lempeng agar yang sebelumnya sudah ditanami bakteri.
- Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu ruang yaitu  $30^{\circ}\text{C}$ .
- Diukur diameter zona bening yang ada disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong untuk menentukan konsentrasi optimum yang dapat menghambat bakteri.
- Untuk mengetahui sifat bakteriosidal (membunuh bakteri) maka dilakukan pengamatan setelah 48 jam.

### 3.6.2 Parameter Uji

Parameter yang diamati pada penelitian ini terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utamanya yaitu melakukan pengamatan terhadap zona hambat bakteri yang dilakukan dengan cara mengukur diameter

zona bening di sekeliling kertas cakram dari masing – masing perlakuan yaitu konsentrasi maksimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Parameter penunjangnya adalah suhu inkubasi yakni sebesar 30°C serta lama perendaman kertas cakram pada ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) selama 15 menit.

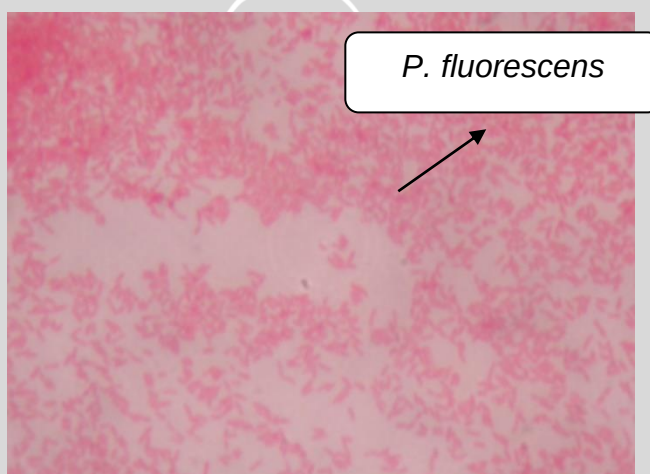
### 3.6.3 Analisa Data

Data hasil zona hambat dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan diameter zona hambat antar perlakuan. Semua analisa akan diulang sebanyak tiga kali dari masing – masing perlakuan dan diuji secara statistik dengan menggunakan *analysis of variance* (ANOVA) sesuai rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha = 0,05$ ) dan 99% ( $\alpha = 0,01$ ). Analisis digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variable bebas) terhadap parameter yang diukur. Apabila nilai uji F memiliki hasil berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka akan dilanjutkan dengan Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antar dua perlakuan.

#### 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

##### 4.1 Daya Antibakterial Ekstrak Kasar Buah Belimbing Wuluh (*A. bilimbi*)

Bakteri *P. fluorescens* merupakan bakteri gram negatif yang sering menyerang pada ikan air tawar (Gambar 5). Untuk mengatasi penyerangan bakteri ini maka dilakukan pengujian dengan menggunakan ekstrak buah belimbing wuluh yang memiliki senyawa antibakteri. Untuk mengetahui daya antibakterial dari ekstrak maka dilakukan uji daya hambat dengan menggunakan kertas cakram yang telah direndam dengan berbagai konsentrasi dari ekstrak kasar buah belimbing wuluh.



**Gambar 5.** Bakteri *P. fluorescens* dengan perbesaran 1000x (Dokumentasi pribadi, 2015)

Daya hambat atau zona bening ditunjukkan dengan tidak ditumbuhinya bakteri *P. fluorescens* di sekitar kertas cakram yang sudah direndam oleh ekstrak dengan konsentrasi yang berbeda – beda. Zona bening ini muncul karena ekstrak memiliki senyawa antibakterial yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini sesuai dengan pernyataan Anon (2007) dalam Kusmarwati (2008), aktivitas daya hambat bakteri dinyatakan berdasarkan zona bening yang dihasilkan di sekitar *paperdisk*. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri diukur dalam satuan mm dan dijadikan ukuran kuantitatif untuk ukuran zona



hambat. Efektifitas dari bahan aktif, ditentukan oleh perbandingan diameter zona hambat dengan nilai standar.

Penelitian ini menggunakan konsentrasi antara lain 10%, 20%, 30% dan 40%. Pemilihan konsentrasi ini didasarkan pada penelitian pendahuluan. Kemampuan daya antibakterial ekstrak terhadap bakteri ditentukan dengan cara mengukur diameter daya hambat atau zona bening yang muncul di sekitar kertas cakram. Semakin lebar zona bening yang dihasilkan, maka semakin kuat sifat antibakterial dari ekstrak. Dari keempat konsentrasi yang diujikan menunjukkan adanya zona bening disekitar kertas cakram yang telah direndam dengan ekstrak kasar buah belimbing wuluh. Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak kasar buah belimbing wuluh mampu menghambat pertumbuhan bakteri atau bersifat bakteristatik yang ditimbulkan oleh adanya senyawa flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak kasar buah belimbing wuluh. Menurut Rahayu (2013), flavonoid merupakan senyawa yang mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol, butanol, dan aseton. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol, senyawa fenol mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri, dan jamur. Flavonoid pada buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) termasuk senyawa fenol. Senyawa fenol dalam buah belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) bekerja dengan cara denaturasi protein sehingga meningkatkan permeabilitas membran sel. Denaturasi protein menyebabkan gangguan dalam pembentukan sel sehingga merubah komposisi komponen protein.

Untuk mengetahui nilai dari kenormalan data, maka dilakukan uji kenormalan data yang ditunjukkan pada Lampiran 5. Dosis perlakuan ditentukan dengan cara perhitungan yang ditunjukkan pada Lampiran 3. Hasil data pengukuran daya hambat ditunjukkan pada Tabel 1. dibawah ini.

**Tabel 1.** Data hasil rata – rata pengukuran diameter daya hambat (mm) ekstrak buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*

| Perlakuan            | Ulangan |         |          | Total  | Rata-rata | Total Kuadrat |
|----------------------|---------|---------|----------|--------|-----------|---------------|
|                      | 1       | 2       | 3        |        |           |               |
| <b>A (10%)</b>       | 6.73    | 7.2     | 8.2      | 22.13  | 7.38      | 489.74        |
| <b>B (20%)</b>       | 4.18    | 7.15    | 3.63     | 14.96  | 4.99      | 223.80        |
| <b>C (30%)</b>       | 8.58    | 7.55    | 9.65     | 25.78  | 8.59      | 664.61        |
| <b>D (40%)</b>       | 14.15   | 14      | 11.65    | 39.8   | 13.27     | 1584.04       |
| <b>Total</b>         | 33.64   | 35.9    | 33.13    | 102.67 |           | 10541.13      |
| <b>Rerata</b>        | 8.41    | 8.975   | 8.2825   |        |           |               |
| <b>Total Kuadrat</b> | 1131.65 | 1288.81 | 1097.597 |        |           |               |

Pada Tabel 1. di atas menunjukkan hasil pengukuran diameter daya hambat ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap bakteri *P. fluorescens*. Berdasarkan tabel tersebut hasil rata – rata diameter daya hambat terbesar yaitu pada konsentrasi 40% yaitu sebesar 13,27 mm. Hal ini dimungkinkan karena adanya senyawa flavonoid yang lebih besar dibandingkan pada konsentrasi yang lain. Sementara hasil rata – rata diameter daya hambat terkecil terdapat pada konsentrasi 20% yaitu sebesar 4,99 mm yang diduga bakteri telah resisten pada konsentrasi tersebut sehingga tidak memberikan diameter daya hambat yang maksimal. Dari hasil pengukuran diameter daya hambat tersebut dilanjutkan dengan perhitungan menggunakan sidik ragam yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Hasil sidik ragam tentang pengaruh pemberian ekstrak buah belimbing wuluh dengan berbagai konsentrasi terhadap bakteri *P. fluorescens* dapat dilihat pada Tabel 2., sementara perhitungan sidik ragamnya dapat dilihat pada Lampiran 5.



