

**UJI DAYA HAMBAT BAKTERI *Aeromonas hydrophila*
SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR
DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L) SECARA *IN VITRO***

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

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh :

**KADI MEY ISMAIL
NIM. 115080500111055**



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



UJI DAYA HAMBAT BAKTERI *Aeromonas hydrophila*
SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR
DAUN SIRSAK (*Annona muricata L*) SECARA *IN VITRO*

SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
Di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya

Oleh :
KADI MEY ISMAIL
NIM. 115080500111055



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015



repository.ub.ac

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

UJI DAYA HAMBAT BAKTERI *Aeromonas hydrophila*
SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR
DAUN SIRSAK (*Annona muricata L*) SECARA *IN VITRO*

Oleh :
KADI MEY ISMAIL
NIM. 115080500111055

Telah dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal 28 Januari 2015
Dan dinyatakan memenuhi syarat

DOSEN PENGUJI

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

MENYETUJUI,
DOSEN PEMBIMBING I

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

DOSEN PEMBIMBING II

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

MENGETAHUI,
KETUA JURUSAN MSP

Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS
NIP. 19622825 198603 2 001
Tanggal :

PERNYATAAN ORISINALITAS

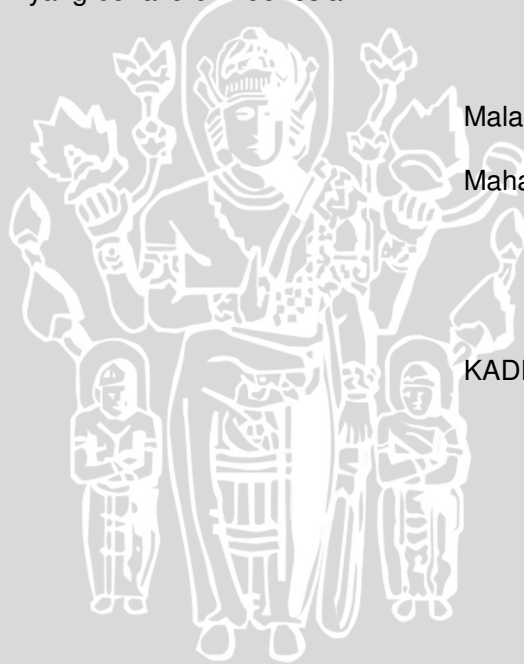
Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar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

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

Malang, Januari 2015

Mahasiswa

KADI MEY ISMAIL



UCAPAN TERIMA KASIH

Pembuatan laporan skripsi ini tidak luput dari bantuan banyak pihak, untuk itu penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Allah SWT yang telah memberikan kelancaran dan berbagai kemudahan pada penulis dalam menyelesaikan laporan skripsi ini.
2. Sutarjo (Bapak), Euis D. Sonariah (Mamah), David Sulaeman (Aa) dan Nuriyani (Mbak) yang tidak bosan-bosannya mendoakan penulis dan telah memberikan dukungan baik moril dan materil kepada penulis.
3. Prof. Dr. Ir. Yogi Sugito dan keluarga serta Ibu Isnaini sebagai keluarga kedua bagi penulis yang telah membantu penulis baik moril dan materil selama menjalankan proses pendidikan S1.
4. Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS dan Dr. Ir. M. Fadjar, Msc sebagai dosen pembimbing yang telah membimbing penulis dalam proses penyelesaian skripsi dari mulai proposal hingga laporan.
5. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS sebagai dosen pembimbing akademik yang telah membimbing penulis selama menjalankan proses pendidikan s1.
6. Mbak Titin dan Mbak Heni yang telah membantu penulis dalam melakukan penelitian di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan.
7. Teman-teman Aquatic Spartan BP 2011, pengurus HMPBP 2014 yang namanya tidak dapat disebutkan satu persatu yang telah mengukir sejarah bersama dalam kehidupan penulis selama menimba ilmu di kampus Universitas Brawijaya.
8. Joko Abdillah, Fajriyan Hadiana, Fachrul Roji, Alif Rahman Hakim dan I Made Dedi Maharyawan yang telah menemani penulis selama proses penelitian.
9. Mas Dimas, Mbak Dista dan Mbak Mega yang telah membantu penulis selama proses penelitian.

10. Semua pihak yang telah banyak membantu penulis selama penelitian dan pembuatan laporan skripsi ini.

Malang, Januari 2015

Penulis



KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji dan syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyajikan Laporan Skripsi yang berjudul **“UJI DAYA HAMBAT BAKTERI *Aeromonas hydrophila* SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN SIRSAK (*Annona muricata* L) SECARA *IN VITRO*”**. Laporan Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Sangat disadari bahwa dengan kekurangan dan keterbatasan yang dimiliki penulis, walaupun telah dikerahkan segala kemampuan untuk lebih teliti, tetapi masih dirasakan banyak kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi yang membutuhkan.

Malang, Januari 2015

Penulis

RINGKASAN

KADI MEY ISMAIL. Uji Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak (*Annona muricata L*) Secara *In Vitro*. **Prof. Dr. Ir. SRI ANDAYANI, MS** dan **Dr. Ir. M. FADJAR, Msc.**

Budidaya perikanan intensif menggunakan padat tebar dan jumlah pakan yang tinggi yang dapat mengakibatkan menurunnya kualitas air budidaya karena tingginya buangan metabolit sehingga akan menimbulkan berbagai macam penyakit (Mariyono dan Sundana, 2002). Salah satu penyakit yang timbul akibat menurunnya kualitas perairan tersebut yaitu penyakit bakterial yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Selama ini antibakteria sintetis banyak digunakan dalam budidaya seperti Cloramphenicol dan Oxytetracycline untuk menghambat atau membunuh bakteri patogen. Dampak dari penggunaan antibakteria sintetis banyak menimbulkan masalah baru pada budidaya seperti resistensi bakteri, retensi bahan toksik dan bersifat residu bagi tubuh konsumen. Hal ini berpengaruh terhadap ekspor hasil perikanan yang ditolak karena diduga menggunakan pestisida (Sarida *et al.*, 2010). Oleh sebab itu, dibutuhkan adanya antibakteria alternatif yang dapat digunakan untuk menghambat atau membunuh bakteri, salah satunya adalah dengan penggunaan daun sirsak (*Annona muricata L*).

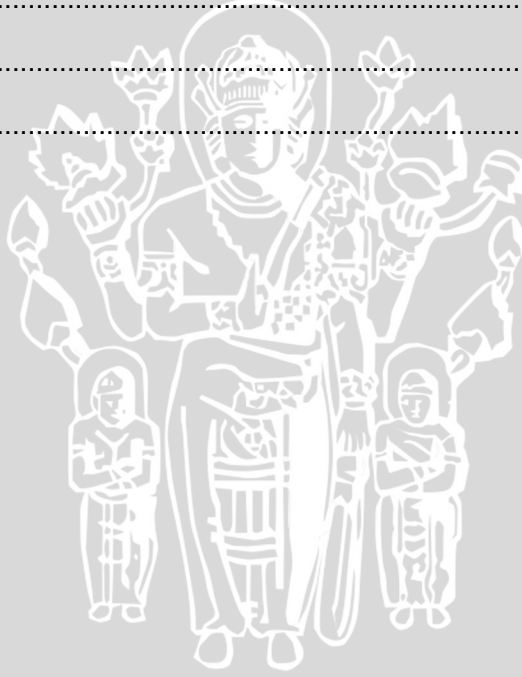
Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan, FPIK UB bulan Desember 2014 dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian dilakukan 5 perlakuan dan tiga kali ulangan yaitu dengan menggunakan dosis 80 ppm (perlakuan A), 90 ppm (perlakuan B), 100 ppm (perlakuan C), 110 ppm (perlakuan D), 120 ppm (perlakuan E). Parameter utama dalam penelitian ini adalah melihat atau mengukur diameter zona bening yang dihasilkan di sekitar kertas cakram yang dihasilkan dari berbagai dosis yang digunakan. Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah lama waktu perendaman yang dilakukan.

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini adalah pada perlakuan A, ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) telah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan rata-rata diameter zona bening yaitu $3,35 \pm 0,28$ mm. Perlakuan E diperoleh rata-rata diameter zona bening sebesar $10,85 \pm 0,53$ mm, perlakuan D diperoleh rata-rata diameter zona bening sebesar $9,07 \pm 0,40$ mm, perlakuan C diperoleh rata-rata diameter zona bening sebesar $7,18 \pm 0,24$ mm, pada perlakuan B diperoleh rata-rata diameter zona bening sebesar $5,07 \pm 0,40$ mm. Hasil tersebut setelah dilakukan uji statistik berbeda sangat nyata dan semakin tinggi dosis yang digunakan memberikan pengaruh terhadap diameter zona bening yang dihasilkan. Grafik yang dihasilkan berupa grafik linier dengan persamaan $y=0,19x - 11,897$ dengan tingkat kepercayaan $R^2= 0,9866$. Ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) merupakan antibakteria yang bersifat bakteriostatik, karena hanya menghambat pertumbuhan tanpa membunuh bakteri.

