

DAYA HAMBAT AIR PERASAN JERUK NIPIS (*Citrus aurantifolia* S.) PADA PERTUMBUHAN BAKTERI *Edwardsiella tarda* DARI BENIH LELE DUMBO (*Clarias gariepinus*) SECARA IN VITRO

Didik Budiyanto¹, Sri Oetami Madyowati², Nur Lailiyah³

^{1,2,3}Jurusan Perikanan, Program Studi Budidaya Perairan
Fakultas Pertanian Universitas Dr. Soetomo Surabaya
e-mail: ¹dbudiyanto_unitomo@yahoo.com

Abstrak

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui seberapa besar daya hambat air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) terhadap pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* yang diambil dari benih lele dumbo (*Clarias gariepinus*) secara in vitro. Metode penelitian yang digunakan adalah eksperimental dengan rancangan percobaan menggunakan rancangan acak lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 ulangan, 6 perlakuan dan 2 kontrol. Perlakuan yang digunakan adalah pemberian konsentrasi air perasan buah jeruk nipis yang berbeda yaitu Perlakuan A (15%), B (30%), C (45%), D (60%), E (75%), dan F (90%), kemudian kontrol positif (*Chloramphenicol*) dan kontrol negatif (*Aquades steril*). Hasil penelitian menunjukkan rata-rata diameter zona hambat tertinggi terdapat pada perlakuan F (dengan nilai rata-rata 17,25 mm) dan rata-rata diameter zona hambat terendah yaitu perlakuan A (dengan nilai rata-rata 1,125 mm). Hubungan antara pemberian air perasan buah jeruk nipis dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* dengan rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan menunjukkan respon yang meningkat seiring dengan bertambahnya dosis. Berdasarkan uji Anova dan BNT menunjukkan bahwa air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) pada masing-masing perlakuan berpengaruh nyata terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* dengan $F_{hit} > F_{tabel}$ pada taraf signifikan 5 % (2.77) maupun 1% (4.25).

Kata Kunci: Air perasan buah jeruk nipis, *Edwardsiella tarda*, Uji Daya Hambat

Pendahuluan

Ikan lele merupakan salah satu komoditas perikanan yang pengembangannya diminati oleh para pembudidaya di Indonesia. Budidaya ikan lele di Indonesia mengalami perkembangan pesat setelah dilakukannya introduksi ikan lele unggul dari Taiwan yang dengan cepat berkembang dan populer di kalangan pembudidaya dengan nama ikan lele dumbo. Budidaya ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) adalah sebagai salah alternatif dalam upaya pemenuhan protein hewani. Prospek pengembangan budidaya ikan lele dumbo sangatlah besar, permintaan pasar terhadap komoditas ini sangatlah tinggi. Banyak petani ikan yang mulai melakukan kegiatan budidaya ikan lele secara intensif untuk memenuhi permintaan pasar. Namun salah satu kendala yang dihadapi dalam budidaya intensif adalah penyakit ikan yang dapat menimbulkan kerugian ekonomi bagi para pembudidaya

ikan, antara lain penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Edwardsiella tarda*.

Bakteri *Edwardsiella tarda* adalah penyebab penyakit Edwardseillois/Emphisemathous Putrevactive Disease of Catfish (EPDC) atau *Edwardsiella Septicaemia* (ES). Penyakit Edwardseillois dikenal sebagai penyakit utama pada budidaya catfish akan tetapi juga bias pada reptile, burung, mamalia dan manusia yang dikenal menyebabkan penyakit gastrointestinae dan extraintestinae. Bakteri *Edwardsiella tarda* hidup secara alamia di perairan tawar dan laut khususnya pada perairan yang banyak mengandung bahan organik dan juga di lumpur (Plumb, 2002).

Penanganan penyakit yang disebabkan oleh *Edwardsiella tarda* dapat dilakukan dengan berbagai cara, seperti pemberian antibiotik. Pemberian bahan kimia ini memang dapat mencegah maupun mengobati penyakit pada

ikan bila digunakan dengan dosis yang tepat, akan tetapi bila digunakan tidak terkontrol maka dapat menimbulkan beberapa efek negatif. Residu antibiotik dapat menyebabkan timbulnya bakteri yang resisten terhadap antibiotik, selain itu juga dapat mencemari lingkungan dan juga dapat dijumpai di tubuh ikan, sehingga ikan tidak aman untuk dikonsumsi oleh manusia (Lukistyowati dan Kurniasih, 2011).

Salah satu alternatif dalam mengobati penyakit bakterial pada ikan adalah menggunakan bahan-bahan alami yang mempunyai kemampuan anti bakteri. Efek samping yang dihasilkan oleh bahan alami dapat dikatakan tidak signifikan terhadap kerusakan lingkungan, resistensi bibit penyakit, residu yang tidak terakumulasi di dalam jaringan atau organ dan aman baik komoditas budidaya maupun konsumen (Feriyanto, 2009). Penanganan penyakit akibat *Edwardsiella tarda* dengan menggunakan bahan herbal, berpotensi sebagai imunostimulan melalui peningkatan sistem imun ikan untuk melawan pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* (Lukistyowati dan Kurniasih, 2011). Sehingga kematian ikan lele kemungkinan besar dapat teratasi.

