## DAFTAR PUSTAKA


Alvicar, A.A, R.R Maurer, and L.L Anderson. 1991. *Superovulatory responses in FSH or Pergonal-treated heifers.* Theriogenology. 22:635.

Alvicar, A.A, R.R Maurer, and L.L Anderson. 1991. *Luteinizing hormone, follicle stimulating hormone, progesterone and estradiol-17B in superovulated beef heifers. In: Proc. 10 th Int.* Cong. Anim. Reprod. And AI, Vol. 3. p 303 Urbana II.

Alcivar. A.A, R.R Maurer and L.L Anderson 1992. *Endocrine changes in beef Heifers Superovulated with Follicle stimulating Hormone (FSH.P) or Human Menopausal Gonadotropin. Department of Animal Science Iowa State University and Roman Lhruskaus.* Dept. of agriculture clay center. J. Anim Sci. 70: 224-231.

Daya, S., Gunby, J., and Hughes, E.G. 1995. *Follicle-stimulating hormone versus human menopausal gonadotrophin for in vitro fertilization cycles*: a meta-analysis. *Fertil. Steril.*, 64: 347-354.

Daya, S and Gunby, J. 1999. *Recombinant versus urinary follicle stimulating hormone for ovarian stimulation in assisted reproduction. HumReprod.*, 14: 2207-2215.

Guyton, A.C. 1997. Fisiologi Kedokteran. Edisi 9. Penerbit Buku Kedokteran ECG. Jakarta. Hal 417-422.

Hafez, E.S.E. 2000. Reproduction in farm animals. 7th ed. Lea and Febiger. Philadelphia. Hal 98-105, 346-356, 560-568.

Hardjopranjoto, S. 1995. Fisiologi Reproduksi. Ed.II. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya. Hal 35-49, 117-120, 136.

Hardjopranjoto, S., 1997. *Ilmu Kemajiran Pada Ternak.* Airlangga University Press, Surabaya.

Hermadi HA, 2003. *Ujicoba hMG Trans Ovari untuk Kasus Hypofungsi Ovarium Sapi Perah.* Hibah Bersaing 2003 Universitas Airlangga.

Hunter, R. H. F., 1995. Fisiologi dan teknologi Reproduksi Hewan Betina Domestik. Penerbit ITB. Bandung. Penerbit Universitas Udayana. Bali. Halaman 74-78.

IIMS, 1994. IIMS Manual for hMG. *Pergonal Seruvo Singapore MIMS Asia.* 135. Cecil street.

Ismudiono, 1999a. *Fisiologi Reproduksi Pada Ternak. 2th*ed. *Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Surabaya.* Halaman 49-50, 61-63.

Ismudiono, 1999b. *Upaya Meningkatkan Angka Kebuntingan Melalui Inseminasi Dalam Upaya Penyerentakan Birahi Pada Sapi Perah. Lembaga Penelitian UNAIR.*

Lauria, A.A., A. Genazzani, O. Oliva, P. Inandi, F. Cremonesi, and C. M. Barbetti.. 1999. *Improved method to induce superovulation in cattle using human menopausal gonadotropin (HMG).*4thed. Theriogenology 18:357.

Jacob, S., Drudy, L., Conroy, R. 1998. *Outcome from consecutive in-vitro fertilization/ intracytoplasmic sperm injection attempts in the final group treated with urinary gonadotrophins and the first group treated with recombinant follicle stimulating hormone. Hum. Reprod.,* 13: 1783-1787.

Jacob, S., 1997. Ilmu Kandungan. Edisi kedua. Yayasan Bina Pustaka. Sarwono Prawirodiharjo. Jakarta. Halaman 62-105

Jaffe, R. B., 2004. Hormon. Http://www.hormone.org/endo101/index/html (23 mei 2004, Accessed 26 agustus 2009)

Martojo, H. 1987. Pengaruh Faktor-faktor Pendukung Terhadap Keberhasilan Transfer Embrio dan Rekayasa Genetik dalam Peningkatan Mutu dan Produksi Ternak. Interuniversity Center for Live Sciences. Bogor Agricultural University.6

Mercan, R., Mayer, J.F., Walker, D. 1997. *Improved oocyte is obtained with follicle stimulating hormone alone than with follicle stimulating hormone/ human menopausal gonadotrophin combination. Hum. Reprod.,* 12: 1886-1889.

Moor, R.M., Th.A.M. Kruip. and D.Green. 1995. *Intraovarian Control of Folliculogenesis* : Limits to Superovulation. 4thed. Theriogenology halaman 18: 33-34

Murtidjo, B. A. 1993. Memelihara kambing sebagai ternak potong dan perah. Cetakan ke-9. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. Halaman 11-23

Richardson W.B., Boethel, D.J and Corell, P.D. 2000. *Meat Goat Selection, carcass evaluation and fabrication guide*. Louisiana State University Agricultural Center. USA

Smith m.C. 1998. The reproductive anatomy and physiology of the female goat. In current therapy in theriogenology 2. 4$^{th}$ed. W.B Sounders Company. Halaman 577-578

Van Rijkom, Z. J. E. F., F. J. Broekmans, and H. G M. Leufkens, 2002. Perspective on Medical Practice : **OPTION** *from hMG trough Purified through Urinary FSH preparation to Recombinant FSH: a substitution study.* European Society of Human Reproduction and Embryology. Rotterdam. Halaman 857-865.

**LAMPIRAN**

**Lampiran 1. Alat-alat penelitian**

**Gambar 1. Kandang Kambing Modifikasi**

**Gambar 2. *Disposible Strynge***

**Lampiran 2. Bahan penelitian**

**Gaambar 3. *h*MG**

**Gaambar 4. Prostaglandine**

# KTIVITAS EKSTRAK KULIT JERUK LEMON (*Citrus limonum*) HADAP DAYA HAMBAT PERTUMBUHAN *Aeromonas hydrophila* SECARA IN VITRO

## SKRIPSI

PROGRAM STUDI S-1 BUDIDAYA PERAIRAN

Oleh :

**KURNIA NIRMALA TANJUNG**
SURABAYA - JAWA TIMUR

**FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN**
**UNIVERSITAS AIRLANGGA**
**SURABAYA**
**2007**

**EFEKTIVITAS EKSTRAK KULIT JERUK LEMON (*Citrus limonum*) TERHADAP DAYA HAMBAT PERTUMBUHAN *Aeromonas hydrophila* SECARA IN VITRO**

**Skripsi Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar Sarjana Perikanan Pada Program Studi S-1 Budidaya Perairan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga**

Oleh:

**KURNIA NIRMALA TANJUNG**

**NIM. 060210039 P**

Menyetujui,

Komisi Pembimbing

Ir. Sudarno, M.Kes
Pembimbing I

Laksmi Sulmartiwi, M.P, S.Pi
Pembimbing II

Mengetahui,

Ketua Program Studi S-1
Budidaya Perairan

Prof. Dr. Hj. Sri Subekti B.S, DEA, drh
NIP. 130 687 296

Hasil penelitian menunjukkan bahwa ekstrak kulit jeruk lemon mempunyai daya antibakteri terhadap *Aromonas hydrophila*. Berdasarkan hasil uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) didapatkan konsentrasi minimum yang dapat menghambat *Aeromonas hydrophila* adalah 0.39% atau 0,01953 gram ekstrak /ml pelarut. Hasil uji MBC didapatkan konsentrasi minimum ekstrak kulit jeruk lemon yang dapat membunuh *Aeromonas hydrophila* adalah 1.56 % atau 0,07812 g ekstrak/ml pelarut. Dengan pembacaan spektofotometer nilai optical density (OD) yang sudah dapat menghambat bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah pada nilai OD mulai 0.151 keatas. Hasil uji F menunjukkan bahwa antar konsentrasi memberikan pengaruh yang berbeda nyata ($p < 0.05$) dalam menghambat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila*. Konsentrasi yang memberikan pengaruh terbaik yaitu konsentrasi 100% yang tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 50%. Saran dari penelitian ini adalah perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang efektivitas dari ekstrak kulit jeruk lemon secara in vivo.

## SUMMARY

**KURNIA NIRMALA TANJUNG. The efektivity of citrus limonum skin extract to inhibit *Aeromonas hydrophila's* growth with *in vitro* method. Academic advisor Ir. SUDARNO M.Kes and LAKSMI SULMATIWI ,M.P., S.Pi.**

The disease which often attacks the freshwater fish is *Aeromonas hydrophila* bacteria which caused *Motil Aromonas Septicemia* (MAS). Control disease by farmers can be done by using antibiotics or chemical treatment, but extensive and constant use of them will led to resistant *Aeromonas hydrophila* and left residu in fish which can disturb human healty. As an alternatif way to control this diseae suggested to be used traditional medicine from natural material like citrus limonum skin is needed.

This research was trying to find an alternatif medicine to threat the MAS. Natural material used in this research is citrus limonum skin. This plant extracted to get active compound and later tested to *Aeromonas hydrophila* with in vitro.

The purpose of this research was to know the ability to kill and inhibit and kill from citrus limonum skin with the different concentration to growth of *Aeromonas hydrophila* and also to know the minimum concentration of citrus limonum skin which can inhibit and kills *Aeromonas hydrophila*. Research was done on March – June 2007 in Sanitation Room of Surabaya Medical Clinic Laboratory.

This research used experimental method completely randomized design with eleven threatments and three times repititons. Parameters observed are *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) and *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC). The results of observation analized with Chi-Square and F-test that continue with Duncan's Multiple Range Test.

Results of research showed that citrus limonum skin extract have antibacterial activity againts *Aeromonas hydrophila*. According to results of MIC test shows that the minimum concentration that can inhibit *Aeromonas hydrophila's* growth at concentrate of extract 0.39% atau 0,01953 g/ml. The results of MBC test shows that the minimum concentration that can kill

*Aeromonas hydrophila* at concentrate of extract 1.56 % or 0,07812 g/ml. Beside that spectrofotometer's optical density value (OD) that can inhibit Aeromonas hydrophila's growth is in OD 0.151. Results of F-test indicate that among the concentration give different significant in inhibiting growth of *Aeromonas hydrophila.* Concentration giving the best influence is 100% what do not different significant with concentration 50%. Suggestion of this research is to find more about effectively of citrus limonum skin extract with in vivo methods.

# KATA PENGANTAR

Segala puji syukur kami ucapkan kehadirat Allah swt atas limpahan berkah, rahmat dan hidayah-Nya sehingga penyusunan Skripsi tentang Efektivitas Ektrak Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limonum*) Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* Secara In Vitro.

Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana perikanan pada Program Studi S-1 Budidaya Perairan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Penulis menyadari laporan ini masih jauh dari sempurna sehingga semua kritik dan saran diharapkan dari semua pihak. Akhirnya, semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi semua pihak, khususnya mahasiswa Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga, Surabaya.

Surabaya, Juli 2007

Penulis

## UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada:

1. Prof. Hj. Rhomziah Sidik, PH.D, Drh selaku Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya
2. Prof. Dr. Hj. Sri Subekti B.S, DEA, drh selaku ketua program studi Budidaya Perairan, Fakultas Kedokteran Hewan, Universitas Airlangga
3. Bapak Ir. Sudarno, M.Kes selaku dosen penguji pertama yang telah memberikan bimbingan dalam proses penelitian dan penulisan skripsi.
4. Ibu Laksmi Sulmartiwi, S.Pi, M.P selaku dosen penguji kedua yang telah memberikan bimbingan dalam proses penyusunan skripsi.
5. Ibu Ir. Rahayu Kusdarwati, M.Kes, Bapak Ir. Boedi Setya Rahardja, M.P dan Bapak Ir. H. Muhammad Arief, M.Kes. selaku dosen penguji yang telah memberikan kritik dan saran demi kesempurnaan skripsi ini.
6. Dr. Ir. Hari Suprapto, M. Agr selaku dosen wali.
7. Seluruh dosen Program Studi S-1 Budidaya Perairan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya yang telah berkenan mendidik penulis seama menempuh pendidikan di FKH.
8. Seluruh staf Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya yang telah membantu dalam proses penelitian.
9. Mama dan Bapak, serta adik-adikku tercinta atas kasih sayang, cinta, doa dan segalanya yang tercurah tiada henti dan seluruh keluarga besarku atas dukungannya.
10. Vindar Noviandi atas segala cinta, perhatian, kesabaran dan bantuan yang diberikan kepada penulis.

11. Maya teman sepenelitianku dan Ifah yang telah banyak membantu dan memberi semangat pada penulis.
12. Teman-temanku satu angkatan BP 2002 dan seluruh pihak yang telah memberi semangat dan dukungan pada penulis.

