

UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR DAUN SELEDRI (*Apium graveolens* L) TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila* SECARA IN VITRO

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

Oleh :
ANANDA HAYYU NURANI
NIM. 125080501111055



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR DAUN SELEDRI (*Apium graveolens* L) TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila* 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 :
ANANDA HAYYU NURANI
NIM. 125080501111055



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

SKRIPSI

UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR DAUN SELEDRI (*Apium graveolens* L) TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila* SECARA IN VITRO

Oleh:
ANANDA HAYYU NURANI
NIM. 125080501111055

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal
dan dinyatakan telah memenuhi syarat
Tanggal :

Menyetujui,
Dosen Penguji I

Muhammad Fakhri, S.Pi., MP., M.Sc
NIK. 860717 08 1 1 0092
Tanggal :

Dosen Pembimbing I

Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS.
NIP. 19611106 198602 2 001
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Ir. Heny Suprastyani, MS.
NIP. 19620904 198701 2 001
Tanggal :

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS.
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal :

PERNYATAAN ORISINALITAS

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, 19 Mei 2016

Penulis

Ananda Hayyu Nurani

UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar - besarnya kepada :

- Tuhan Yang Maha Esa karena atas berkah dan limpahan rahmat-Nya laporan ini dapat terselesaikan dengan tepat waktu.
- Keluargaku tercinta: Bambang Nurwicahyo (Papa), Dra. Sri Haryani (Mama), Bramandika Adi Utama (Mas Bram), dan Adinda Hayyu Nurani (Adik Dinda) yang telah memberikan doa, motivasi, dan dukungan materiil selama ini.
- Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS dan Ir. Heny Suprastyani, MS selaku dosen pembimbing yang telah banyak memberikan masukan selama pelaksanaan dan penyusunan laporan.
- Ibu Titin selaku laboran Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan yang senantiasa selalu memberikan bantuan dengan ikhlas serta arahan dan saran kepada penulis selama kegiatan penelitian berlangsung.
- Teman – teman Aquasean BP 2012 yang namanya tidak dapat disebutkan satu persatu yang memberikan motivasi penuh bagi penulis.

Penulis menyadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, laporan skripsi ini masih banyak kekurangan, oleh karena itu penulis memohon maaf apabila terdapat kesalahan dalam penyusunan laporan ini serta mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi pembaca.

Malang, 19 Mei 2016

Penulis



RINGKASAN

ANANDA HAYYU NURANI. Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Seledri (*Apium graveolens* L) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro*. (Dibawah Bimbingan **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS** dan **Ir. Heny Suprastyani, MS**).

Penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Dengan demikian timbulnya serangan penyakit ikan dikolam merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, kondisi lingkungan dan organisme penyakit. Interaksi yang tidak sesuai ini dapat menyebabkan ikan stress, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit. Serangan penyakit yang disebabkan oleh pembudidayaan 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 penyakit bercak merah atau *Motile Aeromonas Septicaemia* (MAS). Upaya yang telah dilakukan untuk pengobatan penyakit ini adalah menggunakan antibiotik yang dapat menimbulkan resistensi bakteri patogen dan residu antibiotika pada ikan. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan alternatif bahan antibakteri dari tanaman obat. Salah satunya dengan menggunakan ekstrak daun seledri (*Apium graveolens* L).

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari hingga bulan Februari 2016. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui uji daya hambat ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) terhadap bakteri *A. hydrophila* secara *In Vitro*. Parameter utama dalam peneliiian ini adalah melihat atau mengukur diameter zona bening yang dihasilkan di sekitar kertas cakram yang dihasilkan dari berbagai dosis yang digunakan. Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah lama waktu perendaman yang dilakukan.

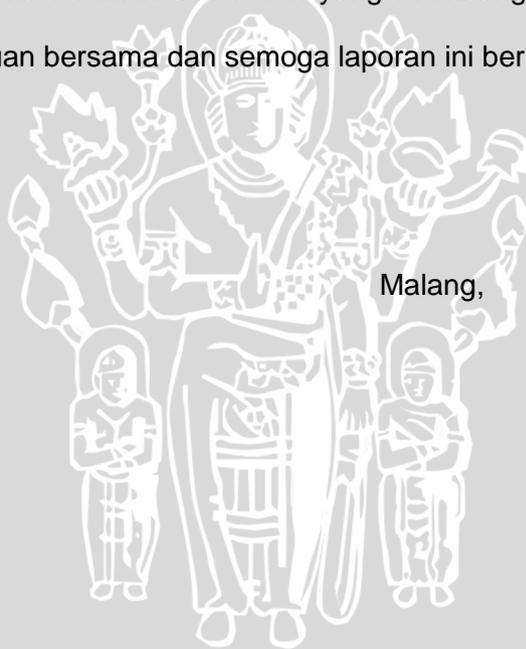
Metode yang digunakan pada penelitian adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil dan rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), menggunakan 4 perlakuan konsentrasi ekstrak kasar daun seledri yaitu : dosis (A) 10 ppm ; (B) 35 ppm ; (C) 60 ppm ; (D) 85 ppm. Masing – masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun seledri memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Dosis maksimal adalah pada 85 ppm dengan rata – rata diameter zona hambatnya 3,41 mm.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) merupakan antibakteri yang bersifat bakteriostatik karena hanya menghambat pertumbuhan tanpa membunuh bakteri.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT karena atas rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul “Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Seledri (*Apium graveolens* L) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro*”. Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis menyadari di dalam penulisan masih banyak terdapat kekurangan, oleh karena itu kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi kemajuan bersama dan semoga laporan ini bermanfaat bagi yang membutuhkan.



Malang,

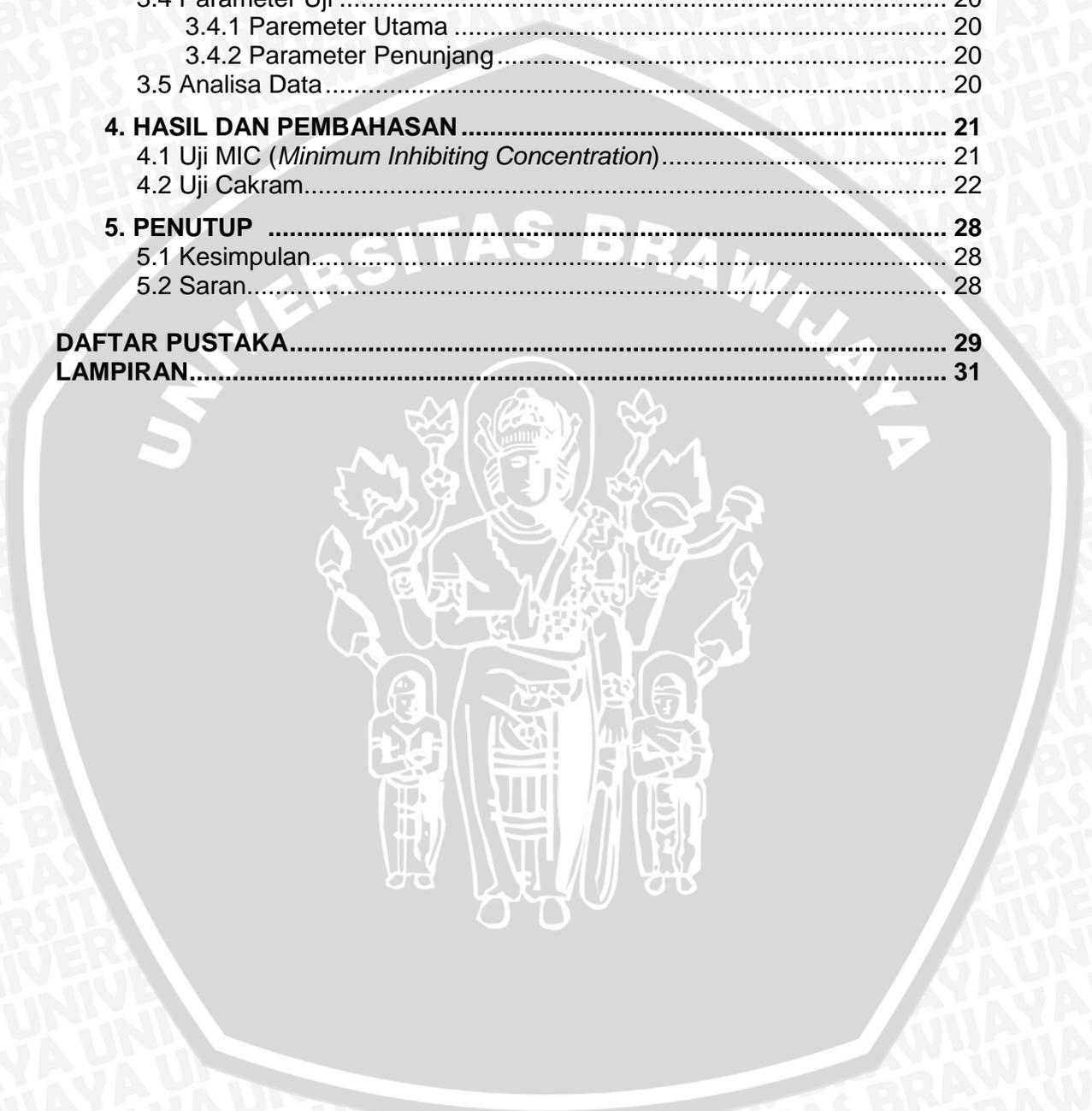
Mei 2016

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|------------|
| JUDUL | i |
| HALAMAN JUDUL..... | ii |
| LEMBAR PENGESAHAN | iii |
| HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS | iv |
| RINGKASAN..... | v |
| KATA PENGANTAR | vi |
| UCAPAN TERIMA KASIH..... | vii |
| DAFTAR ISI | vii |
| DAFTAR GAMBAR | ix |
| DAFTAR TABEL | x |
| DAFTAR LAMPIRAN | x |
| | |
| 1. PENDAHULUAN | |
| 1.1 Latar Belakang | 1 |
| 1.2 Rumusan Masalah | 2 |
| 1.3 Tujuan Penelitian..... | 3 |
| 1.4 Hipotesis | 3 |
| 1.5 Tempat dan Waktu Penelitian..... | 3 |
| 2. TINJAUAN PUSTAKA | |
| 2.1 Tumbuhan Daun Seledri (<i>Apium graveolens</i> L) | 4 |
| 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi | 4 |
| 2.1.2 Habitat dan Penyebaran | 4 |
| 2.1.3 Bahan Aktif | 5 |
| 2.2 Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> | 6 |
| 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi..... | 6 |
| 2.2.2 Habitat dan Penyebaran..... | 7 |
| 2.2.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan..... | 7 |
| 2.3 Uji Aktivitas Antimikroba | 8 |
| 2.3.1 Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>)..... | 8 |
| 2.3.2 Uji Cakram..... | 8 |
| 2.4 Antibakteri | 9 |
| 3. METODELOGI PENELITIAN | |
| 3.1 Materi Penelitian..... | 11 |
| 3.1.1 Alat Penelitian..... | 11 |
| 3.1.2 Bahan Penelitian..... | 12 |
| 3.2 Metode dan Rancangan Penelitian..... | 12 |
| 3.2.1 Metode Penelitian | 12 |
| 3.2.2 Rancangan Penelitian..... | 13 |
| 3.3 Prosedur Penelitian | 14 |
| 3.3.1 Persiapan Penelitian | 14 |
| A. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Seledri | 14 |
| B. Sterilisasi Alat dan Bahan | 15 |
| C. Pembuatan Media Agar Miring..... | 16 |
| D. Pembuatan Media NB (<i>Nutrient Broth</i>)..... | 16 |
| E. Pembuatan Media Agar untuk Uji Cakram | 17 |