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) adalah jeruk yang mempunyai rasa asam dan agak pahit. Tanaman ini adalah tanaman tahunan, sudah sejak lama tanaman jeruk dibudidayakan di Indonesia. Kualitasnya bukan dilihat dari ukuran buahnya, melainkan dari warna, kejernihan, dan tekstur kulit. Semakin tipis kulit jeruk nipis, semakin banyak kandungan airnya.

Jeruk nipis (*Citrus aurantifolia*) mengandung unsur-unsur senyawa kimia yang bermanfaat, seperti asam sitrat, asam amino (triftofan, lisin), minyak atsiri (sitral, limonen, flandren, lemon kamfer, kadinen, gerani-asetat, linalil-asetat, aktiladehid, nonildehid), damar, glikosida, asam situn, lemak, kalsium, fosfor, besi, belerang vitamin B1 dan C (Hariana, Arief, 2006). Menurut Razak dkk (2013), mengatakan bahwa senyawa aktif antibakteri dalam air perasan buah jeruk nipis yang diduga diperoleh dari kandungan kimia yang terdapat di dalamnya, seperti minyak atsiri, diantaranya fenol yang bersifat sebagai bakterisidal mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri.

Tujuan dari penelitian yang dilakukan adalah: Untuk mengetahui seberapa besar daya

hambat air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) terhadap pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* yang diambil dari benih lele dumbo (*Clarias gariepinus*) secara *in vitro*, serta untuk mengetahui konsentrasi optimal air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) yang menghasilkan daya hambat terbesar terhadap pertumbuhan Bakteri *Edwardsiella tarda* yang diambil dari benih lele dumbo (*Clarias gariepinus*) secara *in vitro*.

Metodologi

2.1. Materi Penelitian

Benih ikan lele dumbo yang digunakan dalam penelitian ini adalah sampel yang secara gejala klinis di duga terinfeksi bakteri *Edwardsiella tarda*, diperoleh dari daerah Blitar yang merupakan sampel untuk keperluan sertifikasi kesehatan ikan. Air Perasan Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* S.)

Isolat Bakteri *Edwardsiella tarda* yang digunakan dalam penelitian ini berasal dari hasil identifikasi uji sampel benih ikan lele yang terinfeksi *Edwardsiella tarda* di Laboratorium Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I.

Bahan untuk pengujian dalam penelitian ini adalah kertas cakram, aquades steril, tissue, masker, sarung tangan, kertas label, etanol 96%, antibiotik chloramphenicol 30 mg, larutan fisiologis, media TSA (*Tryphtycase Soy Agar*), media MIO (*Motility Indole Ornitin*), media O/F, media MR (*Methyl Red*), VP (*Voger Prokeur*), Gelatin, TSIA (*Triple Sugar Iron Agar*), MIO (*Motility Indol Ornithin*), LIA (*Lysine Iron Agar*), media uji gula (maltose, laktosa, arabinosa, inositol, manitol, sukrosa, sorbitol).

2.2. Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen (Hanafiah, 1994) yang dilakukan secara *in vitro* menggunakan uji sensitivitas pada *Edwardsiella tarda* terhadap air perasan buah jeruk nipis dengan membandingkan antara perlakuan dan kontrol. Perlakuan diberikan yaitu konsentrasi air perasan buah jeruk nipis sebesar 15%, 30%, 45%, 60%, 75%, 90%, kemudian kontrol positif (*Chloramphenicol*) dan kontrol negatif (*Aquades steril*).

2.3 Prosedur Penelitian

2.3.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi adalah proses penghilang atau membunuh semua jenis mikroorganisme yang terdapat pada suatu benda (Vioren, 2011). Sterilisasi media dilakukan menggunakan autoclave dengan suhu 1210C pada tekanan 1 atm selama 15 menit. Sterilisasi alat dilakukan dengan menggunakan oven dengan suhu 1800C selama 2-3 jam.

2.3.2 Pembuatan Air Perasan Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* S.)

Buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) diambil dari daerah Porong, Sidoarjo. Buah jeruk nipis yang dipilih adalah jeruk nipis yang diameter rata-ratanya 3-4 cm, kondisi buah baik, berkulit halus, tidak cacat, dan berwarna hijau. Adapun proses pembuatannya adalah sebagai berikut : Buah jeruk nipis dicuci bersih, dipotong menjadi dua bagian dan diperas, air perasan buah jeruk nipis murni tersebut adalah konsentrasi 100 %, larutan dengan konsentrasi N % dibuat dengan cara pengenceran dari larutan stock (100 %), setiap tahap konsentrasi dibuat sebanyak 500 µl dengan menggunakan rumus pengenceran $V1.N1 = V2.N2$