Surabaya, Juli 2007

Penulis

## DAFTAR ISI


**HALAMAN JUDUL** ..... i

**HALAMAN PENGESAHAN** ..... ii

**HALAMAN PERSETUJUAN** ..... iii

**RINGKASAN** ..... iv

**SUMMARY** ..... vi

**KATA PENGANTAR** ..... viii

**UCAPAN TERIMA KASIH** ..... ix

**DAFTAR ISI** ..... xi

**DAFTAR TABEL** ..... xiv

**DAFTAR GAMBAR** ..... xv

**DAFTAR LAMPIRAN** ..... xvi

**BAB I. PENDAHULUAN** ..... 1

1.1 Latar Belakang ..... 1

1.2 Perumusan Masalah ..... 3

1.3 Tujuan ..... 3

1.4 Manfaat ..... 4

**BAB II. TINJAUAN PUSTAKA** ..... 5

2.1 Jeruk Lemon (*Citrus limonum*) ..... 5

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi ..... 5

2.1.2 Habitat dan Kegunaan ..... 7

2.1.3 Komposisi Kimia ..... 8

2.1.4 Kegunaan Sebagai Antimikroba ..... 9

2.2 Bakteri *Aeromonas Hydrophila* ..... 10

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi ..... 10

2.2.2 Pertumbuhan dan Sifat Biakan ..... 11

2.2.3 Habitat Dan Penyebaran ..... 12

2.2.4 Infeksi dan Gejala Klinis ..... 12
2.3 Uji Efektivitas Antimikroba In Vitro ..... 13

**BAB III. KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS ..... 16**
3.1 Kerangka Konseptual ..... 16
3.2 Hipotesis ..... 17

**BAB IV. METODOLOGI PENELITIAN ..... 19**
4.1 Tempat dan Waktu ..... 19
4.2 Materi Penelitian ..... 19
4.3 Metode Penelitian ..... 19
4.3.1 Rancangan Penelitian ..... 19
4.3.2 Prosedur Kerja ..... 20
1. Sterilisasi Alat dan Bahan ..... 20
2. Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Lemon ..... 20
3. Pembuktian Isolat Bakteri *Aeromonas Hydrophila* ..... 21
4.4 Pelaksanaan Penelitian ..... 24
4.4.1 Penyiapan Larutan Dengan Berbagai Konsentrasi ..... 24
4.4.2 Penyiapan Suspensi Bakteri *Aeromonas hydrophila* ..... 25
4.4.3 Penentuan Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ..... 25
4.4.4 Penentuan Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) ..... 26
4.4.5 Parameter Uji ..... 27
4.4.6 Analisis Data ..... 27

**BAB V. HASIL DAN PEMBAHASAN ..... 29**
5.1 Hasil ..... 29
5.1.1 Pembiakan Bakteri *Aeromonas hydrophila* ..... 29
5.1.2 Identifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila* ..... 29
5.1.3 Ekstrak Kulit Jeruk Lemon ..... 30
5.1.4 Hasil Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) ..... 30
5.1.5 Hasil Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) ..... 33
5.2 Pembahasan ..... 35

**BAB VI. KESIMPULAN DAN SARAN ..... 44**
6.1 Kesimpulan ..... 44

6.2 Saran..... 44

**DAFTAR PUSTAKA** ..... **45**

**LAMPIRAN** ..... **49**

# DAFTAR TABEL

**Tabel** **Halaman**

1. Spesifikasi Uji Biokimia *Aeromonas hydrophila* ..... 12
2. Hasil Uji Biokimia *Aeromonas hydrophila* ..... 30
3. Hasil Pengamatan Uji MIC Secara Visual ..... 31
4. Hasil Pengamatan Uji MIC Dengan Spektrofotometer ..... 32
5. Hasil Pengamatan Uji MBC ..... 34

# DAFTAR GAMBAR

Halaman

Gambar

1. Morfologi kulit jeruk lemon dan tanaman jeruk.....6
2. Bagian-bagian kulit jeruk lemon.....7
3. Bagan Kerangka Konseptual.....18
4. Bagan Prosedur Kerja Secara Sistematis.....28

## DAFTAR LAMPIRAN

**Lampiran** **Halaman**

1. Gambar Bahan Yang Dipakai Selama Penelitian dan Gambar Hasil Uji Bikoimia Hasil Uji Bikoimia..... 49
2. Gambar Hasil Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) ..... 50
3. Analisa Sidik Ragam Pengamatan Uji MIC Menggunakan Spektrofotometer ..... 51
4. Tabel Frekuensi Pengamatan Hasil Uji Chi Square Uji MBC ..... 53

# BAB I

# PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Ekspor komoditi non migas harus dapat menunjang pemasukan devisa negara, sebagaimana yang telah dicanangkan oleh pemerintah. Salah satu penunjang utama yang berpotensi besar adalah komoditi perikanan. Secara umun permintaan terhadap komoditi perikanan Indonesia dan di dunia terus meningkat dari tahun ke tahun.

Seiring dengan perkembangannya, perikanan budidaya juga banyak menghadapi kendala dan permasalahan utama yang sering menghambat produksi yaitu hama dan penyakit. Penyakit ikan menurut Sachlan (1972) *dalam* Afrianto dan Liviawaty (1992) adalah segala sesuatu yang menimbulkan gangguan pada ikan baik secara langsung maupun tidak langsung. Hal ini menimbulkan kerugian yang cukup besar bagi unit usaha budidaya perikanan tersebut.

Peningkatan sistem budidaya perikanan ke arah intensifikasi sejalan dengan berkembangnya masalah penyakit pada perikanan air tawar. Pemeliharaan intensif yang biasanya dilakukan penebaran dengan kepadatan tinggi serta penggunaan pakan buatan dapat menjadi sumber penumpukan bahan organik dari sisa pakan dan feses. Tingginya bahan organik diperairan dapat memicu berkembangnya berbagai penyakit terutama penyakit bakterial.

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri sering didukung oleh tingginya kadar bahan organik di perairan. Kondisi lingkungan tidak stabil juga menjadi sebab penyakit seperti kadar ammonia, fluktuasi suhu, pH, dan parameter kualitas

air lainnya. Keadaan ini biasa terjadi saat pergantian musim dari kemarau ke musim penghujan (Zonneveld, 1991).

Salah satu jenis bakteri yang sering menginfeksi ikan pada budidaya air tawar adalah *Aeromonas hydrophila.* Bakteri ini menyebabkan penyakit *haemorraghic septicemia* dengan ciri utama timbulnya bercak merah pada permukaan tubuh ikan dan sering mengakibatkan kematian masal (Erawati, 2003). *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri berbentuk batang, bersifat motil dengan monotrichus flagella, termasuk bakteri gram negatif. Suhu optimum pertumbuhan bakteri ini 28°C dan dapat pula tumbuh pada suhu 37°C (Prabawati, 2004).

Upaya pengendalian penyakit bakterial dapat dilakukan dengan cara pencegahan dan pengobatan. Pencegahan dapat dilakukan melalui kegiatan untuk mempertahankan agar kualitas air selalu baik, karantina dan vaksinasi, namun upaya ini tidak mudah karena penyebaran bakteri di perairan sangat tinggi. Pengobatan dapat dilakukan dengan menggunakan antibiotik, namun pengobatan dengan antibiotik akan membawa efek samping jika digunakan dalam waktu yang lama, karena bakteri akan resisten terhadap antibiotik yang digunakan. Penggunaan antibiotik juga dapat mengganggu ekosistem perairan, serta harganya relatif mahal (Afrianto dan Liviawaty, 1992).

Pemanfaatan bahan-bahan alami yang ada di sekitar kita dapat dijadikan salah satu alternatif pengobatan untuk mengatasi penyakit ini. Jeruk lemon merupakan salah satu bahan alami yang dapat dimanfaatkan kulitnya. Kulit jeruk lemon mengandung minyak atsiri yang merupakan salah satu komponen tumbuhan yang bersifat antibakteri. Kandungan minyak atsiri pada kulit jeruk lemon lebih dari 2,5% dan hesperidin. Kulit jeruk lemon sering dikeringkan

menjadi bahan obat-obatan (Sarwono, 1991). Adanya senyawa aktif minyak atsiri pada kulit jeruk lemon diharapkan dapat digunakan sebagai obat antibakteri yang aman tanpa menimbulkan residu yang berdampak negatif sehingga dapat mengontrol pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada budidaya ikan air tawar.

## 1.1 Rumusan Masalah

Berdasarkan latar belakang masalah maka dapat dirumuskan masalah yaitu:

1. Apakah penggunaan ekstrak kulit jeruk lemon *(Citrus limonum)* dengan konsentrasi yang berbeda dapat menghambat dan membunuh bakteri *Aeromonas hydrophila*
2. Berapa konsentrasi minimum dari ekstrak kulit jeruk lemon yang dapat menghambat dan membunuh *Aeromonas hydrophila*

## 1.2 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk :

1. Mengetahui daya hambat ekstrak kulit jeruk lemon *(Citrus limonum)* dengan konsentrasi yang berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila.*
2. Mengetahui konsentrasi minimum dari ekstrak kulit jeruk lemon yang dapat menghambat dan membunuh *Aeromonas hydrophila*

## 1.3 Manfaat

Hasil penelitian ini diharapkan dapat menjadi bahan informasi yang bermanfaat tentang aktivitas ekstrak kulit jeruk lemon sebagai antibakteri terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* secara in vitro. Disamping itu dari hasil penelitian ini akan diperoleh konsentrasi optimal ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) sebagai obat berkhasiat dalam penanggulangan penyakit bakterial di lapangan.

# BAB II

# TINJAUAN PUSTAKA

## 2.1 Jeruk lemon (*Citrus limonum*)

### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Taksonomi jeruk lemon menurut Sarwono (1991) adalah sebagai berikut:

| | | |
|---|---|---|
| Filum | : | Spermatophyta |
| Sub filum | : | Angiospermae |
| Class | : | Dicotyledonae |
| Ordo | : | Dialypetales |
| Sub ordo | : | Rutales |
| Famili | : | Rutaceae |
| Genus | : | *Citrus* |
| Spesies | : | *Citrus limonum* Linne Fillius Burman |

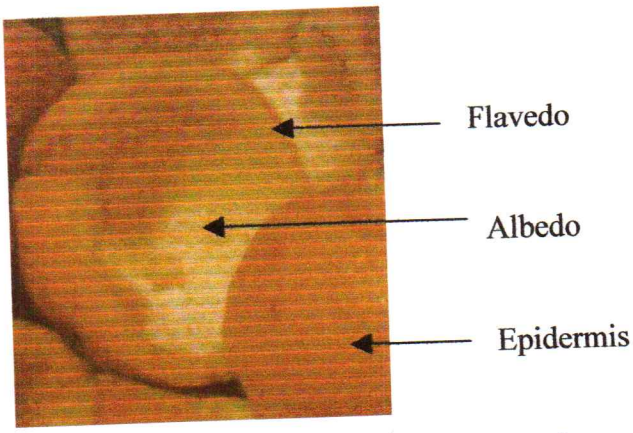
Jeruk sitrun asli atau lemon bentuknya bulat telur dan memiliki puting diantara kedua ujungnya, yang di Indonesia lebih dikenal dengan sebutan lemon susu daripada jeruk sitrus. Tanaman jeruk lemon merupakan tanaman perdu yang tingginya sekitar 2-3,5 m dengan diameter buah rata-rata 4,4-6,4 cm. Morfologi kulit jeruk lemon dan tanaman jeruk lemon dapat dilihat pada gambar 1.

Bagian-bagian utama jeruk lemon menurut Sarwono (1991) terdiri dari kulit yang tersusun atas epidermis, flavedo, kelenjar minyak dan ikatan pembuluh. Kulit jeruk dapat dibagi menjadi dua bagian utama yaitu flavedo (kulit bagian luar yang berbatasan dengan epidermis) dan albedo (kulit bagian dalam yang berupa jaringan busa). Flavedo sebagai lapisan kedua ditandai dengan adanya warna

hijau, kuning, oranye, kelenjar minyak dan tidak terdapat ikatan pembuluh. Pigmen yang terdapat pada flavedo adalah kloroplas dan karotenoid, dimana buah yang tadinya hijau sebelum matang menjadi berwarna oranye. Gambar bagian-bagian utama kulit jeruk dapat dilihat pada gambar 2.

Albedo merupakan jaringan yang berhubungan dengan core di tengah-tengah buah, seperti spon berwarna putih yang mengandung flavonoid dan tidak memiliki kloroplas. Albedo memiliki fungsi mensuplai air dan nutrisi dari pohon untuk pertumbuhan dan perkembangan buah. Bagian ini berwarna putih dimana bagian albedo banyak mengandung selulosa, hemiselulosa, lignin, senyawa pekat, hesteperiodes serta senyawa-senyawa limonum yang menyebakan timbulnya rasa pahit pada produk sari buah jeruk.

**Gambar 1. Morfologi kulit jeruk lemon dan tanaman jeruk lemon**




**Gambar 2. Bagian – bagian utama kulit jeruk lemon**

### 1.1.2 Habitat dan Kegunaan

Buah jeruk lemon tidak asing lagi di kalangan masyarakat Indonesia. Buah yang berasal dari India ini, di Indonesia tumbuh baik di dataran rendah sampai pegunungan dengan ketinggian 1.000 meter di atas permukaan laut. Tumbuhan ini dapat berbuah sepanjang tahun, asalkan keadaan tanahnya subur dan pengairannya cukup (Sarwono, 1991).

Menurut Sunarjono (2006), tanaman jeruk ini dapat tumbuh pada dataran rendah hingga tinggi pada suhu 20-30°C. Tanaman ini membutuhkan tanah yang subur, gembur serta mengandung banyak bahan organik dengan pH tanah antara 5-9.

Tanaman jeruk yang termasuk dalam famili Rutacea banyak mengandung senyawa metabolit sekunder yang bersifat sebagai bakterisida ataupun fungisida. Lemon dimanfaatkan sari buahnya untuk membuat minuman penyegar. Dibandingkan dengan buah-buahan yang lain seperti pisang, pepaya, semangka, juga jenis jeruk lain, kandungan vitamin C pada buah jeruk lemon sangat tinggi sehingga sangat baik untuk mengatasi skorbut (penyakit yang disebabkan

kekurangan vitamin C). Kegunaan jeruk lemon adalah sebagai anti-kanker, menurunkan kolesterol, mencegah pengerasan pembuluh darah, tekanan darah tinggi, batu empedu, memperlambat penuaan, menghilangkan flek-flek hitam, radang saluran nafas, gangguan pencernaan, gangguan lambung dan eksim, mengatasi skorbut/sariawan, mengembalikan fungsi pencernaan, menurunkan tekanan darah, antioksidan, antibacterial, antiseptik dan menurunkan panas (Anonymous, 2004). Pektin dapat menurunkan kolesterol dengan cara mengikat kolesterol dalam usus dan mendorong pengeluarannya. Lamonene sebagai anti oksidan, agen antikanker juga membantu mengatasi batu empedu dan batu ginjal dengan cara membantu melarutkan toksin dari hati dan ginjal (Anonimous, 2004a).