| | |
|---|-----------|
| F. Peremajaan Bakteri <i>A. hydrophila</i> | 17 |
| G. Kultur Bakteri <i>A. hydrophila</i> | 18 |
| H. Cara memperoleh Bakteri <i>A. hydrophila</i> 10 ⁷ | 18 |
| 3.3.2 Pelaksanaan Penelitian | 18 |
| A. Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>) | 18 |
| B. Uji Cakram | 19 |
| 3.4 Parameter Uji | 20 |
| 3.4.1 Parameter Utama | 20 |
| 3.4.2 Parameter Penunjang | 20 |
| 3.5 Analisa Data | 20 |
| 4. HASIL DAN PEMBAHASAN | 21 |
| 4.1 Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>) | 21 |
| 4.2 Uji Cakram | 22 |
| 5. PENUTUP | 28 |
| 5.1 Kesimpulan | 28 |
| 5.2 Saran | 28 |
| DAFTAR PUSTAKA | 29 |
| LAMPIRAN | 31 |



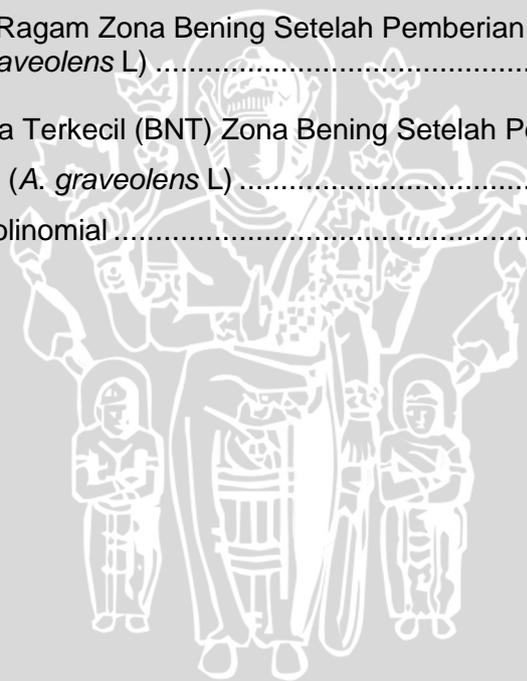
DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|--|---------|
| 1. Daun Seledri (<i>A. graveolens</i> L)..... | 5 |
| 2. Bakteri <i>A. hydrophila</i> | 7 |
| 3. Denah Rancangan Penelitian | 13 |
| 4. Hasil Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>) | 22 |



DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|--|---------|
| 1. Alat Penelitian | 11 |
| 2. Bahan Penelitian | 12 |
| 3. Perkiraan Panjang Gelombang Warna dalam Daerah Cahaya Tampak | 19 |
| 4. Hasil Uji MIC | 21 |
| 5. Hasil Rata – Rata Pengamatan Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Seledri (<i>A. graveolens</i> L) Terhadap Bakteri <i>A. hydrophila</i> | 23 |
| 6. Klasifikasi Respon Hambatan..... | 23 |
| 7. Hasil Analisa Sidik Ragam Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Seledri (<i>A. graveolens</i> L) | 24 |
| 8. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Seledri (<i>A. graveolens</i> L) | 24 |
| 9. Hasil Orthogonal Polinomial | 25 |



DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|---|---------|
| 1. Alat – Alat Penelitian..... | 31 |
| 2. Bahan – Bahan Penelitian..... | 38 |
| 3. Hasil Uji Cakram Ekstrak Kasar Daun Seledri (<i>A. graveolens</i> L) Terhadap Daya Hambat <i>A. hydrophila</i> | 41 |
| 4. Skema Kerja MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>) | 43 |
| 5. Skema Kerja Uji Cakram..... | 44 |
| 6. Perhitungan Statistik Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Seledri (<i>A. graveolens</i> L) | 45 |



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perairan umum merupakan sumberdaya perikanan utama di Indonesia bahkan dunia. Tipe perairan umum yang dikenal yaitu danau alam, danau buatan, sungai dan lebak lebung rawa (banjiran). Lebak lebung dengan sungai – sungainya merupakan tipe perairan umum yang terpenting, dari luas maupun produksinya. Perairan tawar di Indonesia sangat kaya dengan berbagai jenis ikan, namun belum semuanya diupayakan budidaya yang serius. Potensi ini sangat mungkin dikembangkan untuk industri budidaya perikanan. Terus meningkatnya jumlah penduduk telah mendorong peningkatan kebutuhan pangan protein. Sementara dilain pihak sumberdaya ikan sebagai salah satu sumber protein hewani penting, makin terbatas. Hal tersebut menjadikan akuakultur sebagai tumpuan harapan masa depan perikanan (Arsyad, Elok, dan Akbar, 2005).

Perkembangan masyarakat dunia saat ini menunjukkan kecenderungan adanya perubahan pola konsumsi. Perubahan tersebut antara lain disebabkan kebutuhan makanan yang sehat dan bernilai gizi tinggi. Bahan pangan yang memiliki nilai gizi tinggi dan menjadi favorit saat ini salah satunya yaitu ikan. Keterbatasan informasi tentang biologi ikan-ikan tersebut merupakan salah satu kendala untuk memulai suatu usaha budidaya. Untuk itu, perlu dirintis penggalian informasi tentang berbagai aspek dasar budidayanya ikan menjadi komoditas strategis yang dibutuhkan oleh masyarakat dunia (Sukadi, 2002).

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 dikolam merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, kondisi lingkungan dan

organisme penyakit. Interaksi yang tidak sesuai ini dapat menyebabkan ikan stress, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit. Serangan penyakit yang disebabkan oleh pembudidayaan 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 penyakit bercak merah atau *Motile Aeromonas Septicaemia* (MAS).

Upaya yang telah dilakukan untuk pengobatan penyakit ini adalah menggunakan antibiotik yang dapat menimbulkan resistensi bakteri patogen dan residu antibiotika pada ikan. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan alternatif bahan antibakteri dari tanaman obat. Salah satunya dengan menggunakan ekstrak daun seledri (*Apium graveolens* L). Tanaman ini mengandung senyawa aktif yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri yaitu flavonoid. Menurut Majidah *et al.*, (2014), seledri mengandung flavonoid, saponin, tanin, apiin, minyak atsiri, apigenin, kolin, vitamin A, B, C, zat pahit asparagin. Diantara kandungan yang dimiliki seledri, flavonoid, saponin, dan tanin merupakan senyawa yang bersifat antibakteri.

1.2 Rumusan Masalah

Permasalahan yang ada saat ini penggunaan antibiotik dan bahan kimia untuk ikan dapat menyebabkan keracunan, kematian, terjadi resistensi, serta pencemaran lingkungan hidup. Oleh karena itu, diperlukan bahan alami yang mampu digunakan sebagai antibakteri. Berdasarkan latar belakang di atas, masalah yang dihadapi yaitu belum diketahuinya pengaruh penggunaan ekstrak daun seledri terhadap uji daya hambat *A. hydrophila*.

Berdasarkan uraian di atas rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :
Apakah pemberian ekstrak daun seledri (*A. graveolens* L) dengan cara

pemberian kertas cakram yang direndam di dalam ekstrak daun seledri berpengaruh terhadap daya hambat dari bakteri *A. hydrophila*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun seledri (*A. graveolens* L) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis

H_0 = Diduga pemberian ekstrak daun seledri (*A. graveolens* L) dengan dosis yang berbeda tidak mempengaruhi daya hambat dari bakteri *A. hydrophila*

H_1 = Diduga pemberian ekstrak daun seledri (*A. graveolens* L) dengan dosis yang berbeda dapat mempengaruhi daya hambat dari bakteri *A. hydrophila*

1.5 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang dilaksanakan pada bulan Januari – Februari 2016.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan Daun Seledri (*Apium graveolens* L)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Widyaningrum (2008), klasifikasi daun seledri (*A. graveolens* L) sebagai berikut:

| | |
|------------|------------------------------|
| Divisio | : Spermatophyta |
| Subdivisio | : Angiospermae |
| Kelas | : Dicotyledoneae |
| Ordo | : Umbelliferales |
| Familia | : Apiaceae |
| Genus | : <i>Apium</i> |
| Spesies | : <i>Apium graveolens</i> L. |

Morfologi daun seledri yaitu daun majemuk menyirip, tipis, rapuh, warna hijau tua sampai hijau kecoklatan, jumlah anak daun 3 sampai 7 helai, panjang anak daun 2 cm sampai 7,5 cm, lebar 2 cm sampai 5 cm, pangkal dan ujung anak daun runcing, panjang ibu tangkai daun sampai 12,5 cm terputar, beralur, panjang tangkai anak daun 1 cm sampai 2,7 cm (Tambunan, 2012).

2.1.2 Habitat dan Penyebarannya

Menurut Sovianingrum (2008), seledri merupakan herba tegak, dapat tumbuh lebih dari 2 tahun, daun berpangkal pada batang dekat tanah, bertangkai dan di bagian bawah sering terdapat daun muda di kedua sisi tangkainya, helaian daun berbentuk lekuk tangan, tidak terlalu dalam, panjang 2-5 cm, lebar 1,5-3 cm, baunya sedap, khas. Batang kaku dan bersiku, berupa batang semu, tinggi tanaman mencapai 25-100 cm. Bunga tersusun majemuk, bertangkai pendek-pendek, bergerombol kecil, berwarna putih sampai hijau keputihan.

Tumbuhan seledri dikategorikan sebagai sayuran. Tumbuhan berbonggol dan memiliki batang basah. Perkembangbiakan tanaman seledri dapat digunakan dengan dua cara yaitu, melalui bijinya atau pemindahan akar rumpunnya. Seledri dapat tumbuh baik didaerah iklim sedang maupun subtropis sampai ke daerah yang beriklim panas (Tambunan, 2012).

Tanaman yang dapat digunakan sebagai obat salah satunya adalah seledri (*Apium graveolens* L.). Seledri merupakan tanaman yang dapat tumbuh baik di dataran rendah maupun dataran tinggi. Di Indonesia, daun seledri dimanfaatkan sebagai pelengkap sayuran (Majidah *et al.*, 2014).