2.3.3 Penyediaan Bakteri *Edwardsiella tarda*

Bakteri uji yang digunakan adalah diperoleh dari sampel benih ikan lele dumbo yang terinfeksi bakteri *Edwardsiella tarda*. Sampel jaringan untuk diagnosis dan identifikasi *Edwardsiella tarda* harus diambil secara aseptik dari lesi pada ginjal atau organ lainnya, jika tidak ada lesi maka ginjal dan isi usus adalah organ yang sesuai untuk sampel (Pusat Karantina Ikan : 2007). Dari organ target tersebut dilakukan isolasi dengan menggunakan ose pada media TSA, diinkubasi pada suhu 26-30oC selama 24-48 jam dalam inkubator. Untuk mendapatkan biakan murni maka diambil koloni yang tumbuh secara terpisah kemudian diisolasi kembali ke dalam media TSA dan diinkubasi pada suhu 26-30oC selama 24-48 jam dalam inkubator. Setelah mendapatkan biakan murni, kemudian dilakukan uji pendugaan awal, uji biokimia dan diidentifikasi.

2.3.4 Identifikasi Bakteri

Identifikasi bakteri *Edwardsiella tarda* dilakukan menggunakan metode konvensional, yang meliputi pemeriksaan morfologi, pewarnaan Gram, dan uji biokimiawi yaitu uji O/F, uji oksidase, uji katalase, uji motilitas, produksi indol, uji TSIA, uji LIA, uji gelatin, uji MR/VP, dan uji gula (Pusat Karantina Ikan, 2014). Identifikasi bakteri dengan menggunakan uji biokimiawi antara lain:

1) Pengamatan Koloni Bakteri

Pengamatan koloni bakteri dilakukan dengan cara menumbuhkan isolat bakteri pada agar cawan yang meliputi: warna, elevasi, dan tepi koloni.

2) Pengamatan Morfologi Bakteri

Pengamatan morfologi bakteri dilakukan dengan pewarnaan Gram. Pewarnaan Gram bertujuan untuk menentukan apakah bakteri tersebut termasuk di dalam kelompok bakteri Gram positif atau kelompok bakteri Gram negatif. Cara kerja dari pewarnaan Gram yaitu kaca objek dibersihkan dengan alkohol dan dilewatkan beberapa kali pada nyala api bunsen, kemudian diambil isolat bakteri dengan ose secara aseptik dan dioleskan pada kaca objek. Isolat bakteri kemudian ditetesi karbol gentian violet dan dibiarkan selama 1 menit, selanjutnya dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Isolat bakteri kemudian ditetesi lagi dengan larutan lugol's iodine dan dibiarkan selama 1 menit, kemudian dicuci dengan air mengalir dan dianginkan hingga kering. Selanjutnya isolat bakteri dilunturkan alkohol 95% / alkohol aseton, kemudian dialiri air dan dianginkan hingga kering. Isolat bakteri kemudian ditetesi safranin selama 30 detik dan dicuci dengan air mengalir, dikeringkan dengan kertas penghisap dan dikering anginkan, kemudian dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop 1000 kali.

Bakteri Gram positif ditandai dengan warna ungu yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut mampu mengikat warna karbol gentian violet, sedangkan bakteri Gram negatif ditandai dengan warna merah muda yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak mampu mengikat warna karbol gentian violet dan hanya terwarnai oleh safranin (Hadioetomo, 1993). Hasil yang

menunjukkan *Edwardsiella tarda* adalah warna merah muda yang merupakan ciri dari gram negative dan bentuk morfologi bakteri adalah batang.

3) Uji Katalase

Uji katalase bertujuan untuk mengetahui sifat bakteri dalam menghasilkan enzim katalase. Cara kerja dari uji katalase yaitu larutan H₂O₂ 3% diteteskan pada kaca objek, kemudian suspensikan koloni bakteri dengan menggunakan ose steril. Perubahan yang terjadi jika terdapat gelembung-gelembung oksigen, maka bakteri tersebut positif mengandung enzim katalase, tetapi jika tidak terdapat gelembung maka bakteri dikatakan negatif, tidak menghasilkan enzim katalase (Hadioetomo, 1993). Hasil yang menunjukkan *Edwardsiella tarda* dari uji katalase adalah positif.

4) Uji Oksidase

Tujuan uji oksidase adalah mengetahui ada tidaknya enzim oksidase pada bakteri. Cara kerjanya yaitu ambil biakan bakteri murni dengan menggunakan ose kemudian goreskan pada paper oksidase. Hasil uji positif ditandai dengan berubahnya koloni menjadi merah muda, lalu merah tua, merah gelap, dan akhirnya warna hitam, sebaliknya apabila tidak berubah warna maka negatif (Hadioetomo, 1993). Hasil yang menunjukkan *Edwardsiella tarda* dari uji oksidase adalah positif.

