

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pembangunan perikanan saat ini mengarah pengembangan usaha yang berbasis budidaya, karena berkurangnya hasil tangkapan dari perairan umum, sedangkan permintaan pasar semakin hari semakin meningkat. Salah satu cara yang dapat dilakukan usaha budidaya ikan agar berkesinambungan dapat meningkatkan perekonomian masyarakat pembudidaya ikan sehingga perlunya suatu strategi yang tepat dalam pengembangan usaha budidaya ikan air tawar lebih lanjut (Rahmawati dan Dede, 2012).

Kendala utama dalam perikanan salah satunya adalah penyakit. Penyakit ikan merupakan salah satu masalah serius yang harus dihadapi dalam pengembangan usaha budidaya ikan. Kematian yang di timbulkan oleh penyakit ikan sangat tergantung pada jenis penyakit ikan yang menyerang, kondisi ikan dan kondisi lingkungan. Apabila kondisi lingkungan menurun maka kematian yang diakibatkan oleh wabah penyakit sangat tinggi. Wabah penyakit yang terjadi pada kondisi ikan sedang sehat tidak akan mengakibatkan kematian yang tinggi, dan sebaliknya akan mengakibatkan kematian yang tinggi apabila kondisi ikan kurang sehat (Fauziah, 2011).

Menurut Prajitno (2005), penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Dengan demikian timbulnya serangan penyakit ikan di kolam merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, kondisi lingkungan dan organisme penyakit. Interaksi yang tidak sesuai ini dapat menyebabkan ikan stres, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit. Serangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan kendala utama dalam budidaya perikanan. Suatu kegiatan

pembudidaya ikan, pastinya tidak akan terlepas dari adanya berbagai permasalahan yang dapat mempengaruhi dan mengganggu kondisi fisiologis ikan, sehingga ikan jatuh sakit bahkan mati. Salah satu penyakit yang ditakuti oleh para petani ikan adalah bercak merah atau *Motile Aeromonas Septicaemia* (MAS).

Selama ini serangan bakteri *A. hydrophila* bersifat berkepanjangan, sehingga tidak memperlihatkan gejala penyakit meskipun telah di jumpai pada tubuh ikan. Serangan bakteri ini akan terlihat apabila ketahanan tubuh ikan menurun akibat stres karena sistem budidaya yang dilakukan yang di sebabkan karena menurunnya kualitas air, kekurangan pakan atau penanganan ikan dalam budidaya yang kurang baik (Ayu *et al.* 2008).

Selama ini pencegahan terhadap serangan penyakit khususnya bakteri pada umumnya dengan pemberian antibiotik dan bahan kimia. Pemberian antibiotik secara terus menerus dapat menyebabkan organisme patogen menjadi resisten, sehingga penggunaan antibiotik menjadi tidak efektif, selain itu residu dalam penggunaan antibiotik dapat mengakibatkan pencemaran lingkungan perairan yang menyebabkan kualitas perairan menjadi buruk dan rusak. Salah satu alternatif yang digunakan untuk mengatasi permasalahan serangan penyakit adalah mengganti penggunaan antibiotik dengan bahan alami seperti tumbuhan obat yang dapat dijadikan sebagai antibakteri (Rinawati dan Dwi, 2012)

Indonesia kaya akan keanekaragaman hayati yang dapat dimanfaatkan dalam semua segi kehidupan manusia. Obat tradisional adalah salah satu bentuk nyata pemanfaatan sumber daya alam hayati tersebut. Sebagai salah satu negara hujan tropis, Indonesia kaya akan keanekaragaman flora yang dapat digunakan sebagai obat tradisional. Hal ini mendorong para ahli untuk menggali sumber-sumber komponen bahan alam dari tumbuhan yang bermanfaat dalam pengobatan berbagai penyakit. Dengan adanya obat tradisional ini, diperlukan

pengembangan alternatif bahan antibakteri dan tanaman obat. Daun jati memiliki kandungan senyawa flavanoid dan sembilan senyawa asam fenolat atau tanin. Dalam jumlah yang tidak melebihi tingkat optimum tanin memiliki efek positif, yaitu sebagai senyawa untuk menghindari terjadinya bloat pada ternak dan membantu usus untuk mencerna dan menyerap protein secara langsung (by pass protein), caranya dengan membentuk ikatan tanin-protein yang dapat mencegah degradasi protein di dalam rumen (Lamid *et al.*, 2013). Flavonoid dapat menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma dan menghambat metabolisme energi sel (Cushine dan Lamb, 2005).

1.2 Rumusan Masalah

Infeksi bakteri *Aeromonas Hydrophila* pada ikan secara umum dikenal sebagai MAS (*Motile A. Septicemia*) dengan indikasi luka yang meluas pada kulit, nekrosis vakuola pada liver dan ginjal, serta pada jaringan lain. Apabila tidak di tangani secara tepat maka dapat menyebabkan kematian masal (Grandiosa, 2010).

Selama ini upaya yang telah dilakukan untuk pengobatan penyakit ini adalah menggunakan antibiotika yang dapat menimbulkan resistensi bakteri patogen dan residu antibiotika pada ikan dan manusia. Dengan menanggapi hal tersebut, di perlukan adanya pengembangan alternatif bahan sebagai anti bakteri dari tanaman obat. Kandungan senyawa kimia yang telah ditemukan di dalam daun jati adalah kuinon, asam fenolik, flavonoid, asam fenolat, tanin, steroid, dan saponin. Fungsi senyawa senyawa dalam jati belanda yang telah diketahui antara lain sebaga pelindung kerusakan hati, antibakteri, antijamur, dan sebagai antioksidan (Aradhana *et al.*, 2010).

Berdasarkan dari uraian diatas dapat di rumuskan permasalahan sebagai berikut:

- Mengetahui pemberian ekstrak kasar daun jati (*T. grandis*) dengan uji cakram dan Uji MIC dapat berpengaruh terhadap daya hambat dari bakteri *A. hydrophila* ?
- Mengetahui perbedaan dosis ekstrak kasar daun jati (*T. grandis*) terhadap uji daya hambat bakteri *A. hydrophila* memberika pengaruh yang berbeda?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui dosis yang tepat dalam mempengaruhi daya hambat bakteri *A. hydrophila* menggunakan ekstrak kasar daun jati (*T. grandis*) secara *In vitro*.

1.4 Hipotesis

H₀ : Diduga pemberian ekstrak kasar daun jati (*Tectona grandis*) dengan dosis yang berbeda tidak mempengaruhi daya hambat bakteri *A. Hydrophila*.

H₁ : Diduga pemberian ekstrak kasar daun jati (*Tectona grandis*) dengan dosis yang berbeda mempengaruhi daya hambat bakteri *A. Hydrophila*.

1.5 Waktu dan Tempat Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Keamanan Hasil Perikanan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang, Laboratorium Sains dan Teknologi Universitas Islam Negeri Malik Ibrahim Malang Malang pada Bulan Maret 2015 hingga April 2015

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *A. hydrophila*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *A. hydrophila* berdasarkan ilmu taksonomi sebagai berikut (Holt *et al.* 1994) :

- Filum : Protophyta
- Kelas : Schizomycetes
- Ordo : Pseudanonadeles
- Family : Vibrionaceae
- Genus : *Aeromonas*
- Spesies : *Aeromonas hydrophila*

2.1.2 Karakteristik

Ciri utama bakteri *A. Hydrophila* (Gambar 1) adalah bentuknya seperti batang, ukurannya 1–4,4 x 0,4–1 μ m, bersifat gram negatif, fakultatif anaerob (dapat hidup dengan atau tanpa oksigen), tidak berspora, bersifat motil (bergerak aktif) karena mempunyai satu flagel (*Monotrichous flagella*) yang keluar dari salah satu kutubnya, senang hidup di lingkungan bersuhu 15–30°C dan pH 5,5–9 (Afrianto dan Liviawaty, 1992).



Gambar 1. *Aeromonas hydrophila* (a) Makroskopis (b) Mikroskopis

A. hydrophila termasuk gram negatif, berbentuk batang pendek, bersifat aerob dan fakultatif anaerob, tidak berspora, motil mempunyai satu flagel, hidup pada kisaran suhu 25-30°C (Post, 1983). Serangan bakteri ini dapat mengakibatkan gejala penyakit *hemorrhagi septicaemia* yang mempunyai ciri luka dipermukaan tubuh, insang, ulser, abses, eksophthalmia dan perut gembung (Austin dan Austin, 1993), serta gastroenteritis, diare dan *extra intestinal* pada manusia (Porteen *et al.* 2007).

Awalnya *A. hydrophila* dikenal dengan nama *Bacillus hydrophilus fuscus*, pertama kali diisolasi dari kelenjar pertahanan katak yang mengalami pendarahan *septicemia*. Kluiver dan Van Niel pada tahun 1936 mengelompokkan genus *Aeromonas*. Tahun 1984, Popoff memasukan genus *Aeromonas* ke dalam famili *Vibrionaceae*. *A. hydrophila* diisolasi dari manusia dan binatang sampai dengan tahun 1950. Bakteri ini memiliki nama sinonim *A. formicans* dan *A. liquefaciens* (Sismeiro *et al.* 1998).

2.1.3 Habitat dan Penyebaran

Bakteri *A. hydrophila* dapat hidup di berbagai perairan di dunia seperti air sungai, estuaria, air laut dan dikenal sebagai penyebab penyakit *Motil Aeromonas Septicaemia* (MAS) lalu bakteri tersebut memproduksi berbagai produk protein ekstraseluler, termasuk toksin, haemolysin dan enzim protease yang diduga sebagai penyebab virulensi bakteri tersebut terhadap inangnya (Muslim, *et al.* 2009). Penularan bakteri ini melalui air, kontak badan, pemakaian alat yang telah tercemar atau karena alat digunakan untuk pemindahan ikan yang telah terserang bakteri *A. hydrophila*.

A. hydrophila termasuk kelompok bakteri gram negatif (Bullock *et al.* 1971), yang tumbuh maksimal pada kisaran suhu 38°C- 41°C dan pertumbuhan minimal pada suhu 0°C-5°C dengan kisaran pH 5,5-9 (Afrianto dan Liviawaty, 1992). Perkembangbiakan bakteri *A. hydrophila* secara aseksual dengan pemanjangan

sel yang diikuti pembelahan inti yang disebut pembelahan biner. Waktu yang diperlukan untuk pembelahan satu sel menjadi dua sel lebih kurang 10 menit (Volk dan Wheeler, 1988). Bakteri *A. hydrophila* mempunyai habitat didaerah estuaria dan air tawar, keberadaannya berhubungan dengan kandungan bahan organik atau sedimen dasar perairan (Bullock *et al.* 1971). Serangan bakteri *A. hydrophila* biasanya muncul pada musim kemarau karena pada saat tersebut kandungan bahan organik di perairan relatif tinggi. Bakteri *A. hydrophila* berperan dalam penguraian bahan organik sehingga sering ditemukan di perairan yang subur. Kandungan oksigen yang rendah, suhu yang tinggi, akumulasi bahan organik atau sisa metabolisme ikan dan padat tebar ikan yang tinggi sangat menunjang perkembangbiakan bakteri ini (Sutjiati, 2004).