Kandungan nutrisi dan vitamin paling tinggi pada buah jeruk justru terdapat pada bagian kulit jeruk dibandingkan daging atau sari buah jeruk. Pada kulit jeruk terdapat bintik-bintik yang mengandung minyak atsiri yang biasa digunakan untuk bahan pewangi (Pracaya, 1998). Selain diperas minyak atsirinya, kulit jeruk lemon juga dikeringkan sebagai bahan obat-obatan. Di apotik dikenal dengan sebutan *Citri fructus cortex* EFI (Sarwono, 1991). Kulit jeruk sudah lama dikenal sebagai salah satu bahan obat tradisional di Cina yang disebut Qing Pi.

### 2.1.3 Komposisi Kimia

Komposisi kimia jeruk lemon terdiri dari pektin, minyak atsiri, 70% lemonene, alphaterpinene, beta-pinene, vitamin A, vitamin B, vitamin C, kalsium, fosfor, besi, serat protein, karbohidrat, lemak dan asam sitrat berkisar antara 7-8%.

Sarwono (1991) mengatakan bahwa kulit jeruk lemon mengandung minyak atsiri. Kulit buah jeruk lemon yang telah masak yang dikeringkan berupa pita atau potongan tipis. Kulit kering ini mengandung minyak atsiri lebih dari 2,5% dan hesperidin Minyak atsiri ini termasuk jenis minyak yang mudah menguap dan memiliki bau khas aromatik sesuai dengan tanaman penghasilnya, berwarna kuning pucat atau kuning kehijauan. Minyak ini mudah sekali bersenyawa dengan alcohol, eter, dan minyak lemak tapi sukar larut dalam air. Minyak kulit jeruk ini mengandung zat kimiawi sitral 4-8%, d-lemonen dan filadren sampai 90%, limon kamfer atau sitrapen sebanyak 2%. Terdapat pula aktiladehida, noniladehid, metilheptanon, linalilasetat, kadinen dan geranilasetat.

### 2.1.4 Kegunaan Sebagai Antimikroba

Pracaya (1998) menyatakan bahwa kandungan nutrisi dan vitamin pada jeruk paling tinggi justru terdapat pada bagian kulit dibandingkan daging atau sari buahnya. Pada kulit jeruk terdapat bintik-bintik mengandung minyak atsiri, yang digunakan sebagai antibakteri. Minyak atsiri umumnya larut dalam pelarut golongan alkohol seperti acetone, methanol, etanol, dan pelarut lainnya. Penggunaan pelarut etanol lebih sering digunakan karena relatif aman dan tidak menimbulkan toksisitas dengan kemampuan melarutkan bahan aktif yang maksimal (Tim Lentera, 2002).

Penelitian National Academi Science di AS juga membuktikan kulit jeruk dapat dimanfaatkan sebagai bahan makanan antikanker. Zat-zat pada kulit jeruk dapat mencegah kanker, mengurangi tekanan darah tinggi dan mencegah kebutaan karena lanjut usia (Felicia, 2000). Selain itu kulit jeruk ini dapat berfungsi

antioksidan, antibakterial, antiseptik dan menurunkan panas (Anonymous, 2004). Hasil penelitian sebelumnya juga menunjukkan bahwa ekstrak kulit jeruk lemon dapat digunakan sebagai antibakteri yaitu menghambat pertumbuhan bakteri *Vibrio harveyii* (Monang, 2005).

Menurut Sarwono (1991), kandungan minyak atsiri pada kulit jeruk yaitu sitral 4-8%, d-lemonen dan filadren sampai 90%, limon kamfer atau sitrapen sebanyak 2%, aktiladehida, noniladehid, metilheptanon, linalilasetat, kadinen dan geranilasetat. Senyawa-senyawa ini dapat digunakan sebagai antibakteri yang dapat merusak dinding sel mikroorganisme, mendenaturasi protein sel, menghambat kerja enzim dalam sel, menghambat biosintesis dinding sel, meninggikan permeabilitas membran sitoplasma dan mengganggu sintesis protein normal bakteri.

## 2.2 Bakteri *Aeromonas hydrophila*

### 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *Aeromonas hydrophila* menurut Volk and Wheeler (1993) adalah sebagai berikut :

| | | |
|---|---|---|
| Divisio | : | Protophyta |
| Class | : | Schizomycetes |
| Bangsa | : | Spirochaetales |
| Family | : | Vibrionaceae |
| Genus | : | *Aeromonas* |
| Spesies | : | *Aeromonas hydrophila* |

Bakteri *Aeromonas hydrophila* termasuk bakteri gram negatif yang mempunyai bentuk batang pendek dengan ukuran 0,3 x 1,0 – 3,5 μm, bergerak

inti (pembelahan biner). Beberapa sifat biokimia *Aeromonas hydrophila* dapat dilihat pada tabel 1.

**Tabel 1. Spesifikasi Uji Biokimia *Aeromonas hydrophila***

| Uji Biokimia | Hasil |
|---|---|
| Motilitas | + |
| Oksidase | + |
| Katalase | + |
| Lysine decarboxylase | bervariasi tiap spesies |
| Ornithin decarboxylase | - |
| Gelatine | + |
| Maltose | + |
| Laktose | bervariasi tiap spesies |
| Indol | + |
| Glukosa | + |
| Sukrosa | + |

Sumber : Holt and Noel, 1994

### 2.2.3 Habitat dan Penyebaran

Bakteri *Aeromonas hydrophila* umumnya hidup di air tawar yang mengandung bahan organik tinggi, di lingkungan yang bersuhu 15-30°C dengan pH 5-5,9 (Sitanggang, 2002). Bakteri ini juga ditemukan pada di habitat air payau, estuarin dalam jumlah yang banyak (Hayes, 2000). Menurut Jangkaru (2002), penyakit yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* menyerang berbagai jenis ikan air tawar dan banyak ditemukan pada insang dan kulit.

### 2.2.4 Infeksi dan Gejala Klinis

Di alam hubungan antara inang, bakteri patogen dan lingkungan (kualitas air) harus dalam keadaan seimbang. Bila terjadi gangguan antara ketiga faktor tersebut yang menyebabkan ketidakseimbangan, maka akan timbul suatu wabah

penyakit. Pada keadaan stress ikan berada pada tingkat kritis, sehingga mudah terpengaruh oleh faktor lingkungan yang tidak seimbang tersebut. Lingkungan yang tidak seimbang ini merupakan kondisi yang baik bagi pertumbuhan bakteri pathogen dan akan mengeluarkan jenis racun tertentu yang mempengaruhi kerja enzim dalam tubuh (Irawan, 2000).

*Aeromonas hydrophila* dapat menginfeksi berbagai spesies ikan air tawar dengan penyakit yang disebut MAS (*Motil Aeromonas Septicemia*) atau *Haemorraghic septicemia.* Menurut Kordi (2004), penularan bakteri ini dapat berlangsung melalui media air, kontak langsung dengan ikan terinfeksi, kontak dengan peralatan tercemar atau dapat juga karena pemindahan ikan yang telah terinfeksi dari satu tempat ke tempat lain. Ikan yang terserang menunjukkan gejala antara lain: berenang sangat lemah, muncul di permukaan air dan susah bernafas. Hayes (2000) menyatakan penyakit ini dikarakterisasi oleh adanya lesi-lesi kecil pada permukaan tubuh, warna tubuh menjadi gelap, kulit kasar, sisik lepas, pendarahan pada insang dan anus, perut menggembung. Secara internal, infeksi penyakit ini akan terjadi akumulasi cairan nanah, anemia, kerusakan organ terutama hati dan ginjal (Austin dan Austin, 1999).

## 2.3 Uji Efektifitas Antimikroba In Vitro

Beberapa bahan anti-mikrobial tidak membunuh tetapi hanya menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Oleh karena itu perlu diketahui uji pendahuluan berupa uji sensitivitas (*sensitivity test*) untuk menguji kepekaan bakteri terhadap zat antibakterial. Anti-mikroba adalah suatu zat yang mampu mengganggu pertumbuhan dan aktifitas metabolisme mikroba. Khusus untuk bakteri

dinamakan antibakteri. Mekanisme kerja antimikroba antara lain merusak dinding sel mikroorganisme, mendenaturasi protein sel dan menghambat kerja enzim dalam sel, menghambat biosintesis dinding sel, meninggikan permeabilitas membran sitoplasma, mengganggu sintesis protein normal bakteri (Pelczar dan Chan, 1998).

Secara umum antimikroba yang mempengaruhi pembentukan dinding sel atau permeabilitas membran sel bekerja bakteriosida sedangkan pada sintensis protein bekerja bakteriostatik. Istilah bakteriostatik digunakan bila zat antimikroba berfungsi menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan yang dapat membunuh bakteri disebut bakterisidal (Pelczar dan Chan., 1988).

Metode yang digunakan untuk mengetahui adanya aktivitas antimikroba suatu bahan adalah metode pengenceran (*dilution methode*). Metode ini digunakan untuk mengetahui *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) dari suatu bahan antimikroba terhadap pertumbuhan mikroba tertentu (Wistreich, 2003).

Prinsip metode ini adalah suatu seri pengenceran larutan dalam media pertumbuhan bakteri yang dimulai dari konsentrasi tinggi sampai konsentrasi rendah dimana bakteri dengan kepadatan tertentu diinokulasikan pada media pertumbuhan (Gillespie, 1994). Metode dilusi ini digunakan untuk menentukan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) dari suatu bahan antimikroba terhadap pertumbuhan mikroba tertentu. *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) adalah konsentrasi bahan antibakteri terendah (minimum) yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) adalah

konsentrasi bahan antibakteri terndah (minimum) yang mampu membunuh 99,9% inokulum bakteri (Finegold dan Baron, 1986 *dalam* Qosimah, 2005).

Menurut Gillespie (1994), pengujian ini mensuspensikan inokulum bakteri dengan kepadatan tertentu pada larutan antibakterial atau zat kimia yang diuji dengan konsentrasi tertentu kemudian diinkubasikan selama 24 jam dan selanjutnya diamati pertumbuhan bakteri. Apabila media keruh berarti bakteri tersebut masih tumbuh, tetapi bila media bening berarti media tidak tumbuh. Langkah selanjutnya adalah dengan menanamkan suspensi bakteri dalam larutan antibacterial ke dalam media tumbuh untuk melihat apakah larutan antibakterial yang diuji memiliki aktivitas membunuh bakteri. Diketahuinya MIC dan MBC maka dapat diperoleh konsentrasi yang dapat menghambat dan membunuh bakteri.

# BAB III

# KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

# BAB III

# KERANGKA KONSEPTUAL DAN HIPOTESIS

## 3.1 Kerangka Konseptual

Salah satu faktor yang dapat menyebabkan turunnya produksi perikanan budidaya air tawar adalah adanya serangan penyakit bercak merah yaitu Motil Aeromonas Septicemia (MAS) atau Haemorrhage Septicemia yang disebabkan oleh bakteri Aeromonas hydrophila. Penyakit ini menyerang semua jenis ikan air tawar. Serangan penyakit ini memang sulit terdeteksi karena sering tidak menunjukkan gejala-gejala tertentu. Ikan yang terinfeksi akan terlihat apabila mengalami stess (Irawan, 2004).

Upaya pengendalian penyakit bakterial dapat dilakukan dengan cara pencegahan dan pengobatan. Upaya pengobatan dilakukan dengan menggunakan antibiotik melalui penyuntikan, perendaman, atau dicampur dengan pakan. Antibiotik yang biasa digunakan adalah chloramphenicol, oxytetracyclin dan streptomycin (Afrianto dan Liviawaty, 1992), namun pengobatan dengan antibiotik akan membawa efek samping jika digunakan dalam waktu yang lama. Bakteri akan resisten terhadap antibiotik yang digunakan dan mengurangi ketahanan benih terhadap penyakit pada waktu ditebarkan, dapat juga mengganggu ekosistem perairan, serta harganya relatif mahal.