5) Uji O/F

Uji O/F bertujuan untuk membedakan sifat bakteri oksidatif dan bakteri fermentatif yang mengandung oksidasi atau fermentasi terhadap glukosa dengan menggunakan dua tabung media yang salah satunya ditutup dengan paraffin, sehingga diharapkan di dalam media tidak terdapat udara yang dapat mendukung terjadinya fermentasi. Isolat murni bakteri diinokulasi pada media O/F dengan cara tusukan kemudian disimpan dalam inkubator, setelah 24 jam penyimpanan dilakukan diamati perubahan warna yang terjadi. Bakteri oksidatif apabila tabung terbuka (tidak berparaffin) berwarna kuning dan tabung tertutup (dengan paraffin) berwarna biru. Bakteri fermentatif apabila tabung terbuka dan tertutup berwarna kuning. Bakteri non oksidatif/fermentatif pada tabung

terbuka dan tertutup tidak ada perubahan (Hadioetomo, 1993). Hasil yang menunjukkan *Edwardsiella tarda* dari uji O/F adalah fermentatif.

6) Uji MIO (Motility Indol Ornithin)

Uji MIO bertujuan untuk mengetahui apakah bakteri tersebut motil atau tidak dan untuk mengetahui produksi indol dari tryptophane. Cara kerjanya yaitu mengambil bakteri dengan menggunakan ose steril, dan ditusukkan kedalam media. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Pada pengamatan apabila bakteri tumbuh menyebar pada tusukan dikatakan motility positif, jika media berubah menjadi kuning maka ornithin positif dan untuk mengetahui indole, diteteskan cairan konvaks beberapa tetes, lalu didiamkan sebentar kemudian diamati. Apabila terjadi perubahan yaitu dibagian permukaan menjadi warna merah, maka dikatakan indol positif (Hadioetomo, 1993). Hasil yang menunjukkan *Edwardsiella tarda* dari uji MIO adalah ornithin negative, indol positif, dan motilitas positif.

7) Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar)

Uji TSIA (Triple Sugar Iron Agar) bertujuan untuk membedakan jenis bakteri berdasarkan kemampuan memecahkan glukosa, laktosa, dan sukrosa, selain itu uji TSIA berfungsi untuk mengetahui apakah bakteri tersebut menghasilkan gas H₂S atau tidak. Media yang digunakan mempunyai dua bagian yaitu tegak dan miring. Cara kerjanya yaitu dengan mengambil koloni bakteri dengan menggunakan ose steril dan diinokulasikan pada media TSIA dengan menusuk tegak lurus pada bagian media tegak dan secara zig zag pada bagian media miring. Selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan melihat warna media. Apabila bagian media miring berwarna merah dan media tegak berwarna kuning maka bakteri mampu memfermentasi glukosa, sedangkan apabila bagian media miring dan tegak keduanya berwarna kuning maka bakteri mampu memfermentasi sukrosa dan laktosa. Apabila terdapat warna kehitaman pada bekas goresan dan tusukan menunjukkan adanya H₂S (Hadioetomo, 1993). Hasil yang menunjukkan

Edwardsiella tarda dari uji TSIA adalah mampu memfermentasi glukosa, dan terdapat H₂S.

8) Uji LIA (Lysine Iron Agar)

Uji LIA bertujuan untuk mengetahui bakteri memproduksi lysine. Cara kerjanya yaitu dengan mengambil koloni bakteri dengan menggunakan ose steril kemudian ditusukkan pada media tegak dan digoreskan zig zag pada media miring, selanjutnya diinkubasi selama 24 jam. Pengamatan dilakukan dengan melihat perubahan warna pada media LIA. Hasilnya apabila pada goresan berwarna ungu dan pada tusukan berwarna kuning maka lysine decarboxylase positif, sedangkan apabila tidak terdapat perubahan warna maka hasil uji dikatakan negatif (Hadioetomo, 1993). Hasil yang menunjukkan Edwardsiella tarda dari uji LIA adalah lysine decarboxylase positif.

9) Uji Gula

Uji gula bertujuan untuk kemampuan bakteri dalam mendegradasi gula dan menghasilkan asam organik yang berasal dari tiap-tiap jenis gula, yaitu glukosa, sukrosa, maltosa, arabinosa, manitol dan inositol. Isolat murni bakteri diinokulasi pada masing-masing media dengan cara dicelupkan jarum Ose sampai setengah bagian dari media, kemudian disimpan ke dalam inkubator selama 24 jam. Setelah 24 jam amati perubahan warna, apabila bakteri pada masing-masing media tersebut mengalami perubahan warna menjadi kuning, maka bakteri dikatakan positif karena bakteri membentuk asam dari fermentasi glukosa dan jika tidak terjadi perubahan warna dikatakan negatif karena bakteri membentuk asam dari fermentasi glukosa (Hadioetomo, 1993).

2.3.5 Kultur Bakteri Edwardsiella tarda

Kultur Edwardsiella tarda didapat dari hasil pemurnian isolat yang hasil identifikasinya adalah positif isolat bakteri Edwardsiella tarda. Langkah awal yang dilakukan untuk kultur bakteri adalah mengambil 1-3 koloni Edwardsiella tarda dari koloni yang ada sebelumnya dengan menggunakan jarum ose, kemudian di tanam kembali pada media buatan yaitu Trypticase Soya Agar (TSA), selanjutnya diinkubasi pada suhu 26-30°C selama 24-48 jam

dalam inkubator, Semua proses dilakukan secara aseptis.