Di daerah tropik dan subtropik penyakit *haemorrhagic septicaemia* yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* pada umumnya muncul pada musim kemarau pada saat kandungan bahan organik tinggi. *A. hydrophila* banyak ditemukan pada insang, kulit, hati dan ginjal. Ada juga pendapat bahwa bakteri ini dapat hidup pada saluran pencernaan (Kabata, 1985). Infeksi oleh bakteri *A. hydrophila* bisa terjadi melalui permukaan tubuh yang luka, saluran pencernaan makanan atau bisa melalui insang, kemudian masuk dalam pembuluh darah dan menyebar pada organ dalam lainnya yang menyebabkan pendarahan yang disertai *haemorrhagic septicaemia* (keracunan darah karena darah keluar dari pembuluh darah melalui poripori) (Kabata, 1985). Bakteri *A. hydrophila* menyebar secara cepat pada ikan dengan padat penebaran tinggi dan bisa mengakibatkan kematian benih hingga 90%. Penularan penyakit dapat melalui air, kontak badan, kontak dengan peralatan yang tercemar atau dengan pemindahan ikan yang telah terserang *A. hydrophila* dari satu tempat ke tempat lain (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

2.1.4 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan *A. Hydrophilla*

Menurut Prajitno (2007), bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri fakultatif anaerob, yaitu bakteri yang dapat berkembang dalam keadaan dengan atau tanpa oksigen, meskipun perkembangannya lebih cepat pada lingkungan yang ada oksigen. Bakteri fakultatif anaerob akan tersebar di seluruh medium jika diinokulasi pada medium cair, bersifat heterotropik, yaitu mampu mengoksidasi bermacam-macam persenyawaan organik sebagai sumber karbon.

Mangunwardoyo, Ismayasari dan Riani (2010) menyatakan bahwa bakteri *Aeromonas* diperkirakan mencapai pertumbuhan optimal pada fase eksponensial, yaitu pada jam ke 4 – ke 12. Bakteri selanjutnya mengalami fase stasioner pada masa inkubasi sampai 48 jam. Pada fase tersebut, presentase antara bakteri hidup dan mati adalah sama. Bakteri mengalami fase kematian setelah melewati fase 24 jam. Kondisi tersebut terkait dengan ketersediaan nutrisi dan lingkungan yang tepat untuk kehidupan bakteri tersebut.

A. hydrophila termasuk kelompok bakteri gram negatif yang tumbuh maksimal pada kisaran suhu 38°C-41°C dan pertumbuhan minimal pada suhu 0°C-50°C dengan kisaran pH 5,5-9 (Arifianto dan Liviawaty, 1992). Sutjiati (2004), menambahkan bahwa bakteri *A. hydrophila* biasanya muncul pada musim kemarau karena pada saat tersebut kandungan bahan organik di perairan relatif tinggi. Bakteri *A. hydrophila* berperan dalam penguraian bahan organik sehingga sering ditemukan di perairan yang subur, kandungan oksigen yang rendah, suhu yang tinggi, dan akumulasi bahan organik

2.2. Tumbuhan Jati (*T. grandis*)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Tanaman jati yang tumbuh di Indonesia berasal dari India. Tanaman ini mempunyai nama ilmiah *Tectona grandis* Linn. F. Secara historis, nama *tectona*

berasal dari kata Portugis yaitu *tecton* yang berarti tumbuhan yang memiliki kualitas tinggi. Tanaman ini dalam bahasa Jerman di kenal dengan nama teak (Widyastuti & Sumardi, 2004). Dalam sistem klasifikasi, tanaman jati ini mempunyai penggolongan sebagai berikut :

Divisi : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Lamiales

Famili : Verbenaceae

Genus : *Tectona*

Spesies : *Tectona grandis* linn. F

Selain *Tectona grandis*, family Varbenaceae juga memiliki 2 spesies lain yang seperti jati di indonesia, yaitu *Tectona hamiltonianna* wall, yang tumbuh didaerah kering Myanmar dan *Tectona philippinensis* Benth & Hooker yang tumbuh didaerah hutan Batangas dan Mindoro (Pulau Hing), Filipina. *Tectona grandis* mempunyai kualitas yang paling baik dari tanaman kayu dan bernilai ekonomis.

Secara morfologis, tanaman jati memiliki tinggi yang dapat mencapai 30–45 m. Dengan pemangkasan, batang–batang yang bebas cabang dapat mencapai antara 15–20 m, diameter yang dapat mencapai 220 cm. Kulit kayu berwarna kecoklatan atau abu-abu yang mudah terkelupas. Pangkal batang berakar pendek dan bercabang sekitar 4 daun berbentuk *opposite* (berbentuk jantung yang bulat dan meruncing), berukuran panjang 20-50 cm dan lebar 15-40cm, permukaannya berbulu. Daun muda (*petiola*) berwarna hijau kecoklatan, sedangkan daun tua keabu-abuan (Sulaksana & Dadang, 2002).

Bunga jati bersifat majemuk yang berbentuk dalam malai bunga (*inflorence*) yang tumbuh terminal di ujung atau di cabang. Panjang malai antara 60–90 cm dan lebar antara 10–30 cm. Bunga jantan (benang sari) dan betina

(putik) berada dalam satu bunga (*monoceus*). Bunga bersifat asitimerfik, berwarna putih, berukuran 4-5 mm (lebar) dan 6–8 mm (panjang). Kelopak bunga (*calyx*) berjumlah 5–7 dan berukuran 3– 5 mm. Mahkota bunga (*corolla*) tersusun melingkar sekitar 10 mm. Tangkai putik (*stamen*) berjumlah 5–6 buah dengan filamen berukuran 3 mm, antenna memanjang berukuran 1–5 mm, ovarium membulat berukuran sekitar 2 mm. Bunga yang terjadi akan menghasilkan buah 1–1,5 cm (Sumarna, 2001).

2.2.2 Bahan Aktif Daun Jati (*T. grandis*)

Kandungan daun jati dengan ekstrak etanol daun jati (*Tectona grandis* Linn. f.) Verbenaceae. Menunjukkan adanya golongan senyawa flavonoid, saponin, tanin galat, tanin katekat, kuinon, dan steroid/triterpenoid. Dimana senyawa-senyawa di atas di ketahui memiliki sifat antibakteri (Alen *et al.* 2012). Flavonoid berfungsi sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstraseluler yang mengganggu integritas membran sel bakteri.

Kandungan senyawa kimia yang telah ditemukan di dalam daun jati adalah flavonoid, asam fenolat, tanin, steroid, triterpenoid, dan saponin. Fungsi senyawa senyawa dalam jati belanda yang telah diketahui antara lain sebagai pelindung kerusakan hati, antibakteri, antijamur, dan sebagai antioksidan (Wiarsih , 2013).

2.2.3 Ekstraksi

Ekstraksi adalah pemisahan suatu zat dari campurannya dengan pembagian sebuah zat terlarut antara dua pelarut yang tidak dapat tercampur untuk mengambil zat terlarut tersebut dari satu pelarut ke pelarut yang lain. Tujuan ekstraksi adalah untuk menarik semua komponen kimia yang terdapat dalam simplisia. Ekstraksi ini didasarkan pada perpindahan massa komponen zat padat ke dalam pelarut dimana perpindahan mulai terjadi

pada lapisan antar muka, kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut (Sudjadi, 1986).

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

2.2.4 Aktivitas Antimikroba

Flavonoid merupakan senyawa fenol sementara senyawa fenol dapat bersifat koagulator protein (Dwidjoseputro, 1994). Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Robinson, 1991).

Tanin memiliki aktivitas antibakteri, secara garis besar mekanisme yang diperkirakan adalah sebagai berikut: toksisitas tanin dapat merusak membran sel bakteri, senyawa astringent tanin dapat menginduksi pembentukan kompleks senyawa ikatan terhadap enzim atau substrat mikroba dan pembentukan suatu kompleks ikatan tanin terhadap ion logam yang dapat menambah daya toksisitas tanin itu sendiri. Tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel atau membran sel sehingga mengganggu permeabilitas sel itu sendiri. Akibat terganggunya permeabilitas, sel tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau bahkan mati (Ajizah, 2004). Tanin juga mempunyai daya antibakteri dengan cara mempresipitasi protein, karena diduga

tanin mempunyai efek yang sama dengan senyawa fenolik (Masduki, 1996). Efek antibakteri tanin antara lain melalui reaksi dengan membran sel, inaktivasi enzim, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik.

2.3 Uji Efektivitas Antibakteri secara *In Vitro*

2.3.1 Uji Cakram

Antibakteri merupakan bahan atau senyawa yang khusus digunakan untuk kelompok bakteri. Antibakteri dapat dibedakan berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu antibakteri yang menghambat pertumbuhan dinding sel, antibakteri yang mengakibatkan perubahan permeabilitas membran sel atau menghambat pengangkutan aktif melalui membran sel, antibakteri yang menghambat sintesis protein, dan antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel. Aktivitas antibakteri dibagi menjadi 2 macam yaitu aktivitas bakteristatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen dalam kisaran luas) (Brooks *et al.* 2005).

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. *Disc 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/sensitivitas yaitu 10⁵-10⁸ CFU/mL (Hermawan *et al.* 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. Metode lubang/sumuran yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diinjeksikan dengan ekstrak yang akan diuji. Setelah dilakukan inkubasi,

pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling lubang (Kusmayati dan Agustini, 2007).

2.3.2 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Prinsip metode pengenceran adalah senyawa antibakteri diencerkan hingga diperoleh beberapa macam konsentrasi, kemudian masing-masing konsentrasi ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut akan diinkubasi dan diamati ada atau tidaknya pertumbuhan bakteri, yang ditandai dengan terjadinya kekeruhan. Larutan uji senyawa antibakteri pada kadar terkecil yang terlihat jernih tanpa adanya pertumbuhan bakteri uji, ditetapkan sebagai Kadar Hambat Minimal (KHM) atau *Minimal Inhibitory Concentration* (MIC). Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan bakteri uji ataupun senyawa antibakteri, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah inkubasi ditetapkan sebagai Kadar Bunuh Minimal (KBM) atau *Minimal Bactericidal Concentration* (MBC) (Pratiwi, 2008).

Metode dilakukan dengan mencampur sampel, mikroba uji dan media inokulasi dengan beberapa variasi pengenceran. Aktivitas yang diamati dengan kontrol tanpa adanya bahan uji. Metode ini biasanya digunakan untuk menentukan nilai MIC (*Minimum Inhibition Concentration*), konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba uji. *Microplate titer assay well plate 96* menggunakan prinsip dalam metode dilusi tapi dengan skala yang lebih kecil (100-250 μL) (Khasanah dan Isnansetyo, 2013).