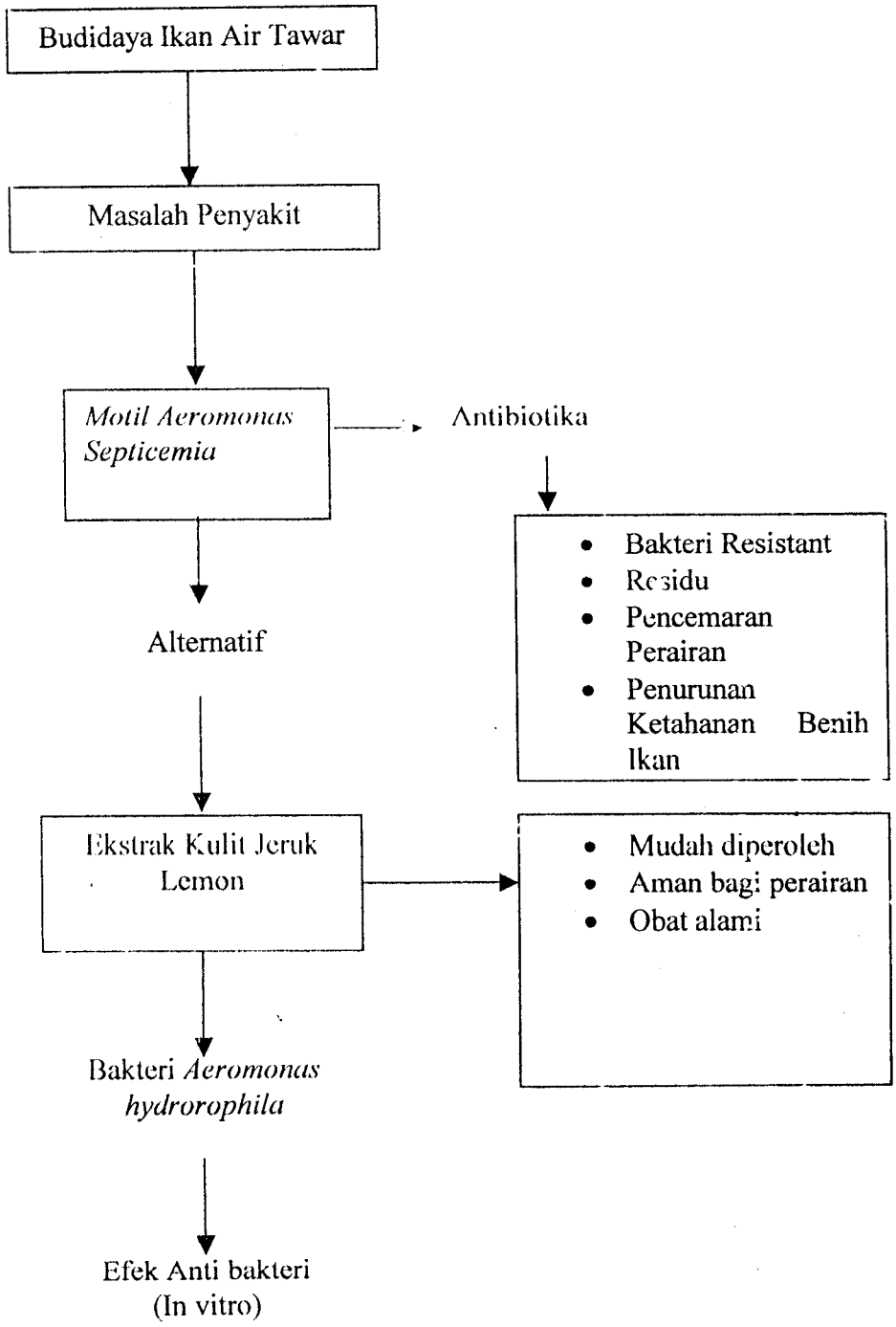
Salah satu cara yang dianggap aman untuk pengendalian penyakit ini adalah pemakaian obat alternatif yaitu menggunakan ekstrak tumbuh-tumbuhan. Bahan obat yang digunakan dalam penelitian ini adalah ekstrak kulit jeruk lemon. Jeruk lemon merupakan salah satu bahan alami yang mudah diperoleh dan aman

bagi perairan. Kulitnya mengandung minyak atsiri dimana atsiri dapat terdiri dari sitral 4-8%, d-lemonen dan filadren sampai 90%, limon kamfer atau sitrapen sebanyak 2%, aktiladehida, noniladehid, mentilheptanon, linalilasetat, kadinen, dan geranilasetat. Senyawa-senyawa ini dapat digunakan sebagai antibakteri yang dapat merusak sel mikroorganisme, mendenaturasi protein sel, menghambat kerja enzim sel, menghambat kerja enzim sel, meninggikan permeabilitas membran sitoplasma dan mengganggu sintesis protein normal bakteri (Sarwono, 1991).

Penelitian ini mencoba untuk memberikan perlakuan terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan pemberian ekstrak kulit jeruk lemon. Hasil penelitian diharapkan, ekstrak kulit jeruk lemon dapat menghambat atau membunuh bakteri bakteri *Aeromonas hydrophila* secara in vitro.

## 3.2 Hipotesis

Berdasarkan permasalahan dan tujuan maka dapat diajukan hipotesis bahwa ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) dapat menghambat pertumbuhan dan dapat membunuh bakteri *Aeromonas hydrophila*.




**Gambar 3. Bagan Kerangka Konseptual Penelitian**

# BAB IV

# METODOLOGI PENELITIAN

## 4.1 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Maret – April 2007 di Laboratorium Sanitasi dan Laboratorium Kimia Klinik di Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya, dan pembuatan ekstrak kulit jeruk lemon dilakukan di Laboratorium Fitokimia Fakultas Farmasi Universitas Airlangga Surabaya.

## 4.2 Materi Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian berupa isolat murni bakteri *Aeromonas hydrophila* yang diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Surabaya, kulit jeruk lemon, TSA (Tripticase Soya Agar), TSIA (Triple Sugar Iron Agar), NaCl fisiologis (PZ), Mc Farland 0.5, kristal violet, safranin, lugol, aquades, alkohol acetone.

Alat yang digunakan meliputi tabung reaksi, rak tabung reaksi, cawan Petri, pembakar Bunsen, ose, mikroskop, object glass, cover glass, autoclave, pipet ukur, pipet tetes, pengaduk, erlenmeyer, gelas ukur, neraca timbangan, incubator, spektrofotometer, rotaryvacuumevaporator.

## 4.3 Metode Penelitian

### 4.3.1 Rancangan Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil. Hasil yang akan di dapat

menegaskan bagaimana hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki dan seberapa besar hubungan sebab akibat tersebut, dengan cara memberikan perlakuan-perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan (Nazir, 1988).

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menguji daya antibakteri ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* secara in vitro. Uji yang digunakan dalam penelitian ini menggunakan metode pengenceran untuk mengetahui *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC). Penelitian terdiri dari sebelas perlakuan dengan tiga kali ulangan (Kusriningrum, 1989).

**4.3.2 Prosedur Kerja**

**A. Persiapan Penelitian**

**1. Sterilisasi alat dan bahan**

Menurut Hadioetomo (1990), sterilisasi adalah suatu proses untuk mematikan semua organisme yang terdapat pada atau dalam suatu benda. Peralatan yang akan digunakan dalam penelitian disterilisasi menggunakan autoclave selama 15 menit pada suhu $121^0$C.

**2. Pembuatan Ekstrak Kulit Jeruk Lemon**

Jeruk yang digunakan adalah jeruk ukuran konsumsi. Menurut Guenther (1990) dinding sel jeruk lemon tidak mudah pecah oleh karena itu dalam pembuatan ekstrak ini kulit harus dipotong-potong atau diblender agar bahan yang terkandung di dalamnya dapat keluar, nantinya bahan tersebut akan digunakan untuk antibakteri dalam melakukan penelitian kali ini.

Langkah-langkah pembuatan ekstrak kulit jeruk lemon adalah sebagai berikut: Kulit jeruk lemon dicuci bersih dari kotoran yang menempel dan dikeringkan, kemudian kulit jeruk ditimbang sebanyak 1 kilogram dan dikeringkan dibawah sinar matahari selama 2 hari. Jika kulit jeruk sudah kering dilanjutkan dengan penggilingan menggunakan blender hingga menjadi serbuk sebanyak 100 gram. Hasil gilingan dimaserasi menggunakan etanol selama 3 x 24 jam, kemudian saring (filtrasi) dengan kertas saring. Hasil filtrasi diuapkan dalam Rotary Vacuum Evaporator 40°C sampai menjadi pekat (ekstrak). Ekstrak kemudian diletakkan pada botol steril dan ditutup dengan aluminium foil. Hasil ekstrak murni dianggap konsentrasi awal 100% atau setara dengan 100 gram serbuk kulit jeruk lemon yang menghasilkan ekstrak sebanyak 20 ml. Ekstrak yang sudah jadi diencerkan kembali dua kali pengenceran sehingga didapat konsentrasi 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, dan 0,39%.

**3. Pembuktian Isolat Bakteri Aeromonas hydrophila.**

Isolat bakteri *Aeromonas hydrophila* diperoleh dari Laboratorium Kesehatan Surabaya. Sebelum digunakan bakteri dibiakkan terlebih dahulu pada media TSA dalam cawan Petri (Petridish). Media TSA yang telah diinokulasi bakteri diinkubasi pada suhu 27-28$^0$C selama 24 jam.

Pembuktian isolat dilakukan untuk lebih meyakinkan jenis bakteri yang akan dipakai dalam penelitian ini yaitu *Aeromonas hydrophila* melalui beberapa uji sebagai berikut:

1. Uji pewarnaan Gram

- Obyek glass dibersihkan dengan alkohol dan dipanaskan diatas api
- Jarum ose dipanaskan, kemudian diambil biakan bakteri dan diratakan diatas obyek glass yang telah ditetesi PZ.

- Fiksasi diatas Bunsen sampai kering
- Menetesi dengan kristal violet diamkan selama 2 menit
- Mencuci dengan air mengalir dan angin-anginkan sampai kering
- Menetesi dengan lugol dan diamkan 1 menit
- Mencuci dengan air mengalir dan angin-anginkan sampai kering
- Menetesi dengan alkohol aceton 10-20 detik hingga zat warna yang tersisa hilang.
- Mencuci dengan air mengalir dan keringkan
- Menetesi dengan safranin 30-60 detik.
- Mencuci dengan air mengalir dan angin-anginkan sampai kering
- Menetesi sediaan dengan minyak emersi.

Hasil pewarnaan diamati dibawah mikroskop perbesaran 1000x, jika warna bakteri terlihat merah/merah muda berarti bakteri bersifat Gram negatif (Erni dkk, 2005)

2. Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Digunakan untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan kemampuan memecahkan glukosa, laktosa, sukrosa dan pembebasan sulfida. Cara kerja adalah sebagai berikut : Mengambil biakan murni bakteri dengan jarum ose, kemudian memindahkan ke media TSIA secara goresan (slan) dan tusukan (butt) dan melakukan inkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam.

Hasilnya jika warna menjadi kuning (asam) acid =A. Warna merah (basa) atau alkaline=K. Bila pada tusukan terdapat rongga udara, berarti menghasilkan gas (G). Bila terdapat warna hitam berarti terdapat $H_2S$.

3. Uji MIO (Motility Indol Ornithin)

Uji ini untuk membedakan kemampuan enzimatik bakteri. Cara kerja adalah sebagai berikut : Mengambil biakan murni dengan jarum ose, kemudian menusukan jarum ose dengan posisi tegak ke dalam media dan melakukan inkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam

Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya pelebaran pada tusukan dikatakan motil, bila tidak ada pelebaran dikatakan nonmotil. Ditetesi dengan kovacs 2 tetes, bila timbul lapis atau cincin merah dikatakan indol negatif. Pada media MIO bila timbul warna kuning disekitar tusukan dikatakan ornithin positif, bila tidak ada berarti negatif.

4. Uji LIA (Lysine Iron Agar)

Uji ini untuk menentukan apakah bakteri mengandung Lysin Decarboxilase atau tidak. Cara kerja : Mengambil biakan dengan ose pindahkan ke media LIA dengan goresan dan tusukan dan melakukan inkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam.

Hasilnya bila warna menjadi ungu pada goresan, kuning pada tusukan berarti Lysin Decarboxilase positif. Warna menjadi ungu pada goresan dan ungu pada tusukan berarti negatif.

5. Uji gula-gula

Mengetahui kemampuan bakteri dalam mendegradasi gula menjadi asam organik. Cara kerja : Mengambil biakan murni dengan jarum ose, inokulasikan pada media gula (glikosa,sukrosa, laktosa) dan melakukan inkubasi pada suhu 27°C selama 24 jam

Hasil uji gula yaitu warna berubah menjadi kuning berarti gula terfermentasi (+). Warna tetap merah berarti gula tidak terfermentasi (-). Pada tabung Durham terdapat gelembung berarti bakteri tersebut menghasilkan gas.

## 4.4 Pelaksanaan Penelitian

### 4.4.1 Penyiapan ekstrak kulit jeruk lemon dengan berbagai konsentrasi

Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa pada konsentrasi 100%,50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78% dan 0.39% ekstrak kulit jeruk lemon dapat menghambat dan membunuh *Aeromonas hydrophila.*

Metode yang digunakan adalah metode dilusi dengan beberapa konsentrasi pengenceran. Larutan ekstrak kulit jeruk lemon dengan konsentrasi 100% didapatkan dengan mengambil 2 ml larutan ekstrak. Pengenceran konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon dilakukan dengan mempersiapkan 11 tabung. Cara kerjanya yaitu mengambil 1 ml larutan ekstrak konsentrasi 100% dari tabung pertama kemudian ditambah dengan 1 ml NaCl fisiologis untuk mendapatkan larutan 50%, selanjutnya diambil 1 ml larutan hasil (50%) dimasukkan dalam tabung reaksi yang baru dan ditambahkan 1 ml NaCl fisiologis sehingga diperoleh larutan konsentrasi 25%. Cara yang sama dilakukan untuk mendapatkan hasil pengenceran 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78% dan 0.39%. Pada pengenceran terakhir yaitu 0.39% larutan diambil 1 ml kemudian dibuang. Larutan sebagai kontrol positif (ekstrak kulit jeruk lemon) diisi dengan 1 ml NaCl fisiologis dan 1 ml ekstrak kulit jeruk lemon 100%, sedangkan kontrol negatif berisi 1 ml stok kuman dan 1 ml NaCl fisiologis. Jadi konsentrasi yang akan digunakan pada penelitian selanjutnya adalah 100%,50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%,

0.78% dan 0.39% Hasil pengenceran ekstrak kulit jeruk lemon diulang sebanyak tiga kali.

### 4.4.2 Penyiapan Suspensi Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Suspensi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang akan digunakan disetarakan terlebih dahulu dengan standar Mc Farland. Cara penyetaraannya yaitu dengan mengambil 4-10 koloni bakteri kemudian ditanam pada media Nutrien Broth (NB) dan diinkubasi 3-4 jam. Hasilnya disetarakan dengan Mc Farland 0.5, sehingga jumlah bakteri yang terdapat didalamnya diperkirakan sebanyak $10^8$ CFU/ml (Jang *et al*, 1978).