2.3.6 Pembuatan Suspensi Bakteri

Infeksi bakteri Edwardsiella tarda terhadap ikan bersifat patogen pada kepadatan 107 CFU/ml (Wahid, 2006). Sehingga kepadatan bakteri disesuaikan dengan kepadatan bakteri yang mampu menginfeksi ikan. Pembuatan suspensi diawali dengan cara mengambil 2-3 koloni dengan menggunakan jarum ose steril, dan dimasukkan kedalam NaCl Fisiologis steril 10 ml kemudian dihomogenkan dengan menggunakan vortex dan kekeruhannya disetarakan dengan standard Mc Farland nomor 0,5.

2.4 Pelaksanaan Penelitian

2.4.1 Pembuatan Air Perasan Buah Jeruk Nipis (Citrus aurantifolia S.) Dengan Berbagai Konsentrasi

Metode yang digunakan pada penelitian adalah metode difusi dilakukan dengan berbagai konsentrasi. Microtube sebanyak 6 buah diisi larutan masing-masing sebanyak 500 µl dan diberi nomor 1-6. Kemudian microtube nomor 1 adalah konsentrasi 15% (75 µl air perasan buah jeruk nipis dan 425 µl aquades steril), microtube nomor 2 konsentrasi 30% (150 µl air perasan buah jeruk nipis dan 350 µl aquades steril), microtube nomor 3 konsentrasi 45% (225 µl air perasan buah jeruk nipis dan 275 µl aquades steril), microtube nomor 4 konsentrasi 60% (300 µl air perasan buah jeruk nipis dan 200 µl aquades steril), microtube nomor 5 konsentrasi 75% (375 µl air perasan buah jeruk nipis dan 125 µl aquades steril), microtube nomor 6 konsentrasi 90% (450 µl air perasan buah jeruk nipis dan 50 µl aquades steril). Berbagai macam konsentrasi tersebut dibandingkan dengan menggunakan antibiotik yang digunakan oleh penyakit penyebab bakteri Edwardsiella tarda yaitu Chloramphenicol.

Langkah selanjutnya adalah mempersiapkan 2 buah media TSA yang sebelumnya telah ditambahkan bakteri sebanyak 200 µl dan diratakan dengan menggunakan drigalski agar bakteri dapat tersebar pada semua bagian media TSA. selanjutnya kertas cakram steril dimasukkan kedalam tabung reaksi yang berisikan larutan menggunakan pinset steril, dan

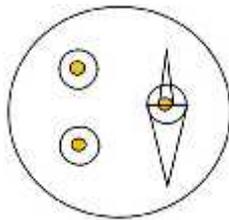
direndam selama 24 jam lalu kertas cakram dipindahkan kedalam cawan petri yang berisikan media TSA dan bakteri *Edwardsiella tarda*. Selanjutnya dilakukan inkubasi selama 24 jam.

2.4.2 Penentuan Zona Hambat

Penentuan zona hambat dilakukan dengan mengamati zona terang air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) pada bakteri *Edwardsiella tarda*. Semakin besar zona hambat (zona terang) maka semakin besar pula kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda*. Zona hambat diukur dengan menggunakan penggaris (mm).

Menurut Pratiwi (2008), aktivitas antibakteri dinyatakan positif apabila terbentuk zona hambat berupa zona bening disekeliling kertas cakram.

Diameter zona hambat dideskripsikan dengan Gambar 1 di bawah ini:



Gambar 3. Perhitungan diameter zona hambat antibakteri.

Keterangan:

a = Diameter kertas cakram (6 mm)

b = Diameter zona hambat yang terbentuk (mm)

c = Daerah yang ditumbuhi bakteri

2.4.3 Parameter Penelitian

Parameter yang diamati dalam penelitian adalah adanya daya sensitivitas air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) terhadap *Edwardsiella tarda* secara in vitro. Hasil konsentrasi terbaik yang dapat menghambat bakteri *Edwardsiella tarda* secara in vitro yang dibandingkan dengan kontrol positif chloramphenicol dilihat dari zona bening disekitar kertas cakram,

2.5 Analisis Data

Dalam penelitian ini menggunakan analisa data ANOVA. Menurut Furqon (2009), untuk mengetahui pengaruh perlakuan,

dilaksanakan analisis variasi (ANOVA), kemudian apabila terdapat pengaruh pada perlakuan tersebut, maka dilanjutkan uji Duncam dengan taraf 5 % dengan cara membandingkan antara F hitung dengan F tabel :

- Jika $F_{hitung} < F_{tabel\ 5\%}$, maka tidak berbeda nyata.
- Jika $F_{hitung} > F_{tabel\ 5\%}$, maka perlakuan menyebabkan hasil sangat berbeda nyata.
- Jika $F_{tabel\ 5\%} < F_{hitung} < F_{tabel\ 1\%}$ maka perlakuan menyebabkan hasil berbeda nyata.