3. METODOLOGI PENELITIAN

3.1. Materi Penelitian

3.1.1 Alat dan Bahan

Peralatan yang digunakan dalam penelitian Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Jati (*T.grandis*) Terhadap Bakteri *A. Hydrophilla* Secara In Vitro disajikan pada Tabel 1 sebagai berikut :

Tabel 1. Bahan yang digunakan saat penelitian

Alat	Fungsi
Cutton Swap	Sebagai Alat untuk menggoreskan bakteri pada media NA saat uji cakram
Autoclave	Sebagai tempat sterilisasi alat & bahan
Hotplate	Sebagai pemanas media NA sehingga terjadi homogen
Cawan petri	Sebagai wadah pengkulturan bakteri
Inkubator	Sebagai wadah penyimpanan bakteri uji
Cuvet	Sebagai wadah sampel bakteri yang hendak akan di spektrofotometri
Toples kaca	Sebagai wadah perendaman daun jati saat proses maserasi
Tabung reaksi	Sebagai wadah larutan
Erlenmayer	Sebagai wadah pembuatan media NA dan NB
Gelas ukur	Sebagia alat pengukur volume larutan
Jarum osse	Sebagai alat untuk mengambil dan mengkultur bakteri pada media NA
Spatula	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
Rotary vacum	Sebagai alat untuk mendapatkan ekstrak kasar daun jati
Evaporator	Sebagai alat untuk mengambil larutan dalam skala mikrometer
Mikropipet	Sebagai alat untuk mengambil larutan dalam skala mikrometer
Timbangan sartorius	Sebagai alat untuk menimbang berat ekstrak kasar daun jati, media NA dan NB yang dibutuhkan
Lemari Pendingin	Sebagai wadah penyimpanan bahan penelitian

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunkana dalam dalam penelitian Pengaruh Ekstrak Kasar Daun Jati (*T. grandis*) Sebagai Antibakteri Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *A. Hydrophila* disajikan pada Tabel 2 sebagai berikut :

Tabel 2. Bahan yang digunakan saat penelitian

Bahan	Fungsi
Daun Jati (<i>T. grandis</i>)	Sebagai bahan yang hendak akan diuji kemampuan dayahambatnya
Bakteri <i>A. hydrophila</i>	Sebagai bahan pengujian daya hambat
Alkohol 70%	Sebagai bahan pengkondisian aseptis pada tangan
NA (<i>Nutrien Agar</i>)	Sebagai bahan tumbuh bakteri dalam bentuk agar
NB (<i>Nutrien Broth</i>)	Sebagai bahan tumbuh bakteri dalam bentuk cari
Alumunium foil	Sebagai bahan untuk menutup ujung tabung reaksi dan erlenmayer pada saat di sterilkan
Spiritus	Sebagai bahan bakar pada bunsen
Kertas cakram 6mm	Sebagai bahan untuk mengetahui besaran daya hambat ekstrak kasar daun jati
KOH 3 %	Sebagai bahan indikator adanya <i>viscous</i> pada sat uji gram
Larutan Pepton	Sebahagai bahan indikator perubahan warna saat uji osidase
Tali kasur	Sebagai bahan untuk mengikat kertas koran pada saat proses sterilisasi
Tissue	Sebagai bahan yang digunakan untuk membersihkan alat yang sudah digunakan
DMSO 10%	Sebagai bahan pengencer ekstrak
Kapas	Sebagai bahan untuk menutup tabung reaksi dan enlemayer pada saat proses sterilisasi
Etanol 70%	Sebagai bahan yang di gunakan untuk proses maserasi daun jati
Kertas saring	Di gunakan sebagai penyaring ekstrak kasar daun jati setelah di lakukan proses maserasi
Akuades	Sebagai bahan pelarut dalam pengenceran bakteri

3.2 Metode Penelitian

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu dengan cara pegamatan secara langsung terhadap gejala–gejala objek yang diteliti baik situasi sebenarnya maupun dalam situasi buatan dalam rangka pengujian hipotesis (Surachmad,1986).

Metode eksperimen menurut Nazir (1988), penelitian eksperimental adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol. Tujuan penelitian eksperimental adalah

untuk menyelidiki kemungkinan saling hubungan sebab–akibat dengan cara mengenakan kepada satu atau lebih kelompok eksperimental, satu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak di kenai kondisi perlakuan.

3.3 Pengambilan Data

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu penyelidik mengadakan pengamatan terhadap gejala–gejala subjek yang diselidiki baik secara langsung dalam situasi yang sebenarnya maupun dalam situasi buatan atau alat yang sudah ada maupun dalam situasi buatan atau alat yang sudah ada maupun yang sengaja dibuat untuk keperluan khusus (Surachmad, 1986).

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan Penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam sehingga kondisi lingkungan tempat penelitian dalam keadaan sama (Sastrosupadi, 2002).

$$Y = \mu + \tau + \varepsilon$$

Keterangan :

- μ = Nilai rerata harapan (*mean*)
- τ = pengaruh faktor perlakuan
- ε = pengaruh galat

Penelitian dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak daun jati (*T. grandis*) dengan perlakuan yang diberikan adalah perbedaan konsentrasi ekstrak daun jati (*T. grandis*) terhadap bakteri *A.*

Hydrophila. Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat yang tepat dalam penggunaan ekstrak daun jati (*T. grandis*). Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, sedangkan perlakuan tersebut diperoleh total sebanyak empat kali perlakuan.

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

- Alat-alat yang akan digunakan dicuci menggunakan sabun cuci, dikeringkan kemudian di bungkus menggunakan kertas koran lalu di ikat menggunakan benang.
- Aquades secukupnya di tuangkan ke dalam autoclave sampai menutupi besi pemanas autoclave, kemudian alat yang telah dibungkus menggunakan kertas koran dimasukkan ke dalam autoclave dan di tutup rapat dengan cara mengencangkan baut secara diagonal.
- Tombol on dinyalakan, setelah suhu mencapai 121°C dan tekanan menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan selama 15 menit (secara otomatis alarm akan berbunyi tanda waktu sterilisasi selesai).
- Tombol OFF ditekan, di tunggu beberapa saat sampai suhu menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka klep uap lalu dibuka penutup autoclave secara diagonal.
- Alat yang sudah di sterilisasi diambil menggunakan *crushable tang*
- Alat yang telah di sterilisasi disimpan didalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah di sterilkan disimpan didalam lemari pendingin.

3.5.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan

Selain alat dan bahan yang disterilisasi, tempat dan laboran harus steril guna menghindari kontaminan. Tangan laboran yang bersinggungan, meja dan

barang disekitar tempat pelaku harus selalu dalam kondisi aseptis yakni dengan cara di lakukan penyemprotan alkohol 70% agar kondisi sekitar tetap selalu aseptis. Sterilisasi tempat selain menggunakan bahan kimia dapat dilakukan dengan cara fisika yakni dengan cara pembakaran bunsen di sekitar maupun penyinaran menggunakan sinar UV.

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Jati (*T. grandis*)

Permulaan proses pembuatan ekstrak kasar daun jati (*T. grandis*), maka disiapkan daun jati segar seberat satu kilogram yang kemudian dikeringkan di terik sinar matahari selama 2 hari sampai memiliki 600 gram berat kering. Setelah kering daun jati di remukan sampai kecil partikel daun jati tersebut dengan tujuan mempermudah dalam proses maserasi didalam toples nantinya. Persiapan perendaman (maserasi) di mana daun jati yang sudah disiapkan 600 gr di maserasi menggunakan ethanol 70% sebanyak 3 liter selama 2 x 24 jam dalam suhu kamar di dalam toples. Setelah itu, larutan yang didapat di saring menggunakan kertas saring lalu di uapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak daun jati sebanyak 14,24 gr dengan nilai rendemen 2,4%.

3.5.4 Pembuatan Media

A. NA (*Nutrient Agar*)

- NA merk *merck* dengan dosis 20 gr/L
- Di timbang 4,8 gr NA
- Di masukan kedalam enlemayer berisi 240 ml *aquades*
- Di aduk dalam kondisi hangat menggunakan *hot plate* sampai tercampur rata
- Erlenmayer di tutup rapat menggunakan kapas dan di rapatkan menggunakan almunium foil kemudian di sterilkan ke dalam autoclave pada suhu 121°C selama 15 menit.

- Media yang akan dipakai di biarkan dingin hingga suhu mencapai $\pm 30^{\circ}\text{C}$ karena bakteri akan mati apabila di inokulasi pada media yang masih panas.
- Di tuang pada cawan petri tunggu dingin dan simpan dalam lemari pendingin agar tidak terkontaminasi sebelum digunakan.

B. NB (Nutrient Broth)

- NB di timbang 2,1 gram di larutkan ke dalam 90 ml *aquades* dalam *erlenmayer* kemudian di aduk hingga larut sempurna dan berwarna kuning.
- Erlenmayer di tutup menggunakan kapas dan aluminium foil lalu di bungkus dengan kertas perkamen dan diikat, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Media yang digunakan untuk pembiakan bakteri dibiarkan dingin karena bakteri akan mati bila diinokulasi pada media yang masih panas.

3.5.5 Pembiakan Bakteri *A. hydrophila*

- Di siapkan tabung reaksi yang berisi media NA (agar miring).
- Jarum ose digoreskan ke kultur murni bakteri untuk mengambil bakteri *A. hydrophila*.
- Digoreskan kedalam media NA secara zig-zag.
- Media NA di inkubasi di dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

3.6 Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Uji MIC (Minimum Inhibition Concentration)

Hasil Uji MIC skala log pada perlakuan Dosis Ekstrak yang berbeda beda untuk menentukan dosis MIC yang sesungguhnya mulai dari 0,01 ppt, 0,1 ppt, 1 ppt, 10 ppt, 100 ppt, 1000 ppt. Disajikan pada Tabel.4

Tabel 4. Hasil spektrofotometer Uji MIC awal

Dosis	Hasil Spektrofotometer	Keterangan
0,01 ppt	0,7406	Keruh
0,1 ppt	0,7376	Keruh
1 ppt	0,7825	Jernih
10 ppt	0,8833	Jernih
100 ppt	0,8645	Jernih
1000 ppt	0,8913	Jernih
Kontrol +	0,7666	Jernih
Kontrol -	0,3944	Keruh

Uji MIC dilakukan untuk mengetahui dosis minimum yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri dengan menggunakan ekstrak kasar daun jati (*T. grandis*). Sebanyak 10 ml NB (*Natrium Broth*) dalam 1 ml bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 CFU/ml di tambahkan spada setiap tabung uji. Menurut Setiawan, *et al.*, (2010), CFU (*Colony Forming Unit*), adalah satuan mikroba yang membentuk suatu koloni. Sejumlah 1 ml yang dimasukkan ke dalam tabung reaksi sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan dimulai dengan bening pertama yakni 1 ppt yang akhirnya dilakuka partisi MIC mulai dari range paling kecil sampai tinggi yakni, 0,6 ppt, 0,7 ppt, 0,8 ppt, 0,9 ppt, 1 ppt , 1,1 ppt, 1,2 ppt serta kontrol positif (dengan bakteri tanpa ekstrak daun jati) dan kontrol negatif (tanpa bakteri hanya ekstrak daun jati) (Grandiosa, 2010).

Pengamatan MIC di lakukan dengan cara kuantitatif yakni dengan melihat adanya warna kekeruhan pada media uji yang menandakan bahwa bakteri btersebut tumbuh, bila media uji bening berarti menandakan tidak adanya pertumbuhan bakteri.