Gambar 1. Daun Seledri

2.1.3 Bahan Aktif

A. graveolens L. (seledri) merupakan salah satu jenis tumbuhan yang dapat menyembuhkan penyakit tertentu pada manusia. Seledri mengandung bahan flavonoid, saponin, tannin 1% minyak atsiri, alkaloid dan zat pahit, sementara bijinya memiliki efek penenang terhadap sistem syaraf pusat sehingga sering digunakan untuk mengobati penderita yang sering merasa bingung (Mursito *dalam* Darmiati, 2013).

Menurut Kuncari *et al.*, (2014), daun seledri mengandung senyawa apiin, apigenin, manitol, inositol, asparagina, glutamina, kolina, linamarosa kalium dan natrium. Apigenin terbentuk dari proses hidrolisis apiin (*glikosida flavonoid*) yang

dibantu oleh asam lambung (HCl) dan merupakan zat aktif yang berkhasiat untuk mengatasi inflamasi.

Seledri (*A. graveolens* L) merupakan tanaman famili Apiaceae, bahan aktif yang terkandung dalam seledri (*A. graveolens* L) antara lain yaitu flavonoid, koumarin, furanokoumarin, isokuersetin, umbelliferon, asparagin, selenium dan minyak atsiri. Daun seledri mengandung flavonoid, minyak atsiri, saponin, tanin, flavoglukosida (apiin), apigenin, kolin, lipase, asparagin, alkaloid dan vitamin. Seluruh herba seledri mengandung glikosida apiin (glikosida flavon), isoquersetin dan umbelliferon serta mengandung mannite, inositol, asparagine, glutamine, choline, linamarose, provitamin A, vitamin C, dan vitamin B (Sudarsono *et al.*, 1996).

2.2 Bakteri *Aeromonas hydrophila*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Holt (1979), klarifikasi bakteri *A. hydrophila* sebagai berikut :

| | |
|----------|------------------------|
| Division | : Prorophyta |
| Class | : Schyzomycetes |
| Ordo | : Pseudomonadales |
| Subordo | : Pseudomonadineae |
| Family | : Vibrionaceae |
| Genus | : Aeromonas |
| Species | : <i>A. hydrophila</i> |

Secara morfologis bakteri ini berbentuk batang pendek dengan ukuran 1,0 – 1,5 μm termasuk bakteri gram negatif, bersifat motil, bergerak dengan satu polar flagella, oksidatif fermentatif, termasuk bakteri fakultatif anaerobik dan merupakan bakteri penyebab penyakit *Haemorrhagic septicaemia* yaitu bakteri

yang merusak jaringan dan organ pembuat sel darah. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37°C (Kabata, 1985).

2.2.2 Habitat dan Penyebarannya

A. hydrophila sering muncul pada musim kemarau karena pada musim ini kandungan bahan organik perairan tinggi. Kandungan O₂ yang rendah, suhu tinggi, dan akumulasi bahan organik atau sisa metabolisme ikan serta pola padat penebaran dengan kepadatan tinggi akan berkorelasi positif terhadap perkembangbiakannya (Christian *et al.*, 2001).

Bakteri ini dapat bertahan dalam lingkungan aerob maupun anaerob dan dapat mencerna material – material seperti gelatin dan hemoglobin. *A. hydrophila* resisten terhadap chlorine serta suhu yang dingin (faktanya *Aeromonas hydrophila* dapat bertahan dalam temperatur rendah ± 4 °C), tetapi setidaknya hanya dalam waktu 1 bulan (Krieg dan Holt *dalam* Haryani *et al.*, 2012).



Gambar 2. Bakteri *A. hydrophila*

2.2.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan

Menurut Prajitno (2005), pengertian umum dari patogenitas adalah kemampuan suatu organisme (penyakit) menimbulkan penyakit atau menginfeksi suatu penyakit. Sifat patogenik dari *A. hydrophila*, umumnya menyebabkan infeksi pada seluruh tubuh disertai dengan pendarahan pada organ dalam tubuh ikan. Bakteri ini dapat menyebar secara cepat pada padat penebaran yang tinggi yang dapat menyebabkan kematian benih sampai 90%.

Pada kondisi normal, penyakit ini tidak muncul tetapi interaksi dengan lingkungan perairan, kondisi inang dan patogen yang tidak harmonis akan mudah menyebabkan munculnya penyakit. Oleh karena itu, penyebaran penyakit yang disebabkan oleh *A. hydrophila* ini cepat sekali penyebarannya sehingga perlu suatu upaya penanggulangan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen ini (Wardiyanto *et al.*, 2008).

2.3 Uji Aktivitas Antimikroba

2.3.1 Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Metode pengujian MIC adalah merupakan salah satu metode yang bertujuan untuk menguji aktivitas zat antimikroba secara *in vitro*. Pengamatan hasil uji MIC secara visual memiliki kelemahan yaitu sulit untuk membedakan tingkat kekeruhan secara pasti, sehingga perlu dilakukan pengamatan selanjutnya menggunakan spektrofotometer. Caranya adalah menentukan konsentrasi terendah dari zat tersebut yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan dari mikroorganisme yang akan diuji.

Hasil dari Uji MIC menurut Putri, Tjahjaningsih dan Handijanto (2008), menyatakan bahwa nilai absorbansi yang berbanding lurus dengan dosis yang digunakan disebabkan karena spektrofotometer tidak mampu membedakan kekeruhan warna ekstrak dengan kekeruhan bakteri oleh karena itu pengamatan bisa dibantu dengan melihat warna dan membandingkan dengan kontrol.

2.3.2 Uji Cakram

Uji cakram digunakan untuk mengetahui konsentrasi tertentu yang dapat menghambat bakteri yang bersifat bakteristatik (menghambat bakteri) maupun bakteriosidal (membunuh bakteri). Metode difusi dilakukan dengan metode Kirby-Bauer yang dikenal dengan sebutan metode cakram kertas. Tiap - tiap cakram kertas kosong sebelumnya dipanaskan dalam oven pada suhu 70°C selama 15

menit, kemudian kertas cakram dicelupkan ke dalam larutan uji. Cakram yang telah berisi ekstrak, kemudian didiamkan selama 15 menit sebelum diletakkan pada media uji. Kemudian secara aseptik setelah kertas cakram menyerap ekstrak tersebut, masing masing diletakkan pada permukaan medium yang telah berisi mikroba uji dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 18 – 24 jam, dilakukan pengukuran diameter zona hambat yaitu zona bening yang terbentuk disekitar cakram dengan menggunakan penggaris millimeter (Noverita, Fitria dan Sinaga, 2009).

2.4 Antibakteri

Antibakteri adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan. Dalam penggolongannya antibakteri dikenal dengan antiseptik dan antibiotik. Berbeda dengan antibiotik yang tidak merugikan sel-sel jaringan manusia, daya kerja antiseptik tidak membedakan antara mikroorganisme dan jaringan tubuh. Namun pada dosis normal praktis tidak bersifat merangsang kulit (Rostinawati, 2009).

Antibakteri adalah suatu senyawa yang mampu menghambat pertumbuhan maupun membunuh mikroorganisme. Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa perusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Di bidang farmasi, bahan antibakteri dikenal dengan nama antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. (Pelczar dan Chan, 1986).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan dalam penelitian ini meliputi dapat dilihat pada Tabel 1, beberapa gambar alat – alat yang digunakan disajikan pada Lampiran 1.

Tabel 1. Alat Penelitian

| No. | Alat | Fungsi |
|-----|-------------------------------|---|
| 1. | Autoklaf | Sebagai alat untuk mensterilisasi peralatan yang akan digunakan |
| 2. | Kulkas | Sebagai tempat penyimpanan bahan pada suhu dingin |
| 3. | Cawan Petri | Sebagai tempat uji cakram |
| 4. | Erlenmeyer 250 ml | Sebagai tempat pembuatan media |
| 5. | Erlenmeyer 1000 ml | Sebagai tempat pembuatan maserasi |
| 6. | Bunsen | Untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada saat perlakuan |
| 7. | Tabung Reaksi | Sebagai tempat untuk peremajaan bakteri dan uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>) |
| 8. | Hot Plate | Sebagai alat pemanas media |
| 9. | Timbangan Digital | Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-2} |
| 10. | Timbangan Analitik | Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-3} |
| 11. | Vortex Mixer | Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan |
| 12. | Mikropipet 10 – 100 μ l | Sebagai alat untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan |
| 13. | Mikropipet 100 – 1000 μ l | Sebagai alat untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan |
| 14. | Nampan | Sebagai tempat menyimpan alat |
| 15. | Spektrofotometer (Genesys 20) | Sebagai alat untuk mengukur kekeruhan |
| 16. | Washing Bottle | Sebagai tempat menyimpan aquades |
| 17. | Sprayer | Sebagai tempat menyimpan alkohol untuk sterilisasi |
| 18. | Masker | Untuk menutup bagian muka (mulut dan hidung) agar tidak terjadi kontaminasi pada saat perlakuan |
| 19. | LAF (Laminary Air Flow) | Sebagai tempat dilakukannya perlakuan |
| 20. | Inkubator | Sebagai alat untuk menginkubasi |
| 21. | Spatula | Sebagai alat untuk mengambil sampel |
| 22. | Rak Tabung | Sebagai alat untuk menyimpan tabung reaksi |
| 23. | Lap | Sebagai alat untuk membersihkan |

| | | |
|-----|---------------------------------|--|
| 24. | <i>Vaccum Rotary Evaporator</i> | Sebagai alat untuk membuat ekstrak kasar |
| 25. | Botol Film | Sebagai tempat menyimpan ekstrak kasar |
| 26. | Gelas Ukur 100 ml | sebagai alat untuk mengukur larutan |

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi dapat dilihat pada Tabel 2, beberapa gambar bahan – bahan yang digunakan disajikan pada Lampiran 2.