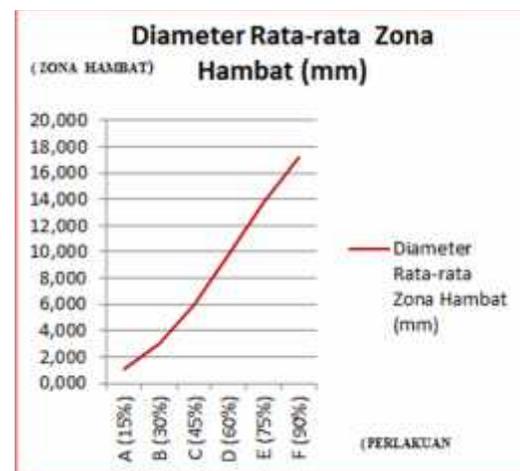
Data hasil penelitian disajikan secara deskriptif dengan menampilkan tabel dan gambar zona hambat air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) yang dibandingkan dengan kontrol positif.

Hasil Penelitian

Hasil akhir penelitian menunjukkan bahwa perlakuan F (90%) menghasilkan daya hambat paling tinggi, hal ini seperti dalam tabel 2 dan Gambar 5 di bawah ini:

Perlakuan (Konsentrasi)	Diameter Zona Hambat (mm)				Rata-rata
	1	2	3	4	
A (15%)	1	1.5	1	1	1.125
B (30%)	3	3	2.5	3.5	3
C (45%)	6	7	5	6	6
D (60%)	11	9	9	10	9.75
E (75%)	14	14	14	13	13.75
F (90%)	18	16	17	18	17,25

Tabel 2. Hasil rata-rata pengamatan zona hambat setelah pemberian air perasan buah jeruk nipis (*Citrus Aurantifolia* S.) terhadap bakteri *Edwardsiella tarda*.



Gambar 5. Grafik Diameter Rata-rata Zona Hambat

Dari hasil tersebut di atas maka diperlihatkan analisis sidik ragam seperti tabel 3 di bawah ini:

SK	JKT	db	KT	F hitung	F tabel 5% dan 1%
Perlakuan	786.302	5	157.260	316.720	2.77 dan 4.25
Galat	8.938	18	0.497		
Total	795.240	23			

Tabel 3. Analisis of Varian (ANOVA)

Dari hasil perhitungan diperoleh bahwa Nilai F hitung > Nilai F tabel pada taraf signifikan 5% dan 1%, sehingga dapat disimpulkan bahwa perlakuan air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda*.

Untuk melihat perlakuan mana saja yang memberikan rata-rata respon yang berbeda dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT). Berdasarkan hasil uji, diperoleh notasi yang berbeda dari semua perlakuan, dimana tidak ada perlakuan yang terletak dalam satu grup. Perlakuan F adalah yang paling besar daya hambatnya yaitu dengan nilai rata-rata mencapai 17,25 mm, disusul perlakuan E yaitu 13,75 mm, perlakuan D yaitu 9,75 mm, Perlakuan C yaitu 6 mm, perlakuan B yaitu 3 mm dan perlakuan A yaitu 1,125. Untuk lebih jelasnya perbedaan selisih daya hambat antar perlakuan disajikan dalam tabel 4 dan tabel 5 di bawah ini:

Perlakuan (Konsentrasi)	Diameter Rata-rata Zona Hambat (mm)	Selisih					Notasi
F (90%)	17,25						f
E (75%)	13,75	3,50					e
D (60%)	9,75	7,50	4,00				d
C (45%)	6,00	11,25	7,75	3,75			c
B (30%)	3,00	14,25	10,75	6,75	3,00		b
A (15%)	1,125	16,125	12,63	8,63	4,875	1,875	a

Tabel 4. Uji Lanjut Duncan Diameter Rata-rata Daya Hambat Air Perasan Buah Jeruk Nipis Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Edwardsiella tarda*.

Perlakuan	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
F (90%)	4	1.125					
E (75%)	4		3.000				
D (60%)	4			6.000			
C (45%)	4				9.750		
B (30%)	4					13.750	
A (15%)	4						17.250
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Tabel 5. Selisih Daya Hambat Air Perasan Buah Jeruk Nipis Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Edwardsiella tarda*.

Dari hasil identifikasi bakteri yang dilakukan dapat dilihat bahwa morfologi koloni bakteri pada isolat bakteri *Edwardsiella tarda* yang diambil dari ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) dapat dilihat bahwa morfologi koloni pada media TSA berukuran kecil (diameter 0.5 mm), bundar, permukaan rata/halus, sedikit cembung, tepi entire dan transparan. Pada uji KOH 3 % didapat hasil positif (terdapat lendir), hal ini menunjukkan bahwa bakteri tersebut adalah gram negatif. Untuk uji peneguhan spesies dilakukan uji biokimia yang hasilnya tertera pada lampiran 3, dimana hasil uji biokimia dan morfologi koloni menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan *Edwardsiella tarda* yang dibandingkan dengan ciri-ciri bakteri yang diuraikan oleh Woo dan Bruno (1999). Oleh karena itu dapat disimpulkan bahwa bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah bakteri *Edwardsiella tarda*.