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	vii
KATA PENGANTAR	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL	xi
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1 PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	2
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Kegunaan Penelitian	3
1.5 Hipotesis	3
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian	4
2 TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Daun Sirsak (<i>Annona muricata L.</i>)	5
2.1.1 Komponen Kimia Daun Sirsak (<i>A. muricata L.</i>)	5
2.1.2 Manfaat Daun Sirsak (<i>A. muricata L.</i>)	5
2.2 <i>Aeromonas hydrophila</i>	6
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	6
2.2.2 Media Biakan Bakteri	8
2.3 Ekstraksi	10
2.4 Uji Aktivitas Anti Mikroba <i>In Vitro</i>	11
2.4.1 Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>)	11
2.4.2 Uji Cakram	12
2.5 Antibakteri	13
3 METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	15
3.1.1 Peralatan Penelitian	15
3.1.2 Bahan Penelitian	16
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian	16
3.2.1 Metode Penelitian	16
3.2.2 Rancangan Penelitian	17
3.3 Prosedur Penelitian	18
3.3.1 Persiapan Penelitian	18
3.3.1.1 Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Sirsak (<i>A. muricata L.</i>)	18
3.3.1.2 Sterilisasi Alat dan Bahan	19
3.3.1.3 Pembuatan Media Agar Miring	20
3.3.1.4 Pembuatan Media NB (<i>Nutrient Broth</i>)	20
3.3.1.5 Pembuatan Media Agar untuk Uji Cakram	20

3.3.1.6 Pembuatan Media MHB (<i>Mueller Hinton Broth</i>)	21
3.3.1.7 Peremajaan Bakteri <i>A. hydrophila</i>	21
3.3.1.8 Kultur Bakteri <i>A. hydrophila</i>	22
3.3.1.9 Cara Memperoleh Bakteri <i>A. hydrophila</i> 10 ⁷	22
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian	23
3.3.2.1 Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>)	23
3.3.2.2 Uji Cakram	23
3.4 Parameter Uji	24
3.4.1 Parameter Utama	24
3.4.2 Parameter Penunjang	24
3.5 Analisis Data	24
4 HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>)	25
4.2 Uji Cakram	26
5 KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	34
5.2 Saran	34
DAFTAR PUSTAKA	35
LAMPIRAN	38



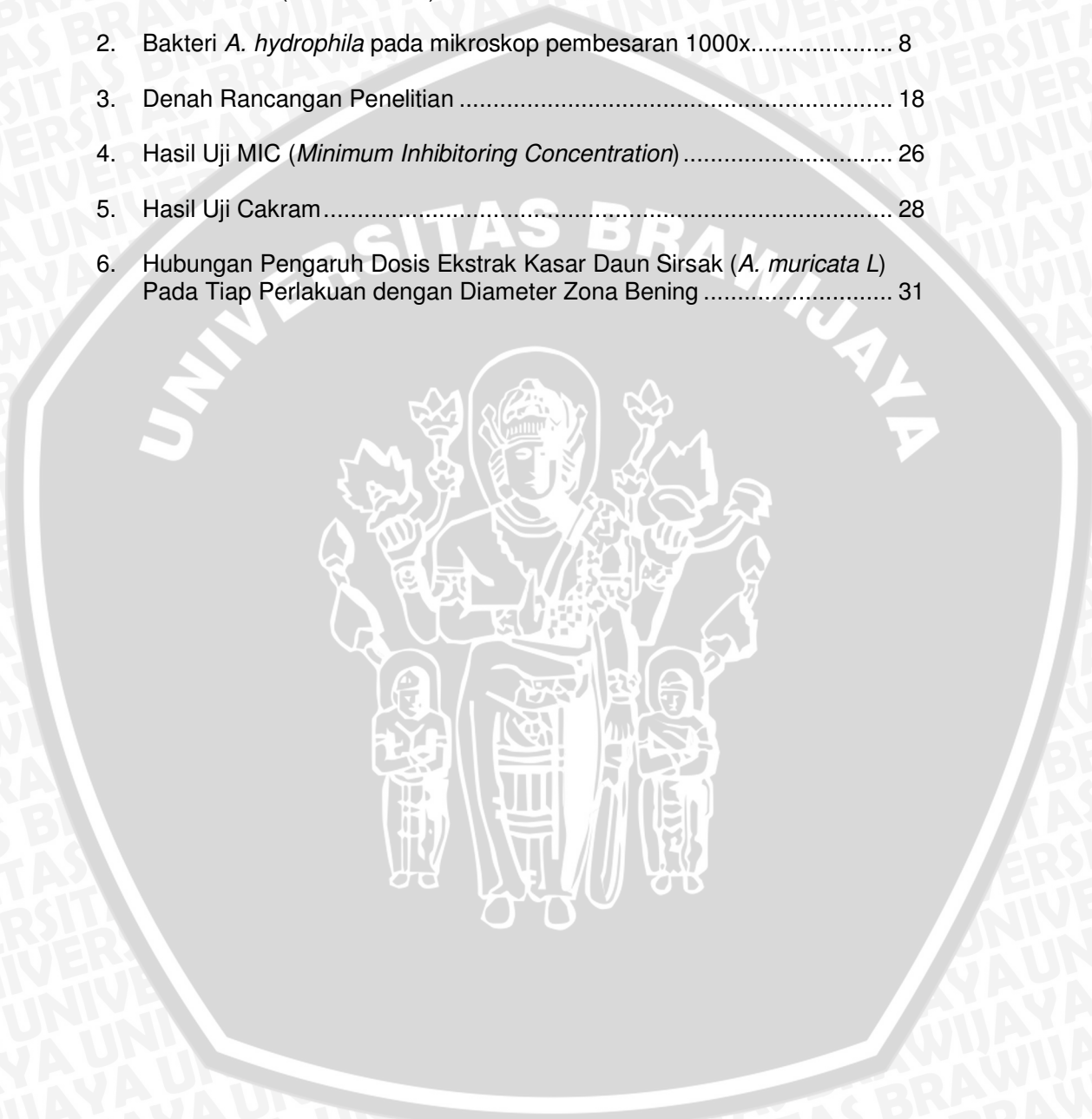
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Peralatan Penelitian.....	15
2. Bahan-bahan Penelitian	16
3. Hasil Pengamatan Uji MIC Menggunakan Spektrofotometer	25
4. Klasifikasi Respon Hambatan	27
5. Hasil Rata-rata Pengamatan Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak (<i>A. muricata L</i>) terhadap Bakteri <i>A. Hydrophila</i>	29
6. Hasil Anlalisa Sidik Ragam Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak (<i>A. muricata L</i>).....	29
7. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak (<i>A. muricata L</i>).....	30



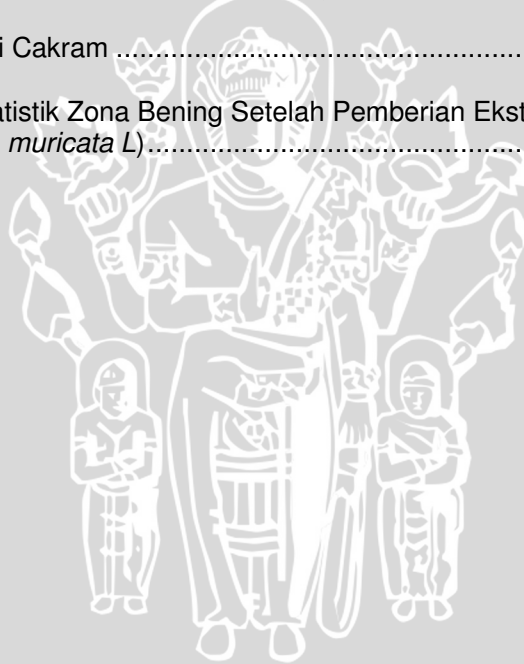
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Daun Sirsak (<i>A. muricata L</i>).....	6
2. Bakteri <i>A. hydrophila</i> pada mikroskop pembesaran 1000x.....	8
3. Denah Rancangan Penelitian	18
4. Hasil Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>).....	26
5. Hasil Uji Cakram.....	28
6. Hubungan Pengaruh Dosis Ekstrak Kasar Daun Sirsak (<i>A. muricata L</i>) Pada Tiap Perlakuan dengan Diameter Zona Bening	31



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat Penelitian.....	38
2. Komposisi Media	40
3. Proses Ekstraksi Daun Sirsak (<i>A. muricata L</i>).....	41
4. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>A. hydrophila</i> dari BBPBAP Jepara.....	42
5. Gambar Isolat Murni dan Peremajaan Bakteri <i>A. hydrophila</i> Pada Media Agar Miring	43
6. Hasil Pengenceran Bakteri	43
7. Skema Kerja Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>).....	44
8. Skema Kerja Uji Cakram	45
9. Perhitungan Statistik Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak (<i>A. muricata L</i>).....	46



I. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Potensi ekonomi sumber daya pada sektor perikanan diperkirakan mencapai US\$ 82 miliar per tahun. Potensi tersebut meliputi potensi perikanan tangkap sebesar US\$ 15,1 miliar per tahun, potensi budidaya laut sebesar US\$ 46,7 miliar per tahun, potensi perairan umum sebesar US\$ 1,1 miliar per tahun, potensi budidaya tambak sebesar US\$ 10 miliar per tahun, potensi budidaya air tawar sebesar US\$ 5,2 miliar per tahun, dan potensi bioteknologi kelautan sebesar US\$ 4 miliar per tahun. Selain itu, potensi lainnya pun dapat dikelola, seperti sumber daya yang tidak terbarukan, sehingga dapat memberikan kontribusi yang nyata bagi pembangunan Indonesia (Putra, 2011).