Tabel 2. Bahan Penelitian

| No. | Bahan | Fungsi |
|-----|--|--|
| 1. | Daun Seledri (<i>A. graveolens</i> L) | Sebagai bahan yang akan digunakan sebagai ekstraksi |
| 2. | Aquades | Sebagai bahan pelarut |
| 3. | Tissue | Sebagai bahan pembersih |
| 4. | Aluminium Foil | Sebagai bahan untuk menutupi seluruh bagian erlenmeyer pada saat maserasi |
| 5. | Alkohol 70% | Sebagai bahan sterilisasi |
| 6. | Kapas | Sebagai bahan untuk menutupi alat pada saat sterilisasi |
| 7. | Kertas Label | Sebagai bahan penanda |
| 8. | Bakteri <i>A. hydrophila</i> | Sebagai bakteri yang digunakan pada saat perlakuan |
| 9. | TSA (<i>Typtic Soy Agar</i>) | Sebagai media agar |
| 10. | Etanol 96% | Sebagai bahan pelarut |
| 11. | NB (<i>Nutrient Broth</i>) | Sebagai media cair |
| 12. | Kertas Koran | Sebagai bahan untuk membungkus peralatan yang akan di sterilisasi |
| 13. | Kertas Cakram | Sebagai bahan untuk mengetahui besar zona bening dari ekstrak kasar yang digunakan |
| 14. | Kertas Saring | Sebagai alat untuk menyaring bahan setelah maserasi |
| 15. | Tali Kasur | Sebagai bahan untuk mengikat peralatan yang akan disterilisasi |
| 16. | DMSO 10% | Sebagai pelarut ekstrak |
| 17. | Spirtus | Sebagai bahan bakar untuk bunsen |
| 18. | Plastik Warp | Sebagai pembungkus botol sampel |

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode penelitian ini menggunakan metode eksperimen yaitu metode yang memungkinkan untuk memanipulasi variabel dengan menghubungkan

sebab dan akibat dari obyek yang diteliti. Menurut Nazir (1998), penelitian eksperimental adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap obyek penelitian serta adanya kontrol.

3.2.2 Rancangan Penelitian

$$Y = \mu + \tau + \epsilon$$

Keterangan :

Y : Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan dan ulangan

μ : Nilai tengah umum

τ : Pengaruh faktor perlakuan

ϵ : Pengaruh galat percobaan dari perlakuan dan ulangan

Penelitian dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) dengan perlakuan yang diberikan adalah perbedaan konsentrasi ekstrak daun seledri (*A. graveolens* L) terhadap bakteri *A. hydrophila*. Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat yang tepat dalam penggunaan ekstrak daun seledri (*A. graveolens* L).

Rancangan Percobaan yang digunakan yaitu menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan kontrol yang masing – masing dilakukan 3 kali ulangan beserta kontrol positif dan kontrol negatif. Hal pertama yang dilakukan yaitu menggunakan skala log dengan dosis 0 ppm, 0,01 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, 1000 ppm, 10000 ppm serta K+ dan K-.

| | | | | | | |
|-----|----|----|-----|-----|-----|-----|
| KN1 | B3 | E3 | KN2 | D2 | KP1 | E2 |
| KP2 | A1 | C3 | B2 | KP3 | C2 | KB1 |
| A2 | E1 | D1 | D3 | A3 | C1 | KN3 |

Gambar 3. Denah Rancangan Penelitian

Keterangan :

Kontrol Positif : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L).

Kontrol Negatif : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media tanpa diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L).

Perlakuan A : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) dengan dosis 10 ppm.

Perlakuan B : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) dengan dosis 35 ppm.

Perlakuan C : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) dengan dosis 60 ppm.

Perlakuan D : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) dengan dosis 85 ppm.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Penelitian

A. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L)

Proses ekstrak daun seledri, adapun langkah – langkahnya sebagai berikut:

1. Daun dicuci terlebih dahulu dan dikeringkan dengan cara diangin – anginkan.
2. Daun dihaluskan dengan menggunakan blender.
3. Daun yang sudah halus ditimbang.

4. Daun yang halus dicampur dengan pelarut etanol dalam beaker glass 1000 ml dengan perbandingan 1 : 6 lalu ditutup dengan aluminium foil.
5. Daun yang sudah dicampur dengan pelarut didiamkan selama 1 x 24 jam (maserasi).
6. Daun yang sudah dimaserasi disaring menggunakan kertas saring.
7. Hasil filtrasi dievaporasi dengan rotary evaporator pada suhu 60 – 70 °C sampai pelarut menguap.
8. Hasil ekstraksi ditimbang.

Menurut Ramadhan dan Phaza (2010), dalam pemilihan jenis pelarut faktor yang perlu diperhatikan antara lain adalah daya melarutkan oleoresin, titik didih, sifat racun, mudah tidaknya terbakar dan pengaruh terhadap alat peralatan ekstraksi. Pada umumnya pelarut yang sering digunakan adalah etanol karena etanol mempunyai polaritas yang tinggi sehingga dapat mengekstrak oleoresin lebih banyak dibandingkan jenis pelarut organik yang lain. Pelarut yang mempunyai gugus karboksil (alkohol) dan karbonil (keton) termasuk dalam pelarut polar. Etanol mempunyai titik didih yang rendah dan cenderung aman. Etanol juga tidak beracun dan berbahaya. Kelemahan penggunaan pelarut etanol adalah etanol larut dalam air, dan juga melarutkan komponen lain seperti karbohidrat, resin dan gum. Larutnya komponen ini mengakibatkan berkurangnya tingkat kemurnian oleoresin. Keuntungan menggunakan pelarut etanol dibandingkan dengan aseton yaitu etanol mempunyai kepolaran lebih tinggi sehingga mudah untuk melarutkan senyawa resin, lemak, minyak, asam lemak, karbohidrat, dan senyawa organik lainnya.

B. Sterilisasi Alat dan Bahan

Langkah - langkah sterilisasi alat dan bahan adalah sebagai berikut:

1. Alat – alat yang akan disterilisasi dibungkus terlebih dahulu menggunakan kertas koran, lalu diikat menggunakan benang (untuk tabung reaksi dan erlenmeyer bagian atas diberi kapas).
2. Air dituang secukupnya ke dalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam autoklaf lalu ditutup rapat secara diagonal.
3. Saklar dinyalakan, kemudian tombol sirine yang berwarna merah pada autoklaf diputar sampai batas lampu yang berwarna merah.
4. Ditunggu 15 menit, setelah mencapai suhu 121°C alarm akan berbunyi lalu dimatikan.
5. Ditunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0.
6. Saklar listrik dimatikan dan dibuka tutup autoklaf.
7. Diambil alat yang sudah disterilisasikan lalu disimpan pada inkubator, bahan yang telah di sterilisasi disimpan dalam lemari pendingin.

C. Pembuatan Media Agar Miring

Media Agar miring digunakan sebagai media untuk peremajaan bakteri.

Langkah – langkah proses pembuatan media agar miring adalah sebagai berikut:

1. Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) ditimbang terlebih dahulu 1,2 gr dengan menggunakan timbangan digital.
2. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
3. Media dilarutkan dengan aquades sebanyak 30 ml lalu dihomogenkan.
4. Media yang sudah homogen lalu dimasukkan ke dalam 3 tabung reaksi sebanyak 10 ml disetiap tabung reaksinya.

5. Tabung reaksi ditutup kapas lalu dibungkus alumunium foil serta diikat oleh tali.
6. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
7. Tabung reaksi yang sudah berisi media steril dimiringkan dengan kemiringan 30°.
8. Media ditunggu sampai menjadi padat.

D. Pembuatan Media NB (*Nutrient Broth*)

Media NB adalah media cair yang digunakan untuk kultur bakteri.

Langkah – langkah proses pembuatan NB adalah sebagai berikut:

1. Media ditimbang 0,44 gr menggunakan timbangan digital.
2. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
3. Media dilarutkan terlebih dahulu dengan aquades sebanyak 55 ml lalu dihomogenkan.
4. Media yang sudah homogen ditutup kapas lalu dibungkus alumunium foil serta diikat oleh tali.
5. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

E. Pembuatan Media Agar untuk Uji Cakram

Langkah – langkah pembuatan media agar untuk uji cakram menggunakan TSA (*Tryptic Soy Agar*) adalah sebagai berikut:

1. Media TSA ditimbang 14,4 gr menggunakan timbangan digital.
2. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
3. Media dilarutkan dengan aquades sebanyak 360 ml lalu dihomogenkan.
4. Erlenmeyer ditutup kapas lalu dibungkus alumunium foil serta diikat oleh tali.
5. Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

6. Media steril ditunggu hingga media tidak terlalu panas.
7. Media dituangkan pada 18 cawan petri sebanyak ± 20 ml disetiap cawannya.
8. Media ditunggu hingga menjadi padat.

F. Peremajaan Bakteri *A. hydrophila*

Isolat bakteri *A. hydrophila* didapatkan dari Balai Besar Budidaya Air Payau (BBBAP) Jepara. Bakteri tersebut sudah dilakukan uji biokimia terlebih dahulu. Langkah – langkah peremajaan bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Media Agar miring yang sudah dibuat disiapkan terlebih dahulu.
2. Bakteri diambil menggunakan jarum ose dari stok bakteri.
3. Bakteri yang terdapat pada jarum ose digoreskan terlebih dahulu ke dalam media agar miring menggunakan metode gores.
4. Media agar miring diinkubasi pada inkubator dengan suhu 32°C selama 24 jam.

G. Kultur Bakteri *A. hydrophila*

Langkah – langkah kultur bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Biakan bakteri yang sudah diremajakan pada media agar miring lalu diambil menggunakan jarum ose sebanyak 1 gores.
2. Ose yang sudah ada bakterinya dicelupkan terlebih dahulu pada media NB yang sudah disiapkan.
3. Media lalu disimpan pada inkubator dengan suhu 32°C selama 24 jam.
4. Semua kegiatan pengkulturan dilakukan secara steril.

H. Cara Memperoleh Bakteri *A. hydrophila* 10^7 sel/ml

Langkah – langkah bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 sel/ml diperoleh dengan cara sebagai berikut:

1. Kultur murni bakteri dari media agar miring disiapkan terlebih dahulu.

2. Bakteri lalu diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi NaFisiologis 10 ml dan di vortex.
3. Kekeruhan bakteri disamakan dengan kekeruhan Mc Farland yang 10^8 sel/ml.
4. Tabung reaksi yang telah diisi Nafisiologis dengan volume 9 ml disiapkan.
5. Bakteri dari kekeruhan bakteri 10^8 sel/ml diambil 1 ml lalu dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi NaFisiologis dengan volume 9 ml.
6. Diperoleh kekeruhan bakteri 10^7 sel/ml.

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

A. Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Langkah – langkah prosedur kerja untuk melakukan uji MIC adalah sebagai berikut:

1. 11 tabung reaksi yang sudah berisi media TSA steril disiapkan terlebih dahulu.
2. Ekstrak daun seledri sebanyak 0,5 ml diberikan pada 9 tabung reaksi dengan dosis yang berbeda setiap tabungnya.
3. Pada tabung 2 reaksi sisa dijadikan kontrol positif dan kontrol negatif.
4. Penentuan dosis dilakukan dengan langkah membuat stok dosis yaitu 10000 ppm kemudian dilakukan pengenceran berseri.
5. Pengenceran berseri dilakukan dengan melarutkan DMSO 10% sebanyak 9 ml dengan ekstrak kasar daun seledri 10000 ppm untuk mendapatkan konsentrasi 1000 ppm. Demikian pula untuk mendapatkan konsentrasi 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 0,1 ppm, 0,01 ppm, 0 ppm dengan melakukan pengenceran berseri. DMSO 10% didapatkan dengan cara melarutkan 10 ml DMSO dengan 90 ml aquades murni kemudian di vortex sampai homogen.
6. Setiap tabung reaksi diberi isolat bakteri 1 ose.
7. Media diinkubasi pada inkubator dengan suhu 32°C selama 24 jam.
8. Media dicek kekeruhannya dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer.