**Tabel 2.** Sidik ragam diameter daya hambat ekstrak buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*

| Sumber Keragaman | Db | JK      | KT       | F Hitung | F 5% | F 1% |
|------------------|----|---------|----------|----------|------|------|
| Perlakuan        | 3  | 108.968 | 36.32273 | 20.13**  | 4.07 | 7.59 |
| Acak             | 8  | 14.4355 | 1.804434 |          |      |      |
| Total            | 11 | 123.404 |          |          |      |      |

Keterangan : \*\* = Berbeda Sangat Nyata

Pada perhitungan sidik ragam di atas menunjukkan pengaruh pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* adalah berbeda sangat nyata. Hal ini ditunjukkan dengan hasil perhitungan F Hitung yang lebih besar dari F Tabel 1% atau nilai 20,13 lebih besar dari 7,59. Selanjutnya untuk mengetahui antar perlakuan (rata – rata) yang mana yang berbeda sangat nyata maka dilakukan uji nilai tengah (rata – rata) antar perlakuan atau uji Beda Nyata Terkecil (BNT) yang ditunjukkan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Uji perbandingan Beda Nyata Terkecil (BNT) ekstrak buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*

| Rerata perlakuan | B (4.99)           | A (7.38)           | C (8.59) | D (13.27) | Notasi |
|------------------|--------------------|--------------------|----------|-----------|--------|
| B (4.99)         | 0.00               |                    |          |           | a      |
| A (7.38)         | 2.39 <sup>ns</sup> | 0.00               |          |           | b      |
| C (8.59)         | 3.60*              | 1.21 <sup>ns</sup> | 0.00     |           | c      |
| D (13.27)        | 8.28**             | 5.89**             | 4.68**   | 0.00      | d      |

Keterangan : \*) berbeda nyata

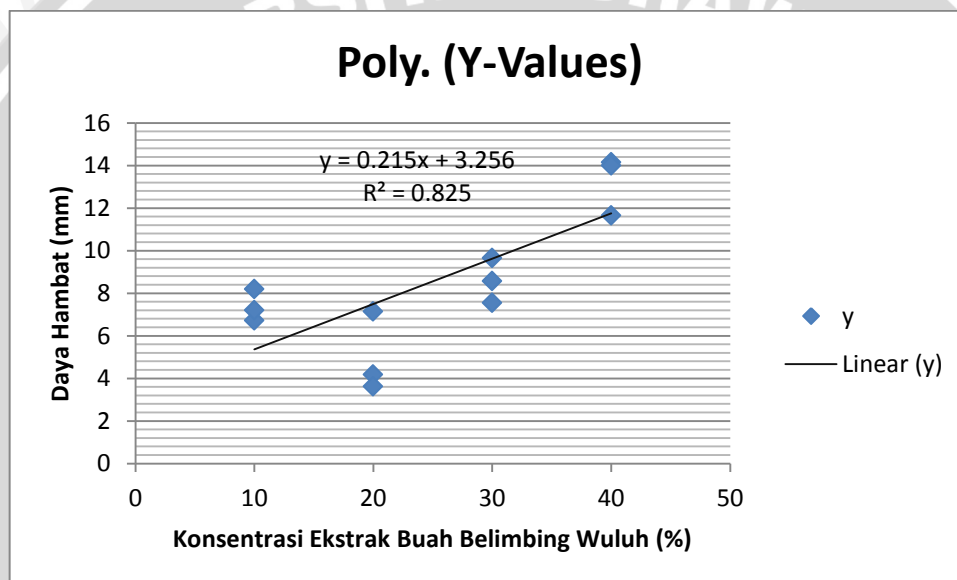
\*\*) berbeda sangat nyata

Berdasarkan Tabel 3. di atas menunjukkan bahwa perlakuan yang berbeda sangat nyata yaitu pada perlakuan D (40%). Hasil perhitungan selisihnya menunjukkan bahwa perlakuan D (40%) berbeda sangat nyata dengan perlakuan B (20%), perlakuan D (40%) berbeda sangat nyata dengan perlakuan A (10%) dan perlakuan D (40%) berbeda sangat nyata dengan perlakuan C (30%). Sedangkan perlakuan C berbeda nyata dengan perlakuan B dan perlakuan C tidak berbeda nyata dengan perlakuan A begitu juga perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan B. Nilai dengan huruf yang berbeda kearah



kolom menunjukkan bahwa perbedaan perlakuan memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata. Kesimpulan dari uji BNT ini didapat dari hasil selisih antar perlakuan (rata – rata) yang dibandingkan dengan nilai BNT 5% dan nilai BNT 1% yang ditunjukkan pada Lampiran 5.

Untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antara perlakuan dengan parameter yang diuji yaitu daya hambat bakteri *P. fluorescens*, maka dilakukan uji polinomial orthogonal. Hasil uji polynomial orthogonal ditunjukkan pada Gambar 6. dan pada Lampiran 5.



**Gambar 6.** Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap diameter zona hambat bakteri *P. fluorescens*

Berdasarkan hasil uji polinomial orthogonal yang ditunjukkan pada Gambar 4. di atas menunjukkan bahwa hubungan antara perbedaan konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap diameter daya hambat bakteri *P. fluorescens* menghasilkan hubungan atau grafik secara linear. Dari gambar tersebut nampak bahwa perlakuan ini menghasilkan garis perpotongan yang membentuk grafik linear dengan persamaan  $y = 0,215x + 3,256$  dengan nilai koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0,825. Grafik tersebut menunjukkan bahwa konsentrasi maksimal ekstrak buah belimbing wuluh yang dapat menghambat

pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* yaitu terdapat pada konsentrasi 40%. Kemampuan ekstrak buah belimbing wuluh untuk dapat memberikan diameter daya hambat terbaik ini diduga disebabkan karena adanya senyawa flavonoid yang lebih besar dari konsentrasi perlakuan lain yang telah diberikan.

Menurut Sabir (2005), flavonoid merupakan salah satu senyawa fenol alami yang tersebar luas pada tumbuhan, yang disintesis dalam jumlah sedikit (0,5-1,5%) dan dapat ditemukan pada hampir semua bagian tumbuhan. Penelitian *in vitro* maupun *in vivo* menunjukkan aktivitas biologis dan farmakologis dari senyawa flavonoid sangat beragam, salah satu diantaranya yakni memiliki aktivitas antibakteri. Sedangkan menurut Roslizawati, Ramadani, Fakhurrizi, dan Herrialfian (2013), flavonoid berperan langsung sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme seperti bakteri atau virus. Mekanisme penghambatan flavonoid terhadap pertumbuhan bakteri diduga karena kemampuan senyawa tersebut membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler, mengaktifasi enzim, dan merusak membran sel. Pada umumnya senyawa flavonoid dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif. Flavonoid dapat berfungsi sebagai bahan antimikrob dengan membentuk ikatan kompleks dengan dinding sel dan merusak membran. Senyawa ini merupakan antimikrob karena kemampuannya membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler terlarut serta dinding sel mikroba. Flavonoid yang bersifat lipofilik akan merusak membran mikroba.