Hasil perlakuan pemberian air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) menggunakan kertas cakram dengan berbagai konsentrasi pada bakteri *Edwardsiella tarda* dengan metode sebar (Pour plate) yang tertera pada lampiran 2. menunjukkan bahwa pengujian daya hambat air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) terhadap bakteri *Edwardsiella tarda* terlihat bahwa semakin tinggi konsentrasi air perasan jeruk nipis yang diberikan maka semakin tinggi pula zona bening yang terbentuk, dengan zona bening terbesar pada konsentrasi 90 % dengan rata-rata zona bening sebesar 17.25 mm. Zona bening di sekitar kertas cakram merupakan petunjuk kepekaan mikroorganisme terhadap senyawa anti mikroba. Menurut Lay (1994), terbentuknya zona hambat melalui pengamatan daerah jernih di sekeliling cakram kertas membuktikan adanya aktifitas senyawa antimikroba. Zona lisis yang kecil menunjukkan adanya aktifitas antimikroba yang rendah, sedangkan zona lisis yang lebih besar menunjukkan daya aktifitas antimikroba yang besar pula.

Adanya zona bening di sekeliling kertas cakram membuktikan bahwa air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda*. Tetapi setelah didiamkan selama 5 hari, zona bening tersebut ditumbuhi oleh bakteri seperti yang terlihat pada lampiran 2, hal ini

disebabkan zat anti mikrobal pada zona bening tersebut telah habis sehingga bakteri di luar zona bening dapat masuk dan berkembangbiak pada zona bening tersebut. Hal ini diperkuat oleh pendapat Hasim (2003) yang menyatakan bahwa zona hambat (Zona bening) yang ditumbuhi bakteri pada hari ke empat inkubasi menunjukkan bahwa zat antibakteri yang digunakan hanya bersifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) bukan bakterisidal (membunuh bakteri).

Menurut Mathur (2009), bahwa ketentuan kekuatan antibakteri adalah sebagai berikut, zona hambat 10 mm berarti lemah, 11-14 mm berarti kuat, dan 15 mm berarti sangat kuat. Hasil uji daya hambat menunjukkan bahwa kontrol positif Chloramphenicol termasuk dalam antibakteri sangat kuat (15 mm). Sedangkan konsentrasi air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) 90% jika dibandingkan dengan kontrol positif chloramphenicol maka termasuk dalam antibakteri sangat kuat (17,25 mm). Konsentrasi air perasan buah jeruk nipis 15% dan 30% tidak dapat digunakan sebagai antibakteri karena zona bening terbentuk di sekitar kertas cakram sangat kecil yaitu 6 mm. Menurut Enny (2005), bahwa kepekaan mikroba terhadap suatu bahan obat adalah dapat dinyatakan peka apabila obat tersebut mampu memberikan zona hambat minimal 6 mm. Kandungan senyawa minyak atsiri dan keasaman yang terkandung dalam air perasan buah jeruk nipis mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat. Perasan jeruk nipis segar mengandung asam sitrat 6,15%, asam laktat 0,09%, serta sejumlah kecil asam tartarat. Aktivitas antibakteri dari buah jeruk nipis disebabkan oleh kandungan sejumlah asam organik seperti asam sitrat yang merupakan komponen utama, kemudian asam malat, asam laktat dan asam tartarat. Penghambatan sebagai antibakteri dari asam organik karena penurunan pH dibawah kisaran pertumbuhan mikroorganisme dan penghambatan metabolisme oleh molekul asam yang terkondisiasi (Zainal dkk., 2002). Sedangkan menurut Razak dkk (2013) mengatakan bahwa senyawa aktif antibakteri dalam air perasan buah jeruk nipis yang diduga diperoleh dari kandungan kimia yang terdapat di dalamnya, seperti minyak atsiri, diantaranya fenol yang

bersifat sebagai bakterisidal mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri.

Uji statistik yang digunakan dalam penelitian ini yaitu analisa sidik ragam Anova untuk membandingkan rata-rata daya hambat dari masing-masing perlakuan maupun dari masing-masing pengulangan dan juga memperhatikan interaksi antara perlakuan dan pengulangan. Hasil yang memperlihatkan rata-rata diameter zona hambat cakram yang diberi air perasan buah jeruk nipis menunjukkan bahwa efektifitas air perasan buah jeruk nipis terhadap pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* memiliki perbedaan yang nyata pada varian yang berbeda dengan F hitung >0.05 ($316.72 > 2.27$).

Berdasarkan uji lanjut beda nyata terkecil terlihat pada tabel dapat diketahui bahwa perlakuan A (15%) berbeda nyata dengan perlakuan B (30%), C (45%), D (60%), E (75%) dan F (90%). Perlakuan B (30%) berbeda nyata dengan perlakuan A (15%), C (45%), D (60%), E (75%) dan F (90%). Perlakuan C (45%) berbeda nyata dengan perlakuan A (15%), B (30%), D (60%), E (75%) dan F (90%). Perlakuan D (60%) berbeda nyata dengan perlakuan A (15%), B (30%), C (45%), E (75%) dan F (90%). Perlakuan E (75%) berbeda nyata dengan perlakuan A (15%), B (30%), C (45%), D (60%) dan F (90%). Perlakuan F (90%) berbeda nyata dengan perlakuan A (15%), B (30%), C (45%), D (60%) dan E (75%).