Salah satu faktor yang menghambat keberhasilan intensifikasi dalam budidaya perairan adalah terjadinya serangan penyakit terhadap organisme budidaya. *Food and Agriculture Organization* (FAO) melaporkan, bahwa wabah penyakit menjadi perhatian utama terhadap perkembangan sektor perikanan budidaya, dengan perkiraan kerugian global karena penyakit mencapai kisaran US \$ 3 milyar per tahun (Subasinghe *et al.*, 2001).

Budidaya perikanan intensif menggunakan padat tebar dan jumlah pakan yang tinggi yang dapat mengakibatkan menurunnya kualitas air budidaya karena tingginya buangan metabolit sehingga akan menimbulkan berbagai macam penyakit (Mariyono dan Sundana, 2002). Salah satu penyakit yang timbul akibat menurunnya kualitas perairan tersebut yaitu penyakit bakterial yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila*. Bakteri ini merupakan bakteri Gram negatif yang pada umumnya hidup di perairan tawar yang mengandung bahan organik tinggi. Gejala yang timbul pada ikan akibat infeksi bakteri *A. hydrophila* yaitu pada permukaan tubuhnya terdapat warna merah darah (pendarahan) terutama pada

bagian dada, pangkal sirip dan perut, selaput lendir berkurang sehingga tidak licin, dibebepara bagian terdapat kulit yang terlihat melepuh, sirip rusak dan pecah-pecah, insang rusak dan berwarna keputih-putihan sampai kebiru-biruan dan bahkan serangan penyakit yang lebih parah dapat menyebabkan pendarahan pada organ dalam ikan seperti ginjal atau limpa sehingga dapat menyebabkan kematian masal pada saat kegiatan budidaya (Wintoko *et al.*, 2013).

. Selama ini antibakteri sintesis banyak digunakan dalam budidaya seperti *Cloramphenicol* dan *Oxytetracycline* untuk menghambat atau membunuh bakteri patogen. Dampak dari penggunaan antibakteri sintesis banyak menimbulkan masalah baru pada budidaya seperti resistensi bakteri, retensi bahan toksik dan bersifat residu bagi tubuh konsumen. Hal ini berimbas pada penolakan hasil perikanan yang diduga masih menggunakan pestisida pada proses ekspor ikan (Sarida *et al.*, 2010). Oleh sebab itu, dibutuhkan adanya antibakteri alternatif yang dapat digunakan untuk menghambat atau membunuh bakteri, salah satunya adalah dengan penggunaan daun sirsak. Menurut Permatasari *et al.* (2013), daun sirsak yang mengandung *flavonoid*, *saponin*, *tanin* dan *alkaloid* ini berpotensi sebagai bahan untuk mencegah penyakit infeksi bakteri. Berdasarkan informasi tersebut, sifat antibakteri pada daun sirsak diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

1.2 Rumusan Masalah

Saat ini kegiatan budidaya ikan khususnya ikan air tawar menggunakan sistem budidaya secara intensif. Sistem budidaya intensif yang menerapkan padat penebaran tinggi menyebabkan ikan lebih rentan terserang penyakit yang salah satunya ditimbulkan oleh bakteri *A. hydrophila* (Kamaludin, 2011).

Pencegahan dan pengobatan penyakit ikan selama ini menggunakan bahan kimia dan antibiotik. Penggunaan antibiotik dan bahan kimia secara terus menerus

dapat menimbulkan efek samping baik terhadap lingkungan maupun manusia sebagai konsumen (Mariyono dan Sundana, 2002).

Daun sirsak mengandung *flavonoid*, *saponin*, *tanin* dan *alkaloid* berpotensi sebagai bahan untuk mencegah penyakit infeksi bakteri (Permatasari *et al.*, 2013). Berdasarkan informasi tersebut maka dibutuhkan penelitian mengenai pemanfaatan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) dalam menghambat bakteri *A. hydrophila*. Berhubungan dengan hal tersebut, maka didapatkan rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

- Apakah pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi terhadap pembaca terutama para pembudidaya ikan air tawar yang berguna untuk kemajuan dunia perikanan yang ramah lingkungan dengan menggunakan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

1.5 Hipotesis

- H0 : Diduga pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) tidak berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila*.
- H1 : Diduga pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) dapat berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila*.

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Desember 2014.



II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Daun Sirsak (*Annona muricata L*)

2.1.1 Komponen Kimia Daun Sirsak (*A. muricata L*)

Daun sirsak mengandung flavonoid, tanin, alkaloid, saponin, kalsium, fosfor, hidrat arang, vitamin (A, B dan C), fitosterol, kalsium oksalat dan beberapa kandungan kimia lainnya termasuk *annonaceous acetogenins* (Mangan, 2009).

Salah satu kandungan kimia daun sirsak yang berperan penting untuk obat adalah flavonoid (Tenrirawe, 2011). Flavonoid merupakan salah satu metabolit sekunder dan keberadaannya pada daun tanaman dipengaruhi oleh proses fotosintesis sehingga daun muda belum terlalu banyak mengandung flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa bahan alam dari golongan fenolik (Sjahid 2008).

Menurut Wullur *et al.* (2011), selain flavonoid, kimia sirsak yang juga dimanfaatkan sebagai obat adalah tanin. Tanin merupakan senyawa metabolit sekunder yang sering ditemukan pada tanaman. Tanin merupakan astrigen, polifenol, berasa pahit, dapat mengikat dan mengendapkan protein serta larut dalam air (terutama air panas) (Subroto dan Saputro, 2006).

Senyawa flavonoid berfungsi sebagai bakterostatik dan mekanisme kerjanya mendenaturasi protein sel bakteri dan dapat merusak membran sitoplasma (Aulia, 2008). Sementara menurut Ajizah (2007) tanin diduga dapat mengkerutkan dinding sel sehingga mengganggu permeabilitas sel.

2.1.2 Manfaat Daun Sirsak (*A. muricata L*)

Sirsak (*A. muricata L*) merupakan salah satu jenis tanaman dari familia Annonaceae yang mempunyai manfaat besar bagi kehidupan manusia, yaitu sebagai tanaman buah yang syarat dengan gizi dan merupakan bahan obat

tradisional yang memiliki multikhasiat. Dengan adanya flavonoid mampu menjadi antibakteri dan obat bagi penyembuhan beberapa penyakit. (Jannah, 2010).

Daun sirsak memiliki kandungan senyawa acetogenin yang lebih dominan dibandingkan dengan bagian tumbuhan yang lain. Senyawa acetogenin memiliki banyak manfaat antara lain sebagai antikanker, antitumor, anti-inflamasi, antidepresi, antivirus, dan antibakteri (Zuhud, 2011).

Daun sirsak secara tradisional digunakan untuk mencegah dan mengobati abses, artritis, asma, bronkitis, gangguan empedu, diabetes, jantung, hipertensi, cacangan, gangguan hati, malaria, rematik, obat penenang, tumor dan kanker (Wicaksono, 2011). Selain itu digunakan juga untuk pengobatan beberapa jenis penyakit yang disebabkan oleh bakteri seperti pneumonia, diare, infeksi saluran kemih dan beberapa jenis penyakit kulit karena ekstrak dari daun ini memiliki senyawa antibakteri yang berlimpah (Gajalakshmi, *et al.*, 2012). Adapun gambar dari daun sirsak (*A. muricata* L) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Daun Sirsak (*A. muricata* L)

2.2 *Aeromonas hydrophila*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

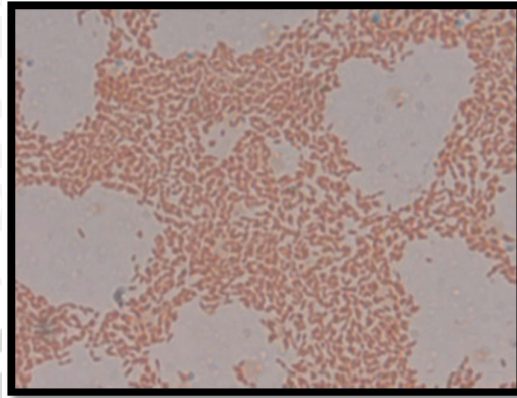
Bakteri *Aeromonas hydrophila* adalah penyebab penyakit *Motile Aeromonas Septicemia* (MAS) yang menyerang beberapa spesies ikan air tawar. Penyakit ini

merupakan masalah serius pada usaha budidaya baik budidaya intensif maupun tradisional. Penyakit ini di Asia Tenggara, pertama kali terjadi di Jawa Barat pada tahun 1980 yang menyebabkan kematian 82,2 ton ikan air tawar dalam sebulan, sementara di Jawa Tengah tahun 1984, sebanyak 1,6 ton ikan lele mati (Angka, 2001). Kasus kematian masal ini hingga ke wilayah Banyumas pada tahun 2003, tercatat 52.000 ekor gurami dan 20.000 ekor lele sangkuriang yang terserang. Tahun 2004 sebanyak 28.000 ekor gurami dan 15.000 ekor lele sangkuriang juga terserang (Dinas peternakan dan perikanan wilayah Banyumas, 2005).