Pada konsentrasi 10% ekstrak buah belimbing wuluh sudah dapat memberikan diameter daya hambat yang cukup baik, namun pada konsentrasi 20% terjadi penurunan diameter daya hambat yang dihasilkan. Hal ini diduga karena bakteri telah resisten terhadap antibakteri dari ekstrak buah belimbing wuluh, sehingga tidak menghasilkan diameter daya hambat yang maksimal. Menurut Ariyanti, Darmayasa dan Sudirga (2012) aktivitas antibakteri dari



senyawa aktif juga dapat dihambat oleh mekanisme resistensi bakteri terhadap bahan antibakteri. Adanya struktur membran luar yang kompleks pada bakteri gram negatif membatasi akses senyawa aktif ekstrak ke dalam membran sel, dan menjadikan bakteri lebih resisten terhadap antibakteri.

Menurut Elifah (2010) dalam Ariyanti *et al.* (2012), diameter daya hambat tidak selalu naik sebanding dengan naiknya konsentrasi antibakteri, kemungkinan ini terjadi karena perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar serta jenis dan konsentrasi senyawa antibakteri yang berbeda juga memberikan diameter zona hambat yang berbeda. Sedangkan penelitian Iriano (2008) dalam Ariyanti *et al.* (2012), menunjukkan bahwa uji antibakteri infusum lidah buaya terhadap *Porphyromonas gingivalis* dengan metode difusi, zona hambatan paling besar pada konsentrasi 30% dan 90% yaitu 1,75 mm, sedangkan konsentrasi 40-80% memiliki zona hambatan yang lebih rendah yaitu berkisar antara 0,75-1 mm. Hal ini dapat disebabkan oleh banyaknya faktor yang berpengaruh terhadap besar zona hambatan yang dihasilkan pada metode difusi antara lain kecepatan difusi, sifat media agar yang digunakan, jumlah organisme yang diinokulasi, kecepatan tumbuh bakteri, konsentrasi bahan kimia, serta kondisi pada saat inkubasi sehingga diperlukan adanya standarisasi keadaan untuk memperoleh hasil yang dapat dipercaya.

Untuk mengetahui sifat antibakteri dari ekstrak kasar buah belimbing wuluh, maka dilakukan pengamatan setelah inkubasi selama 48 jam. Setelah inkubasi selama 48 jam, terlihat bahwa diameter daya hambat dari masing – masing perlakuan rata – rata mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar buah belimbing wuluh masih bersifat bakteriostatik. Menurut Anita, Khotimah dan Yanti (2014), sifat antibakteri mempunyai efek bakterisida yang ditandai dengan adanya peningkatan diameter zona hambat. Talaro (2008) dalam Anita *et al.* (2014), menyatakan bahwa semakin lama sel bakteri terpapar



dengan senyawa antibakteri maka semakin besar peningkatan diameter zona hambat. Sedangkan sifat bakteriostatik terlihat dengan adanya penurunan diameter zona hambat pada jam ke-48. Terjadinya penurunan tersebut dapat disebabkan bakteri bersifat gram negatif dan mempunyai dinding sel lebih tebal dibandingkan bakteri gram positif. Fardiaz (1983) dalam Anita *et al.* (2014), mengemukakan bahwa bakteri gram negatif dan bakteri gram positif mempunyai dinding sel yang berbeda sensitivitasnya terhadap perlakuan fisik, enzim dan antibiotik.

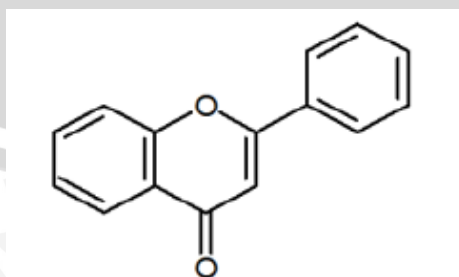
Menurut Amin (2014), secara umum, aktivitas antibiotik dibagi menjadi dua bagian besar, yaitu bakteriostatik (menghambat pertumbuhan mikroba) dan bakterisidal (membunuh mikroba). Contoh antibiotik yang bersifat bakterisidal antara lain *aminoglycoside*, *beta-lactam*, *metronidazole*, *kuinolon*, *rifampicin*, *pirazinamide*, *vancomycin*, *isoniazide*, dan *bacitracin*. Sedangkan antibiotik yang memiliki sifat bakteriostatik antara lain *chloramphenicol*, *clindamycin*, *ethambutol*, *macrolide*, *sulfonamide*, *tetracycline* dan *trimethoprim*. Namun sifat bakteriostatik dan bakterisid dari antimikroba tidak mutlak karena antibiotik dengan sifat bakteriostatik dapat pula bersifat bakterisid bila kadarnya ditingkatkan.

Menurut Rahayu (2013), hasil uji skrining fitokimia pendahuluan terhadap ekstrak kental methanol buah belimbing diketahui positif mengandung senyawa golongan flavonoid, alkaloid, saponin dan minyak atsiri dengan kemungkinan kandungan utamanya adalah flavonoid. Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol yang mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri dan jamur. Pada buah belimbing wuluh (*A. bilimbi* L) kandungan antioksidan termasuk tinggi dibandingkan dengan buah-buahan lain. Dengan kandungan fenol sebanyak  $1261,63 \pm 31,41$  mg GAE/100 g dan nilai aktivitas antioksidan sebesar  $91,89\% \pm 0,01\%$ <sup>1,2</sup>. Sedangkan ekstrak etanol dari buah

belimbing wuluh menunjukkan uji positif pada pengujian flavonoid dan terpenoid.

Dari penelitian, senyawa flavonoid bersifat aktif sebagai antimikroba.