Hasil penelitian ini dapat dinyatakan bahwa hipotesis H_0 ditolak dan hipotesis H_1 diterima yang menunjukkan bahawa uji potensi air perasan buah jeruk nipis mempunyai pengaruh nyata dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* secara in vitro.

Kesimpulan

Hasil penelitian uji daya hambat air perasan buah jeruk nipis (*Citrus aurantifolia* S.) terhadap pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* yang diambil dari benih lele dumbo (*Clarias gariepinus*) dapat disimpulkan sebagai berikut:

1. Pemberian air perasan buah jeruk nipis berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* yang diambil dari benih lele dumbo.

2. Konsentrasi air perasan buah jeruk nipis 90 % (Perlakuan F) memberikan hasil yang paling tinggi dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Edwardsiella tarda* yaitu sebesar 17.25 mm, kemudian perlakuan perlakuan E (75%) yaitu 13,75 mm, perlakuan D (60%) yaitu 9,75 mm, Perlakuan C (45%) yaitu 6 mm, perlakuan B (30%) yaitu 3 mm dan perlakuan A (15%) yaitu 1,125 mm
3. Perlakuan A (15%) tidak berpengaruh nyata jika dibandingkan dengan perlakuan yang lainnya.

Daftar Pustaka

- Abdul Razak, Aziz Djamal dan Gusti Revilla, 2013. Uji Daya Hambat Air Perasan Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* s.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus* Secara In Vitro. <http://jurnal.fk.unand.ac.id> Jurnal. Dikutip pada tanggal 1 Agustus 2013.
- Astuti, A. B. 2003. Interaksi Pestisida dan Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.). Skripsi. Departemen Budidaya Perairan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Institut Pertanian Bogor.
- Austin B. dan D.A. Austin, 1999. Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and wild Fish. John Willey and Sons Ltd. England.
- Buller, N.B., 2004. Bacteria From Fish and other Aquatic Animals : A Practical Identification Manual. CABI Pub. Massachusetts, USA.
- Chomnawang, M.T, Surassno S., Nukoolkarn, V.S., and Gristanapan, W. 2005. Antimicrobia effects of Thai medicinal plants against acneinducing bacteria. *Jethnopharmacol* 101. 330-333 hlm.
- Coma, Irena, M. Edyta, M. Grzelak. 2010. Bioautography Detection in Thin-Layer Chromatography. *Jurnal o Chromatography A Chroma*-351708.
- Enny, N. 2005. Uji Aktivitas Antibakteri Sari Buah Majapahit (*Crescentia cujete* L.) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. Skripsi Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, hal 16-18. Universitas Institut Teknologi Sepuluh November. Surabaya.
- Feriyanto, N. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Minyak atsiri Kulit Buah Jeruk Keprok (*Citrus nobilis* L.) terhadap *Staphylococcus* dan *Escherichia coli*. Fakultas Farmasi Universitas Muhammadiyah Surakarta. Surakarta.
- Kadi Mey, I. 2014. Uji Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak (*Annona muricata*) Secara In Vitro. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2011. Kelangsungan Hidup Ikan Mas (*Cyprinus carpio* L) yang diberi Pakan Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*) dan di Infeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*, 16,1 (2011) : 144-160.
- Mathur, J.N. 2009. Detection Of Antimikrobal Resistence in Common Gram Negative and Gram Positive Bacteria Encountered in Infectious Diseasean Update. *ICMR Bulletin*. Indian Council of Medical Research Ansari Nagar. New Delhi-110 029. ISSN 0377-4910. India. 7 p.
- Nadeak, A. 2009. Kawasan Basis Sektor Perikanan dan Kelautan. *Jurnal Perencanaan dan Pengembangan Wilayah*. 4(3) : 102-110.
- Pusat Karantina Ikan, 2007. Metode Standar Pemeriksaan HPIK Golongan Bakteri *Edwardsiella tarda* Dokumen 5. Jakarta.
- Razak, A., Aziz, D., dan Gusti, R. 2013. Uji Daya Hambar Air Perasan Buah Jeruk Nipis (*Citrus aurantifolia* S.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus*

aureus Secara In Vitro. Jurnal kesehatan
Andalas

<http://viorenshafloody.blogspot.co.id/definisi-sterilisasi-tujuan-caraproses.html?m=1>
. Diakses pada 25 Desember 2016.

Plumb, J.A., 1999. Edwardsiella Septicaemias.
Dalam : Fish Diseases and Disorder, Vol.
3: Viral Bacterial and Fungal Infections,
P.T.K. Woo & D.W. Bruno (ed). pp. 479-
521. CABI Pub. New York.

Woo P.T.K. and D.W. Bruno (editors) 1999.
Fish Diseases and Disorder, Vol. 3: Viral
Bacterial and Fungal Infections. CABI
Pub. New York. 896 pp.

Vioren, 2011. Defnisi Sterilisasi, Tujuan, dan
Pelaksanaan Sterilisasi.