Menurut Martin (2004), klasifikasi bakteri *A. hydrophila* adalah sebagai berikut :

Domain	: Bacteria
Kingdom	: Proteobacteria
Filum	: Gammaproteobacteria
Kelas	: Aeromonadales
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>

Bakteri ini termasuk bakteri anaerob yang mendiami lingkungan perairan dan dapat hidup pada saluran pencernaan (Rey *et al.*, 2009). Bakteri ini termasuk bakteri anaerob, Gram negatif yang memiliki flagella polar dan memiliki diameter 1,0-3,5 mikrometer. Kordi (2011), menyatakan bahwa bakteri ini memiliki ciri-ciri berbentuk seperti batang, ukurannya 1-4,4 x 0,4-1 mikron. Bersifat Gram negatif, fakultatif aerobik (dapat hidup dengan atau tanpa oksigen), tidak berspora, bersifat motil (bergerak aktif) karena mempunyai flagel (*monotrichous flagella*) yang keluar dari salah satu kutubnya. Hayes (2000) dalam Tarigan (2014), juga berpendapat bahwa bakteri *A. hydrophila* adalah jenis bakteri yang bersifat anaerobik fakultatif, dapat memfermentasi gula. Adapun gambar dari bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Bakteri *A. hydrophila* pada mikroskop pembesaran 1000x (Herupradoto dan Gandul, 2010)

2.2.2 Media biakan bakteri

Dwidjoseputro (2010), media dan dasar makanan yang baik bagi pemeliharaan bakteri ialah media yang mengandung zat-zat organik seperti rebusan daging, sayur-sayuran, sisa makanan atau ramuan-ramuan yang dibuat oleh manusia. Medium buatan yang banyak digunakan dalam pekerjaan rutin di laboratorium ialah kaldu cair dan kaldu agar. Medium buatan manusia itu dapat berupa :

a. Medium Cair

Medium cair yang biasa dipakai ialah kaldu yang disiapkan sebagai berikut. Satu liter air murni ditambahkan 3 g kaldu daging lembu dan 5 g pepton. Pepton ini adalah protein yang terdapat pada daging, air susu, kedelai dan putih telur. Pepton banyak mengandung N_2 , sedang kaldu berisi garam-garam mineral dan lain-lainnya lagi. Medium itu kemudian ditentukan pHnya 6,8 sampai 7 jadi sedikit asam atau netral. Setelah itu disaring dengan menggunakan kertas saring, setelah tabung atau botol berisi medium kaldu tersebut disumbat dengan kapas, dan hasil saringan yang di dapat disimpan ke dalam alat pesteril (Autoklaf).

b. Medium Kental (Padat)

Suatu penemuan yang bagus ialah dengan medium dari kaldu yang dicampur dengan sedikit agar-agar. Setelah medium itu disterilisasikan dan kemudian dibiarkan mendingin, maka akan menjadi medium padat. Gelatin dapat juga dipakai sebagai bahan pengental dan akan mencair pada suhu 95°C, sedangkan gelatin sudah mencair pada suhu 23°C oleh karena itu medium yang mengandung gelatin harus disimpan ditempat yang lebih dingin dari temperatur kamar.

c. Medium Diperkaya

Kebanyakan bakteri biasa hidup pada dasar makanan seperti yang sudah diterangkan diatas. Namun apabila bakteri-bakteri yang membutuhkan nilai gizi yang tinggi maka diperlukan pengkayaan media. Zat makanan yang biasa ditambahkan yaitu fibrinogen. Fibrinogen adalah zat yang menyebabkan darah menjadi kental apabila keluar. Serum atau darah itu dicampurkan ke dalam medium yang sudah di sterilkan.

d. Medium Kering

Perkerjajaan laboratorium sekarang ini banyak dipermudah dengan adanya bermacam-macam medium yang tersedia dalam bentuk serbuk kering. Untuk menyiapkan medium tersebut cukup dengan mengambil sekian gram serbuk kering tersebut untuk dilarutkan dalam sekian liter air dan kemudian larutan disterilkan.

e. Medium Sintetik

Medium sintetik berupa ramuan-ramuan zat organik yang tertentu yang mengandung zat karbon dan nitrogen. Bakteri autotrof dapat hidup dalam medium ini. Bakteri saprofit dapat dipelihara di dalam medium ini asalkan ditambahkan natrium sitrat dan natrium ammonium fosfat.

2.3 Ekstraksi

Proses ekstraksi terdiri dari tiga langkah besar, yaitu proses pencampuran, proses pembentukan fase setimbang dan proses pemisahan fase setimbang. Proses ekstraksi dapat berjalan dengan baik apabila pelarut ideal harus memenuhi syarat-syarat yaitu selektivitasnya tinggi, memiliki perbedaan titik didih dengan *solute* cukup besar, perbedaan kepadatan cukup besar, tidak beracun, tidak bereaksi secara kimia dengan *solute* maupun diluen, viskositasnya kecil, tidak bersifat korosif, tidak mudah terbakar, murah dan mudah didapat, beberapa faktor yang berpengaruh dalam proses ekstraksi adalah temperatur, waktu kontak, perbandingan *solute*, faktor ukuran partikel, pengadukan dan waktu dekantasi (Yasita dan Rachmawati, 2009).

Menurut Katno (2009), faktor-faktor yang berpengaruh dalam ekstraksi antara lain ukuran bahan, waktu kontak antara bahan dengan pelarut dan suhu ekstraksi. Faktor lain yang menentukan hasil ekstraksi adalah perbandingan antara sampel terhadap cairan pengestraksi (jumlah bahan pengestraksi) dan jangka waktu di mana sampel kontak dengan cairan pengestraksi (waktu ekstraksi). Apabila bahan yang digunakan pada proses ekstraksi menggunakan bahan dari dedaunan maka bahan tersebut harus cukup tua.

Menurut Simanjuntak (2008), ekstraksi adalah suatu proses pemisahan kandungan senyawa kimia dari jaringan tumbuhan ataupun hewan dengan menggunakan penyaring tertentu. Ada beberapa metode ekstraksi, yaitu :

- 1) Cara Dingin
 - a. Maserasi adalah proses pengestrakan simplisia dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan. Remaserasi berarti dilakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserasi pertama, dan seterusnya.

- b. Perkolasi adalah ekstraksi dengan pelarut yang selalu baru sampai terjadi penyaringan sempurna yang umumnya dilakukan pada temperatur kamar. Proses perkolasi terdiri dari tahapan pengembangan bahan, tahap maserasi antara, tahap perkolasi sebenarnya (penetesan/penampungan ekstrak), terus-menerus sampai diperoleh ekstrak (perkolat).
- 2) Cara Panas
 - a. Refluks adalah ekstraksi dengan pelarut pada temperatur titik didihnya selama waktu tertentu dan dalam jumlah pelarut terbatas yang relatif konstan dengan adanya pendingin balik.
 - b. Digesti adalah maserasi dengan pengadukan kontinyu pada temperatur yang lebih tinggi dari temperatur kamar yaitu pada suhu 40-50°C.
 - c. Infus adalah ekstraksi menggunakan pelarut air pada temperatur penangas air (bejana infus tercelup dalam penangas air mendidih, temperatur terukur 90°C) selama 15 menit.
 - d. Dekok adalah ekstraksi dengan pelarut air pada temperatur 90°C selama 30 menit.
 - e. Sokletasi adalah metode ekstraksi untuk bahan yang tahan pemanasan dengan cara meletakkan bahan yang akan diekstraksi dalam sebuah kantong ekstraksi (kertas saring) di dalam sebuah alat ekstraksi dari gelas yang bekerja kontinyu.

2.4 Uji Aktivitas Anti Mikroba in Vitro

2.4.1 Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Metode pengujian MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) adalah merupakan salah satu metode yang bertujuan untuk menguji aktivitas zat antimikroba secara invitro. Dengan cara menentukan konsentrasi terendah dari zat tersebut yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan dari mikroorganisme yang diuji.

Terdapat 2 metode yang digunakan dalam pengujian MIC yaitu teknik tabung pengenceran (*tube dilution technique*) dan metode difusi agar (*agar diffusion method*). Dalam teknik tabung pengenceran disiapkan beberapa seri tabung yang berisi medium kultur yang telah diinokulasi dengan mikroorganisme yang akan diujikan dan diberi zat antimikroba dengan konsentrasi berbeda-beda. Adanya aktivitas zat antimikroba ditentukan dengan kekeruhan yang terlihat pada tabung tersebut. MIC dipengaruhi oleh jenis organisme, ukuran, inokulan, komponen media kultur, waktu inkubasi, serta kondisi inkubasi berupa suhu, pH, atau aerasi. Metode tabung pengenceran ini tidak dapat digunakan untuk menentukan zat tersebut bersifat sidal, statis atau litik (Schegel and Schmidt, 1994 dalam Gunawan, 2007).

Hasil dari uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) menurut Wardani *et al.* (2012), menyatakan bahwa dosis yang digunakan berbanding terbalik dengan nilai absorbansi yang dihasilkan atau semakin tinggi dosis yang digunakan maka nilai absorbansi semakin rendah. Namun Putri *et al.* (2008), menyatakan bahwa nilai absorbansi yang berbanding lurus dengan dosis yang digunakan disebabkan karena spektrofotometer tidak mampu membedakan kekeruhan warna ekstrak dengan kekeruhan bakteri oleh karena itu pengamatan bisa dibantu dengan melihat warna dan membandingkan dengan kontrol.