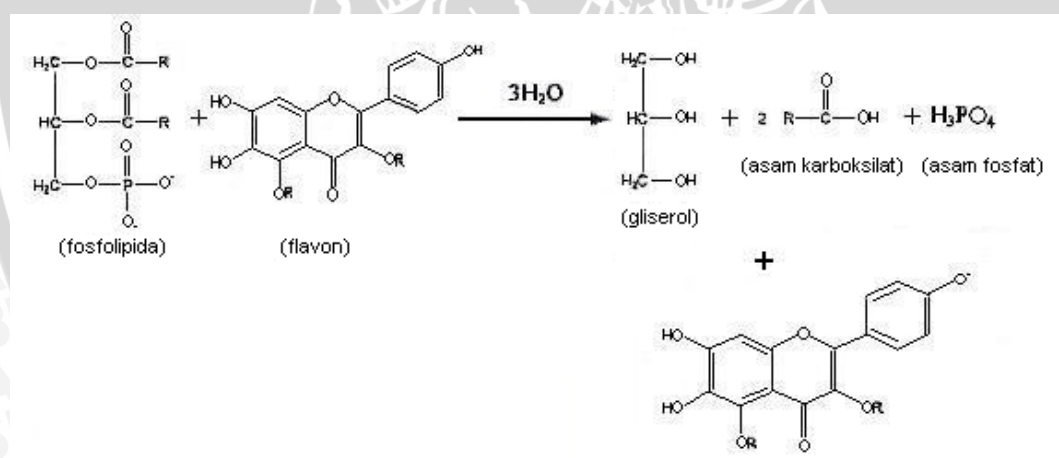
Menurut Harborne (1987) dalam Maulidia (2010), Flavonoid adalah senyawa yang terdiri dari  $C_6-C_3-C_6$  dan umumnya terdapat pada tumbuhan sebagai glikosida. Menurut Markham (1988), dalam tumbuhan aglikon flavonoid (yaitu flavonoid tanpa gula) terdapat dalam berbagai bentuk struktur. Semuanya mengandung 15 atom karbon dalam inti dasarnya, yang tersusun dalam konfigurasi yaitu dua cincin aromatik yang dihubungkan oleh satuan tiga karbon yang dapat membentuk cincin ketiga. Flavonoid merupakan kandungan senyawa khas pada tumbuhan hijau dengan mengecualikan alga. Flavonoid sebenarnya terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, bunga dan biji. Aglikon dari flavonoid adalah polifenol dan karena itu mempunyai sifat kimia senyawa fenol, yaitu bersifat agak asam sehingga dapat larut dalam basa dan ketika ditambahkan basa atau ammonia warnanya akan berubah. Tetapi bila senyawa ini terlalu lama di dalam basa akan menyebabkan banyak senyawa flavonoid terurai. Flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar. Hal ini disebabkan karena adanya gula yang terikat pada flavonoid yang cenderung menyebabkan flavonoid mudah larut dalam air sehingga flavonoid ini dapat diekstraksi dengan etanol 70% dan tetap ada dalam lapisan air setelah ekstrak dikocok dengan petroleum eter.



**Gambar 7.** Struktur Kimia Flavonoid (Maulidia, 2010)



Menurut Volk dan Wheeler (1988) dalam Prajitno (2007), menjelaskan bahwa senyawa flavonoid dapat merusak membran sitoplasma yang dapat menyebabkan bocornya metabolit penting dan menginaktifkan sistem enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino merembes keluar dan mencegah masuknya bahan – bahan aktif ke dalam sel, keadaan ini dapat menyebabkan kematian bakteri. Pada perusakan membran sitoplasma, ion  $H^+$  dan turunanya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipida akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma akibatnya membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan dan bahkan kematian. Reaksi penguraian fosfolipida pada membran sitoplasma bakteri oleh flavon ditunjukkan dalam Gambar 8.



**Gambar 7.** Reaksi penguraian fosfolipida pada membran sitoplasma bakteri oleh flavon

Menurut Ariyanti *et al.* (2012), mekanisme yang menyebabkan penghambatan dalam pertumbuhan bakteri diduga disebabkan adanya interaksi senyawa fenol dan turunannya dengan sel bakteri. Senyawa – senyawa ini berikatan dengan protein pada bakteri melalui ikatan non spesifik membentuk kompleks protein fenol. Pada konsentrasi rendah, terbentuk kompleks protein



fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian, kemudian merusak membran sitoplasma dan menyebabkan kebocoran isi sel, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat. Sedangkan pada konsentrasi tinggi, zat tersebut berkoagulasi dengan protein seluler dan membran sitoplasma mengalami lisis. Menurut Dwidjoseputro (1994), senyawa fenol masuk ke dalam sel bakteri melewati dinding sel bakteri dan membran sitoplasma, di dalam sel bakteri senyawa fenol menyebabkan penggumpalan (denaturasi) protein penyusun protoplasma sehingga dalam keadaan demikian metabolisme menjadi inaktif, dan pertumbuhan bakteri menjadi terhambat.

Menurut Rokhman (2007), hasil penelitian menunjukkan bahwa konsentrasi fenol 5% bersifat antiseptik terhadap *Staphylococcus aureus* pada 10 menit masa kontak. Mekanisme kerja senyawa fenol sebagai antiseptik yaitu merusak dan menembus dinding sel bakteri, kemudian mengendapkan protein sel mikroba sehingga merupakan racun bagi protoplasma.

#### 4.2 Hasil dari Parameter Penunjang

Pada penelitian ini parameter penunjang yang digunakan yaitu suhu inkubasi dengan menggunakan suhu sebesar 30°C. Dengan menggunakan suhu inkubasi sebesar 30°C pada penelitian, maka hasil pembiakan bakteri *P. fluorescens* sudah dapat tumbuh dengan baik setelah diinkubasi selama 24 jam. Tanda – tanda bahwa bakteri *P. fluorescens* sudah tumbuh yaitu pada media agar berwarna kekuningan padat. Penggunaan suhu 30°C ini karena suhu optimal pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* yaitu sebesar 25°C sampai dengan 30°C. Hal ini sesuai dengan pernyataan Anonymous (2013), bakteri *P. fluorescens* tumbuh pada pH netral dan memiliki suhu pertumbuhan optimal sebesar 25-30°C (Palleroni, 1984), dengan suhu pertumbuhan terendah sebesar 4°C. *P. fluorescens* tidak membentuk spora atau struktur hidup lain dan tidak

tumbuh di bawah kondisi asam ( $\text{pH} < 4,5$ ) (Holt, 1994). Kebutuhan nutrisi *P. fluorescens* sangat sederhana, sehingga mereka dapat bertahan hidup dan berkembang biak selama berbulan – bulan pada lingkungan yang lembab. Kebanyakan strain hidup secara aerobik kemo-organotroph yaitu membutuhkan oksigen dan karbon organik untuk pertumbuhan.

Lama perendaman kertas cakram pada konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh juga dapat mempengaruhi diameter daya hambat yang dihasilkan. Oleh karena itu, parameter penunjang kedua yang digunakan pada penelitian ini yaitu lama perendaman kertas cakram pada ekstrak yaitu selama 15 menit. Dengan perendaman kertas cakram selama 15 menit pada konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh, maka kertas cakram dapat menyerap ekstrak dengan sempurna sehingga hasil diameter daya hambat juga maksimal yang ditunjukkan pada Lampiran 4. Hal ini sesuai dengan pernyataan Noverita, Fitria dan Sinaga (2009), pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode Kirby-Bauer yang dikenal dengan sebutan metode cakram kertas. Tiap – tiap cakram kertas kosong sebelumnya dipanaskan dalam oven pada suhu  $70^{\circ}\text{C}$  selama 15 meni, kemudian kertas cakram dicelupkan ke dalam larutan uji. Cakram yang telah berisi supernatan, kemudian didiamkan selama 15 menit sebelum diletakkan pada media uji. Kemudian secara aseptik, setelah kertas cakram menyerap supernatan tersebut, masing – masing diletakkan pada permukaan medium yang telah berisi mikroba uji.



## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro* diperoleh kesimpulan bahwa hasil uji efektifitas antibakterial dengan menggunakan uji cakram menunjukkan konsentrasi ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* dengan konsentrasi daya hambat maksimalnya yaitu sebesar 40%, namun masih bersifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) dan belum bersifat bakterisidal (membunuh bakteri).

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan untuk menggunakan ekstrak buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) untuk menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* yang menyerang ikan air tawar pada kolam. Selain itu juga disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian ekstrak kasar buah belimbing wuluh (*A. bilimbi*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro* yang mengacu pada kandungan senyawa antibakteri lain yang terdapat pada buah belimbing wuluh seperti saponin, tannin dan alkaloid serta disarankan adanya penelitian lebih lanjut secara *in vivo* dengan menggunakan ikan air tawar yang terserang bakteri *P. fluorescens* dengan rentang konsentrasi ekstrak buah belimbing wuluh sebesar 10% hingga 40%.