### 4.4.3 Penentuan Minimum Inhibitor Concentration (MIC)

MIC (Minimum Inhibitor Concentration) adalah konsentrasi hambat minimum dari suatu bahan yang mengandung zat atau senyawa antimikroorganisme, yang mana selain untuk efektivitas bahan juga merupakan tujuan dari pemberian obat yaitu untuk menghambat pertumbuhan bakteri (Edberg, 1986). Tahap pelaksanaan uji MIC adalah sebagai berikut:

- Menyiapkan tabung yang telah disterilkan sebanyak 11 buah.
- Membuat konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon sebanyak 2 ml dan dimasukkan pada tabung pertama.
- Mengisi sepuluh tabung reaksi dengan NaCl fisiologis masing-masing sebanyak 1 ml, sedangkan tabung pertama tanpa NaCl fisiologis.
- Pengenceran berseri dilakukan 9 kali dengan pemindahan sebanyak 1 ml ekstrak kulit jeruk lemon dari tabung pertama ke tabung kedua yang telah

berisi NaCl fisiologis, kemudian dihomogenkan. Hal yang sama dilakukan pada tabung kedua sampai kesembilan.

- Memasukkan 1 ml suspensi kuman pada tabung pertama hingga sepuluh yang telah disetarakan dengan Mc Farland 0.5.
- Tabung kesepuluh adalah kontrol negatif yang berisi 1 ml ekstrak kulit jeruk lemon dan 1 ml larutan NaCl fisiologis.
- Kemudian semua tabung diinkubasi pada suhu 27-28$^0$C selama 24 jam.
- Setelah 24 jam, melakukan pengamatan seluruh tabung reaksi terhadap kekeruhan media menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 540 nm dan pengamatan secara visual. Untuk uji MIC ini diambil konsentrasi yang mendekati kontrol positif sebagai konsentrasi minimum.

### 4.4.4 Penentuan Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

Uji MBC dilakukan untuk menetukan daya bakterisidal dari ekstrak kulit jeruk lemon. Tahap pelaksanaan uji MBC adalah sebagai berikut :

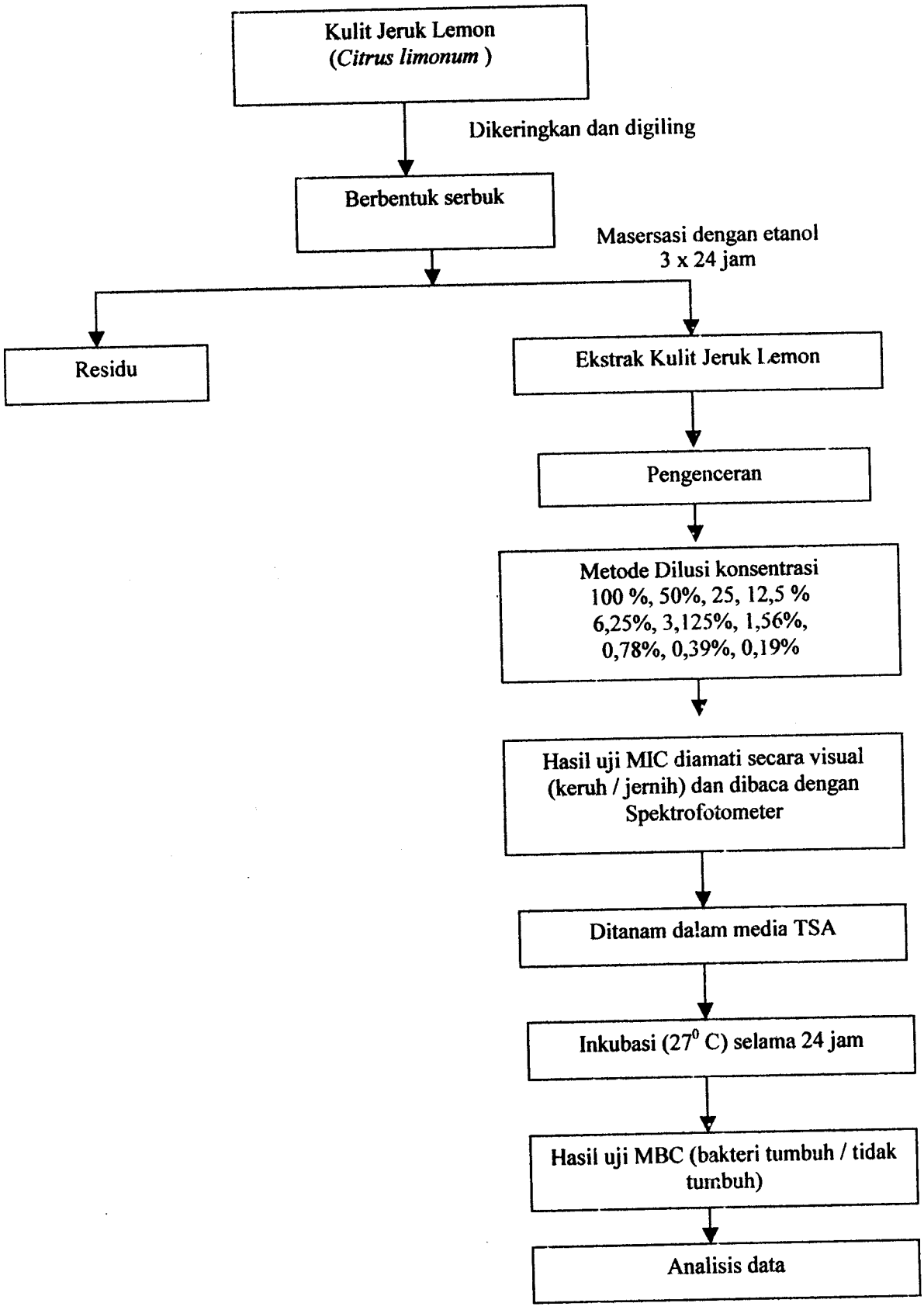
- Mengambil 1 ose dari masing-masing tabung hasil pengenceran MIC dan diinokulasi pada media agar TSA dalam petridish.
- Melakukan inkubasi selama 24 jam pada suhu 27-28$^0$C.
- Mengamati pertumbuhan bakteri pada medium TSA. Apabila pada medium agar teramati adanya pertumbuhan bakteri berarti ekstrak kulit jeruk lemon tidak bersifat bakterisidal, sedankan apabila tidak ada pertumbuhan bakteri berarti ekstrak kulit jeruk lemon bersifat bakterisidal.

### 4.4.5 Parameter Uji

Parameter uji menggunakan parameter kualitatif dan kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari tingkat kejernihan ekstrak kulit jeruk lemon pada uji MIC dan konsentrasi terendah pada uji MIC yang dapat menghambat bakteri. Parameter kualitatif diperoleh melalui pengamatan pertumbuhan bakteri di media TSA pada uji MBC.

### 4.4.6 Analisis Data

Hasil penelitian MIC dan MBC secara kualitatif akan dianalisis menggunakan analisis uji *Chi Square* sedangkan hasil MIC secara kuantitatif (nilai Optical Density (OD) dari spektrofotometer) diuji dengan uji F dan dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan.




**Gambar 4. Bagan Prosedur Kerja Secara Sistematis**

# BAB V

# HASIL DAN PEMBAHASAN

## 5.1 Hasil

### 5.1.1 Pembiakan Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah isolat murni yang diperoleh dari Balai Besar Laboratorium Kesehatan Surabaya. Isolat bakteri yang akan digunakan untuk penelitian, dibiakkan pada media TSA (*Trypticase Soya Agar*) yang merupakan media umum atau media non selektif yang digunakan untuk isolasi dan kultur bakteri. Pada media TSA, bakteri membentuk koloni bulat berwarna kuning pucat, menyebar dengan koloni cembung dan mengkilap.

### 5.1.2 Identifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Identifikasi bakteri dilakukan untuk memastikan kebenaran identitas bakteri *Aeromonas hydrophila*. Metode yang digunakan untuk identifikasi bakteri yaitu melalui pengamatan secara mikroskopik menggunakan pewarnaan gram serta pengujian sifat biokimia dari bakteri *Aeromonas hydrophila*. Uji biokimia dilakukan sebelum penggunaan bakteri untuk uji MIC. Hasil pengamatan identifikasi bakteri dapat dilihat pada tabel 2.

Berdasarkan hasil uji biokimiawi diketahui bahwa TSIA bersifat asam/alkali, motil, memproduksi indol, Lysin decarboksilase positif serta memproduksi gas dari glukosa. Hasil tersebut menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah isolat murni *Aeromonas hydrophila*.

**Tabel 2. Hasil Uji Biokimia Bakteri *Aeromonas hydrophila***

| Parameter | Hasil |
|---|---|
| Motilitas | + |
| TSIA | A/K, gas+, $H_2S$+ |
| Indol | + |
| Lysin decarboksilase | + |
| Ornithin | - |
| Arginin | - |
| Hemolisin | + |
| Glukosa | + |
| Laktosa | - |
| Sukrosa | + |

Keterangan: A/K = Asam/Alkali
+ = positif
- = negatif

### 5.1.3 Ekstrak Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limonum*)

Ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) didapatkan dari 100 gram bahan kering kulit jeruk lemon dan menghasilkan larutan ekstrak sebanyak 20 ml. Ekstraksi minyak atsiri ini didapatkan dengan menggunakan pelarut alkohol 96% (etanol). Hasil ekstraksi berbentuk kental dan berwarna coklat gelap.

### 5.1.4 Hasil Uji *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC)

Pengamatan uji MIC dilakukan dengan cara melihat kekeruhan secara visual pada semua tabung reaksi dengan berbagai konsentrasi pengenceran (kualitatif) dan dengan mengukur kekeruhan sampel menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 540 nm (kuantitatif). Pengamatan dilakukan setelah inkubasi selama 24 jam pada suhu 27-28°C.

Hasil uji MIC secara visual diperoleh bahwa ekstrak kulit jeruk lemon mempunyai aktivitas menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila* Hasil pengamatan uji MIC secara visual dapat dilihat pada tabel 3.

**Tabel 3. Hasil Pengamatan Uji MIC Secara Visual**

| Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon (%) | Ulangan ke-1 | Ulangan ke-2 | Ulangan ke-3 |
|---|---|---|---|
| 100 | Keruh | Keruh | Keruh |
| 50 | Keruh | Keruh | Keruh |
| 25 | Keruh | Keruh | Keruh |
| 12.5 | Keruh | Keruh | Keruh |
| 6.25 | Keruh | Keruh | Keruh |
| 3.12 | Jernih | Jernih | Jernih |
| 1.56 | Jernih | Jernih | Jernih |
| 0.78 | Jernih | Jernih | Jernih |
| 0.39 | Jernih | Jernih | Jernih |
| Kontrol (-) | Jernih | Jernih | Jernih |
| Kontrol (+) | Keruh | Keruh | Keruh |

Berdasarkan hasil uji MIC dengan pengamatan secara visual menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak 6.25% sampai 100% pada ulangan 1,2 dan 3 tabung reaksi terlihat keruh. Konsentrasi 0.39% sampai 3.12% tabung reaksi ini terlihat jernih. Hasil pengamatan secara visual tersebut menunjukkan bahwa konsentrai minimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yaitu konsentrasi 0.39%. (Gambar hasil pengamatan uji MIC disajikan pada Lampiran 2 )

Pengamatan uji MIC dilanjutkan dengan pengukuran secara kualitatif dengan mengukur kekeruhan menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 540 nm sehingga akan diperoleh *optical density* (OD) atau nilai absorbansi. Hasil uji MIC secara visual ini harus dibandingkan

dengan hasil spektrofotometer, dan untuk mengetahui konsentrasi minimum hasil uji MIC adalah dengan melihat nilai OD dari konsentrasi berapa yang mendekati nilai OD kontrol positif. Hasil nilai OD uji MIC dapat dilihat pada tabel 4.

**Tabel 4. Hasil Uji MIC dengan pengukuran menggunakan Spektrofotometer**

| Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon (%) | Nilai OD | | | Rata-rata |
|---|---|---|---|---|
| | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Ulangan 3 | |
| 100 | 0.841 | 0.650 | 0.677 | 0.723 [a] |
| 50 | 0.788 | 0.614 | 0.697 | 0.700 [a] |
| 25 | 0.401 | 0.470 | 0.503 | 0.458 [b] |
| 12.5 | 0.210 | 0.272 | 0.275 | 0.252 [c] |
| 6.25 | 0.285 | 0.238 | 0.232 | 0.252 [c] |
| 3.12 | 0.266 | 0.168 | 0.183 | 0.206 [cd] |
| 1.56 | 0.192 | 0.143 | 0.119 | 0.151 [cde] |
| 0.78 | 0.190 | 0.142 | 0.084 | 0.139 [de] |
| 0.39 | 0.133 | 0.090 | 0.063 | 0.095 [e] |
| Kontrol (-) | 0.029 | 0.015 | 0.025 | 0.023 |
| Kontrol (+) | 0.695 | 0.689 | 0.752 | 0.712 |

Keterangan : notasi pada superskrip yang berbeda menunjukkan perbedaan yang nyata ($p < 0.05$)

Hasil pembacaan spektrofotometer yang berupa nilai OD pada ulangan 1, 2 dan 3 pada konsentrasi 100% sampai dengan konsentrasi 6.25% menunjukkan nilai OD yang mendekati nilai OD kontrol positif, sedangkan pada konsentrasi 3.12% sampai pada konsentrasi 0.39% menunjukkan nilai OD yang mendekati nilai OD kontrol negatif. Konsentrasi minimum larutan ekstrak yang mempunyai nilai OD mendekati nilai OD kontrol positif adalah konentrasi 0.39.

Hasil analisis sidik ragam (Lampiran 3) dapat diketahui bahwa perlakuan berbagai konsentrasi larutan pengenceran (Fhitung = 67.349956) lebih besar dari Ftabel (0.01 dan 0.05), jadi antar perlakuan menunjukkan perbedaan yang nyata dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*.