Perhitungan pengenceran dosis dapat dilakukan dengan langkah membuat stok dosis yakni 4 ppt , kemudian selanjutnya dilakukan pengenceran dosis dari 1 ppt hingga 4 ppt dengan rumus :

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

Contoh menginginkan dosis 1 ppt:

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 4 \text{ ppt} = 2 \text{ ml} \times 1 \text{ ppt}$$

$$V_1 = 2/4$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml}$$

Larutan pengencer yang dibutuhkan : $2 \text{ ml} - 0,5 \text{ ml} = 1,5 \text{ ml}$

jadi untuk membuat konsentrasi dosis 1 ppt di butuhkan 0,5 ml dari 4 ppt dan 1,5 ml dari larutan pengencer DMSO 10 %.

3.6.2 Uji Cakram

Uji cakram merupakan penujian untuk antibakteri dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi disekitar kertas cakram yang mengandung bahan antibakteri sesuai dengan konsentrasi perlakuan (Pelczar dan Chan, 1986)

Kegunaan uji cakram digunakan untuk mengetahui pada konsentrasi tertentu manakah yang dapat menghambat bakteri yang bersifat bakteristatik (menghambat bakteri) setelah melakukan pengamatan 24 jam, maupun bakteriosidal (membunuh bakteri) setelah pengamatan 48 jam. Kertas cakram yang telah dilakukan perendaman dengan zat antibakteri diletakan di atas lempengan agar yangtelah disemai dengan mikroorganismenya yang akan diuji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganismenya oleh zat antibakteri terlihat sebagai wilayah yang jernih (bening) di sekitar pertumbuhan mikroorganismenya.

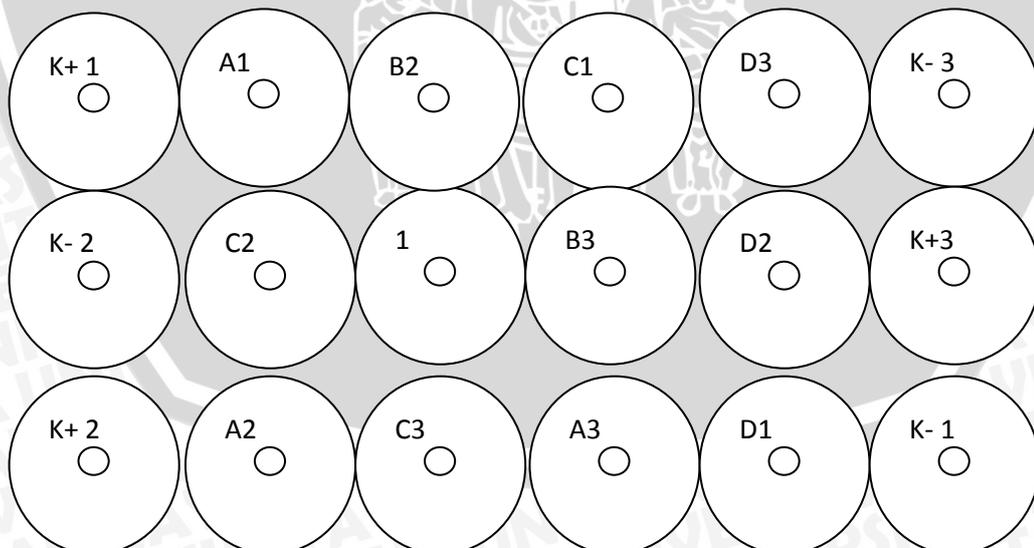
3.6.3 Prosedur Uji Cakram

Prosedur pelaksanaan Uji cakram adalah:

- Disiapkan petridisk yang terdapat media NA
- Disiapkan konsentrasi ekstrak kasar daun jati untuk uji cakram

- Penanaman media bakteri pada media NA dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri dari media NB mencelupkan *cotton swap*, kemudian digoreskan pada seluruh permukaan media agar NA hingga rata.
- Kertas cakram yang telah direndam dengan ekstrak kasar daun jati (*T. grandis*) ditiriskan dan diletakkan pada permukaan agar NA.
- Dibaca hasil setelah diinkubasi pada suhu ruangan 37C° selama 24 jam dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong.
- Jarak kertas cakram dengan tepi petridisk tidak boleh kurang dari 15 mm.
- Jika jumlah kertas cakram lebih dari satu, maka jarak antara cakram tidak boleh kurang dari 24 mm.
- Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh bergeser, karena mengurangi validasi pengukuran.

Untuk denah penelitian disajikan pada Gambar 2. sebagai berikut:



Gambar 2. Denah Penelitian Uji Cakram

Keterangan :

- A : Perlakuan Dosis 1 ppt
- B : Perlakuan Dosis 1,1 ppt
- C : Perlakuan Dosis 1,2 ppt
- D : Perlakuan Dosis 1,3 ppt
- K + : 100 % ekstrak kasar
- K - : Pelarut DMSO 10%
- 1,2,3 : Ulangan

3.7 Parameter Uji

Parameter uji terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama yaitu melakukan pengujian dosis ekstrak terhadap bakteri menggunakan uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) yang nantinya akan diukur tingkat kekeruhannya hingga terjadi bening pertama dan penghitungan diameter daerah hambatan yang diukur dengan menggunakan kertas cakram dengan pengamatan 24 jam dinyatakan dengan mm ditambah daerah bening yang ada di sekeliling kertas cakram. Parameter penunjangnya adalah suhu inkubasi yakni sekitar 35°C

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi Bakteri *A. hydrophila*

Proses identifikasian bakteri untuk memastikan bakteri tersebut adalah *A. hydrophila* dan mengetahui sifat-sifat biokimianya, maka perlu dilakukan beberapa pengujian biokimia yakni antara lain adalah uji gram, motilitas.

Pada uji gram bakteri dilakukan dengan larutan KOH 3%, pada bakteri *A. hydrophila* didapati hasil uji gram negatif. Prosedur perlakuan dilakukan dengan cara sampel bakteri dari cawan petri di letakkan di atas objek glass yang kemudian di tetesi dengan larutan KOH 3% lalu dihomogenkan menggunakan jarum ose selama 3 - 5 detik kemudian jarum ose diangkat ke atas dan percampuran bakteri *A. hydrophila* dan larutan KOH 3% mengalami viskositas. Menurut Fahri (2008), Sebanyak satu atau dua tetes larutan suspensi bakteri ditetaskan pada gelas objek. Kemudian inokulum bakteri yang berumur 24 jam dengan menggunakan jarum osse diletakkan pada tetesan larutan KOH 3% tersebut. Campuran bakteri dan KOH3% diaduk selama 5-10 detik dan kemudian jarum ose diangkat keatas dari tetesan tadi. Bila larutan KOH menjadi kental (*viscous*) dan cairan mengikuti jarum ose sampai 0,5-2 cm, saat jarum ose diangkat, hal ini menunjukkan bakteri yang diperiksa adalah gram negatif.

Pada uji motilitas digunakan larutan pepton sebagai indikasi kekeruhan pada larutan pepton pada tabung raksi yang menandai bahwa bakteri ini bersifat motil. Menurut Angelia (2009), uji motilitas untuk mengetahui masing-masing isolat bersifat motil atau tidak. Bakteri tersebut bersifat motil (biasanya pada bakteri berbentuk spiral dan sebagian berbentuk basil) dan yang bersifat immotil (bakteri berbentuk coccus). Kemampuan suatu organisme untuk bergerak sendiri disebut motilitas. Hampir semua sel bakteri spiral dan sebagian dari sel bakteri

basil bersifat motil, sedangkan bakteri yang berbentuk kokus bersifat immotil. Sifat ini diakibatkan oleh adanya alat motor cambuk yang disebut flagela sehingga sel bakteri dapat berenang di dalam lingkungan air. Untuk hasil data pengamatan bakteri *A. hydrophila* lebih jelasnya disajikan pada Lampiran 2

4.2 Daya hambat Anti bakterial Ekstrak Kasar Daun Jati (*T. grandis*)

4.2.1 Uji MIC (*Minimum Inhibitor Concentration*)

Uji MIC dilakukan untuk mengetahui dosis minimum yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. Hydrophila* dengan menggunakan ekstrak daun Jati (*T. grandis*). *Minimum inhibitor concentration* (MIC) diidentifikasi sebagai penentu hasil nilai terendah dari konsentrasi antimikroba yang nantinya akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme setelah inkubasi 24 jam (Andrew, 2001). Hasil uji MIC disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Data Hasil Panjang Gelombang Uji MIC

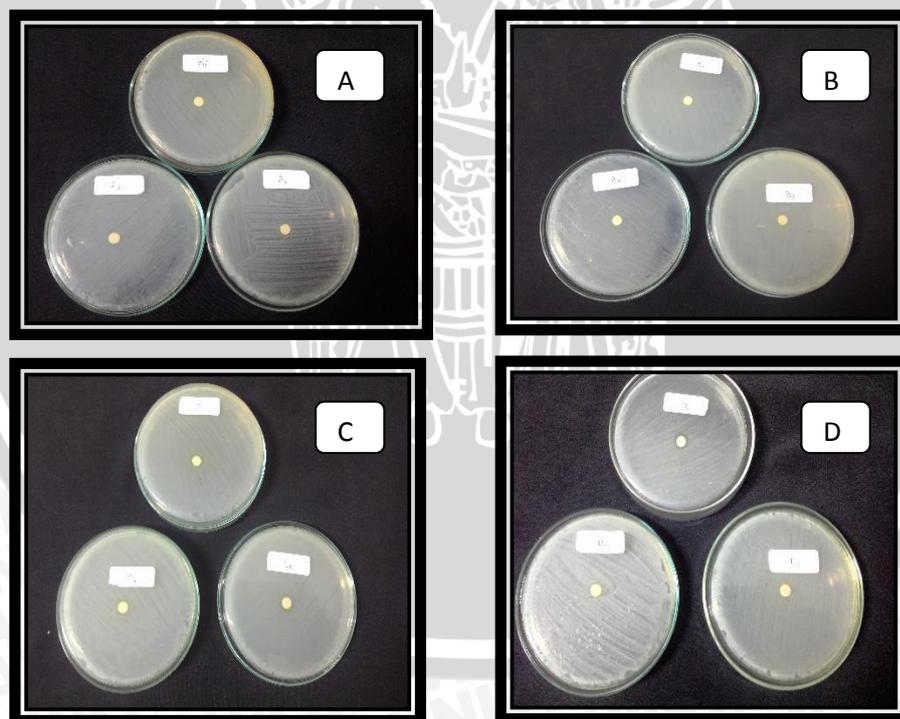
Dosis	Hasil spektrofotometer	keterangan
0,6 ppt	0,7321	Keruh
0,7 ppt	0,7368	Keruh
0,8 ppt	0,7521	Keruh
0,9 ppt	0,7545	Keruh
1 ppt	0,7829	Jernih
1,1 ppt	0,7880	Jernih
1,2 ppt	0,7932	Jernih
Kontrol +	0,7658	Jernih
Kontrol -	0,3849	Keruh

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan hasil uji MIC pada dosis 1 ppt didapatkan hasil jernih pertama kali. Kejernihan pada larutan uji tersebut dipengaruhi karena adanya aktivitas antibakteria dari ekstrak kasar daun jati (*T. grandis*) yakni ekstrak kasar yang bereaksi membunuh bakteri *A. hydrophila* dengan cara merusak membran sitoplasma bakteri. Hal tersebut dikarenakan adanya aktivitas ekstrak kasar menggunakan dosis yang berbeda yang bereaksi dengan bakteri *A. hydrophilla*. Maka mempengaruhi nilai absorbansi di tiap

tabung perlakuan yang di tandai dengan tingkat kekeruhan pada perlakuan tersebut. Hal ini seperti dikemukakan oleh Grandiosa (2010), Pengamatan MIC dilakukan dengan pengamatan kualitatif yaitu dengan melihat adanya tingkat kekeruhan pada media sebagai indikasi adanya pertumbuhan bakteri setelah 24 jam inkubasi pada suhu 37°C dan bila mediana jernih diindikasikan tidak ada pertumbuhan bakteri. Kemudian dilakukan pengamatan dengan spektrofotometer dengan panjang gelombang 615 nm untuk mengetahui hasil lebih jelasnya disajikan pada Lampiran 3.