Menurut Skoog dan West dalam Triyati (1985), menyatakan bahwa perkiraan panjang gelombang warna dalam daerah cahaya tampak dapat diklasifikasikan seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Perkiraan Panjang Gelombang Warna dalam Daerah Cahaya Tampak

| Warna | Warna Pelengkap | Panjang Gelombang (mm) |
|--------------|-----------------|------------------------|
| Ungu | Hijau Kuning | 400 - 435 |
| Biru | Kuning | 435 - 480 |
| Biru Hijau | Oranye | 480 - 490 |
| Hijau Biru | Merah | 490 - 500 |
| Hijau | Merah Lembayung | 500 - 560 |
| Hijau Kuning | Ungu | 560 - 580 |
| Kuning | Biru | 580 - 595 |
| Oranye | Biru Hijau | 595 - 610 |
| Merah | Hijau Biru | 610 - 750 |

B. Uji Cakram

Setelah didapatkan dosis yang sesuai dilanjutkan dengan mengetahui daya hambat ekstrak kasar daun seledri. Langkah - langkah prosedur kerja untuk melakukan uji cakram adalah sebagai berikut:

1. Cawan petri yang telah terdapat media TSA disiapkan terlebih dahulu.
2. Kertas cakram steril diberikan beberapa perlakuan, yakni direndam ke dalam ekstrak daun seledri dengan konsentrasi yang berbeda – beda.
3. Bakteri *A. hydrophila* disebar di seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan, untuk memperoleh pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar kemudian diputar lempeng agar 80° dan dibuat olesan kedua dengan lempeng agar diputar 45° lalu dibuat olesan ketiga.

4. Setelah 10 – 15 menit kertas cakram yang telah mengandung ekstrak diletakkan pada media agar.
5. Kontrol positif menggunakan antibiotik tetracylin 500 mg dalam 10 ml dan kontrol negatif hanya menggunakan DMSO 10%.
6. Media yang sudah ditanam bakteri dan diberi kertas cakram diinkubasi pada suhu 32°C selama 18 – 24 jam.
7. Media diamati hasil lalu diukur zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong.

3.4 Parameter Uji

3.4.1 Parameter Utama

Parameter utama dalam penelitian ini adalah hasil pengamatan yaitu hasil zona bening yang terlihat disekitar kertas cakram yang sudah ditumbuhi oleh bakteri *A. hydrophila*.

3.4.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini yaitu lama waktu perendaman kertas cakram pada ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L).

3.5 Analisis Data

Data yang didapatkan dari hasil penelitian dilakukan pengujian statistik sesuai dengan metode yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Jika data sidik ragam memperlihatkan pengaruh berbeda nyata maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) dilakukan dengan menggunakan berbagai macam dosis ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) yang bertujuan untuk mengetahui dosis terkecil dalam menghambat atau membunuh bakteri *A. hydrophila*. Hasil uji MIC menunjukkan adanya perbedaan setiap perlakuan setelah dilakukan pengamatan dengan menggunakan spektrofotometer seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

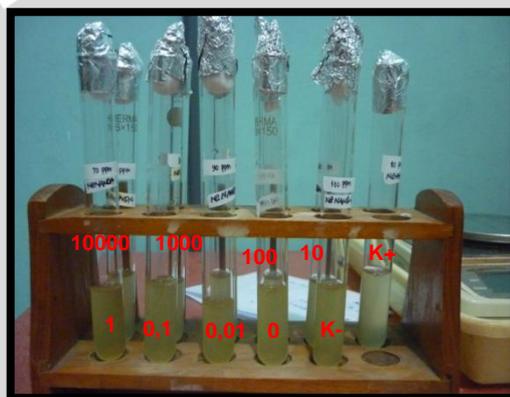
| No. | Konsentrasi (ppm) | Absorbansi | Warna |
|-----|-------------------|------------|--------|
| 1. | 10000 | 0,559 | Keruh |
| 2. | 1000 | 0,657 | Keruh |
| 3. | 100 | 0,613 | Bening |
| 4. | 10 | 0,548 | Bening |
| 5. | 1 | 0,418 | Bening |
| 6. | 0,1 | 0,431 | Keruh |
| 7. | 0,01 | 0,398 | Keruh |
| 8. | 0 | 0,724 | Keruh |
| 9. | Kontrol (-) | 0,543 | Keruh |
| 10. | Kontrol (+) | 0,563 | Bening |

Keterangan :

Kontrol Positif : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L).

Kontrol Negatif : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media tanpa diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L).

Berdasarkan hasil dari penelitian didapati hasil uji MIC pada dosis 10 ppm menjadi bening menghasilkan absorbansi sebesar 0,548, nilai absorbansi ini mendekati kontrol positif yaitu sebesar 0,563. Tingkat kejernihan pada larutan uji dipengaruhi karena adanya aktivitas antibakteria dari ekstrak kasar seledri (*A. graveolens* L) yakni flavonoid yang bereaksi membunuh bakteri *A. hydrophila* dengan cara merusak membran sitoplasma bakteri karena adanya aktivitas bakteri yang bereaksi dengan dosis perlakuan berbeda, maka akan mempengaruhi nilai absorbansi di tiap tabung perlakuan yang ditandai dengan tingkat kekeruhan.



Gambar 4. Hasil Uji MIC

4.2 Uji Cakram

Dalam mengetahui kemampuan daya hambat ekstrak kasar seledri (*A. graveolens* L), maka diperlukan uji daya hambat dengan menggunakan kertas cakram. Uji cakram dilakukan menggunakan perlakuan dosis 10 ppm, 35 ppm, 60 ppm, 85 ppm serta kontrol (negatif dan positif). Digunakan dosis diatas 10 ppm dikarenakan adanya kemungkinan dari uji MIC sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

Berdasarkan hasil pengamatan diameter zona bening pada uji cakram selama penelitian, setiap perlakuan didapatkan zona bening. Diameter zona bening hasil penelitian dipengaruhi oleh jumlah dosis yang digunakan maka diameter zona bening yang dihasilkan semakin besar.

Hasil uji cakram dari ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) dengan empat perlakuan dosis dan tiga kali ulangan yang dilakukan yaitu dengan dosis 10 ppm, 35 ppm, 60 ppm, dan 85 ppm didapatkan diameter zona bening setelah dilakukan pengamatan 24 jam seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Rata – Rata Pengamatan Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L) Terhadap Bakteri *A. hydrophila*

| Perlakuan | Zona Bening | | | Total | Rerata ± Standar Deviasi |
|-------------------|-------------|-------|-------|--------|--------------------------|
| | 1 | 2 | 3 | | |
| A (10 ppm) | 0,213 | 0,093 | 1,496 | 1,802 | 0,60 ± 0,77 |
| B (35 ppm) | 1,756 | 2,593 | 2,4 | 6,749 | 2,25 ± 0,43 |
| C (60 ppm) | 2,923 | 2,886 | 2,636 | 8,445 | 2,82 ± 0,15 |
| D (85 ppm) | 3,41 | 4,3 | 3,716 | 11,429 | 3,81 ± 0,45 |
| Jumlah | | | | 28,422 | |

Menurut Suryawiria (2005), menyatakan bahwa respon hambat dari suatu bahan aktif dapat diklasifikasikan pada empat respon seperti yang ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Klasifikasi Respon Hambatan

| No. | Diameter Zona Bening (mm) | Respon Hambatan Pertumbuhan |
|-----|---------------------------|-----------------------------|
| 1. | < 5 | Lemah |
| 2. | 5 - 10 | Sedang |
| 3. | 10 - 19 | Kuat |
| 4. | > 20 | Sangat Kuat |

Kemudian dilakukan analisa sidik ragam untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan, berikut merupakan tabel sidik ragam zona bening yang dihasilkan dari beberapa perlakuan ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) yang berbeda seperti yang ditunjukkan pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Analisa Sidik Ragam Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L)

| Sumber Keragaman | db | JK | KT | F Hitung | F 5% | F 1% |
|------------------|----|---------|--------|----------|------|------|
| Perlakuan | 3 | 16,2383 | 5,4127 | 4,0776* | 4,07 | 7,59 |
| Acak | 8 | 10,6192 | 1,3274 | | | |
| Total | 11 | 26,8575 | | | | |

Keterangan : * = Berbeda nyata

Tabel sidik ragam menunjukkan bahwa dosis ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila*. Perbedaan dosis perlakuan pada penelitian ini menghasilkan zona daya hambat yang berbeda pula. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) didapatkan untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan seperti dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L)

| | Rerata | A 0,60 | B 2,25 | C 2,82 | D 3,81 | Notasi |
|---|--------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------|--------|
| A | 0,60 | - | - | - | - | a |
| B | 2,25 | 1,649 ^{ns} | - | - | - | a |
| C | 2,82 | 2,2144* | 0,5654 ^{ns} | - | - | ab |
| D | 3,81 | 3,208** | 1,559 ^{ns} | 0,9936 ^{ns} | - | b |

Keterangan : ** = Berbeda sangat nyata

Pada Tabel 8 menunjukkan bahwa perlakuan nilai hasil dari perlakuan D memiliki nilai yang berbeda sangat nyata, perlakuan C memiliki nilai yang berbeda nyata, perlakuan B dan A tidak berpengaruh. Dengan rata – rata diameter zona bening tertinggi terdapat pada perlakuan D (dengan nilai zona bening rata – rata 3,81 dan hasil zona bening dengan nilai terendah yaitu perlakuan A didapatkan rata – rata 0,60. Perbedaan notasi dikarenakan dengan dosis 85 ppm (perlakuan D) mampu menghambat paling baik daripada perlakuan lainnya yang ditunjukkan pula dengan lebar dari zona hambat bakteri uji. Pertumbuhan bakteri dihambat oleh flavonoid yang terkandung dalam ekstrak

kasar daun seledri (*A. graveolens* L), dimana sebagai anti mikroba menurut Pelczar dan Chan (1986), antara lain dengan jalan merusak dinding sel mikroorganisme, merusak membran sitoplasma, mendenaturasi protein dan menghambat kerja enzim dalam sel bakteri.