## DAFTAR PUSTAKA

- Amin, L. Z. 2014. Pemilihan Antibiotik yang Rasional. *Scientific Journal of Pharmaceutical Development and Medical Application*. **27** (3): 40-45.
- Anita, A., S. Khotimah, A. H. Yanti. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Benalu Jambu Air (*Dendrophoe pentandra* (L.) Miq) Terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi*. *Jurnal Protobiont*. **3** (2): 268-272.
- Anonymous. 2013. Draft Screening Assessment for *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Gouvernement du Canada: Canada. 48 hlm.
- Ariyanti, N. K., I. B. G. Darmayasa, S. K. Sudirga. 2012. Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis* Miller) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. *Jurnal Biologi*. **16** (1): 1-4.
- Arwiyanto, T., Y. M. S. Maryudani dan N. Azizah. 2007. Sifat – Sifat Fenotipik *Pseudomonas fluorescens*, Agensia Pengendalian Hayati Penyakit Lincat Pada Tembakau Temanggung. *Biodiversitas*. **8** (2): 147-151.
- Attia, A., S. Mesalhy, Y. A. Galil dan M. Fathi. 2012. Effect of Injection Vaccination against *Pseudomonas fluorescens* on Specific and Non-Specific Immune Response of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Using Different Prepared Antigens. *Open Acces Scientific Reports*. **1** (12): 1-7.
- Baehaki, A., M. T. Suhartono, N. S. Palupi dan T. Nurhayati. 2008. Purifikasi dan Karakterisasi Protease dari Bakteri Patogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal. Teknol. dan Industri Pangan*. **19** (1): 80-87.
- Campbell, N. A., J. B. Reece, L. G. Mitchell. 2003. Biologi Edisi Kelima Jilid 2. Erlangga: Jakarta: 472 hlm
- Dewi, F. K. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*, Linnaeus) Terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. Skripsi Universitas Sebelas Maret: Surakarta. 37 hlm.
- Dewi, I. K., Joharman, L. Y. Budiarti. 2013. Perbandingan Daya Hambat Ekstrak Etanol dengan Sediaan Sirup Herbal Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Pertumbuhan *Shigella dysenteriae* In Vitro. *Berkala Kedokteran*. **9** (2): 191-198.
- Dowson, W. J. 1957. Plant Disease Due to Bacteria. Cambridge at the University Press: New York. 225 hlm.
- Hardi, E. H., C. A. Pebrianto, G. Saptiani. 2014. Toksisitas Produk Ekstraseluler dan Intraseluler Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Veteriner*. **15** (3): 312-322.
- Harmita dan M. Radji. 2008. Buku Ajar Analisis Hayati. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta. 167 hlm.

- Hartanto, R. 2003. Modul Metodologi Penelitian. Universitas Diponegoro: Semarang. 24 hlm.
- Hatmanti, A. 2003. Penyakit Bakterial Pada Budidaya Krustasea Serta Cara Penanganannya. *Oseana*. **28** (3): 1-10.
- Irianto, A. 2005. Patologi Ikan Teleostei. Gadjah Mada University Press: Yogyakarta. 256 hlm.
- Kartika, A. 2009. Teknik Eksplorasi dan Pengembangan Bakteri *Pseudomonas fluorescens*. 18 hlm.
- Kordi, M. G. H. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. PT. Rineka Cipta dan PT. Bina Adiaksara: Jakarta. 194 hlm.
- \_\_\_\_\_. 2010. Panduan Lengkap Memelihara Ikan Air Tawar di Kolam Terpal. Lily Publisher. Yogyakarta. 280 hlm.
- Kumar, K. A., S. K. Gousia, Anupama, M. dan J. N. L. Latha. 2013. A Review on Phytochemical Constituents and Biological Assays of *Averrhoa bilimbi*. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research*. **3** (4): 136-139.
- Kusmarwati, A., dan N. Indriati. 2008. Daya Hambat Ekstrak Bahan Aktif Biji Picung (*Pangium edule* Reinw.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri Penghasil Histamin. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. **3** (1): 29-36.
- Mastan, S.A. 2013. *Pseudomonas* Septicemia in *Labeo Rohita* (Ham.) and *Cyprinus Carpio* (Linn.) in Andra-Natural Occurrence and Artificial Challenge. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **5** (2): 564-568.
- Maulidia, S. O. 2010. Uji Efektivitas dan Fotostabilitas Krim Ekstrak Etanol 70% The Hitam (*Camellia sinensis* L.) Sebagai Tabir Surya Secara *in vitro*. Skripsi Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta. 319 hlm.
- Noverita, D. Fitria dan E. Sinaga. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit dari Daun dan Rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia*. **4** (4):171-176.
- Prajitno, A. 2007. Penyakit Ikan – Udag: Bakteri. Penerbit Universitas Negeri Malang: Malang. ISBN:978-979-3506-89-0. 115 hlm.
- \_\_\_\_\_. 2007. Uji Sensitifitas Flavonoid Rumput Laut (*Eucheuma cottoni*) Sebagai Bioaktif Alami Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi*. *Jurnal Protein*. **15** (2): 66-71.
- Prayogo, B. S. Rahardja dan R. W. Putri. 2011. Uji Potensi Sari Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Aeromonas salmonicida smithia* Secara *In Vitro*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **3** (2): 165-168.



- Purwantiningsih, T. I., Y. Y. Suranindyah dan Widodo. 2014. Aktivitas Senyawa Fenol Dalam Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Sebagai Antibakteri Alami untuk Penghambatan Bakteri Penyebab Mastitis. *Buletin Peternakan*. **38** (1): 59-64.
- Rahayu, P. 2013. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. Skripsi. Universitas Hasanuddin: Makassar. 45 hlm.
- Rokhman, F. Aktivitas Antibakteri Filtrat Bunga Teleng (*Clitoria ternatea* L.) Terhadap Bakteri Penyebab Konjungtivitis. Skripsi Institut Pertanian Bogor: Bogor. 24 hlm.
- Roslizawaty, N. Y. Ramadani, Fakhurrazi dan Herrialfian. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Rebusan Sarang Semut (*Myrmecodia* sp.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Medika veterinaria*. **7** (2): 91-94.
- Roy, A., Geetha, Laksmi. 2011. *Averrhoa bilimbi* Linn – Nature's Drug Store – A Pharmacological Review. *International Journal of Drug Development and Research*. **3** (3): 101-106.
- Sabir, A. 2005. Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis *Trigona* sp. Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* (*in vitro*). *Maj. Ked. Gigi. (Dent. J.)*. **38** (3): 135-141.
- Salle, A. J. 1961. Fundamental Principles of Bacteriology. McGraw-Hill Book Company: London. 812 hlm.
- Sampurna, I. P. dan T. S. Nindhia. 2013. Penuntun Praktikum Rancangan Percobaan dengan SPSS. Universitas Udayana: Bali. 161 hlm.
- Sastrahidayat, I. R. 1990. Ilmu Penyakit Tumbuhan. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya bekerjasama dengan "Usaha Nasional: Surabaya. 365 hlm.
- Savitri, N. P. I. 2014. Efektivitas Antibakteri Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) Terhadap Bakteri Mix Saluran Akar Gigi. Skripsi Universitas Mahasaraswati: Denpasar. 72 hlm.
- Sutrisna, E. M., S. Ermawati, Mulyadin, M. Agung. 2012. Uji Praklinis Efek Hipoglikemik Blimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dan Daun Tapak Dara (*Catharanthus Roseus* G). *Pharmacon*. **13** (1): 37-40.
- Tortora, G.J., B. R. Funke, C. L. Case. 2001. Microbiology an Introduction. An Imprint of Addison Wesley Longman: New York. 443 hlm
- Wibisono, D. 2013. Panduan Penyusunan Skripsi, Tesis dan Disertasi. C.V Andi Offset: Yogyakarta. 556 hlm.
- Yulvizar, C., I. Dewiyanti, dan C. N. N. Defira. 2014. Seleksi Bakteri Berpotensi Probiotik Dari Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) Indegenous Jantho Berdasarkan Aktivitas Antibakteri Secara In Vitro. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertania Indonesia*. **6** (2): 20-24.