4.2.2 Uji Cakram

Berdasarkan dari hasil pengamatan selama penelitian pada perlakuan 24 jam mengenai uji daya hambat ekstrak kasar daun jati (*T. grandis*) terhadap pertumbuhan bakteri *A. Hydrophila* didapatkan hasil zona bening yang ditunjukkan pada Gambar 3



Gambar.3 hasil uji daya hambat ekstrak kasar Daun Jati (*T.grandis*) terhadap bakteri *A. Hydrophila* (A dosis 1 ppt, B dosis 1,1 ppt, C dosis 1,2 ppt , D dosis 1,3 ppt)

Pada penelitian daya hambat ini diperoleh hasil daya hambat bakteri *A. hydrophila* yakni ditandai dengan tidak adanya pertumbuhan bakteri disekitar kertas cakram yang direndam menggunakan perlakuan dosis yang berbeda mulai dari 1 ppt, 1,1 ppt, 1,2ppt 1,3 ppt . Diameter zona bening pada uji daya hambat dipengaruhi oleh jumlah dosis yang berbeda pada setiap perlakuannya. Berdasarkan Gambar 3 pengamatan 24 jam uji daya hambat zona bening diameter yang terbesar didapatkan pada dosis tertinggi pada perlakuan D sebesar 1,3 ppt sedangkan pada dosis terendah pada perlakuan A sebesar 1 ppt. Hal tersebut dipengaruhi oleh jumlahnya bahan aktif ekstrak yang meresap kedalam kertas cakram. Pernyataan tersebut sesuai dengan pernyataan Katno (2009), diameter zona bening atau zona hambat yang dihasilkan oleh suatu ekstrak berbanding lurus dengan jumlah konsentrasi ekstrak yang digunakan sehingga perbedaan besar kecilnya zona bening atau zona hambat yang dihasilkan masing - masing konsentrasi berbanding dengan jumlah bahan aktif yang digunakan. Klasifikasi respon hambat disajikan pada Tabel. 6 Sedangkan hasil sidik ragam diameter zona hambat 24 jam yang disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Data Diameter Zona Hambat Bakteri

PERLAKUAN	ULANGAN			TOTAL	RATA-RATA \pm SD
	R1	R2	R3		
A (1) ppt	2	3	3	8	2,67 \pm 0.577
B (1,1) ppt	3	3	5	11	3,67 \pm 1.15
C (1,2) ppt	5	4	6	15	5 \pm 1
D (1,3) ppt	6	7	5	18	6 \pm 1
TOTAL				52	

Pada Tabel 6 didapati hasil uji daya hambat tentang besar diameter zona hambat ekstrak kasar daun jati (*T.grandis*) terhadap bakteri *A. hydrophila*. Hasil rata-rata nilai tertinggi yakni didapatkan pada dosis 1,3 ppt dengan nilai sebesar 6 mm dan diameter terkecil yakni 2,67 mm pada dosis 1 ppt.

Tabel 7. Sidik Ragam Diameter Zona Hambat

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	52,67	17,5	19,15**	4,07	7,59
Acak	8	7,33	0,91			
Total	11					

Keterangan **: Berbeda sangat nyata

Pada perhitungan sidik ragam didapati hasil bahwa pengaruh pemberian ekstrak kasar daun jati (*T.grandis*) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* adalah berbeda sangat nyata. Hal ini dikarenakan hasil dari F Hitung lebih besar dari F Tabel 5% dan lebih kecil dari F Tabel 1 % atau nilai 19,15 lebih besar dari pada 4,07 dan 19,15 lebih kecil daripada 7,59. Untuk selanjutnya dalam mengetahui perbandingan antar perlakuan secara detail maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 24 jam yang disajikan pada Tabel 8 berikut ini.

Tabel 8. Uji Perbandingan Beda Nyata Terkecil Ekstrak kasar Daun Jati (*T. grandis*) terhadap Diameter Zona Hambat Bakteri *A. hydrophila*

Rerata Perlakuan	A	B	C	D	Notasi
	2,67	3,67	5	6	
A	2,67	-	-	-	a
B	3,67	1 ^{ns}	-	-	ab
C	5	2,3*	1,3 ^{ns}	-	bc
D	6	3,3**	2,3*	1 ^{ns}	c

Keterangan :

* : berbeda nyata

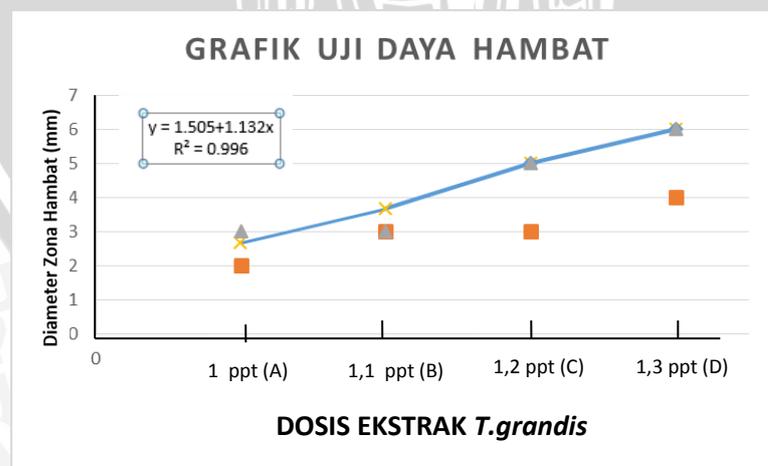
** : berbeda sangat nyata

Pada hasil tabel uji BNT (Tabel. 8) didapatkan nilai dari hasil perlakuan D (1,3 ppt) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata dengan perlakuan A (1 ppt), B (1,1 ppt), C (1,2 ppt). Perlakuan tersebut didasari bahwa perlakuan A tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap semua perlakuan sehingga diberi notasi a. Perlakuan B terhadap perlakuan A tidak memberikan pengaruh yang signifikan maka diberi notasi ab. Perlakuan C memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap perlakuan A dan B sehingga diberi notasi bc. Sedangkan perlakuan D memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap

perlakuan A, B, dan C maka diberi notasi c. Penghambatan tersebut dikarenakan ekstrak kasar daun jati (*T. grandis*) memiliki kandungan senyawa antioksidan yang sangat tinggi yaitu flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak dinding sel, merusak membran sitoplasma, mendenaturasi protein sel dan menghambat kinerja protein sel (Pelczar dan Chan, 2008).

Pada ekstrak daun jati (*T. grandis*) mengandung bahan antibakteri yakni berupa flavonoid. Flavonoid merupakan suatu zat turunan dari golongan fenol yang terdapat dalam ekstrak daun jati (*T. grandis*) serta larut dalam air. Fenol dapat juga berfungsi sebagai zat bakteriosidal. Kadar tinggi akan mengendapkan protein sedangkan kadar rendah mendenaturasi protein tanpa koagulasi sehingga bebas menembus jaringan (Doerge, 1972). Semua senyawa flavonoid, menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon dan semuanya mempunyai sejumlah sifat yang sama flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air dan berupa senyawa fenol (Harbone, 1987).

Untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antar perlakuan dengan zona bening maka perlu dilakukan uji polinomial ortogonal. Berikut hasil perhitungan uji polinomial orthogonal yang berupa grafik pada Gambar. 4



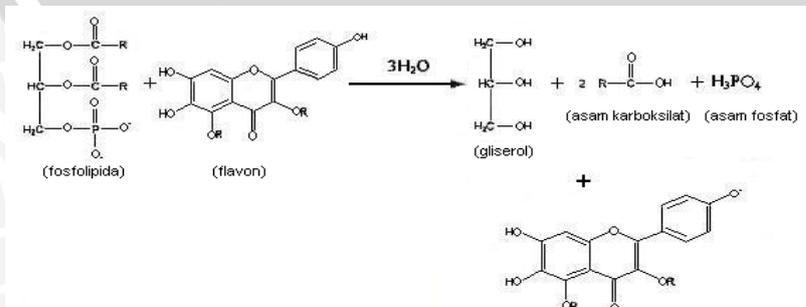
Gambar. 4 Grafik Hubungan Zona Hambat antar Perlakuan Ekstrak Kasar Daun jati (*T. grandis*) terhadap Bakteri *A. hydrophila*

Berdasarkan Gambar 4, grafik hubungan zona hambat antar perlakuan ekstrak kasar daun jati terhadap bakteri *A. hydrophila* menunjukkan perpotongan garis secara linear dengan persamaan $y = 1.505 + 1.132x$ dengan koefisien nilai determinasi (R^2) sebesar 0,996. Pada dosis 1 ppt hingga 1,3 grafik mengalami peningkatan pada besarnya zona hambat, hasil perhitungan lengkapnya pada Lampiran. 6. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar daun jati mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada pengamatan 24 jam.

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

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

Reaksi penguraian pada membran sitoplasma bakteri oleh flavon menurut Noviana (2004), disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Mekanisme Perusakan Membran Sitoplasma oleh Flavonoid

Pada Gambar 5 ini nampak pada perusakan membran sitoplasma, ion H^+ dari senyawa fenol dan turunannya (flavanoid) 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 (Noviana, 2004).

Persenyawaan fenol sebagai desinfektan bersifat aktif terhadap sel vegetatif bakteri, tetapi tidak aktif terhadap spora bakteri. Persenyawaan bersifat fungisida dan antivirus. Keaktifannya menurun dengan berbagai senyawa organik lain (Prajitno, 2005).

4.3 Suhu Inkubator

Pertumbuhan bakteri dapat diketahui dari beberapa parameter penunjang, salah satunya adalah suhu inkubator. Parameter ini sangat penting agar bakteri tumbuh dengan baik. Seperti halnya makhluk hidup tingkat tinggi, untuk pertumbuhannya bakteri memerlukan suhu tertentu. Pada penelitian ini menunjukkan bahwa suhu inkubasi yang digunakan adalah $35^{\circ}C$.