2.4.2 Uji Cakram

Metode difusi dilakukan dengan metode Kirby-Bauer yang dikenal dengan sebutan metode cakram kertas. Tiap-tiap cakram kertas kosong sebelumnya dipanaskan dalam oven pada suhu 70°C selama 15 menit, kemudian kertas cakram dicelupkan ke dalam larutan uji. Cakram yang telah berisi supernatan, kemudian didiamkan selama 15 menit sebelum diletakkan pada media uji. Kemudian secara aseptik, setelah kertas cakram menyerap supernatant tersebut,

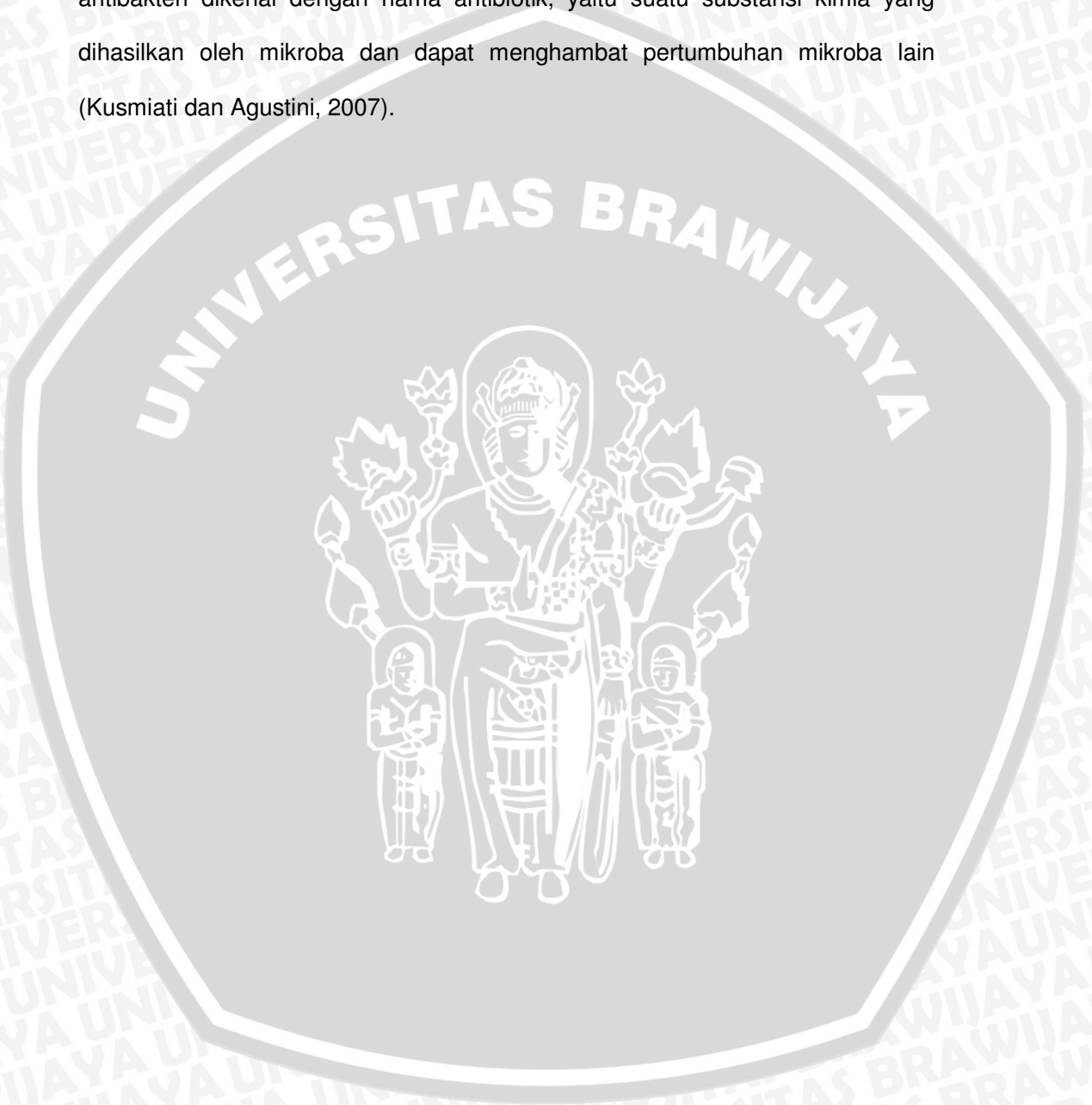
masing-masing diletakkan pada permukaan medium yang telah berisi mikroba uji dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, dilakukan pengukuran diameter zona bening, yaitu zona bening yang terbentuk di sekitar cakram, dengan menggunakan penggaris millimeter (Noverita *et al.*, 2009).

Metode yang paling banyak direkomendasikan dan digunakan secara luas dalam praktek di laboratorium ialah metode Kirby-Bauer. Dalam metode ini, bakteri uji diinokulasikan secara keseluruhan ke dalam sebuah media agar dan sebuah kertas cakram (*paper disk*) berukuran 4-6 mm yang mengandung konsentrasi tertentu dari antibiotik yang akan diujikan dan ditempatkan di permukaan agar cawan kemudian diinkubasi. Setelah inkubasi pada suhu dan waktu tertentu, tergantung pada jenis mikroba uji diamati adanya zona hambat. Diameter penghambatan diukur dan jika cukup lebar berarti bakteri cukup sensitif terhadap senyawa antibakteri tersebut. Apabila antibakteri pada kadar rendah dapat memberikan diameter zona hambat yang lebar dan bening di sekitar bahan antibakteri, maka hal ini menunjukkan bahwa senyawa antibakteri tersebut potensial untuk menghambat pertumbuhan bakteri uji yang digunakan (Yulian 2011).

2.5 Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan serta perusakan bahan oleh mikroorganisme. Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa perusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran

sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Di bidang farmasi, bahan antibakteri dikenal dengan nama antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain (Kusmiati dan Agustini, 2007).



III. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 1, beberapa gambar peralatan yang digunakan disajikan pada Lampiran 1.

Tabel 1. Peralatan Penelitian

No	Alat	Kegunaan
1	Autoklaf	Sebagai alat untuk mensterilisasi peralatan yang akan digunakan.
2	Kulkas	Sebagai tempat penyimpanan bahan pada suhu dingin.
3	Cawan Petri	Sebagai tempat untuk uji cakram.
4	Erlenmeyer 500 ml	Sebagai tempat pembuatan media.
5	Beaker glass 1000 ml	Sebagai tempat maserasi.
6	Gelas ukur 100 ml	Sebagai alat untuk mengukur larutan.
7	Bunsen	Untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada saat perlakuan.
8	Tabung Reaksi	Sebagai tempat untuk peremajaan bakteri dan uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>).
9	Hot Plate	Sebagai alat pemanas media.
10	Timbangan Digital	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-2} .
11	Timbangan Analitik	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-3} .
12	Vortex Mixer	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan.
13	Curigen 5 Liter	Tempat penyimpanan aquades.
14	Mikropipet 10-100 μ l	Sebagai alat untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan.
	Mikropipet 100-1000 μ l	
15	Nampan	Sebagai tempat menyimpan alat.
16	Spektrofotometer	Sebagai alat untuk mengukur kekeruhan.
17	Washing bottle	Sebagai tempat menyimpan akuades.
18	Sprayer	Sebagai tempat menyimpan alkohol untuk sterilisasi.
19	Masker	Untuk menutup bagian muka (mulut dan hidung) agar tidak terjadi kontaminasi pada saat perlakuan.
20	Sarung Tangan	Sebagai alat untuk mencegah kontaminasi.
21	Botol Sampel \pm 25 ml	Sebagai tempat penyimpanan sampel.
22	LAF (<i>Laminary Air Flow</i>)	Sebagai tempat dilakukannya perlakuan.
23	Inkubator	Sebagai alat untuk menginkubasi.
24	Sendok Bahan	Sebagai alat untuk mengambil sampel.
25	Oven	Sebagai alat untuk mengeringkan cawan petri.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat dilihat pada Tabel 2 dibawah ini :

Tabel 2. Bahan-bahan Penelitian

No	Bahan	Kegunaan
1	Daun sirsak (<i>Annona muricata L</i>)	Sebagai bahan yang akan digunakan sebagai ekstraksi.
2	Aquadess	Sebagai bahan pelarut.
3	Etil Asetat	Sebagai bahan pelarut.
4	Tisu	Sebagai bahan pembersih.
5	Alumunium Foil	Sebagai bahan untuk menutupi seluruh bagian beaker glass pada saat maserasi.
6	Alkohol 70%	Sebagai bahan sterilisasi.
7	Kapas	Sebagai bahan untuk menutupi alat pada saat sterilisasi.
8	Kertas Label	Sebagai bahan penanda.
9	Bakteri <i>A. hydrophila</i>	Sebagai bakteri yang digunakan pada saat perlakuan.
10	TSA (<i>Tryptic Soy Agar</i>)	Sebagai media Agar.
11	NB (<i>Nutrient Broth</i>)	Sebagai media cair.
12	MHB (<i>Mueller Hinton Broth</i>)	Sebagai media cair uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>).
12	Plastik 2 Kg	Sebagai bahan untuk menyimpan petri pada saat diinkubator.
13	Kertas Koran	Sebagai bahan untuk membungkus peralatan yang akan di sterilisasi.
14	Kertas cakram	Sebagai bahan untuk mengetahui besar zona bening dari ekstrak kasar yang digunakan.
15	Kertas Saring Whattman No. 41	Sebagai alat untuk menyaring bahan setelah maserasi.
16	Tali Kasur	Sebagai bahan untuk mengikat perlatan yang akan di sterilisasi.
17	DMSO 10%	Sebagai pelarut ekstrak.
18	NaCl	Sebagai bahan pembuatan NaFisiologis.
19	Spirtus	Sebagai bahan bakar untuk Bunsen.
20	Plastik <i>Wrap</i>	Sebagai pembungkus botol sampel.