# Lampiran 1. Foto Alat Penelitian



Cawan petri



Oven



Inkubator



Lemari Pendingin



Autoclave



Gelas Ukur

# Lampiran 1. (Lanjutan)



Tabung Reaksi



Nampan



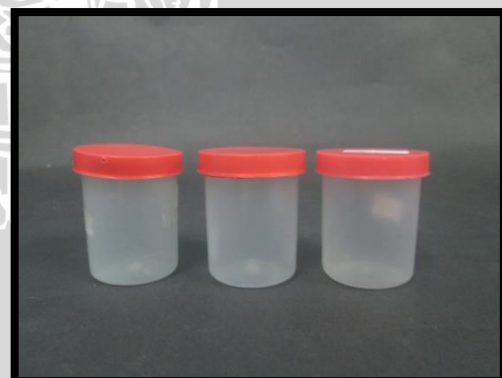
Beaker Glass



Corong Kaca



Jarum osse, Spatula dan Capit



Botol film



# Lampiran 1. (Lanjutan)



Bunsen dan Korek Api



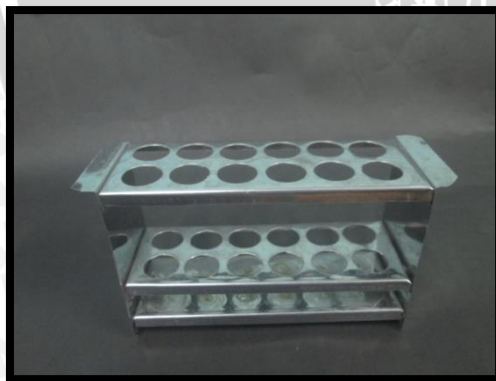
Mikropipet dan Blue tip



Erlenmeyer



Gunting



Rak Tabung Reaksi



Timbangan Digital

Lampiran 1. (Lanjutan)



Jangka Sorong



Laminar Air Flow





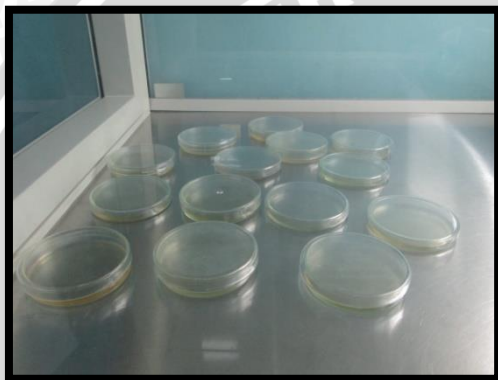
## Lampiran 2. Foto Kegiatan Penelitian



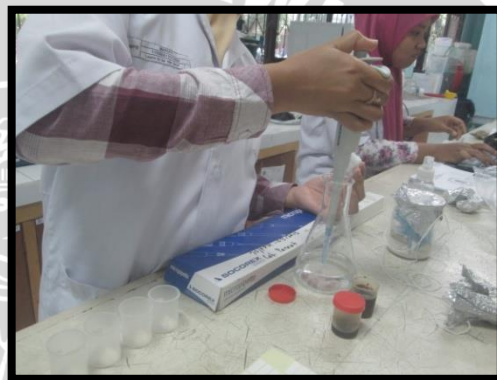
Penimbangan Kebutuhan Media PSA



Pembuatan Media PSA



Penuangan Media Pada Cawan Petri



Penentuan Konsentrasi Ekstrak



Penghomogenan Ekstrak dengan Pelarut



Perendaman Kertas Cakram Dalam Ekstrak

## Lampiran 2. (Lanjutan)



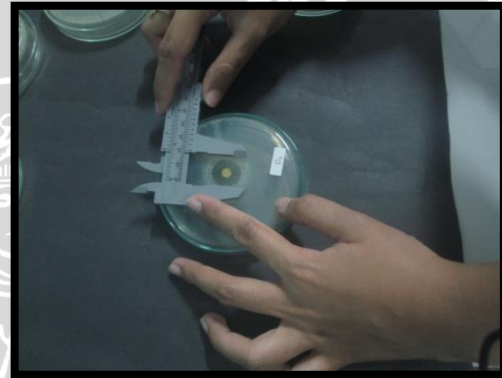
Pengenceran Bakteri



Penumbuhan Bakteri Pada Media Agar



Peletakan Kertas Cakram Pada Media Agar yang Sudah Ditumbuhi Bakteri



Pengukuran Diameter Zona Hambat



### Lampiran 3. Penentuan Konsentrasi Ekstrak Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*)

Pembuatan ekstrak dimulai dengan menimbang buah belimbing wuluh segar sebanyak 1 kg. Selanjutnya buah belimbing dicuci sampai bersih dan dilakukan pemotongan untuk mempercepat proses pengeringan dengan menggunakan oven. Pengovenan dilakukan selama 27 jam dengan menggunakan suhu 50°C. Berat buah belimbing wuluh setelah dilakukan pengovenan yaitu sebanyak 53,55 gram. Selanjutnya persiapan perendaman (maserasi) dimana buah belimbing wuluh kering direndam dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 615,83 ml selama 4 x 24 jam. Larutan yang didapat kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* untuk menguapkan etanol sehingga didapatkan ekstrak buah belimbing wuluh sebanyak 32,48 gram. Selanjutnya dilakukan pengukuran untuk menentukan konsentrasi yang diinginkan dengan menambahkan larutan pengencer aquades.

- 10%

Ditimbang ekstrak kasar buah belimbing wuluh sebesar 0,10 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan aquades sebanyak 0,90 ml sehingga dihasilkan 1 ml ekstrak kasar buah belimbing wuluh dengan konsentrasi 10%.

- 20%

Ditimbang ekstrak kasar buah belimbing wuluh sebesar 0,20 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan aquades sebanyak 0,80 ml sehingga dihasilkan 1 ml ekstrak kasar buah belimbing wuluh dengan konsentrasi 20%.

- 30%

Ditimbang ekstrak kasar buah belimbing wuluh sebesar 0,30 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan aquades sebanyak 0,70 ml sehingga dihasilkan 1 ml ekstrak kasar buah belimbing wuluh dengan konsentrasi 30%.

- 40%

Ditimbang ekstrak kasar buah belimbing wuluh sebesar 0,40 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan aquades sebanyak 0,60 ml sehingga dihasilkan 1 ml ekstrak kasar buah belimbing wuluh dengan konsentrasi 40%.