Perlakuan analisis sidik ragam ini dilanjutkan dengan uji jarak berganda Duncan untuk mengetahui perlakuan mana yang memberikan perlakuan terbaik. Berdasarkan penghitungan uji jarak berganda Duncan, didapatkan notasi dengan pengertian sebagai berikut: perlakuan dengan konsentrasi 100% (notasi a) memberikan pengaruh perlakuan yang tidak berbeda nyata dengan konsentrai 50% (notasi a). Konsentrasi 50% memberikan pengaruh perlakuan yang berbeda nyata dengan konsentrasi 25% (notasi b). Konsentrasi 25% memberikan pengaruh yang berbeda nyata dengan konsentrai 12.5% (notasi c). Konsentrasi 12.5% memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata dengan konsentrai 6.25% (notasi c).

Konsentrasi 6.25% memberikan pengaruh perlakuan yang tidak berbeda nyata dengan konsentrai 3.12% (notasi cd) dan konsentrai 3.12% ini memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 1.56% (notasi cde). Konsentrasi 1.56% memberikan pengaruh perlakuan yang tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 0.78% (notasi de) dan konsentrai 0.78% memberikan pengaruh perlakuan yang tidak berbeda nyata dengan konsentrasi 0.39% (notasi e). Hasil penghitungan uji F dan uji jarak berganda Duncan ini dapat diketahui bahwa konsentrasi minimum dari uji MIC yaitu 0.39%. Hasil penghitungan uji F dan uji jarak berganda Duncan dapat dilihat pada Lampiran 3.

### 5.1.5 Hasil Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Uji MBC dilakukan untuk mengetahui pada konsentrasi berapa ekstrak bersifat membunuh bakteri (bakterisidal). Pengamatan hasil uji MBC dilakukan setelah menanam (inokulasi) seluruh tabung hasil uji MIC pada media TSA dan

diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 27-28$^0$C. Pada hasil uji MBC dapat diketahui bahwa pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12% dan 1.56% ekstrak kulit jeruk lemon bersifat bakterisidal. Ini dibuktikan dengan tidak tumbuhnya bakteri pada media TSA, sehingga dari hasil uji MBC diperoleh konsentrasi minimum yang bisa membunuh bakteri adalah konsentrasi 1.56%. Hasil Pengamatan Uji MBC dapat dilihat pada tabel 5.

**Tabel 5. Hasil Pengamatan Uji MBC**

| Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon (%) | Pertumbuhan Koloni Bakteri | | |
|---|---|---|---|
| | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Ulangan 3 |
| 100 | - | - | - |
| 50 | - | - | - |
| 25 | - | - | - |
| 12.5 | - | - | - |
| 6.25 | - | - | - |
| 3.12 | - | - | - |
| 1.56 | - | - | - |
| 0.78 | + | + | + |
| 0.39 | + | + | + |
| Kontrol (-) | + | + | + |
| Kontrol (+) | - | - | - |

Keterangan : (-) = tidak ada pertumbuhan koloni bakteri
(+) = ada pertumbuhan koloni bakteri

Pengamatan uji MBC dilanjutkan dengan uji *Chi-Square*. Uji *Chi-Square* menunjukkan bahwa tidak terdapat perbedaan yang nyata pada ketujuh konsentrasi (konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, dan 1.56%). Dengan demikian maka pada ketujuh konsentrasi tersebut tidak mempunyai perbedaan pengaruh dalam membunuh bakteri (bakterisidal), sehingga hasil MBC

didapatkan konsentrasi minimum yaitu 1.56%. Hasil uji Chi Square disajikan pada Lampiran 4.

**5.2 Pembahasan**

Identifikasi bakteri dilakukan dengan metode pewarnaan gram. Uji ini dilakukan untuk mengetahui bentuk sel *Aeromonas hydrophila* dan mengetahui bakteri tersebut termasuk bakteri gram positif atau negatif. Hasil uji pewarnaan gram, pada biakan bakteri *Aeromonas hydrophila* menunjukkan bahwa bakteri tersebut termasuk dalam bakteri gram negatif yang diindikasikan dengan warna kemerahan dan bentuk batang. Warna kemerahan yang terlihat disebabkan oleh dinding sel memberikan respon terhadap pewarna yang diberikan.

Pelczar dan Chan (1986) mengemukakan bahwa dinding sel bakteri Gram negatif tipis (10-15nm) dan kandungan lipidnya rendah (1-14%) sehingga pada saat pencucian dengan alkohol, lipid terekstrasi dari dinding sel, pori-pori mengembang akibatnya kompleks ungu kristal violet keluar dari sel dan tidak berwarna. Sel menyerap zat pewarna kedua yaitu safranin sehingga berwarna kemerahan.

Identifikasi bakteri dilakukan dengan uji biokimiawi untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah isolat murni *Aeromonas hydrophila.* Hasil uji MIO dapat diketahui bahwa bakteri tersebut motil yang ditandai dengan adanya pelebaran pada tusukan, dari uji MIO juga dapat diketahui bahwa bakteri dapat memproduksi indol. Uji TSIA bertujuan untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan kemampuan memecahkan glukosa, laktosa dan sukrosa yang menunjukkan warna menjadi kuning (asam/acid=A dan warna merah (alkali=K),

jadi uji TSIA bersifat asam/alkali, dapat memecahkan glukosa, laktosa dan sukrosa. Bakteri dapat memproduksi gas dari glukosa, dapat mendegradasi gula menjadi asam organik, yang ditandai dengan adanya rongga udara pada tusukan. Menurut Austin dan Austin (1999), *Aeromonas hydrophila* dapat menfermentasikan glukosa dan sukrosa, sesuai dengan sifat biokimia dari Aeromonas hydrophila. Berdasarkan hasil uji biokimia maka dapat diketahui bahwa bakteri yang digunakan adalah isolat murni *Aeromonas hydrophila.*

Ekstrak kulit jeruk lemon yang dihasilkan berbentuk kental dan berwarna coklat gelap. Faktor warna yang dihasilkan dapat dipengaruhi oleh bahan-bahan yang dibuat ekstrak. Warna coklat gelap didapatkan dari hasil kulit jeruk yang telah dikeringkan. Minyak atsiri yang diperoleh dari hasil ekstrak dapat dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu : ukuran bahan yang diekstrak, waktu perendaman dengan pelarut, temperatur dan jenis pelarut (Sundari, 2001). Ukuran bahan yaitu banyaknya kulit jeruk yang diekstrak sebanyak 100 gram sehingga dihasilkan 20 ml ekstrak, jadi semakin besar ukuran jeruk semakin banyak ekstrak yang akan diperoleh. Waktu perendaman dengan pelarut yang digunakan yaitu 3X24 jam dalam suhu ruang antara 27–32°C, hal ini sesuai dengan Monang (2005). Perolehan minyak atsiri tertinggi didapat dengan penggunaan pelarut etanol, oleh karena itu penelitian menggunakan pelarut etanol (Sundari, 2001).

Hasil uji MIC, pada konsentrasi ekstrak 100% yang berisi larutan murni 100% larutan ekstrak kulit jeruk lemon ditambah 1ml NaCl fisiologis menunjukkan kekeruhan yang paling tinggi. Berdasarkan teori sebelumnya, bila pada konsentrasi tertentu larutan terlihat keruh berarti konsentrasi tersebut tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Larutan ekstrak sebagai media tumbuh

bakteri keruh maka dapat dikatakan terdapat pertumbuhan bakteri. Sebaliknya, larutan jernih berarti tidak terdapat pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini, konsentrasi 12,5% - 100% dimana konsentrasi ekstrak tinggi yang seharusnya larutan jernih, namun larutan terlihat keruh. Kekeruhan yang terjadi bukan berarti pada konsentrasi ini ekstrak tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri, karena pada konsentrasi ekstrak lebih rendah (0,39 - 6,25%) larutan terlihat jernih sehingga dapat dikatakan mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Kekeruhan ini dapat disebabkan karena semakin pekatnya larutan ekstrak kulit jeruk lemon pada konsentrasi 100% sehingga semakin besar konsentrasi ekstrak maka larutan semakin keruh.

Dwijoseputro (1989) menyatakan bahwa pekat encernya konsentrasi larutan (obat) merupakan salah satu faktor yang mempengaruhi daya hambat pertumbuhan bakteri dan juga mempengaruhi daya bunuh terhadap bakteri tersebut. Hasil pengamatan secara visual menunjukkan konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, dan 6.25% terlihat sangat keruh namun mendekati kekeruhan pada kontrol positif yang berisi ekstrak kulit jeruk lemon. Dapat disimpulkan bahwa konsentrasi 0.39% merupakan konsentrasi minimum ekstrak kulit jeruk lemon yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Secara visual, larutan pada konsentrasi tersebut terlihat jernih dan mempunyai nilai OD yang paling minimum yang mendekati kontrol negatif.

Hasil pembacaan spektrofotometer menunjukkan pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5% dan 6.25% menunjukkan nilai OD yang mendekati nilai OD kontrol positif, sehingga dianggap mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Tabel 4). Berdasarkan hasil perbandingan uji MIC secara visual dan

spektrofotometer maka dapat diketahui bahwa konsentrai minimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri adalah konsentrasi 0.39%. Semakin rendah konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon nilai OD semakin menurun, padahal dengan menurunnya konsentrasi ekstrak maka pertumbuhan bakteri akan semakin meningkat.

Perbandingan pengamatan visual dengan hasil pengukuran nilai OD dapat diketahui bahwa pada konsentrasi 0.39% mempunyai nilai OD rata-rata sebesar 0.095, maka didapatkan nilai OD yang efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri menggunakan ekstrak kulit jeruk lemon adalah mulaipada nilai OD 0.095 keatas. Nilai OD diatas 0.095 berarti konsentrasi ekstrak semakin tinggi sehingga semakin efektif untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan hasil tersebut dapat disimpulkan bahwa semakin jernih larutan maka nilai OD juga semakin rendah dan sebaliknya semakin keruh larutan maka nilai OD juga semakin tinggi. Hal ini disebabkan karena nilai OD yang terbaca spektrofotometer merupakan nilai banyaknya partikel yang terserap oleh spektrofotometer, dalam hal ini adalah partikel-partikel dari ekstrak kulit jeruk lemon dan partikel dari bakteri *Aeromonas hydrophila.*

Perlakuan dari konsentrasi pengenceran (100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%) pada ekstrak kulit jeruk lemon memberikan pengaruh sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila.* Uji berjarak Duncan dilakukan untuk mengetahui perlakuan yang memberikan pengaruh terbaik. Penghitungan uji ini dapat diketahui bahwa perlakuan dengan konsentrasi 100% (notasi a) memberikan pengaruh terbaik yang tidak berbeda nyata dengan dengan konsentrasi 50% (notasi a). Pengaruh perlakuan yang tidak berbeda nyata ini

dapat disebabkan oleh berbagai faktor yaitu faktor kepekaan dari bakteri terhadap ekstrak kulit jeruk lemon. Hal ini disebabkan pada konsentrasi yang rendah bakteri mempunyai kecenderungan berada pada kisaran ketahanan yang sama terhadap antimikroba. Zat aktif antibakteri dari ekstrak kulit jeruk lemon semakin meningkat sebanding dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak pada tiap perlakuan.

Uji MBC dilakukan untuk mengetahui daya bunuh ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. Media TSA pada konsentrasi 0.39% sampai 0.78% diamati terdapat pertumbuhan bakteri, sedangkan pada konsentrasi 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12% dan 1.56% tidak teramati adanya pertumbuhan koloni bakteri pada media TSA. Tidak adanya pertumbuhan bakteri pada media TSA tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kulit jeruk lemon efektif untuk membunuh bakteri *Aeromonas hydrophila* (bersifat bakterisidal), jadi konsentrasi minimum yang dapat membunuh bakteri adalah konsentrasi 1.56%.

Konsentrasi 1.56% dan 3.12% ini pada pengamatan visual terlihat jernih dapat disebabkan oleh tidak adanya pertumbuhan bakteri, sedangkan konsentrasi 6.25% sampai 100% walaupun pada pengamatan visual terlihat keruh dapat disebabkan oleh pekatnya partikel ekstrak, namun konsentrasi ini dapat membunuh bakteri. Ini menunjukkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon maka semakin tinggi pula jumlah bakteri yang akan terbunuh. (Pelczar dan Chan, 1986).

Uji *Chi-Square* menunjukkan bahwa pada konsentrasi 100% - 1.56% tidak mempunyai perbedaan pengaruh dalam membunuh bakteri (bakterisidal). Hal ini

dapat diartikan bahwa penggunaan konsentrasi ekstrak baik 100% maupun 1.56%tidak memberikan perbedaan pengaruh dalam membunuh bakteri, jadi konsentrasi mana yang digunakan akan mampu membunuh bakteri *Aeromonas hydrophila.*

Secara umum antimikroba bekerja dengan cara menghambat biosintesis dinding sel, meninggikan permeabilitas membran sitoplasma dan mengganggu sintesis protein normal bakteri. Antimikroba yang mempengaruhi pembentukan dinding sel atau permeabilitas membran sel bekerja bakteriosid sedangkan pada sintesis protein, antimikroba bekerja bakteriostatik (Pelczar dan Chan, 1986).