Komposisi media bakteri dapat dilihat pada Lampiran 2.

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode penelitian adalah metode eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan terhadap variabel yang data-datanya belum ada sehingga perlu dilakukan proses manipulasi melalui pemberian perlakuan tertentu

terhadap subjek penelitian yang kemudian diamati/diukur dampaknya (data yang akan datang) (Jaedun, 2011).

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian merupakan gambaran umum penelitian yang akan dilaksanakan oleh peneliti untuk mencapai tujuan tertentu. Rancangan penelitian disajikan dalam satu kesatuan naskah yang ringkas dan utuh. Rancangan penelitian menunjukkan adanya format penulisan yang disusun secara sistematis dan operasional meliputi langkah-langkah dan tahapan yang harus dijalani oleh peneliti. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL).

Menurut Hanafiah (2013), Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana jika dibandingkan dengan rancangan-rancangan lainnya. Dalam rancangan ini tidak terdapat lokal kontrol, sehingga sumber keragaman yang diamati hanya perlakuan dengan galat. Kondisi ini hanya dicapai di ruangan-ruangan terkontrol seperti di laboratorium. Adapun model rancangan acak lengkap yang secara umum dinyatakan dalam model matematika adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

Keterangan :

Y_{ij} = Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

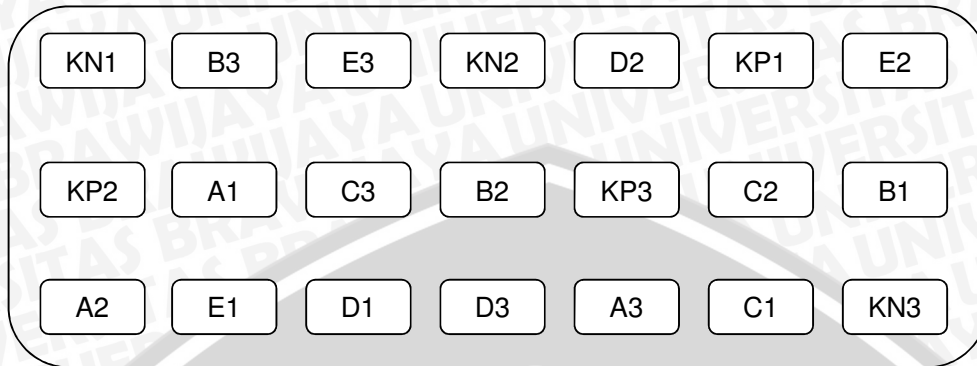
μ = Nilai tengah umum

T_i = Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} = Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Rancangan Percobaan yang digunakan yaitu menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan dan 2 kontrol yang masing-masing dilakukan 3 kali ulangan.

Denah penelitian yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Denah Rancangan Penelitian

Keterangan :

- Kontrol Positif : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi Antibakteri sintetis (*Chloramphenicol*).
- Kontrol Negatif : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media tanpa diberi ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*)
- Perlakuan A : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) dengan dosis 80 ppm.
- Perlakuan B : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak tinta daun sirsak (*A. muricata L*) dengan dosis 90 ppm.
- Perlakuan C : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak tinta daun sirsak (*A. muricata L*) dengan dosis 100 ppm.
- Perlakuan D : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak tinta daun sirsak (*A. muricata L*) dengan dosis 110 ppm.
- Perlakuan E : Bakteri *A. hydrophila* ditanam pada media diberi ekstrak tinta daun sirsak (*A. muricata L*) dengan dosis 120 ppm.
- 1,2 dan 3 = Sebagai ulangan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Penelitian

3.3.1.1 Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Sirsak (*A. muricata L*)

Proses ekstraksi daun sirsak (*A. muricata L*) dapat dilihat pada Lampiran

3, adapun langkah-langkahnya sebagai berikut:

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

4. Daun yang halus dicampur dengan pelarut etil asetat dalam beaker glass 1000 ml dengan perbandingan 1 : 3 lalu ditutup dengan alumunium foil.
5. Daun yang sudah dicampur dengan pelarut didiamkan selama 2x24 jam (maserasi).
6. Daun yang sudah dimaserasi disaring dengan menggunakan kertas saring Whatman No. 41.
7. Hasil filtrasi dievaporasi dengan *rotary evaporator* pada suhu 60-70°C sampai pelarut menguap.
8. Hasil ekstraksi ditimbang.

Daun sirsak kering yang sudah dihaluskan didapat sebanyak 495 g dicampur dengan etil asetat sebanyak 1.485 ml dan didapatkan hasil ekstrak sebanyak 12,38 g.

3.3.1.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Proses sterilisasi alat dan bahan adalah sebagai berikut:

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

7. Diambil alat yang sudah disterilisasi lalu disimpan dalam inkubator, bahan yang telah disterilisasi disimpan dalam lemari pendingin.

3.3.1.3 Pembuatan Media Agar Miring

Media Agar miring digunakan sebagai media untuk peremajaan bakteri. Adapun proses pembuatan media Agar miring adalah sebagai berikut:

1. Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) ditimbang 2 gr dengan menggunakan timbangan digital.
2. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
3. Media dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 ml dan dihomogenkan.
4. Media yang sudah homogen dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi sebanyak 10 ml disetiap tabung reaksinya.
5. Tabung reaksi ditutup kapas dan dibungkus alumunium foil serta diikat oleh tali.
6. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
7. Tabung reaksi yang berisi media steril dimiringkan dengan kemiringan 30°.
8. Media ditunggu sampai menjadi padat.

3.3.1.4 Pembuatan Media NB (*Nutrient Broth*)

Media NB adalah media cair yang digunakan untuk kultur bakteri. Adapun proses pembuatan media NB adalah sebagai berikut:

1. Media ditimbang 0,40 gr dengan menggunakan timbangan digital.
2. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
3. Media dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 ml lalu dihomogenkan.
4. Media yang sudah homogen ditutup kapas dan dibungkus alumunium foil serta diikat oleh tali.
5. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

3.3.1.5 Pembuatan Media Agar untuk Uji Cakram

Proses pembuatan media Agar untuk uji cakram menggunakan TSA (*Tryptic Soy Agar*) adalah sebagai berikut:

1. Media TSA ditimbang 16,8 gr dengan menggunakan timbangan digital.
2. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
3. Media dilarutkan dengan aquades sebanyak 420 ml dan dihomogenkan.
4. Erlenmeyer ditutup kapas dan dibungkus alumunium foil serta diikat oleh tali.
5. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
6. Media steril ditunggu hingga media tidak terlalu panas.
7. Media dituangkan pada 21 cawan petri sebanyak \pm 20 ml disetiap cawannya.
8. Media ditunggu hingga menjadi padat.

3.3.1.6 Pembuatan Media MHB (*Mueller Hinton Broth*)

Media MHB digunakan sebagai media untuk uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*). Adapun proses pembuatannya adalah sebagai berikut:

1. Media MHB ditimbang sebanyak 1,26 gr menggunakan timbangan digital.
2. Media dimasukkan ke dalam Erlenmeyer.
3. Media dilarutkan dengan aquades sebanyak 60 ml.
4. Media yang sudah homogen dimasukkan ke dalam 11 tabung reaksi sebanyak 4,5 ml disetiap tabung reaksinya.
5. Tabung reaksi ditutup kapas dan dibungkus alumunium foil serta diikat oleh tali.
6. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

3.3.1.7 Peremajaan Bakteri *A. hydrophila*

Isolat bakteri *A. hydrophila* didapatkan dari Balai Besar Budidaya Air Payau (BBBAP) Jepara. Bakteri tersebut sudah dilakukan uji biokimia terlebih dahulu

seperti yang ditunjukkan pada Lampiran 4. Peremajaan bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan cara sebagai berikut:

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

Adapun hasil dari peremajaan bakteri dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.3.1.8 Kultur Bakteri *A. hydrophila*

Kultur bakteri *A. hydrophila* dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Biakan bakteri yang sudah diremajakan pada media Agar Miring diambil dengan menggunakan jarum ose sebanyak 1 gores.
2. Ose yang sudah ada bakterinya dicelupkan pada media NB yang sudah di persiapkan.
3. Media disimpan pada inkubator dengan suhu 30°C selama 24 jam.
4. Semua kegiatan pengkulturan dilakukan secara steril.