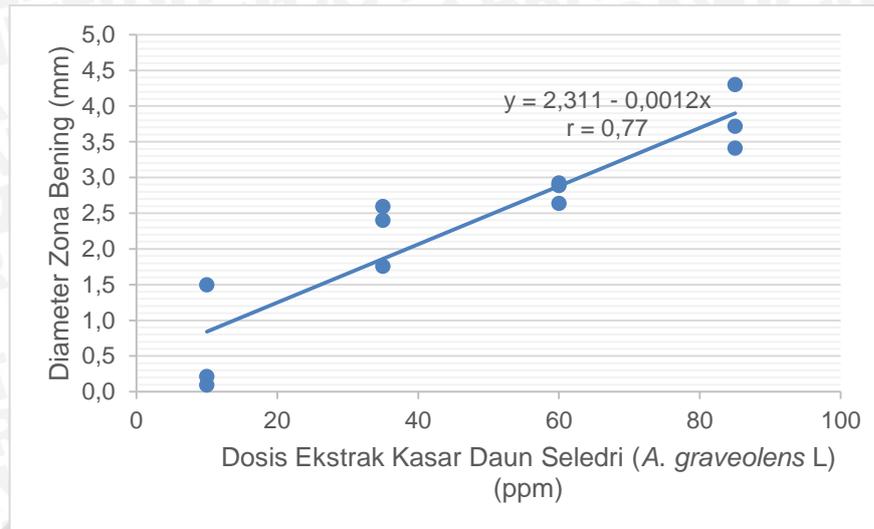
Hasil orthogonal polinomial didapatkan untuk mengetahui hubungan fungsi respon antar perlakuan seperti dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Orthogonal Polinomial

| Perlakuan | Hasil (Ti) | Perbandingan (Ci) | | |
|---|------------|-------------------|-----------|-------|
| | | Linear | Kuadratik | Kubik |
| 10 ppm | 1,802 | -3 | +1 | -1 |
| 35 ppm | 6,749 | -1 | -1 | +3 |
| 60 ppm | 8,445 | +1 | -1 | -3 |
| 85 ppm | 11,426 | +3 | +1 | +1 |
| Q = $\sum CiTi$ | | 30,568 | -1,966 | 4,536 |
| Kr = $(\sum Ci^2) \times r$ | | 60 | 12 | 60 |
| Jkxy = $\frac{Q^2}{Kr}$ | | 15,57 | 0,322 | 0,342 |

Berdasarkan hasil Orthogonal Polinomial pada Tabel 8 untuk data diatas didapatkan hubungan fungsi respon dengan perlakuan pada suatu pengamatan hingga membentuk suatu fungsi ortogonal polinomial dengan ulangan sama dan jarak perlakuan berbeda kesimpulan bahwa data dapat dibentuk fungsi respon dengan perlakuan pada derajat polinomial linier.

Hubungan antara konsentrasi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) terhadap diameter zona hambat bakteri *A. hydrophila* yang disajikan pada gambar 5 sebagai berikut:



Gambar 5. Konsentrasi Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L) Terhadap Diameter Zona Hambat Bakteri *A. hydrophila*

Keterangan :

X = Dosis ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L)

Y = Diameter zona bening (mm)

Pada grafik di atas menunjukkan hubungan antara pengaruh pemberian ekstrak kasar daun seledri dengan diameter zona hambat bakteri *A. hydrophila*. Pada dosis 10 ppm hingga 85 ppm grafik mengalami kenaikan kurva hingga menuju ke titik puncak, hal ini dikarenakan ekstrak kasar daun seledri masih mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri *A. hydrophila*. Pada perusakan membran sitoplasma, ion OH⁻ dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipida akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma akibatnya membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan bahkan kematian (Noviana, 2004).

Daun seledri mengandung flavonoid, saponin, tanin, minyak atsiri, flavoglukosida (apiin), apigenin, kolin, lipase, asparagin, alkaloid serta vitamin. Seluruh herba seledri mengandung glikosida apiin (glikosida flavon),

isoquersetin, dan umbelliferon, juga mengandung mannite, inosite, asparagine, glutamine, choline, linamarose, provitamin A, vitamin C dan vitamin B. Kandungan asam – asam dalam minyak atsiri pada biji antara lain : asam – asam resin, asam – asam lemak terutama palmitat, oleat, linoleat dan petroselinat (Sudarsono *et al.*, 1996).



5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) mampu menghambat bakteri *A. hydrophila* dan bersifat bakteriostatik dilihat dari diameter zona bening yang dihasilkan dari semua perlakuan yang sudah ditentukan selama penelitian. Diameter zona bening yang dihasilkan semakin meningkat seiring dengan semakin tinggi dosis perlakuan yang digunakan. Perlakuan dengan dosis 10 ppm sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan ukuran diameter rata – rata zona bening 0,60 mm dengan persamaan $y = 2,311 - 0,0012x$ dengan nilai koefisien korelasi sebesar 0,77.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini maka dapat disarankan ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) dapat diaplikasikan sebagai bahan obat namun sebelumnya harus dilakukan uji *in vivo* terlebih dahulu untuk membuktikan keefektifan bahan tersebut serta pemberian ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L) dapat dimanfaatkan untuk menghambat bakteri *A. hydrophila* dengan dosis 10 ppm (dosis terendah), namun perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mengetahui dosis yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Arsyad M.N., Elok I., dan Akbar S. 2005. Perkembangan Kegiatan Budidaya Ikan di Perairan Umum Sumatera Selatan. *Jurnal Ilmu – Ilmu Perikanan dan Budidaya Perairan*. **21** (3): 63 – 76.
- Christian C., Volk C., Creason R., Jarosh J., Robinson J. and C. Wames. 2001. Detection of *Aeromonas hydrophila* in a Drinking- Water Distribution System: a Field and Pilot Study. *Jurnal Microbiol.* **47** (8): 782 -786.
- Darmiati N. N. 2013. Uji Aktivitas Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) terhadap Kumbang Kacang *Callosobruchus chinensis* L. (Coleoptera:Bruchidae). *Agrotrop*. **3** (1): 17 – 22.
- Gardenia L., Koesharyani I., Supriyadi H., dan T. Mufidah. 2010. Aplikasi Deteksi *Aeromonas hydrophila* Penghasil Aerolysin dengan Menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. 877 – 883.
- Haryani A., Grandiosa R., Buwono I. D., dan A. Santika. 2012. Uji Efektivitas Daun Pepaya (*Carica papaya*) untuk Pengobatan Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas Koki (*Carassius auratus*). **3** (3): 213 – 220.
- Majidah D., Fatmawati D. W. A., dan A. Gunadi . 2014 . Daya Antibakteri Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* Sebagai Alternatif Obat Kumur. Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa. Fakultas Kedokteran Gigi. Universitas Jember.
- Pelczar M. J. dan E. C. S. Chan. 1986. Dasar – Dasar Mikrobiologi I. UI Press : Jakarta. 443 hlm.
- Prajitno A. 2005. Diktat Parasit dan Penyakit Ikan. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya Malang. 105 hlm.
- Prajitno A. 2007. Penyakit Ikan dan Udang Bakteri. Universitas Brawijaya. Malang. 113 hlm.
- Kabata Z. 1985. Parasites and Diseases of Fish Cultured in Tropics. Taylor and Francisco Ltd. London.
- Kuncari E. S., Iskandarsyah dan Praptiwi. 2014. Uji Iritasi dan Aktivitas Pertumbuhan Rambut Tikus Putih: Efek Sediaan Gel Apigenin Dan Perasan Herba Seledri (*Apium Graveolens* L.). *Media Litbangkes*. **25** (1): 15 – 22.
- 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): 173 – 174.

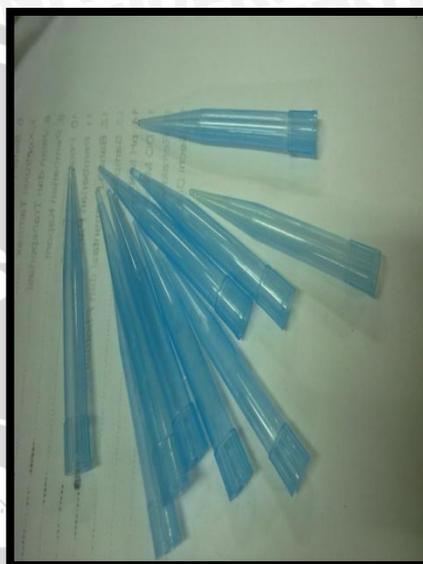
- Noviana L. 2004. Identifikasi Senyawa Flavonoid Dari Propolis Lebah Madu (*Apis mellifera*) dan Uji Aktivitasnya Sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus*. Skripsi. Fakultas Matematika dan IPA. Universitas Brawijaya. Malang. 61 hlm.
- Ramadhan A. E dan Phaza H. A. 2010. Pengaruh Konsentrasi Etanol, Suhu Dan Jumlah Stage Pada Ekstraksi Oleoresin Jahe (*Zingiber Officinale* Rosc) Secara Batch. Skripsi. Universitas Diponegoro. Semarang.
- Rostinawati T. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* Dan *Staphylococcus aureus* Dengan Metode Difusi Agar. Skripsi. Fakultas Farmasi Universitas Padjadjaran. Jatinangor.
- Sovianingrum I. 2008. Uji Efek Penurunan Kadar Glukosa Darah Fraksi Air Ekstrak Etanol Seledri (*Apium graveolens*. L) Pada Kelinci Putih Jantan Galur New Zealand Yang Dibebani Glukosa. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah. Surakarta.
- Sudarsono, Pudjoanto A., Gunawan D., Wahyuono S. dan Ngatidjan. 1996. Tumbuhan Obat, Hasil Penelitian, Sifat – Sifat dan Penggunaan. Yogyakarta : Pusat Penelitian Obat Tradisional UGM. 190 hlm.
- Sukadi M. F. 2002. Peningkatan Teknologi Budidaya Perikanan. *Jurnal Ikhtologi Indonesia*. **2** (2): 61 – 66.
- Suryawiria U. 2005. Mikrobiologi Dasar. Paps Sinar Sinanti. Jakarta.
- Tambunan L R. 2012. Uji Stabilitas Mikroemulsi Esktrak Daun Seledri dan Miktoemulsi Ekstrak Daun Urang Aring dan Efektivitasnya Terhadap Pertumbuhan Rambut Tikus Jantan Spraque Dawley. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Indonesia.
- Triyati E. 1985. Spektrofotometer Ultra Violet dan Sinar Tampak Serta Aplikasinya Dalam Oseanologi. *Oseana*. **5** (1) : 39 – 47.
- Putri R. W., Tjajaningsih W., dan D. Handijanto. 2008. Daya Antibakteri pigmen pyocyanin dari isolate *Pseudomonas aeruginosa* Terhadap *Aeromonas hydrophila* Secara In Vitro. *Jurnal Berkala Ilmiah Perikanan*. **3** (1): 65 – 73.
- Wardiyanto, Sukoso dan U. Yanuhar. 2008. Analisa Daya Hambat Ekstrak Daun Pepaya (*Carica Papaya* L) Terhadap Infeksi Selular *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas (*Cyrprinus carpio* L). *Jurnal Penelitian*. **2** (1): 107 – 114.
- Widyaningrum L. 2008. Uji Efek Penurunan Kadar Glukosa Darah Ekstrak Etanol 70% Daun Seledri (*Apium Graveolens* L.) Pada Kelinci Jantan. Skripsi. Fakultas Farmasi. Universitas Muhammadiyah. Surakarta.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat – Alat Penelitian