Ekstrak kulit jeruk lemon mengandung senyawa minyak atsiri yang dapat membunuh bakteri *Aeromonas hydrophila.* Menurut Sarwono (1991), kandungan minyak atsiri terdapat zat aktif utama yang memiliki aktivitas antimikroba antara lain : sitral 4-8%, d-lemonen dan filadren 90%, limon kamfer atau sitrapen sebanyak 2%, aktiladehida, noniladehid, methilheptanon, linalilasetat, kadinen dan geranilasetat. Sitral adalah golongan aldehid, yang menghambat pertumbuhan mikroba dengan cara inaktivasi beberapa enzim melalui alkilasi gugus nukleofildan denaturasi protein. Senyawa-senyawa tersebut terbukti dapat memberikan pengaruh terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila.*

Adanya kandungan asam sitrat pada ekstrak kulit jeruk lemon akan menyebabkan protein mengalami denaturasi yang didahului dengan perubahan struktur molekulnya, dimana akan menyebabkan protein tidak dapat melakukan fungsinya sehingga sel bakteri akan mengalami kematian.

Bagian kulit jeruk bagian dalam yang berupa jaringan busa ini banyak mengandung flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa polifenol mempunyai sifat khas sebagai pengendap protein dan mudah terurai dalam asam (Manitto, 1992) *dalam* Windyaanita, 2006). Banyak senyawa dari golongan flavonoid yang mudah larut dalam air terutama glikosidanya, bahkan senyawa yang hanya larut dalam air kepolarannya memadai untuk diekstraksi dengan baik menggunakan pelarut etanol, methanol/aceton.

Konsentrasi ekstrak kulit jeruk lemon yang tinggi antara 1.56% sampai 100% terdapat kandungan flavonoid yang tinggi pula, akan mendenaturasi protein dinding sel dan mampu menembus ke dalam sel sehingga bagian dalam sel (sitolasma) yang berisi protein akan mengalami kerusakan. Hal ini sesuai dengan Robinson (1995) yang menyatakan bahwa senyawa flavonoid pada konsentrasi tinggi akan menyebabkan denaturasi protein dan kadar lebih tinggi bisa menyebabkan koagulasi protein.

Menurut Tanu (1972), dalam konsentrasi 1 fenol : 500 pelarut, fenol bersifat bakteriostatik. Larutan dengan konsentrasi 1% bersifat bakterisidal yang dapat mengadakan koagulasi protein. Ikatan fenol dengan protein tidak erat dan mudah lepas, sehingga fenol dapat mengadakan penetrasi ke dalam kulit. Pada konsentrasi 0,1-2% fenol dapat merusak sitoplasma yang menyebabkan bocornya metabolit penting yaitu substansi atau nutrient yang diperlukan oleh bakteri berupa vitamin dan asam amino.

Senyawa fenol dan turunannya flavonoid merupakan salah satu anti bakteri yang bekerja dengan mengganggu fungsi membran sitoplasma. Sebagai zat antibakteri, flavonoid menghambat pertumbuhan bakteri dengan merusak dinding

sel dan membran sitoplasma bakteri serta mencegah pembelahan bakteri sehingga menyebabkan bakteri tidak dapat berkembang biak (Robinson, 1995). Pada kondisi rendah dapat merusak membran sitoplasma yang dapat menginaktifkan sistem enzim bakteri, sedangkan pada konsentrasi tinggi mampu merusak membran sitoplasma dan mengendapkan protein sel sehingga bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan dan bahkan kematian (Volk dan Wheeler, 1993).

Senyawa aktif flavonoid mempunyai kemapuan untuk membentuk kompleks dengan protein melalui ikatan hidrogen. Struktur dinding sel dan membran sitoplasma yang mengandung protein menjadi tidak stabil karena struktur menjadi rusak karena ikatan hydrogen dengan flavonoid sehingga protein kehilangan struktur biologinya. Akibatnya fungsi permeabilitasnya terganggu dan sel bakteri akan mengalami lisis yang berakibat pada kematian sel (Harbourne, 1987).

Menurut Kimbal (1992), flavonoid menyebabkan tidak berfungsinya $Na^+$ dan $K^+$ pada sel bakteri dimana keadaan ini menyebabkan ion sodium tertahan didalam sel sehingga terjadi perubahan kepolaran pada plasma sel yang diikuti dengan masuknya air yang tidak terkontrol di dalam sel. Hal ini menyebabkan sel membengkak dan akhirnya pecah. Pecahnya membran inilah yang meyebabkan kematian bakteri.

Parameter lingkungan yang harus diperhatikan untuk menunjang kehidupan bakteri diantaranya adalah pH dan suhu. Suhu inkubator pada penelitian ini menggunakan suhu ruang yaitu 27 - 28°C. Menurut Hayes (2000), *Aeromonas hydrophila* dapat tumbuh dengan baik pada suhu 22 - 28°C.

*Aeromonas hydrophila* termasuk dalam kelompok bakteri mesophilik yaitu bakteri yang dapat hidup pada suhu antara 25 - 40°C, sedangkan suhu maksimum untuk pertumbuhannya adalah 38 - 41°C (Pelczar dan Chan, 1986). Jadi dapat disimpulkan bahwa suhu yang digunakan untuk penelitian masih berada pada kisaran yang layak bagi pertumbuhan bakteri. Derajat keasaman (pH) juga mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Hasil pengukuran pH pada media dengan kertas lakmus menunjukkan pH media adalah 6.9. Menurut Pelczar dan Chan (1986), pH optimum bagi bakteri umumnya adalah 6.8-7.2, jadi pH pada media masih berada pada kisaran yang layak untuk pertumbuhan bakteri. Bakteri patogen akan tumbuh dengan baik pada pH netral (pH 7.00) atau agak basa (pH 7.40). Apabila bakteri berada pada kondisi asam sedangkan kisarannya tidak memungkinkan, maka pertumbuhannya akan terhambat. Bakteri juga peka terhadap pH basa akan tetapi efek secara umum tidak merusak dibandingkan dengan pH asam (Dwidjoseputro, 1989).

# BAB VI

# KESIMPULAN DAN SARAN

## 6.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian tentang efektivitas ekstrak kulit jeruk lemon terhadap daya hambat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*, maka dapat diambil kesimpulan sebagai berikut :

1. Ekstrak kulit jeruk lemon dapat menghambat pertumbuhan dan membunuh bakteri *Aeromonas hydrophila.*
2. Konsentrasi minimum ekstrak kulit jeruk lemon yang bersifat bakteriostatik dari uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) terhadap *Aeromonas hydrophila* adalah 0.39% atau 0,01953 gram ekstrak /ml pelarut. Konsentrasi minimum ekstrak kulit jeruk lemon yang bersifat bakterisida dari uji MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*) terhadap *Aeromonas hydrophila* adalah 1.56% atau 0,07812 gram ekstrak/ml pelarut.

## 6.2 Saran

1. Perlu dilakukannya penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak kulit jeruk lemon terhadap ikan yang yang terinfeksi *Aeromonas hydrophila* (secara *in vivo*) sehingga dapat dijadikan informasi dasar dalam penerapan obat alternatif di lapangan.
2. Perlu dilakukannya aplikasi dilapangan untuk membunuh *Aeromonas hydrophila* pada ikan terinfeksi dengan penggunaan ekstrak kulit jeruk lemon dengan konsentrasi 1.56% atau 0.07812 gram ekstrak/ml pelarut.

# DAFTAR PUSTAKA


Anonymous. 2004a. Sehat dengan Jeruk Lemon. Http://www.dnet.net.id/kesehatan/kiatalami/detail/.php?id=640

_____. 2004b. *Citrus limonum.* Http://www.botanical_online.com/medicalslimonangles.htm

_____. 2004c. *Antibodies and Bacteria Diseases.* Http://www.fishdoc.co.uk/treatments/antibiotics.htm

Afrianto, E, dan Liviawati. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 89 halaman.

Austin. B., D.A Austin. 1999. Bacterial Fish Pathogens: *Disease of Farmed Add Wildfish* (Third Revised Edition). Proxis Publishing Ltd. Chichester. England. 457 hal.

Dwidjoseputro, D. 1989. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan. Jakarta. 125 halaman.

Edberg, S.C. 1986. Antibiotika dan Infeksi (*Antibiotics and Invections*). Alih Bahasa Chandra Sanusi. Churchill Livingstone Inc. New York. 211 hal.

Erawati. C.I. 2003. Pengaruh Pemberian Perasan Kasar Daun Pepaya (*Carica papaya l*) Dengan Dosis Yang Berbeda Terhadap Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Terinfeksi *Aeromonas hydrophila.* Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.

Erni R.S.I., D. Handijanto, W. Tyaningsih. 2005. Penuntun Praktikum Mikrobiologi Veteriner I Program S-1 Departemen Pendidikan dan Kebudayaan. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Felicia. 2000. Sari Kulit Jeruk. Http://www.Bpkpenabur.or.id/jelajah/u3n8/14.pdf.

Gillespie, S.H. 1994. *Medical Microbiology Illustrated.* Butterworth-Heineman. London.

Guenther, E. 1990. Minyak Atsiri. Jilid 1. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.

Hadioetomo. R. S. 1990. Mikrobiologi Dasar dalam Praktek. PT Gramedia. Cetakan Kedua. Jakarta.

Harborne, J. B. 1987. Metode Fitokimia Penuntun Cara Modern Menganalisa Tumbuhan. Penerbit Institut Teknologi Bandung. Bandung. 354 hal.

Hayes, J. 2000. *Aeromonas hydrophila.* http://www.TermProject-Aeromonas *hydrophila.*htm. 3p.

Holt. J.G. and Noel. R.K. 1923. *Bergeys Manual of Systemic Bacteria (vol 1).* Williams and Wilkins. Paltmore. London.

Irawan,A. 2000. Menanggulangi Hama dan Penyakit Ikan. CV. Aneka. Solo.

Jang S.S., Biberstein E.L., and D.C Hirsh. 1978. *A Diagnostic Manual of Veterinary Clinical Bacteriology and Micology.* Microbiological Diagnostic Laboratory of Veterinary Medical Teaching Hospital. University of California. Davis. 171p.

Jangkaru. Z. 2002. Memacu Pertumbuhan Gurami. Penebar Swadaya. Jakarta.

Kimbal, J. W. 1992. Biologi Jilid II. Penerbit Erlangga. Jakarta.

Kordi. K. 2004. PenanggulanganHama dan Penyakit Ikan. Penerbit Rineka Cipta dan Bina Adi Aksara Jakarta.

Kusriningrum. 1989. Dasar Perancangan Percobaan dan Rancangan Acak Lengkap. Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga. Surabaya.

Lay, B. W. 1994. Analisa Mikroba di Laboratorium. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 168 halaman.

Manitto, P. 1992. Biosintesis Produk Alami. IKIP Semarang Press, Semarang.

Monang, M. 2005. Penggunaan Ekstrak Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limonum*) Dengan Konsentrasi Yang Berbeda Terhadap Daya Hambat Pertumbuhan Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In Vitro. Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.

Nazir. 1988. Metode Penelitian. Penerbit Ghalia Indonesia. Jakarta.

Pelczar, M. J. dan E.C.S Chan. 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Alih Bahasa: R.S. Hadioetomo, T. Imas, S. S. Tjitrosomo dan S.I. Angka. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta. 997 halaman.

Pracaya. 1998. Jeruk Manis. Penebar Swadaya. Jakarta.

Prabawati, D.A. 2004. Uji Efektivitas Ekstrak Mengkudu (*Morinda citrifolia l*) Terhadap *Aeromonas hydrophila* Secara In Vitro. Skripsi. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang.

Roberts, R.J. 1989. Fish Patology (Second Edition). Baillere Tindal. England. U.K 467 hal.

Qosimah, D.A. 2004. Daya Antibakteri Perasan Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphyloccocus aureus* Secara In Vitro. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. Penerbit Institut Teknologi Bandung. Bandung.

Sarwono, B. 1991. Jeruk dan Kerabatnya. Penebar Swadaya. Jakarta.

_____. 1991. Jeruk Nipis dan Pemanfaatannya. Penebar Swadaya. Jakarta.

Sitanggang, M. 2002. Mengatasi Penyakit dan Hama Penyakit Ikan Hias. Agro Media Pustaka. Jakarta. 52 hal.

Stoskopf, M. K. 1993. *Fish Medicine*. W. B.Saunders Company. Mexico. 882p.

Sunarjono, H. 2006. Berkebun 21 Jenis Tanaman Buah. Penebar Swadaya. Jakarta.

Sundari, E. 2001. Pengambilan Minyak Atsiri dan Oleoresin dari Kulit Kayu Manis. ITB Central Library. Bandung. 4 hal.

Tanu, I. 1972. Farmakologi dan Terapi. Fakultas Kedokteran. Universitas Indonesia. Jakarta.

Tim Lentera. 2002. Khasiat dan Manfaat Jahe Merah si Rimpang Ajaib. Agro Media Pustaka. Jakarta. 88 hal.

Volk, W. A dan M. F Wheeler. 1993. Mikrobiologi Dasar. Alih Bahasa: Markham. Edisi ke-5. Jilid 1. Erlangga. Jakarta. 396 halaman.

Widyaanita, H. 2006. Daya Antibakteri Buah Mengkudu (Morinda citrifolia L) yang Diekstraksi Dengan Etanol dan Yang Diekstraksi dengan Air Terhadap *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Airlangga. Surabaya.

Wistreich, G.A. 2003. *Microbiology Laboratory Fundaments and Applications*. Person Education Inc. Los Angeles.