Menurut Nabib, *et al.* (2005), suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* adalah $28^{\circ}C$, sedangkan suhu minimum dan maksimalnya adalah $37^{\circ}C$ dan $40^{\circ}C$. Menurut Ledberg (1992), sebagian besar bakteri *A. hydrophila* dapat tumbuh pada kisaran suhu $20^{\circ}C - 35^{\circ}C$, dan sebagian spesies dapat tumbuh pada $50^{\circ}C$. Dari kisaran diatas, bakteri *A. hydrophila* dapat digolongkan dalam kelompok bakteri psikrofil yaitu bakteri yang tumbuh pada kisaran suhu $0^{\circ}C - 20^{\circ}C$ dan mesofil yaitu bakteri yang dapat tumbuh pada kisaran suhu $25^{\circ}C - 40^{\circ}$.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari penelitian tentang “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar daun jati (*T.grandis*) terhadap Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila* Secara *In Vitro*” diperoleh kesimpulan bahwa konsentrasi terbaik dari hasil penelitian ini didapat dosis terbaik yang dapat menghambat dari pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* adalah sebesar 1,3 ppt.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian ini maka disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak kasar daun jati (*T.grandis*) secara *In Vitro* terhadap bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian dosis diatas 1,3 ppt .



DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E. dan Liviawaty. E. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Kanisius. Jogjakarta.
- Alen, Y., Akhsanita, M., Mulyani, I., Susanti, M. 2012. Uji Sitotoksik Ekstrak Dan Fraksi Daun Jati (*Tectona grandis Linn. F.*) Dengan Metoda Brine Shrimp Lethality Bioassay. Universitas Andalas Padang. 147 – 153 .
- Angelia, T. O., 2009. Kajian Metode Deteksi Bakteri Patogen Penyebab Penyakit Asal Pangan Di Pusat Riset Obat Dan Makanan Badan Pom RI. Institut Pertanian Bogor. 42 hlm.
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas salmonella typhimurium terhadap ekstrak daun *Psidium guajava l.* *Bioscientiae* **1** (1): 31-8.
- Anderson, D.P. 1974. Fish immunology In Snieszko dan H.R. Axelrod (Ed.), *Disease of Fishes*. TFH Publication Ltd. Hongkong.
- Austin, B. Dan Austin, D.A. 1986. Bacterial Fish Patogen "Diseases In Farmed and Wild Fish". Second Edition. Ellis Horwood Limited, England. Hlm. 173-177.
- Brooks, G. F., J. S. Butel dan S. A. Morse. 2005. Medical Microbiology. Mc Graw Hill, New York.
- Bullock R.E., D.A. Conroy dan S.F. Sniesko. 1971. The Identification of Fish Pathogenic Bacteria. Book 2 B. T.H.F. Publication. England.
- Cushnie T.P.T. dan A. J. Lamb. 2005. Review: Antimicrobial activity of flavanoids. *Int. J. Antimicrob. Agents* **26** (1): 343–356.
- Darmanto. 2003. *Respons kebal ikan maskoki Carassius auratus melalui vaksinasi dan imunostimulan terhadap infeksi bakteri Aeromonas hydrophila*. Tesis Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Dwidjoseputro, D. 1994. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Djambatan. Jakarta.
- Fahri, N. 2008. Prevalensi Ektoparasit Protozoa *Ichthyophthirius multifiliis* pada Ikan Maskoki (*Carassius auratus*) di Desa Canggung Kecamatan Pare Kabupaten Kediri. Universitas Airlangga. Surabaya. 48 hlm.
- Fauziah, R. 2001. Pengaruh salinitas terhadap pevalensi ektoparasit pada ikan kerapu macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Universitas Sumatera Utara. Medan. Hlm. 23.
- Ghufran, Kordi. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. PT. Sadi Mahasatya. Jakarta.
- Grandiosa, R. 2010. Efektivitas penggunaan larutan filtran jintan hitam (*Nigella sativa*) dengan konsentrasi berbeda terhadap pertumbuhan bakteri

Aeromonas hydrophila secara in vitro dan uji toksisitasnya terhadap ikan mas (*Cyprinus carpio*). Fakultas Perikanan dan ilmu kelautan. Universitas Padjajaran. Bandung. Hlm. 47.

Hermawan, A., Hana, W. dan Wiwiek, T. 2007. Pengaruh ekstrak daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* dengan metode difusi disk. Universitas Erlangga.

Holt, J.G. 1979. *The Sorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Wiliam and Wilkins Company Baltimor. USA. 157 pp.

Kabata, Z. 1985. Parasites and disease of fish cultured in tropics. Taylor and Francis, London.

Kasanah, N. dan A. Isnansetyo. 2013. High Throughput Screening dan Bioassay dalam Penemuan Bioaktif dari Alam. Materi Workshop dan Pelatihan Bioprospecting Bahan Alam Kelautan II. Laboratorium Hidrobiologi Jurusan Perikanan Fakultas Pertanian Universitas Gadjah Mada.

Kusmayati dan Agustini, N. W. R. 2007. Uji aktivitas senyawa antibakteri dari mikroalga (*Porphyridium cruentum*). *Biodiversitas* **8**(1): 48-53.

Masduki, I. 1996. Efek antibakteri ekstrak biji pinang (*Areca catechu*) terhadap *S. Aureus* dan *E. coli*. *Cermin Dunia Kedokteran* **109**: 21-4.

Mangunwardoyo, W., R. Ismayasari Dan E. Riani. 2010. Uji Patogenitas Dan Virulensi *Aeromonas Hydrophilastanier* Pada Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus* Lin.) Melalui Postulat Koch. *Jurnal Ristek Akuakultur* No. 5 Vol. 2. Hal. 245-255.

Muslim., Holtly M. P. dan H. Widjajanti. 2009. Penggunaan ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) untuk mengobati benih ikan patin siam (*Pangasius hypophthalmus*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophilla*. *Jurnal Akuakultur* **8**(1): 91-100.

Porteen K., Agarwal R.K. dan Bhilegaonkar K.N. 2007. Detection of *Aeromonas* sp. from chicken and fish samples by polymerase chain reaction. *American Journal of Food Technology* **2**(1): 30–37.

Post, G. 1987. *Texbook of fish health*. New Jersey. TFH Publication Inc. Neptune. P. 288 pp

Prajitno, A. 2005. Diklat parasit dan penyakit ikan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang. 105 hlm.

Pratiwi, Sylvia. T. 2008. Mikrobiologi farmasi. Erlangga. Jakarta.

Rinawati, N. Dan Dwi. 2012 . Daya antibakteri tumbuhan majapahit (*Crescentia cujete* L.) terhadap bakteri *Vibrio alginolyticus*. Skripsi FMIPA Institut Teknologi Sepuluh Nopember. Surabaya. 63 hlm.

- Riyanto, T.A. 1993. Patologi dan gambaran darah ikan lele dumbo ukuran fingerling yang disuntik secara intramuskular dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* (sel utuh). Skripsi Institut Pertanian Bogor. Bogor.
- Robinson, T. 1991. Kandungan organiktumbuhan tingkat tinggi. ITB. Bandung. hlm. 13-26.
- Seismiro. 1998. *Aeromonas hydrophyla* adenyl cyclase: a new class of adenyl cyclase with thermopophilic properties and sequences similarities to proteins from hyperthermophilic archaebacteria. *J Bakteriol* **180**: 3339-3344.
- Sudjadi, 1986. Metode Pemisahan. UGM Press. Yogyakarta Pustaka
- Sulaksana dan Dadang. 2002. Kemuning dan jati belanda. Swadaya. Jakarta.
- Sumarna, Y. 2001. Budi daya jati. Swadaya. Jakarta
- Suryandari, S., 1981. Pengambilan Oleoresin Jahe Dengan Cara Solvent
- Sutjiati, M. 2004. Penyakit ikan. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang.
- Volk, W.A. dan Wheller M.F. 1988. Mikrobiologi dasar. Alih Bahasa. Markham. Erlangga. Surabaya
- Widyastuti, S.M. dan Sumardi. 2004. Dasar-dasar perlindungan hutan. Gajah Mada University Press. Yogyakarta.
- Wiarsih, W. 2013. Uji Pengaruh Pemberian Ekstrak Etanol 70 % Daun Jati (*Tectona grandis*) Terhadap Penurunan Kadar Kolestrol Total Darah Pada Tikus Putih Jantan . UIN Syarif Hidayatullah . Jakarta.

Lampiran 1 . Dokumentasi Penelitian



Autoklaf



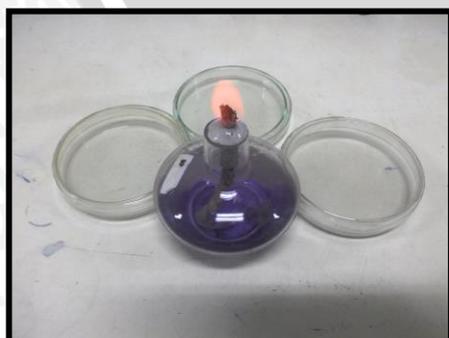
Hot Plate



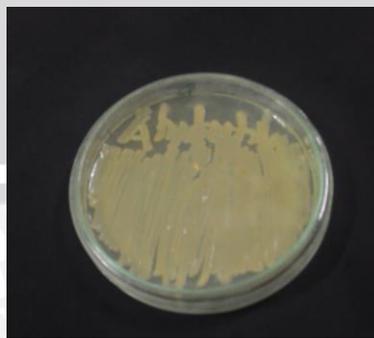
Timbangan digital



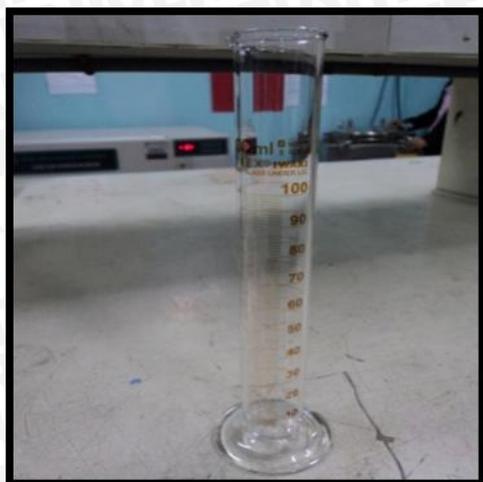
Media NB



bunsen



Bakteri *A. hydrophila*



Gelas Ukur



Evaporotary



UV. FISH



Tabung Reaksi



Rak Tabung Reaksi



inkubator

Lampiran 2. Data Hasil Uji Identifikasi Bakteri *A. hydrophila*

PROTOKOLER PEMERIKSAAN
LABORATORIUM UJI BALAI KIPM KELAS I SURABAYA I
BIDANG : BAKTERIOLOGI

Jenis Pemeriksaan : *Aeromonas hydrophila* (IKM/5.4.13/BKI-JS)