Mikropipet 100 – 1000 μ l



Blue Tip



Vortex Mixer



Laminary Air Flow



Corong



Spatula



Botol Film

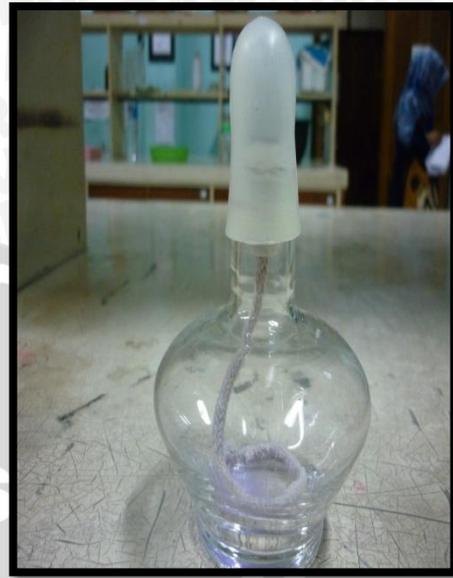


Erlenmeyer 250 ml





Cawan Petri



Bunsen



Autoklaf



Rak Tabung

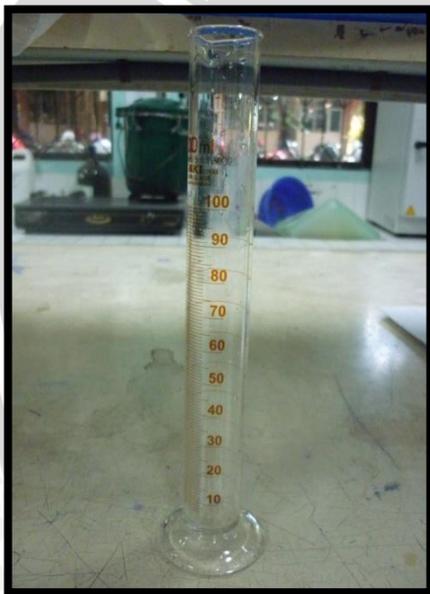




Hot Plate



Tabung Reaksi



Gelas Ukur



Timbangan Digital





Kulkas



Nampan



Spektrofotometer



Vaccum Rotary Evaporator



Sprayer



Jangka Sorong



Lap



Inkubator





Pipet Volume



Gunting



Timbangan Analitik



Lampiran 2. Bahan – Bahan Penelitian



Daun Seledri (*A. graveolens* L)



Aluminium Foil



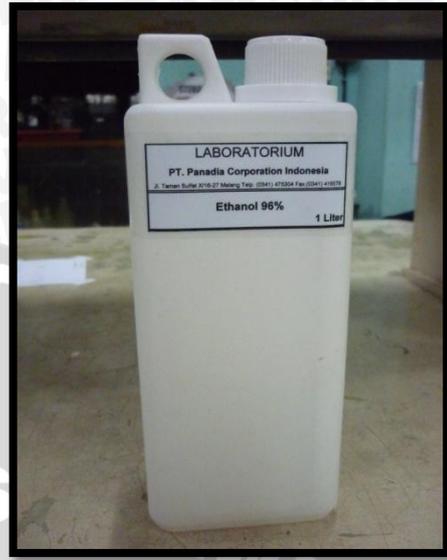
Nutrient Broth



Tryptic Soy Agar



Kapas



Etanol 96%



Nafis



DMSO 10%





Kertas Label



Bakteri *A. hydrophila*



Tali Kasur

Lampiran 3. Hasil Uji Cakram Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L)
Terhadap Daya Hambat *A. hydrophila*