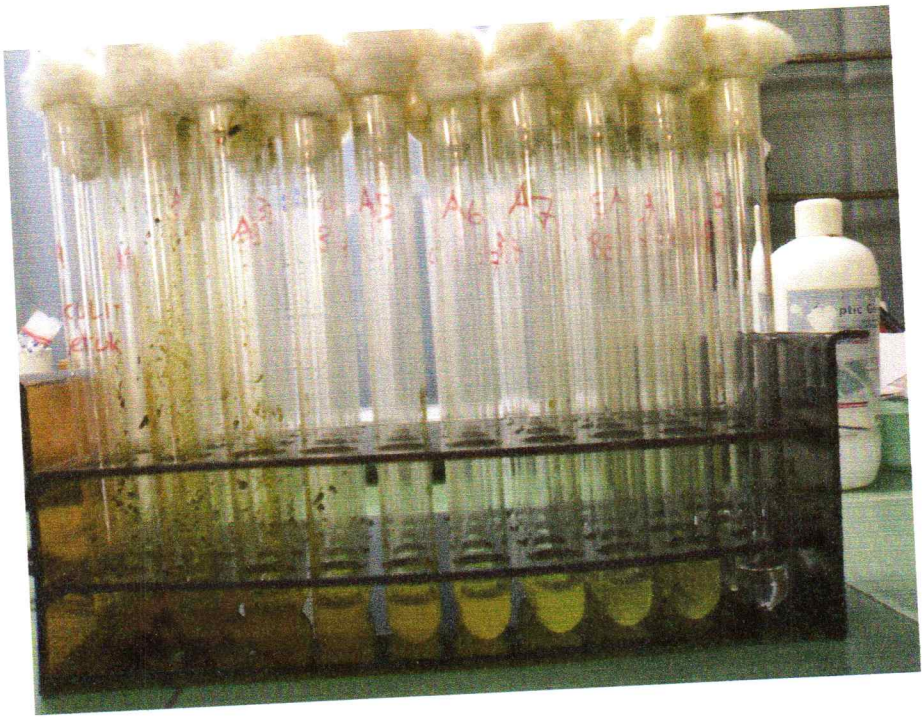
Woo, P.T.K.,and D.W. Bruno. 1999. *Fish Disease and Disorders vol 3(Viral. Bacterial and Fingal Infection*). CAB International Publishing. Wallingford. UK. 874p.

Zonneveld, N., E. A. Husiman dan J.H Boon. 1991. Prinsip-prinsip Budidaya Ikan. Penerbit Gramedia Pustaka Utama. Jakarta.

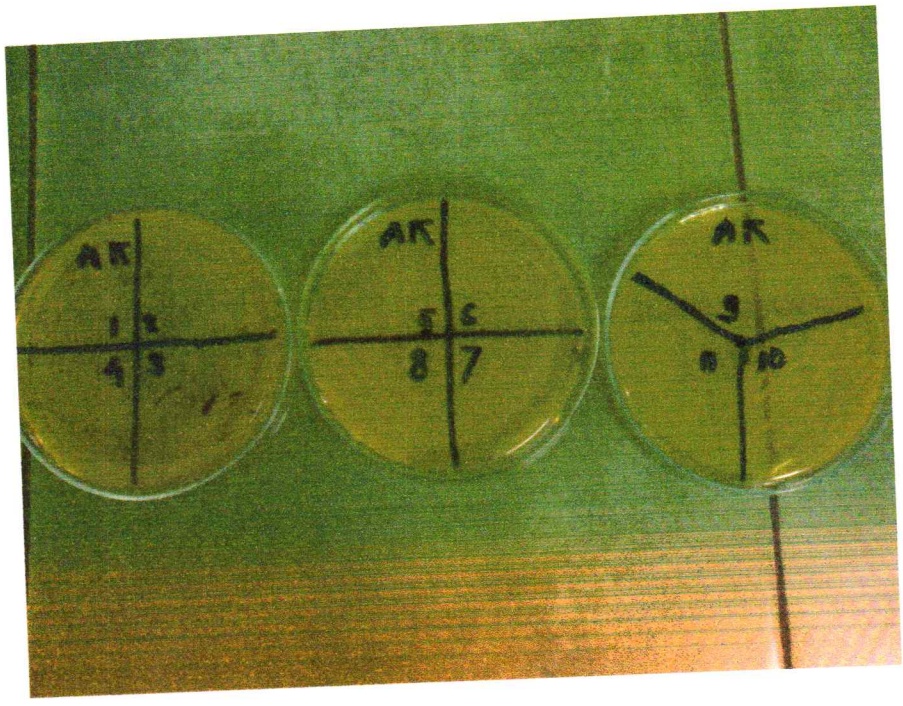
**Lampiran 1. Gambar Bahan SelamaPenelitian dan Hasil Uji**

A. Gambar bahan yang Dipakai Selama Penelitian

**Lampiran 2. Hasil Uji MIC dan Hasil Uji MBC**



A. Hasil Uji MIC




B. Hasil Uji MBC

**Lampiran 3**

**Analisa Sidik Ragam pada Pengamatan Uji MIC menggunakan Spektrofotometer**

| Perlakuan | Ulangan 1 | Ulangan 2 | Ulangan 3 | Total | Rata-rata |
|---|---|---|---|---|---|
| 100% | 0.841 | 0.650 | 0.677 | 2.168 | 0.723 |
| 50% | 0.788 | 0.614 | 0.697 | 2.099 | 0.700 |
| 25% | 0.401 | 0.470 | 0.503 | 1.374 | 0.458 |
| 12.5% | 0.210 | 0.272 | 0.275 | 0.757 | 0.252 |
| 6.25% | 0.285 | 0.238 | 0.232 | 0.755 | 0.252 |
| 3.12% | 0.266 | 0.168 | 0.183 | 0.617 | 0.206 |
| 1.56% | 0.192 | 0.143 | 0.119 | 0.454 | 0.151 |
| 0.78% | 0.190 | 0.142 | 0.084 | 0.416 | 0.139 |
| 0.39% | 0.133 | 0.090 | 0.063 | 0.286 | 0.095 |
| (K-) | 0.029 | 0.015 | 0.025 | 0.069 | 0.023 |
| (K+) | 0.695 | 0.689 | 0.752 | 2.136 | 0.712 |
| | | | Total | 11.131 | |

Faktor Koreksi (FK) $= \frac{(11.131)^2}{33} = 3.755$

Jumlah Kuadrat Total (JKT) $= 0.841^2 + 0.650 + 0.677^2 + \ldots\ldots + 0.752^2 - FK$
$= 5.9139 - 3.755$
$= 2.1589$

Jumlah Kuadrat Perlakuan (JKP) $= \frac{2.168^2 + 2.099^2 + \ldots\ldots + 2.136^2}{3} - FK$
$= \frac{17.536816}{3} - 3.755 = 2.09061$

Jumlah Kuadrat Sisa (KTS) $= JKT - JKP$
$= 2.1589 - 2.09061 = 0.06829$

**Tabel Analisis Sidik Ragam**

| S.K | d.b | JK | KT | F.hitung | F. tabel | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 0.05 | 0.01 |
| Perlakuan | 10 | 2.09061 | 0.209061 | 67.349956** | 2.30 | 3.26 |
| Sisa | 22 | 0.06829 | 0.0031041 | | | |
| Total | 32 | 2.1589 | | | | |

Keterangan :
d.b = derajat bebas
J.K = Jumlah Kuadrat
K.T = Kuadarat Tengah

** = berbeda sangat nyata

Kesimpulan : F hitung > F tabel 0.05

Berarti sebelas macam perlakuan tersebut memberikan perbedaan yang sangat nyata terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila.*

**Uji Jarak Duncan**

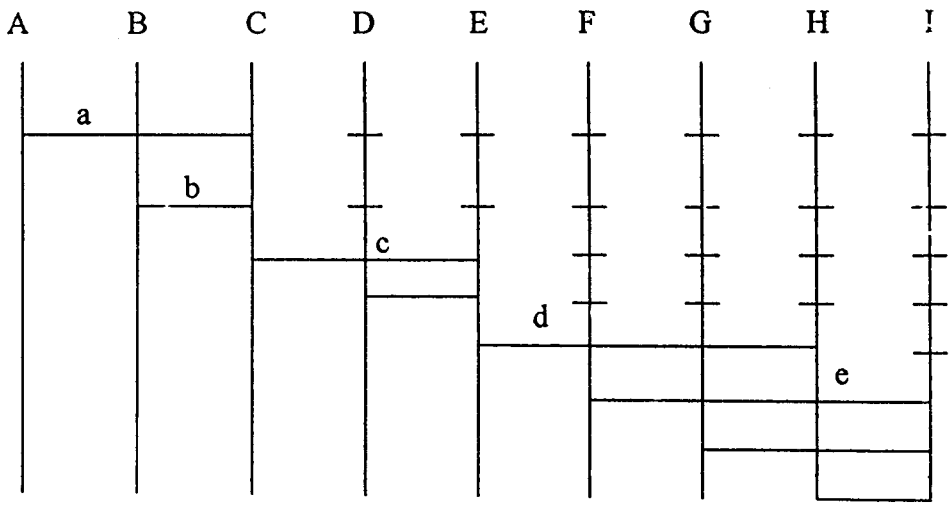
$$S.e = \sqrt{\frac{KTS}{n}} = \sqrt{\frac{0.0031041}{3}} = 0.032167$$

LSR = SSR x S.e

= SSR x 0.032167

**Tabel Uji Duncan**

| Perlakuan | Rata-rata perlakuan | Beda | | | | | | | | P | SSR | LSR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | X-I | X-H | X-G | X-F | X-E | X-D | X-C | X-B | | | |
| A (100%)[a] | 0,723 | 0,623* | 0,584* | 0,572* | 0,517* | 0,471* | 0.471* | 0,265 | 0,023 | 9 | 3,40 | 0,1094 |
| B (50%)[a] | 0,700 | 0,605* | 0,561* | 0,549* | 0,494* | 0,448* | 0,448* | 0,242 | | 8 | 3,38 | 0,1087 |
| C (25%)[b] | 0,458 | 0,363* | 0,319* | 0,307* | 0,252* | 0,206 | 0,206 | | | 7 | 3,36 | 0,1081 |
| D (12,5%)[c] | 0,252 | 0,157* | 0,113* | 0,101* | 0,046* | 0 | | | | 6 | 3,33 | 0,1071 |
| E (6,25%)[c] | 0,252 | 0,157* | 0,113 | 0,101 | 0,046 | | | | | 5 | 3,29 | 0,1058 |
| F (3,12%)[cd] | 0,206 | 0,11 | 0,067 | 0.055 | | | | | | 4 | 3,25 | 0,1045 |
| G(1,56%)[cde] | 0,151 | 0,056 | 0,012 | | | | | | | 3 | 3,18 | 0,1023 |
| H (0,78%)[de] | 0,139 | 0,044 | | | | | | | | 2 | 3,09 | 0,0994 |
| I (0.39%)[e] | 0,095 | | | | | | | | | 1 | 2,94 | 0,0946 |



**Lampiran 4. Tabel Frekuensi Pengamatan Hasil Analisis Chi Square uji MBC**

| Konsentrasi | Tidak Tumbuh | Tumbuh | Total |
|---|---|---|---|
| 1 | 3 | 0 | 3 |
| 2 | 3 | 0 | 3 |
| 3 | 3 | 0 | 3 |
| 4 | 3 | 0 | 3 |
| 5 | 3 | 0 | 3 |
| 6 | 3 | 0 | 3 |
| 7 | 3 | 0 | 3 |
| 8 | 0 | 3 | 3 |
| 9 | 0 | 3 | 3 |
| | 21 | 6 | 27 |

Perhitungan Frekuensi Harapan

Tidak Tumbuh $= \frac{3}{27} \times 21 = 2.33$ Tumbuh $= \frac{3}{27} \times 6 = 0.67$

**Tabel Frekuansi Pengamatan dan Frekuansi Harapan**

| Konsentrasi Ekstrak Kulit Jeruk Lemon (*Citrus limonum*) | Frekuensi | *Aeromonas hydrophila* | | Total |
|---|---|---|---|---|
| | | Tidak Tumbuh | Tumbuh | |
| 100% | Pengamatan | 3 | 0 | 3 |
| | Harapan | 2.33 | 0.67 | 3 |
| 50% | Pengamatan | 3 | 0 | 3 |
| | Harapan | 2.33 | 0.67 | 3 |
| 25% | Pengamatan | 3 | 0 | 3 |
| | Harapan | 2.33 | 0.67 | 3 |
| 12.5% | Pengamatan | 3 | 0 | 3 |
| | Harapan | 2.33 | 0.67 | 3 |
| 6.25% | Pengamatan | 3 | 0 | 3 |
| | Harapan | 2.33 | 0.67 | 3 |
| 3.12% | Pengamatan | 3 | 0 | 3 |
| | Harapan | 2.33 | 0.67 | 3 |
| 1.56% | Pengamatan | 3 | 0 | 3 |
| | Harapan | 2.33 | 0.67 | 3 |

Db = (banyak baris-1) (banyak lajur-1)

= ( 9-1) (2-1)

= 8

Perhitungan Chi Square

$$(x^2) = \frac{\Sigma (Oi - Ei)^2}{Ei}$$

$$= \left(\frac{3-2.33}{2.33}\right)^2 + \left(\frac{0-0.67}{0.67}\right)^2 + \left(\frac{3-2.33}{2.33}\right)^2 + \left(\frac{0-0.67}{0.67}\right)^2 + \left(\frac{3-2.33}{2.33}\right)^2 +$$

$$\left(\frac{0-0.67}{0.67}\right)^2 + \left(\frac{3-2.33}{2.33}\right)^2 + \left(\frac{0-0.67}{0.67}\right)^2 + \left(\frac{3-2.33}{2.33}\right)^2 + \left(\frac{0-0.67}{0.67}\right)^2 +$$

$$\left(\frac{3-2.33}{2.33}\right)^2 + \left(\frac{0-0.067}{0.67}\right)^2 + \left(\frac{3-2.33}{2.33}\right)^2 + \left(\frac{0-0.67}{0.67}\right)^2 + \left(\frac{3-2.33}{2.33}\right)^2 +$$

$$\left(\frac{0-0.67}{0.67}\right)^2$$

$$= 6.91$$

$x^2$ tabel = 15.507

$x^2$ (6.91) < $x^2$ tabel = berarti tidak terdapat perbedaan yang nyata pada perlakuan