Tanggal Uji : 12 MARET 2015

Karakteristik	Acuan (IKM)	CRM/RM <i>Aeromonas hydrophila</i>	Tube <i>A. hydrophila</i>
Morfologi			
· Warna	Krem	Krem	Krem Tebal
· Bentuk	.	.	.
· Tepi	.	.	.
· Elevasi	.	.	.
· Struktur dalam	.	.	.
Uji gram, Morf. Sel	-, Batang	-, Batang	-, Batang
Oksidase	+	+	+
Katalase	+	+	+
Uji Biokimia	.	.	.
O/F	F	F	F
TSA 37°C	+	+	+
TSIA, Gas, H ₂ S	As/As, H ₂ S	As/Alk, H ₂ S	Alk/As
L I A	d	-	-
Motilitas	+	+	+
Gelatin (22°C)	+	+	+
Indole	+	+	+
Ornithine	-	-	-
MR	+	+	+
Vp	+	-	-
Arginin	+	+	+
Simmons Citrate	d	-	-
Urease	-	-	-
TCBS	.	.	.
Mac Konkey	G	G	G
Muier Hilton / Novo	R	R	V
Uji Karbohidrat			.
* Glukosa	+	+	+
* Laktosa	v	-	-
* Sukrosa	+	+	+
* Arabinosa	+	+	+
* Manitol	+	+	+
* Inositol	-	-	-
* Maltosa	+	+	+
RS-A			+
HASIL			Positif (+) <i>A. hydrophila</i>

Lampiran 3. Hasil Uji *Minimum Inhibitor Concentration (MIC)* Ekstrak Kasar Daun jati (*T.grandis*) terhadap Daya Hambat bakteri *A. Hydrophila*

Instrument Settings

Instrument	Cary 50
Instrument version no.	3.00
Wavelength (nm)	615.0
Ordinate Mode	Abs
Ave Time (sec)	0.1000
Replicates	3
Sample averaging	OFF

Comments:

Zero Report

Read	Abs	nm
Zero	(0.0894)	615.0

Analysis

Collection time 2/9/2015 2:40:34 PM

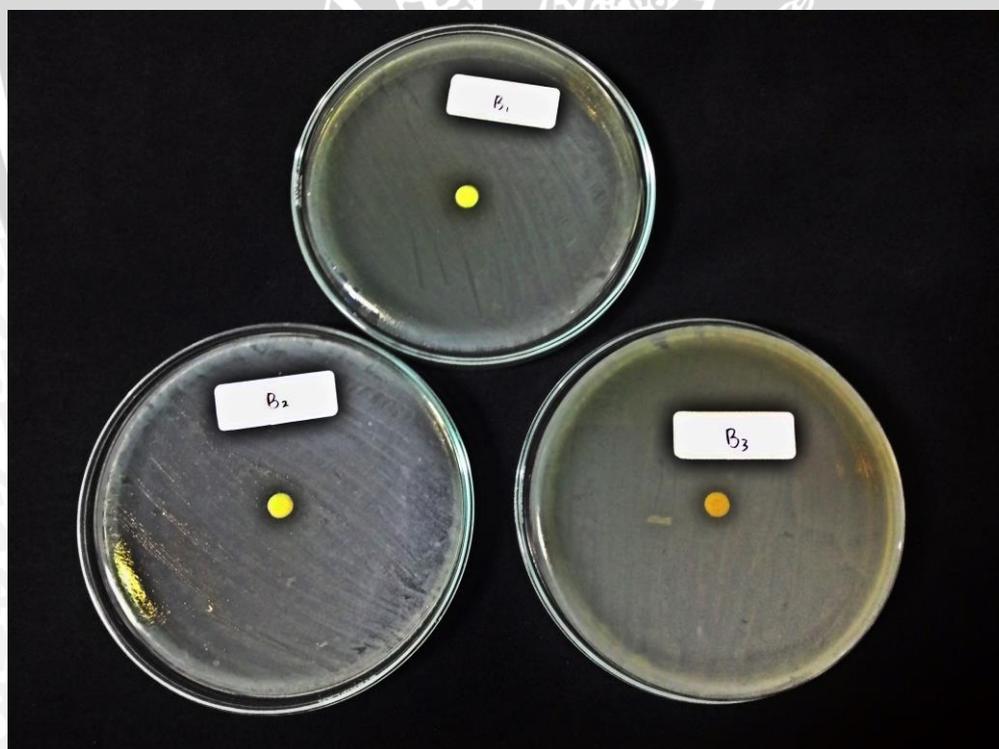
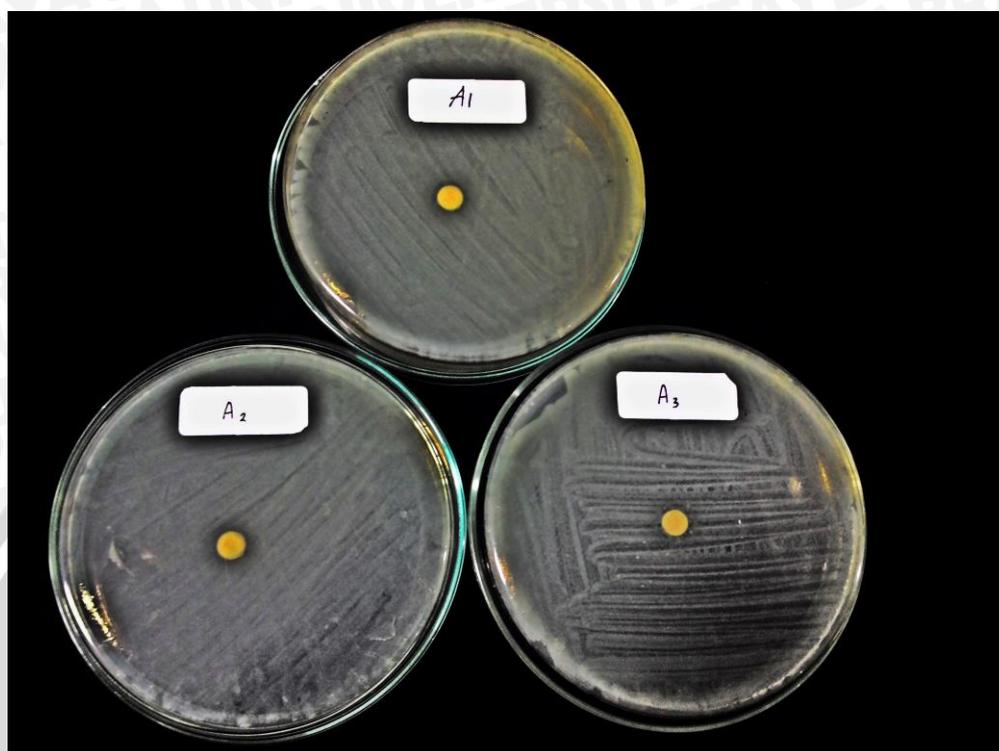
Sample	F	Mean	SD	%RSD	Readings
Kontrol +					0.7995 0.7991
Kontrol -		0.7658	0.0012	0.17	0.7013 0.3942 0.3948
0.6 ppt		0.3849	0.0003	0.07	0.3944 0.7395 0.7387
0.7 ppt		0.7321	0.0026	0.35	0.7436 0.7361 0.7401
0.8 ppt		0.7368	0.0021	0.29	0.7367 0.7822 0.7829
0,9 ppt		0.7521	0.0004	0.05	0.7823 0.8813 0.8812
1 ppt		0.7545	0.0036	0.41	0.8875 0.8660 0.8658
1,2 ppt		0.7829	0.0024	0.27	0.8618 0.8936 0.8906
1,3 ppt		0.7880	0.0020	0.23	0.8898 0.8936 0.8906
		0.7932	0.0020	0.23	0.8898

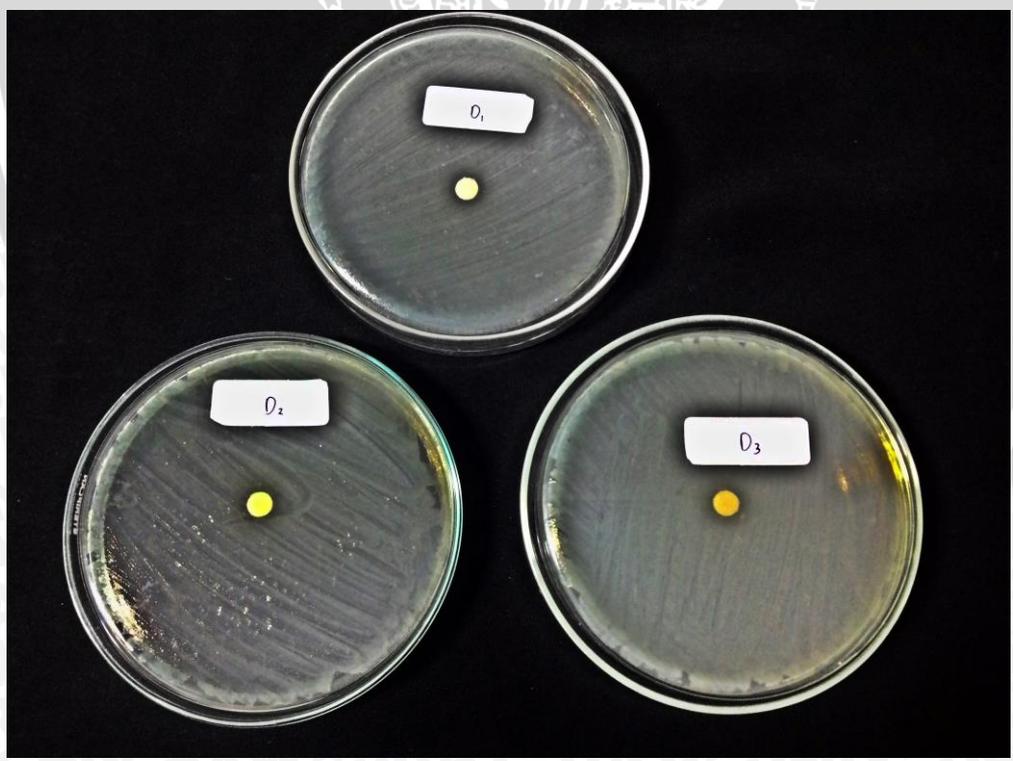
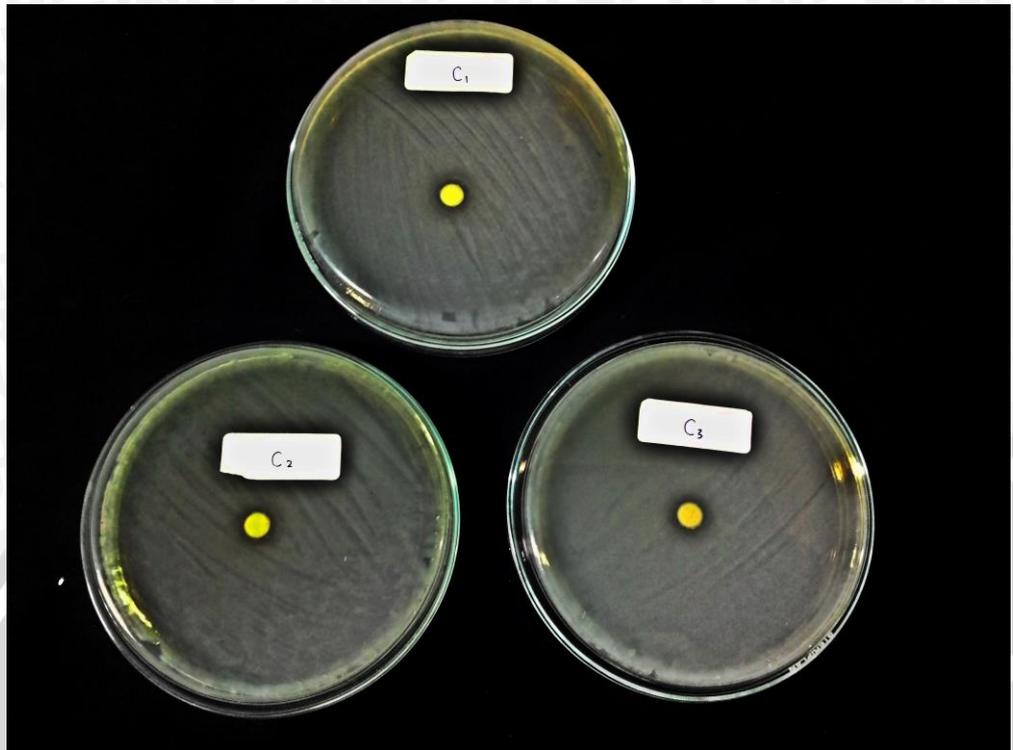
Results Flags Legend

R = Repeat reading



Lampiran 4. Hasil Daya Hambat Uji Cakram Ekstrak Kasar Daun jati (*T.grandis*) terhadap Daya Hambat bakteri *A. Hydrophila*





Lampiran 5. Penentuan Konsentrasi Ekstrak Daun Jati (*T.grandis*) pada uji MIC dan Uji Cakram

Persiapan perendaman (maserasi) di mana daun jati yang sudah disiapkan 600 gr di maserasi menggunakan ethanol 70% sebanyak 3 liter selama 2 x 24 jam dalam suhu kamar di dalam toples. Setelah itu, larutan yang didapat di saring menggunakan kertas saring lalu di uapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak daun jati sebanyak 14,24 gr dengan nilai rendemen 2,4%.

dan ditambahkan larutan pengencer DMSO 10% sebanyak 50 ml.