Konsentrasi 10 ppm



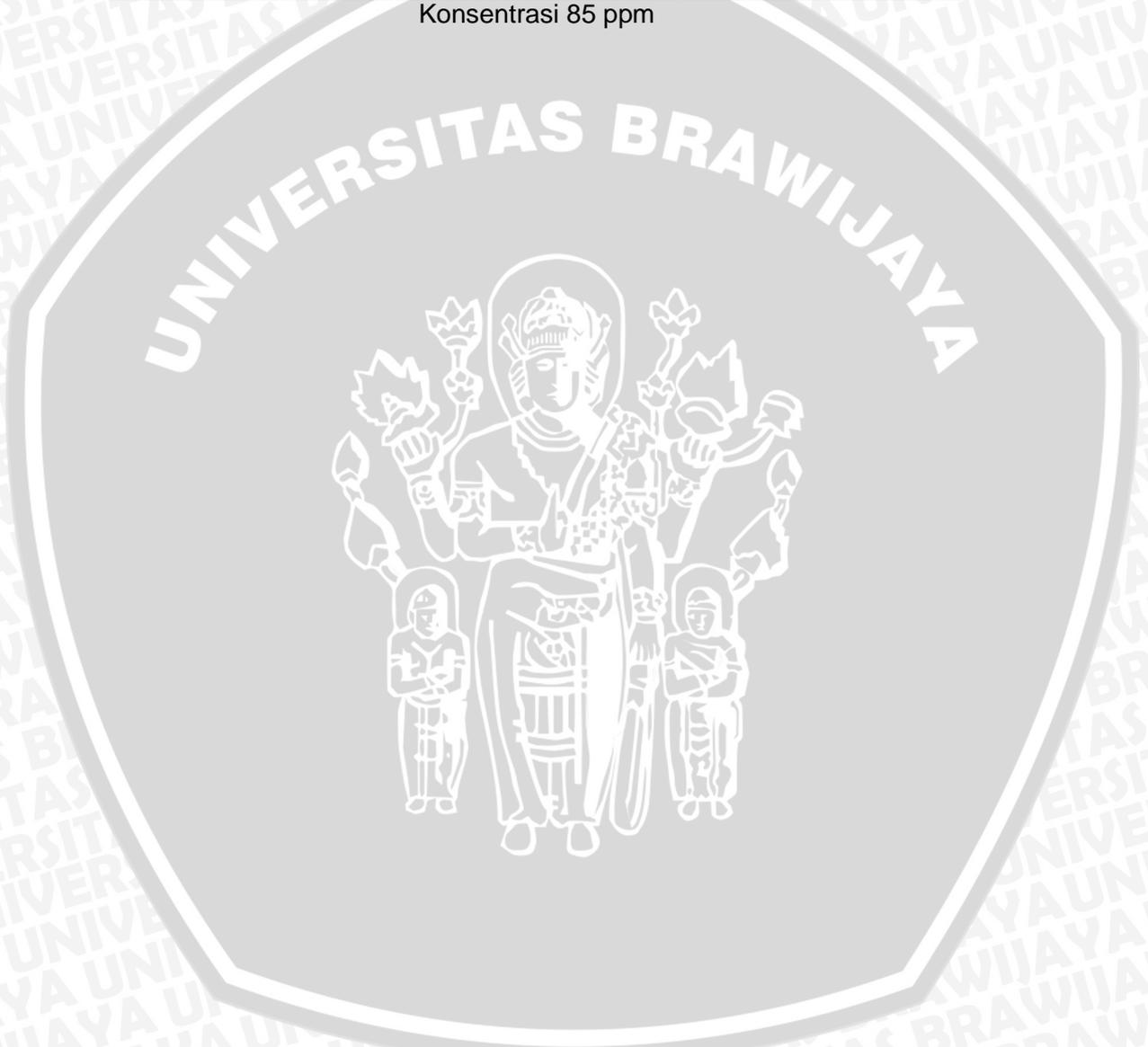
Konsentrasi 35 ppm

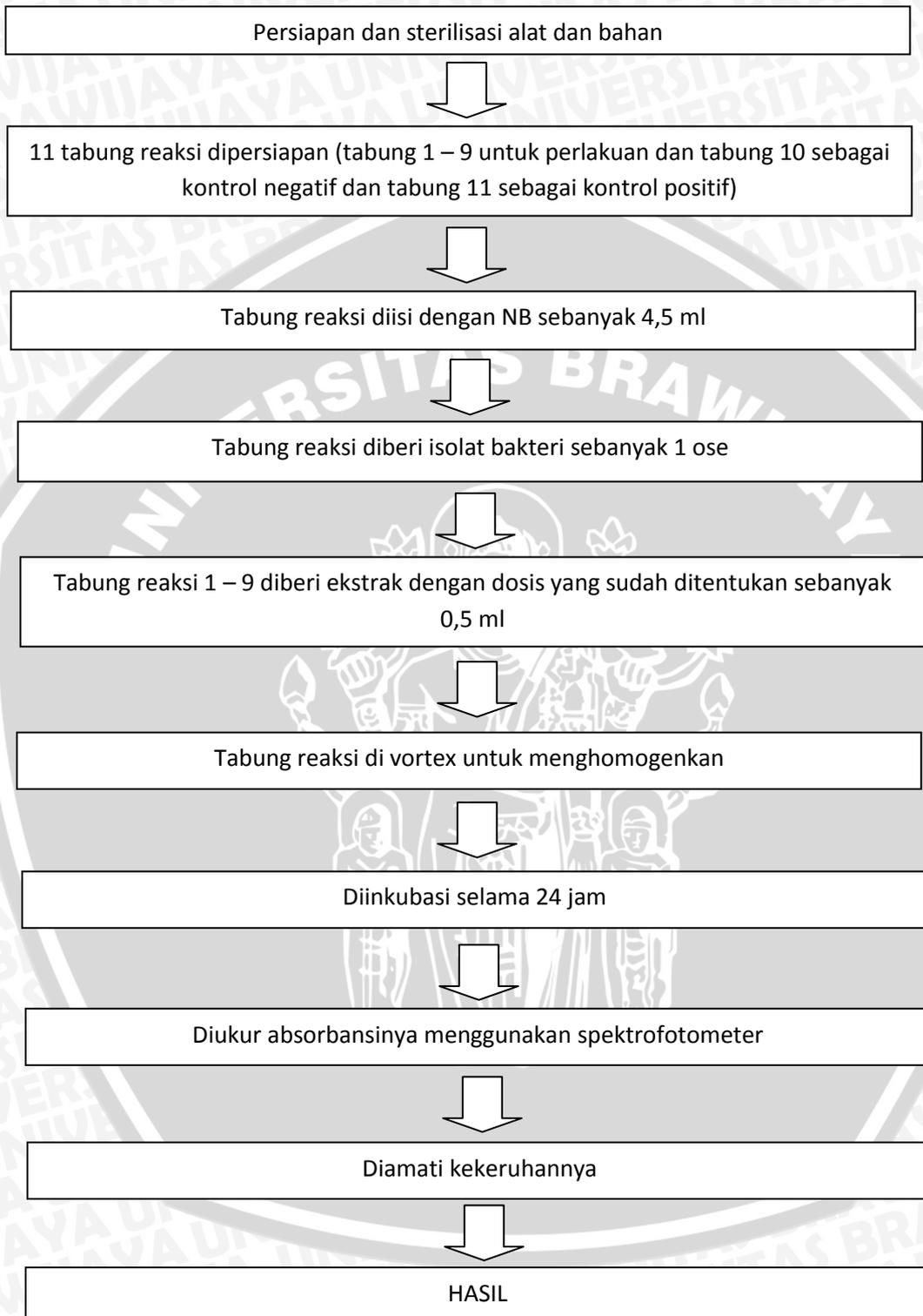


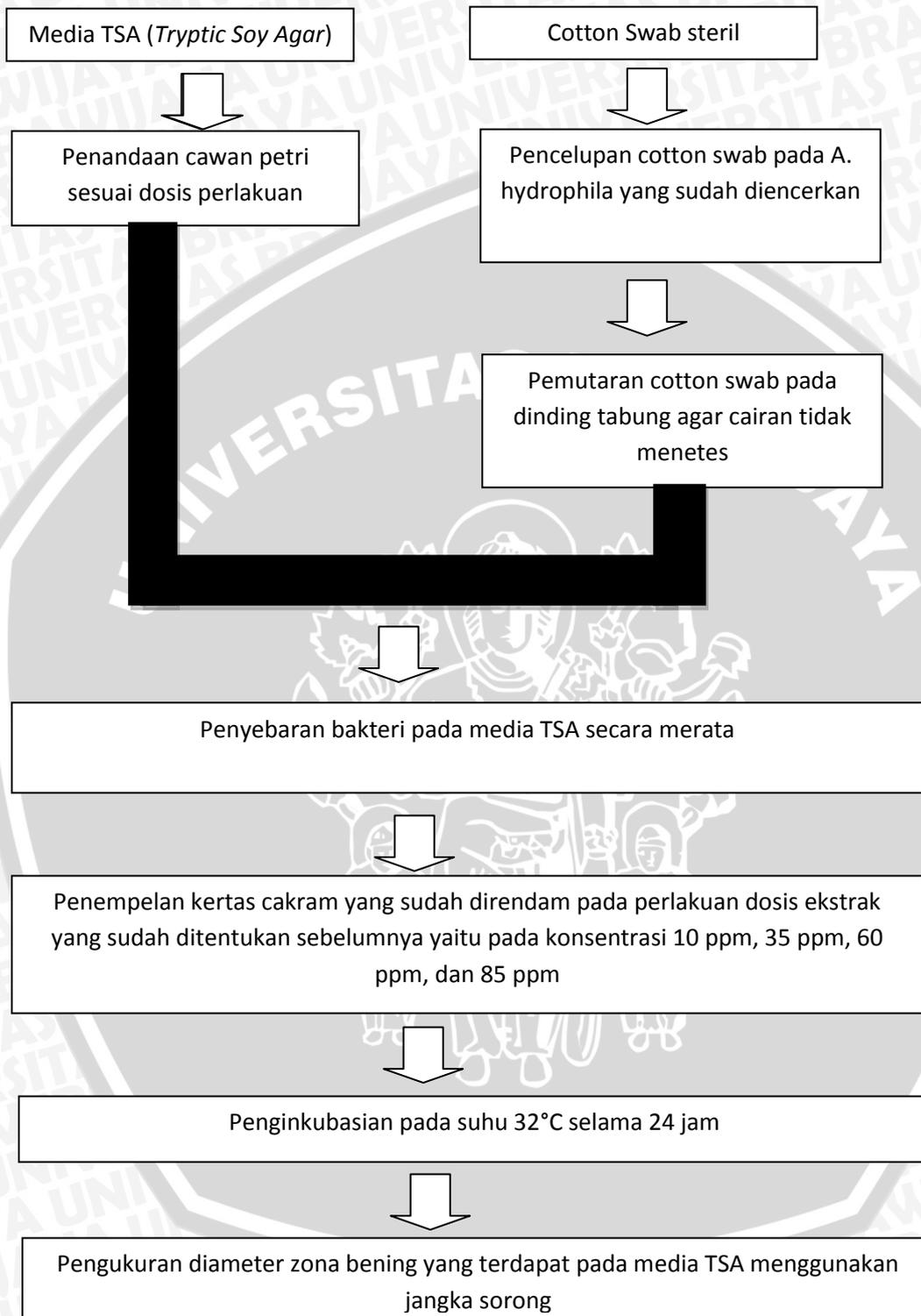
Konsentrasi 60 ppm



Konsentrasi 85 ppm



Lampiran 4. Skema Kerja MIC (Minimum Inhibiting Concentration)

Lampiran 5. Skema Kerja Uji Cakram

Lampiran 6. Perhitungan Statistik Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L)

| Perlakuan | Zona Bening | | | Total | Rerata ± Standar |
|-------------------|-------------|-------|-------|--------|------------------|
| | 1 | 2 | 3 | | Deviasi |
| A (10 ppm) | 0,213 | 0,093 | 1,496 | 1,802 | 0,60 ± 0,77 |
| B (35 ppm) | 1,756 | 2,593 | 2,4 | 6,749 | 2,25 ± 0,43 |
| C (60 ppm) | 2,923 | 2,886 | 2,636 | 8,445 | 2,82 ± 0,15 |
| D (85 ppm) | 3,41 | 4,3 | 3,716 | 11,429 | 3,81 ± 0,45 |
| Jumlah | | | | 28,422 | |

$$FK = \frac{G^2}{n} = \frac{28,422}{3 \times 4} = 67,3175$$

$$\begin{aligned} JK \text{ Total} &= 0,093^2 + 1,756^2 + 2,636^2 + 3,41^2 + 0,213^2 + 2,4^2 + 2,886^2 + 3,716^2 + \\ &1,496^2 + 2,593^2 + 2,923^2 + 4,3^2 - FK \\ &= 94,175 - 67,3175 \\ &= 26,8575 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JK \text{ Perlakuan} &= \frac{1,802^2 + 6,749^2 + 8,445^2 + 11,429^2}{3} - FK \\ &= 83,5558 - 67,3175 \\ &= 16,2383 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} JK \text{ Acak} &= JK \text{ Total} - JK \text{ Perlakuan} \\ &= 26,8575 - 16,2383 \\ &= 10,6192 \end{aligned}$$

➤ Perhitungan Sidik Keragaman

| Sumber Keragaman | db | JK | KT | F Hitung | F 5% | F 1% |
|------------------|----|---------|--------|----------|------|------|
| Perlakuan | 3 | 16,2383 | 5,4127 | 4,0776* | 4,07 | 7,59 |
| Acak | 8 | 10,6192 | 1,3274 | | | |
| Total | 11 | 26,8575 | | | | |

Keterangan : * = Berbeda nyata

$$\begin{aligned} F \text{ Hitung} &= \frac{KT \text{ Perlakuan}}{KT \text{ Acak}} \\ &= \frac{5,4127}{1,3274} \\ &= 4,0776 \end{aligned}$$

➤ Uji BNT

| | | |
|---------------|--|--|
| SED | $\sqrt{\frac{2 \times \text{KT Acak}}{3}}$ | $\sqrt{\frac{2 \times 1,3274}{3}}$ |
| BNT 5% | t tabel 5 % (db acak) x SED | 2,306 x $\sqrt{\frac{2 \times \text{KT Acak}}{3}}$ = 2,1690 |
| BNT 1% | t tabel 1 % (db acak) x SED | 3,355 x $\sqrt{\frac{2 \times \text{KT Acak}}{3}}$ = 3,1557 |

➤ Tabel Uji BNT

| | Rerata | A 0,60 | B 2,25 | C 2,82 | D 3,81 | Notasi |
|----------|-------------|---------------------|----------------------|----------------------|-----------|----------|
| A | 0,60 | - | - | - | - | α |
| B | 2,25 | 1,649 ^{ns} | - | - | - | α |
| C | 2,82 | 2,2144* | 0,5654 ^{ns} | - | - | ab/b |
| D | 3,81 | 3,208** | 1,559 ^{ns} | 0,9936 ^{ns} | - | c |

Keterangan : ns = non significant

* = Berbeda Nyata

** = Berbeda Sangat Nyata

➤ Tabel Orthogonal Polinomial

| Perlakuan | Hasil (Ti) | Perbandingan (Ci) | | |
|---|------------|-------------------|-----------|-------|
| | | Linear | Kuadratik | Kubik |
| 10 ppm | 1,802 | -3 | +1 | -1 |
| 35 ppm | 6,749 | -1 | -1 | +3 |
| 60 ppm | 8,445 | +1 | -1 | -3 |
| 85 ppm | 11,426 | +3 | +1 | +1 |
| Q = $\sum CiTi$ | | 30,568 | -1,966 | 4,536 |
| Kr = $(\sum ci^2) \times r$ | | 60 | 12 | 60 |
| Jkxy = $\frac{Q^2}{Kr}$ | | 15,57 | 0,322 | 0,342 |

$$\text{Total JK Regresi} = 15,57 + 0,322 + 0,342 = 16,234$$

➤ Tabel Sidik Ragam Regresi

| Sumber Keragaman | db | JK | KT | F Hitung | F 5% (4,07) | F 1% (7,59) |
|------------------|----|---------|--------|---------------------|-------------|-------------|
| Perlakuan | 3 | 16,2383 | - | - | - | - |
| - Linear | 1 | 15,57 | 15,57 | 11,729** | - | - |
| - Kuadratik | 1 | 0,322 | 0,322 | 0,242 ^{ns} | - | - |
| - Kubik | 1 | 0,342 | 0,342 | 0,257 ^{ns} | - | - |
| Acak | 8 | 10,6192 | 1,3274 | - | - | - |
| Total | 14 | 45,0915 | - | - | - | - |

| x | y | xy | x ² |
|------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|
| 10 ppm | 0,213 | 2,13 | 100 |
| 10 ppm | 0,093 | 0,93 | 100 |
| 10 ppm | 1,496 | 14,96 | 100 |
| 35 ppm | 1,756 | 61,46 | 1225 |
| 35 ppm | 2,593 | 90,755 | 1225 |
| 35 ppm | 2,4 | 84 | 1225 |
| 60 ppm | 2,923 | 175,38 | 3600 |
| 60 ppm | 2,886 | 173,16 | 3600 |
| 60 ppm | 2,636 | 158,16 | 3600 |
| 85 ppm | 3,41 | 289,85 | 7225 |
| 85 ppm | 4,3 | 365,5 | 7225 |
| 85 ppm | 3,716 | 315,86 | 7225 |
| $\Sigma x = 570$ | $\Sigma y = 28,422$ | $\Sigma xy = 1732,145$ | $\Sigma x^2 = 36,450$ |
| $\bar{x} = 47,5$ | $\bar{y} = 2,3685$ | | |