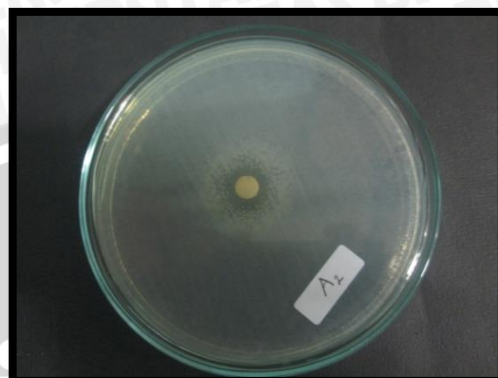




**Lampiran 4. Hasil Uji Cakram Ekstrak Kasar Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens***



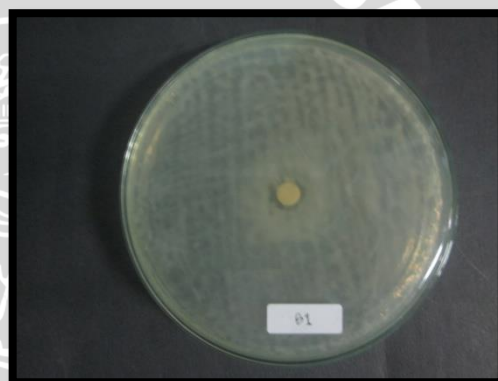
Perlakuan A<sub>1</sub> = 10%



Perlakuan A<sub>2</sub> = 10%



Perlakuan A<sub>3</sub> = 10%



Perlakuan B<sub>1</sub> = 20%

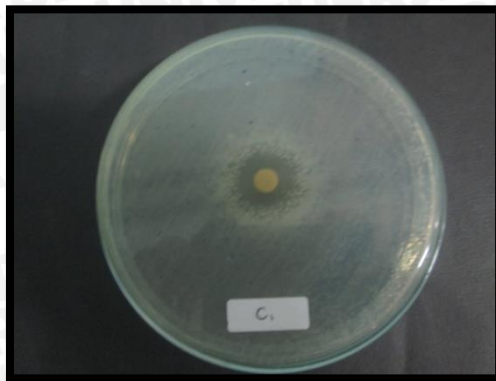


Perlakuan B<sub>2</sub> = 20%

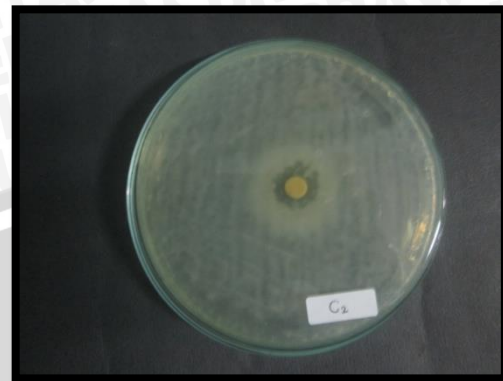


Perlakuan B<sub>3</sub> = 20%

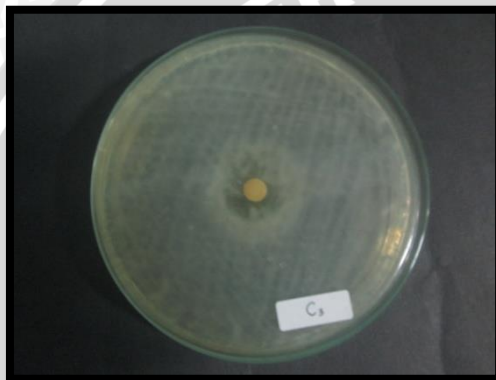
Lampiran 4. (Lanjutan)



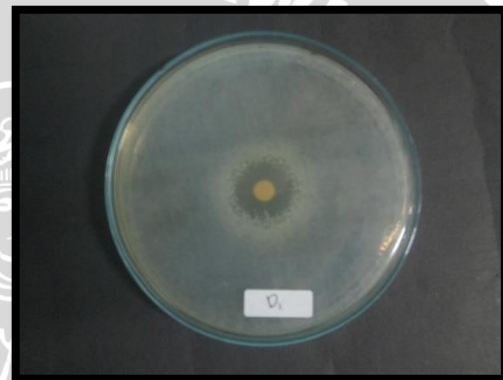
Perlakuan  $C_1 = 30\%$



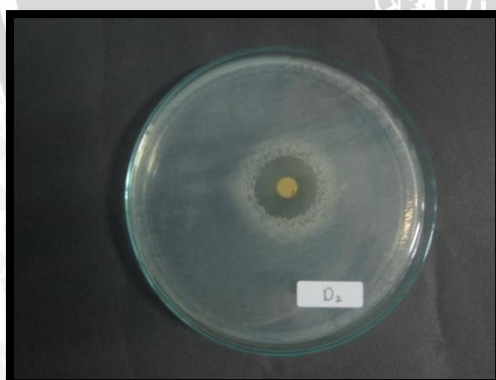
Perlakuan  $C_2 = 30\%$



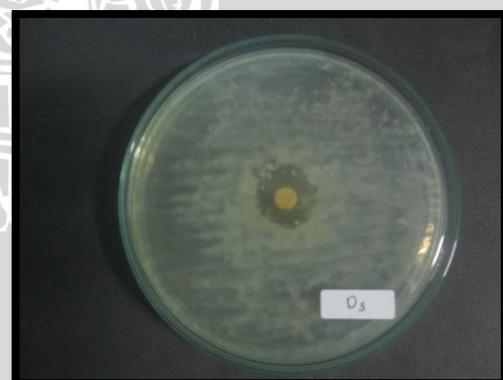
Perlakuan  $C_3 = 30\%$



Perlakuan  $D_1 = 40\%$



Perlakuan  $D_2 = 40\%$



Perlakuan  $D_3 = 40\%$



**Lampiran 5. Analisis Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* secara *In vitro***

➤ **Data Diameter Hambatan (mm) Bakteri *Pseudomonas fluorescens***

| Perlakuan | R1    | R2   | R3    | Total  | Rata<br>rata | R1 <sup>2</sup> | R2 <sup>2</sup> | R3 <sup>2</sup> | ΣR <sup>2</sup> |
|-----------|-------|------|-------|--------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| A         | 6.73  | 7.2  | 8.2   | 22.13  | 7.38         | 45.29           | 51.84           | 67.24           | 164.37          |
| B         | 4.18  | 7.15 | 3.63  | 14.96  | 4.99         | 17.47           | 51.12           | 13.18           | 81.77           |
| C         | 8.58  | 7.55 | 9.65  | 25.78  | 8.59         | 73.62           | 57.00           | 93.12           | 223.74          |
| D         | 14.15 | 14   | 11.65 | 39.8   | 13.27        | 200.22          | 196             | 135.72          | 531.95          |
|           |       |      |       | 102.67 |              |                 |                 |                 | 1001.83         |