3.3.1.9 Cara Memperoleh Bakteri *A. hydrophila* 10⁷

Bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10⁷ sel/ml diperoleh dengan cara sebagai berikut:

1. Kultur murni bakteri dari media agar miring disiapkan terlebih dahulu.
2. Bakteri diambil dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang sudah berisi NaFisiologis 10 ml dan di vortex.
3. Kekeruhan bakteri disamakan dengan kekeruhan Mc Farlan yang 10⁸.
4. Tabung reaksi yang berisi NaFisiologis dengan volume 9 ml disiapkan.
5. Bakteri dari kekeruhan bakteri 10⁸ diambil 1 ml kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi berisi NaFisiologis dengan volume 9 ml.

6. Didapatkan kekeruhan bakteri 10^7 .

Adapun gambar dari hasil pengenceran berseri dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

3.3.2.1 Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Skema kerja uji MIC dapat dilihat pada Lampiran 7. Adapun prosedur melakukan uji MIC adalah sebagai berikut:

1. 11 tabung reaksi yang sudah berisi media MHB steril sebanyak 4,5 ml disiapkan terlebih dahulu.
2. Ekstrak kasar daun sirsak (*A. Muricata L*) diberikan pada 9 tabung reaksi dengan dosis yang berbeda setiap tabungnya. Adapun dosisnya terdiri dari 1000 ppm, 750 ppm, 500 ppm, 250 ppm, 100 ppm, 75 ppm, 50 ppm, 25 ppm, dan 10 ppm. Pada 2 tabung reaksi sisa dijadikan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif diberi antibakteri sintetis (*Chloramphenicol*).
3. Setiap tabung reaksi diberi isolat bakteri 1 ose.
4. Media diinkubasi di inkubator dengan suhu 32°C selama 24 jam.
5. Media dicek kekeruhannya dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer.

3.3.2.2 Uji Cakram

Setelah didapatkan dosis yang sesuai dilanjutkan dengan mengetahui daya hambat ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*). Skema kerja uji cakram dapat dilihat pada Lampiran 8. Adapun prosedur pelaksanaan uji cakram adalah sebagai berikut:

1. Cawan petri yang telah terdapat media TSA disiapkan terlebih dahulu.
2. Kertas cakram steril diberikan beberapa perlakuan, yakni direndam ke dalam ekstrak daun sirsak (*A. muricata L*) dengan konsentrasi 80 ppm, 90 ppm, 100

ppm, 110 ppm, 120 ppm. Perlakuan kontrol positif, kertas cakram direndam ke dalam antibakteri sintetis (*Chloramphenicol*) dan untuk kontrol negatif direndam ke dalam aquades selama 10-15 menit.

3. Bakteri *A. hydrophila* disebar pada seluruh permukaan lempeng Agar dengan cara dioleskan, untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar kemudian diputar lempeng Agar 80° dan dibuat olesan kedua dengan lempeng Agar diputar 45° dan dibuat olesan ketiga.
4. Setelah 10-15 menit kertas cakram yang telah mengandung ekstrak diletakkan pada media Agar.
5. Media yang sudah ditanam bakteri dan diberi kertas cakram diinkubasi pada suhu 30°C selama 18-24 jam.
6. Media diamati hasil dan diukur zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong.

3.4 Parameter Uji

3.4.1 Parameter Utama

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

3.4.2 Parameter Penunjang

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

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian dilakukan pengujian statistik sesuai dengan metode yang digunakan yaitu rancangan acak lengkap (RAL). Jika data sidik ragam memperlihatkan pengaruh berbeda nyata maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT).

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Uji MIC (*Minimum Inibiting Concentration*) dilakukan dengan menggunakan berbagai macam dosis ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) yang bertujuan untuk mengetahui dosis terkecil dalam menghambat atau membunuh bakteri *A. hydrophila*. Hasil uji MIC menunjukkan adanya perbedaan setiap perlakuan setelah dilakukan pengamatan dengan menggunakan spektrofotometer seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3 di bawah ini.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Uji MIC Menggunakan Spektrofotometer

No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Warna
1	1000	0,4843	Bening
2	750	0,4206	Bening
3	500	0,4060	Bening
4	250	0,5350	Bening
5	100	0,2565	Bening
6	75	0,2771	Keruh
7	50	2,9016	Keruh
8	25	2,4383	Keruh
9	10	2,5672	Keruh
10	Kontrol (-)	1,9211	Keruh
11	Kontrol (+)	0,2613	Bening

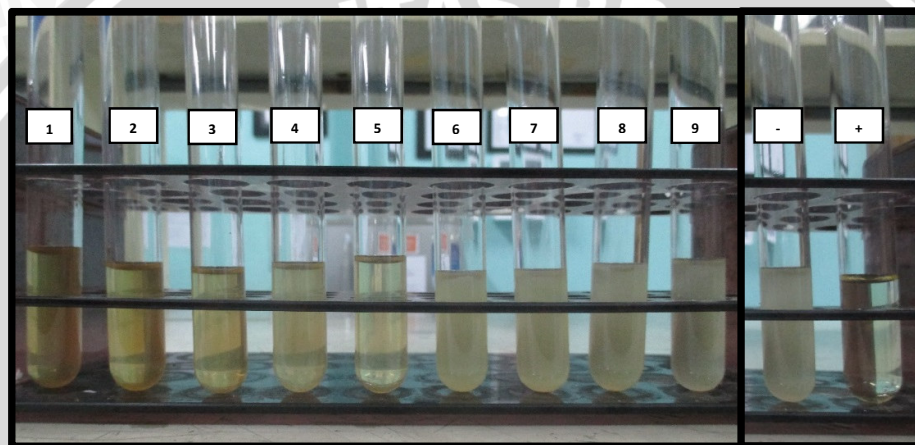
Keterangan :

- Tabung No. 5 = Konsentrasi 100 ppm mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*
- Kontrol (-) = Perlakuan tidak ditambahkan antibakteri
- Kontrol (+) = Perlakuan ditambahkan antibakteri konvensional (Chloramfenicol)

Hasil di atas menunjukkan bahwa dosis yang tinggi menghasilkan nilai absorbansi yang rendah dan sesuai dengan pernyataan Wardani *et al.*, (2012), menyatakan bahwa dosis yang digunakan berbanding terbalik dengan nilai absorbansi yang dihasilkan, atau semakin tinggi dosis yang digunakan maka nilai absorbansi semakin rendah. Pada hasil uji MIC yang telah dilakukan tidak semua nilai absorbansinya sesuai dengan pernyataan tersebut dikarenakan warna ekstrak dapat mempengaruhi pembacaan spektrofotometer terhadap perlakuan yang dilakukan. Menurut Putri *et al.*, (2008), spektrofotometer tidak mampu

membedakan kekeruhan warna ekstrak dengan kekeruhan bakteri oleh karena itu pengamatan bisa dibantu dengan melihat warna dan membandingkan dengan kontrol.

Hasil spektrofotometer pada pada tabung nomor lima menghasilkan nilai absorbansi dibawah kontrol negatif atau mendekati kontrol positif dan juga pada saat pengamatan warna, perlakuan pada tabung nomor lima menunjukkan warna bening pertama kali. Hasil Uji MIC dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) dari dosis tertinggi pada tabung nomor 1 sampai dosis terendah pada nomor 9 kemudian tabung (-) sebagai kontrol negatif dan tabung (+) sebagai kontrol positif

Hasil uji MIC dengan cara pengamatan perubahan warna bening pertama kali dan pengukuran nilai absorbansi dengan spektrofotometer dengan memiliki nilai yang mendekati kontrol positif atau dibawah kontrol negatif yaitu terdapat pada dosis 100 ppm, dosis tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

4.2 Uji Cakram

Uji cakram dilakukan menggunakan perlakuan dosis 80 ppm, 90 ppm, 100 ppm, 110 ppm, 120 ppm serta kontrol (negatif dan positif). Digunakan dosis di bawah 100 ppm yakni 80 ppm dan 90 ppm dikarenakan, adanya kemungkinan di

bawah dosis 100 ppm dan diatas 75 ppm dari uji MIC sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*.

Berdasarkan hasil pengamatan diameter zona bening pada uji cakram selama penelitian, setiap perlakuan didapatkan zona bening. Diameter zona bening hasil penelitian dipengaruhi oleh jumlah dosis yang digunakan, semakin tinggi dosis yang digunakan maka diameter zona bening yang dihasilkan semakin besar. Pernyataan tersebut sesuai dengan pernyataan Katno (2009), bahwa kecenderungan diameter zona bening atau zona hambat pada pertumbuhan bakteri uji yang dihasilkan oleh suatu ekstrak berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi ekstrak yang digunakan karena perbedaan besarnya daerah zona hambatan masing-masing konsentrasi akibat perbedaan besarnya kandungan senyawa aktif.