➤ Dosis stok 10 ppt

$$= 10/100 \times 1000$$

= 100 gram ekstrak kasar daun kemangijati dilarutkan dalam 50 ml DMSO

10%, maka akan menghasilkan dosis 10 ppt

➤ Uji MIC

➤ 0.6 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 0,6 \times 2$$

$$V_1 = 0,12 \text{ ml}$$

0,12 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,83 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 0.6 ppm

➤ 0.7 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 0,7 \times 2$$

$$V_1 = 0,14 \text{ ml}$$

0,14 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,86 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 0.7 ppt

Lampiran 3. (Lanjutan)

➤ 0.8 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 0,8 \times 2$$

$$V_1 = 0,16 \text{ ml}$$

0,16 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,84 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 0.8 ppt

➤ 0.9 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 0,9 \times 2$$

$$V_1 = 0,18 \text{ ml}$$

0,18 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,82 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 0.9 ppt

➤ 1 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 1 \times 2$$

$$V_1 = 0,2 \text{ ml}$$

0,2 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,8 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 1 ppt

➤ 1,1 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 1,1 \times 2$$

$$V_1 = 0,22 \text{ ml}$$

0,22 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,78 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 1,1 ppt

Lampiran 3. (Lanjutan)

➤ 1,2 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 1.2 \times 2$$

$$V_1 = 0,24 \text{ ml}$$

0.24 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,76 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 1,2 ppt

➤ 1,3 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 1.3 \times 2$$

$$V_1 = 0,26 \text{ ml}$$

0.26 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,74 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 1,3 ppt

➤ **Uji Cakram**

➤ 1 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 1 \times 2$$

$$V_1 = 0,1 \text{ ml}$$

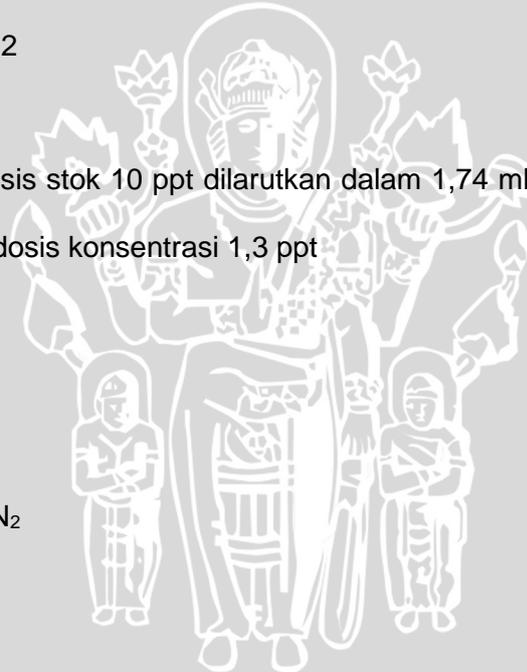
0,1 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,9 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 1 ppt

➤ 1,1 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 1,1 \times 2$$

$$V_1 = 0,22 \text{ ml}$$



0,22 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,78 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 1,1 ppt

➤ 1,2 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 1.2 \times 2$$

$$V_1 = 1,05 \text{ ml}$$

0.24 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,76 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 1,2 ppt

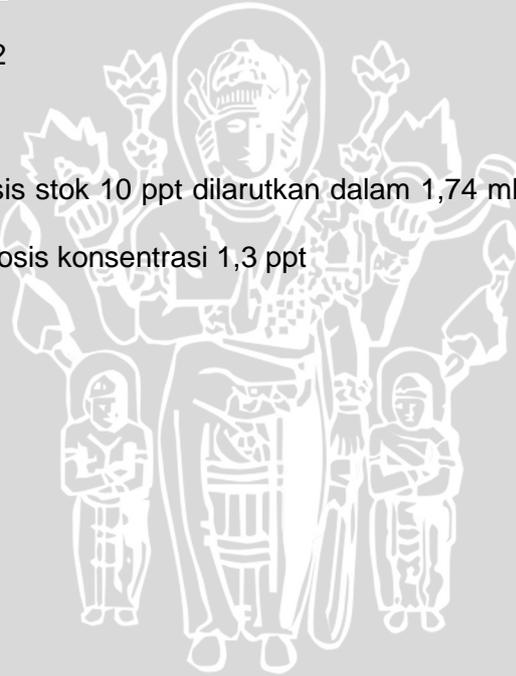
➤ 1,3 ppt

$$V_1 \times N_1 = V_2 \times N_2$$

$$V_1 \times 10 = 1.3 \times 2$$

$$V_1 = 1,05 \text{ ml}$$

0.26 ml dari dosis stok 10 ppt dilarutkan dalam 1,74 ml DMSO 10% akan menghasilkan dosis konsentrasi 1,3 ppt



Lampiran 6. Analisis Data Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Kasar *T. grandis* Terhadap Diameter Hambatan (mm) Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada pengamatan 24 jam

DATA ZONA BENING PENGAMATAN 24 JAM

PERLAKUAN	ULANGAN			TOTAL	RATA-RATA
	1	2	3		
A	2	3	3	8	2,67
B	3	3	5	11	3,67
C	5	4	6	15	5
D	6	7	5	18	6
TOTAL				48	

➤ Faktor Koreksi

$$\begin{aligned}
 FK &= \frac{G^2}{n} \\
 &= \frac{48^2}{12} \\
 &= \frac{2304}{12} \\
 &= 192
 \end{aligned}$$

➤ Jumlah Kuadrat

$$\begin{aligned}
 JK_{\text{total}} &= (A1^2 + A2^2 + A3^2 + B1^2 + B2^2 + B3^2 + C1^2 + \dots + D3^2) - FK \\
 &= (2^2 + 3^2 + \dots + 5^2) - 192 \\
 &= 252 - 192 \\
 &= 60
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JK_{\text{perlakuan}} &= \frac{\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2 + \sum D^2}{3} - FK \\
 &= \left(\frac{8^2 + 11^2 + 15^2 + 18^2}{3} \right) - 192 \\
 &= 244,6 - 192 \\
 &= 52,6
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 JK_{\text{acak}} &= P_{\text{(total)}} - Q_{\text{(perlakuan)}} \\
 &= 60 - 52,6 \\
 &= 7,4
 \end{aligned}$$



Perhitungan JK	
FK	192
JK Total	60
JK Perlakuan	52,67
JK Acak	7,4

Tabel Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	52,67	17,56	19,08**	4,07	7,59
Acak	8	7,4	0,92			
Total	11					

Keterangan (**)= Berbeda sangat nyata

Dikarenakan nilai F hitung memiliki nilai yang lebih besar dari pada F 5% dan F 1% maka perhitungan dilanjutkan pada proses perhitungan beda nyata terkecil (BNT).

SED	0,78173596
T tabel 5%	2,306
T tabel 1%	3,355

BNT 5%= T tabel 5%(db acak) x SED	1,81
BNT 1%= T tabel 1%(db acak) x SED	2,62

Tabel BNT Laju Metamorfosis

Rata-Rata	A	B	C	D	Notasi
Perlakuan	2,67	3,67	5	6	
A	2,67	-	-	-	a
B	3,67	1 ^{ns}	-	-	ab
C	5	2,33*	1,33 ^{ns}	-	bc
D	6	3,33**	2,33*	1 ^{ns}	c

Keterangan (**)= Berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil perhitungan uji beda nyata terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil yang diperoleh berbeda sangat nyata, dalam hal ini maka dilakukan perhitungan lanjutan dengan menggunakan *Polynomial orthogonal*.

Uji Polinomial	Perlakuan	Total	Perbandingan(Ci)		
			Linier	Kuadratik	Kubik
	A	8,00	-3	1	-1
	B	11,00	-1	-1	3
	C	15,00	1	-1	-3
	D	18,00	3	1	1
	Q= $\sum ci \cdot Ti$		34	0	-2
	HasilKuadrat		20	4	20
	Kr= $(\sum ci^2) \cdot r$		60	12	60
	JK=Q ² /Kr		19,27	0	0,07
	Total	19,31			
	Regresi				

➤ JK regresi total = JK Linear + JK Kuadratik + JK Kubik

$$= 19,27 + 0 + 0,07$$

$$= 11,34$$

Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	3	19,34			4,07	7,59
Linier	1	19,27	19,27	21,02	**	
Kuadratik	1	0	0	0,0	ns	
Kubik	1	0,07	0,07	0,07	ns	
2. Acak	8	7,33	0,97			
Total	11	38,67				

• Perhitungan R²

$$R^2 \text{ Linear} = \frac{JK \text{ linear}}{JK \text{ linear} + JK \text{ acak}} = \frac{19,27}{19,27 + 7,33} = 0,72$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{JK \text{ Kuadratik}}{JK \text{ Kuadratik} + JK \text{ acak}} = \frac{0}{0 + 7,33} = 0$$

$$R^2 \text{ Kubik} = \frac{JK \text{ Kubik}}{JK \text{ Kubik} + JK \text{ acak}} = \frac{0,07}{0,07 + 7,33} = 0,0094$$

Berdasarkan data perhitungan regresi yang telah dilakukan diperoleh hasil perhitungan data tertinggi pada data Linear, yang berarti bentuk kurva

respon yang paling tepat yaitu kurva Linear . Nilai data Linear yang diperoleh pada analisa regresi Linear yaitu 21,02 yang memiliki nilai lebih besar dari F 5% dan F 1%. Pada perhitungan R^2 kuadratik didapat hasil 0.95. Untuk pembuatan kurva sendiri dilanjutkan dengan menggunakan program Ms. Excel 2007.