**Perhitungan:**

- Faktor Koreksi (FK)  $= \frac{G^2}{N}$

$$= \frac{102,67^2}{12}$$

$$= 878,427$$
- Jumlah Kuadrat (JK total)  $= \sum x_{ij}^2 - FK$

$$= (A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + D3^2) - FK$$

$$= (6,73^2 + 7,2^2 + 8,2^2 + \dots + 11,65^2) - 878,427$$

$$= 123,404$$
- JK Perlakuan  $= \frac{\sum (\sum x_i)^2}{r} - FK$

$$= \frac{(TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2)}{r} - FK$$

$$= \frac{22,13^2 + 14,96^2 + 25,78^2 + 39,8^2}{3} - 878,427$$

$$= 108,968$$
- JK galat  $= JK \text{ Total} - JK \text{ Perlakuan}$

$$= 123,404 - 108,968$$

$$= 14,436$$

**Lampiran 5. (Lanjutan)**

$$\begin{aligned}
 5. \text{ db Total} &= (n \times r) - 1 \\
 &= (4 \times 3) - 1 \\
 &= 11 \\
 6. \text{ db Perlakuan} &= n - 1 \\
 &= 4 - 1 \\
 &= 3 \\
 7. \text{ db Galat} &= \text{db Total} - \text{db Perlakuan} \\
 &= 14 - 3 \\
 &= 11
 \end{aligned}$$

- **Analisa Sidik Ragam dengan Uji F tabel dalam Statistik Rancangan Percobaan Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara *In vitro***

| Sumber Keragaman | Db | Jumlah Kuadrat | Kuadrat Tengah | F Hitung | F 5% | F 1% |
|------------------|----|----------------|----------------|----------|------|------|
| Perlakuan        | 3  | 108.968        | 36.322733      | 20.13    | 4.07 | 7.59 |
| Acak             | 8  | 14.4355        | 1.8044338      |          |      |      |
| Total            | 11 | 123.404        |                |          |      |      |

Berdasarkan hasil analisa sidik ragam di atas menunjukkan bahwa nilai F hitung (20,13) lebih besar dari F tabel 5% yaitu 4,07 maupun F tabel 1% sebesar 7,59 maka  $H_0$  ditolak, hal ini berarti bahwa perbedaan perlakuan berpengaruh sangat nyata. Setelah  $H_0$  ditolak, selanjutnya apabila ingin diketahui antar perlakuan (rata-rata) mana yang berbeda nyata, maka untuk mengetahui hal tersebut dilakukan uji nilai tengah (rata-rata) antar perlakuan atau disebut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT)



# Lampiran 5. (Lanjutan)

- Hasil Uji BNT Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) Terhadap daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara *in vitro*

| Rerata perlakuan | B (4.99)           | A (7.38)           | C (8.59) | D (13.27) | Notasi |
|------------------|--------------------|--------------------|----------|-----------|--------|
| B (4.99)         | 0.00               |                    |          |           | a      |
| A (7.38)         | 2.39 <sup>ns</sup> | 0.00               |          |           | b      |
| C (8.59)         | 3.60*              | 1.21 <sup>ns</sup> | 0.00     |           | bc     |
| D (13.27)        | 8.28**             | 5.89**             | 4.68**   | 0.00      | d      |

\*) berbeda nyata

\*\*) berbeda sangat nyata

$$SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ acak}}{\text{ulangan}(r)}} = \sqrt{\frac{2 \times 1,8044}{3}} = 1,0968$$

$$BNT \ 5\% = t_{(0,05;dbG)} SED = 2,31 \times 1,0968 = 2,5336$$

$$BNT \ 1\% = t_{(0,01;dbG)} SED = 3,36 \times 1,0968 = 3,6852$$

- Tabel Uji Polinomial Orthogonal

| Perlakuan    | Data (Ti) | Perbandingan Ci |           |          |
|--------------|-----------|-----------------|-----------|----------|
|              |           | Linear          | Kuadratik | Kubik    |
| A            | 22.13     | -3              | 1         | -1       |
| B            | 14.96     | -1              | -1        | 3        |
| C            | 25.78     | 1               | -1        | -3       |
| D            | 39.8      | 3               | 1         | 1        |
| Q=ΣCi*Ti     |           | 63.83           | 21.19     | -14.79   |
| Kr=(ΣCi^2)*r |           | 60              | 12        | 60       |
| JK=Q^2/Kr    |           | 67.904482       | 37.418008 | 3.645735 |
|              |           | 1.0638333       | 1.7658333 |          |

- Tabel Sidik Ragam Regresi Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Buah Belimbing Wuluh (*A. bilimbi*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *P. fluorescens* Secara In Vitro

| Sumber Keragaman | db | JK     | KT    | F hit              | F 5% | F 1% |
|------------------|----|--------|-------|--------------------|------|------|
| Perlakuan        | 3  | 108.97 |       |                    | 4.07 | 7.59 |
| Linear           | 1  | 67.90  | 67.90 | 37.63**            |      |      |
| Kuadratik        | 1  | 37.42  | 37.42 | 20.74**            |      |      |
| Kubik            | 1  | 3.65   | 3.65  | 2.02 <sup>ns</sup> |      |      |
| Acak             | 8  | 14.44  | 1.80  |                    |      |      |
| Total            | 11 |        |       |                    |      |      |

\*\* = berbeda sangat nyata

ns = tidak berbeda nyata

### Lampiran 5. (Lanjutan)

Dari hasil sidik ragam terlihat bahwa regresi linier berbeda sangat nyata, berarti regresi yang sesuai untuk kurva respon ini adalah regresi linier.

Mencari persamaan linier  $y = b_0 + b_1x$

| X                | y        | xy     | x <sup>2</sup> |
|------------------|----------|--------|----------------|
| 10               | 6.73     | 67.3   | 100            |
| 10               | 7.2      | 72     | 100            |
| 10               | 8.2      | 82     | 100            |
| 20               | 4.18     | 83.6   | 400            |
| 20               | 7.15     | 143    | 400            |
| 20               | 3.63     | 72.6   | 400            |
| 30               | 8.58     | 257.4  | 900            |
| 30               | 7.55     | 226.5  | 900            |
| 30               | 9.65     | 289.5  | 900            |
| 40               | 14.15    | 566    | 1600           |
| 40               | 14       | 560    | 1600           |
| 40               | 11.65    | 466    | 1600           |
| $\Sigma x = 300$ | 102.67   | 2885.9 | 9000           |
| Rerata = 25      | 8.555833 |        |                |

$$\begin{aligned}
 B_1 &= \frac{\Sigma xy - (\Sigma x \cdot \Sigma y)/n}{\Sigma x^2 - \frac{(\Sigma x)^2}{n}} \\
 &= \frac{2885,9 - (300 \cdot 102,67)/12}{9000 - \frac{(300)^2}{12}} \\
 &= \frac{2885,9 - 2566,75}{9000 - 7500} \\
 &= \frac{322,15}{1500} \\
 &= 0,215
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 B_0 &= \bar{y} - b_1 \bar{x} \\
 &= 8,56 - (0,212 \cdot 25) \\
 &= 8,556 - 5,3 = 3,256
 \end{aligned}$$

$$\text{Persamaan linier : } y = b_0 + b_1x \rightarrow y = 3,256 + 0,215x$$



## Lampiran 5. (Lanjutan)

$$\begin{aligned} R^2 &= \frac{JK \text{ regresi}}{JK \text{ total terkorelasi}} \\ &= \frac{JK \text{ regresi}}{JK \text{ regresi} + JK \text{ acak}} \\ &= \frac{67,90}{67,90 + 14,44} \\ &= \frac{67,90}{82,34} \\ &= 0,825 \end{aligned}$$

- Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Buah Belimbing Wuluh (*A. bilimbi*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *P. fluorescens* Secara *In Vitro*