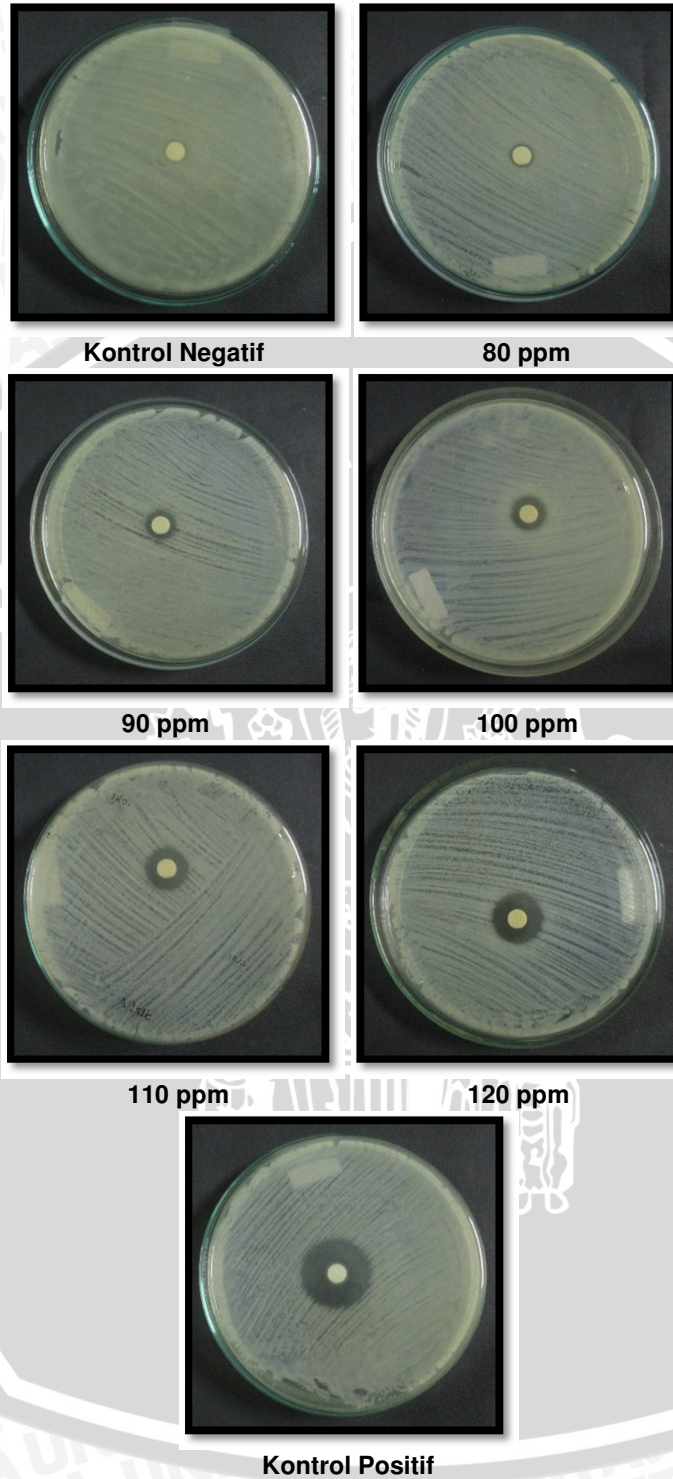
Suryawiria (2005), menyatakan bahwa respon hambat dari suatu bahan aktif dapat diklasifikasikan pada empat respon seperti yang ditunjukkan pada Tabel 4.

Tabel 4. Klasifikasi Respon Hambatan

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

Sumber: Suryawiria (2005)

Berdasarkan Tabel 4 mengenai respon hambat suatu bahan aktif terhadap bakteri dengan uji cakram dapat ditentukan bahwa respon hambatan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata* L) terhadap bakteri *A. hydrophila* dengan dosis 80 ppm dan 90 ppm dikatakan lemah karena ukuran diameter zona bening < 5 mm, sedangkan dosis 100 ppm, 110 ppm dan 120 ppm dikatakan sedang karena ukuran diameter zona bening yang dihasilkan berada pada jarak antara 5-10 mm. Adapun gambar hasil uji daya hambat bakteri *A. hydrophila* setelah pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata* L) dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil Uji Cakram

Hasil uji cakram dari ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata* L) dengan lima perlakuan dosis dan tiga kali ulangan yang dilakukan yaitu dengan dosis 80 ppm,

90 ppm, 100 ppm, 110 ppm, 120 ppm didapatkan diameter zona bening setelah dilakukan pengamatan 24 jam seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Rata-rata Pengamatan Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak (*A. muricata L*) terhadap Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Zona Bening (mm)			Total	Rerata ± Standar Deviasi
	1	2	3		
A (80 ppm)	3,3	3,65	3,1	10,05	3,35 ± 0,28
B (90 ppm)	4,65	5,1	5,45	15,2	5,07 ± 0,40
C (100 ppm)	7,1	7	7,45	21,55	7,18 ± 0,24
D (110 ppm)	9,45	9,1	8,65	27,2	9,07 ± 0,40
E (120 ppm)	10,65	10,45	11,45	32,55	10,85 ± 0,53

Data rata – rata diameter zona bening tertinggi terdapat pada perlakuan E (dengan nilai zona bening rata-rata $10,85 \pm 0,53$ mm dan hasil zona bening dengan nilai terendah yaitu perlakuan A didapatkan rata-rata nilai $3,35 \pm 0,28$ mm. Kemudian dilakukan analisa sidik ragam untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan, berikut merupakan tabel sidik ragam zona bening yang dihasilkan dari beberapa perlakuan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) yang berbeda seperti yang ditunjukkan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Analisa Sidik Ragam Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak (*A. muricata L*)

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	108,4023	27,10058	184,3577	3,48	5,99
Acak	10	1,4700	0,147	**		
Total	14					

Keterangan: ** = Berbeda sangat nyata

Tabel sidik ragam menunjukkan bahwa dosis ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila*. Perbedaan dosis perlakuan pada penelitian ini menghasilkan zona daya hambat yang berbeda pula. Perbedaan masing-masing perlakuan terhadap zona daya hambat bakteri didukung dengan perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf $p > 5\%$ (kepercayaan 95 %) maupun taraf

nyata 1% (kepercayaan 99%). Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) didapatkan untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan seperti dilihat pada Tabel 7.

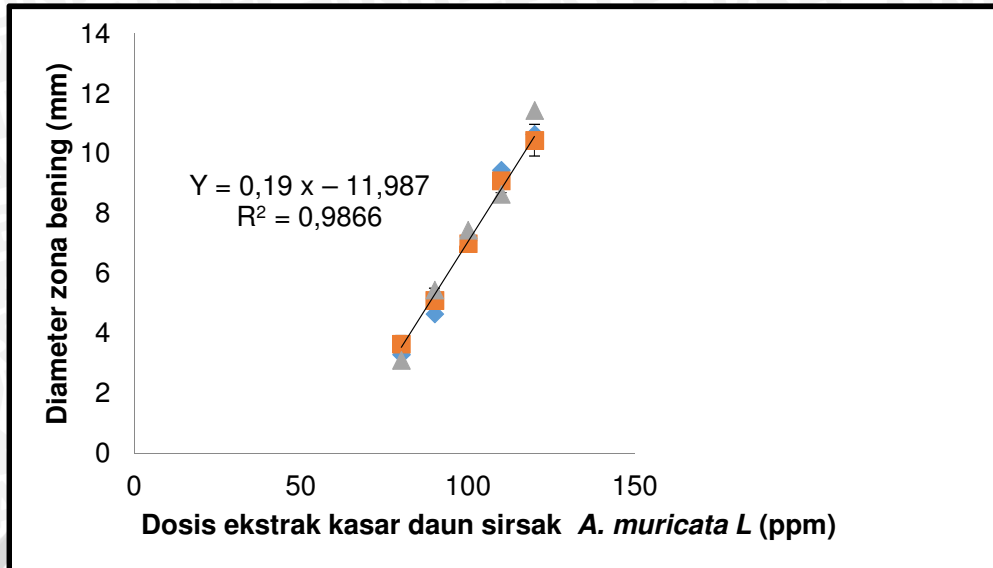
Tabel 7. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak (*A. muricata L*)

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		(80 ppm)	(90 ppm)	(100 ppm)	(110 ppm)	(120 ppm)	
		3.35	5.07	7.18	9.07	10.85	
A (80 ppm)	3,35	-					A
B (90 ppm)	5,07	1,72**	-				B
C (100 ppm)	7,18	3,83**	2,12**	-			C
D (110 ppm)	9,07	5,72**	4,00**	1,88**	-		D
E (120 ppm)	10,85	7,50**	5,78**	3,67**	1,78**	-	E

Keterangan :

** : Berbeda sangat nyata

Pada Tabel 7 menunjukkan bahwa perlakuan A tidak memberikan nilai yang signifikan antar perlakuan dan diberi notasi a. Perlakuan B terhadap perlakuan A memberikan pengaruh berbeda sangat nyata sehingga diberi notasi b. Perlakuan C memberi pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A dan perlakuan B sehingga diberi notasi c. Pada perlakuan D memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A, perlakuan B dan perlakuan C sehingga diberi notasi d. Pada perlakuan E memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A, perlakuan B, perlakuan C dan perlakuan D sehingga diberi notasi e. Kemudian berdasarkan hasil penelitian didapatkan grafik regresi diameter zona bening yang dihasilkan dengan perlakuan yang berbeda seperti pada Gambar 6.



Gambar 6. Hubungan Pengaruh Dosis Ekstrak Kasar Daun Sirsak (*A. muricata* L) pada Tiap Perlakuan dengan Diameter Zona Bening

Berdasarkan Gambar 6 terlihat hubungan antara penambahan dosis perlakuan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata* L) terhadap diameter zona bening menunjukkan pola linier dengan persamaan $y = 0,19x - 11,897$ dan koefisien $R^2 = 0,9866$. Hubungan antara pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata* L) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan rata-rata diameter zona bening yang dihasilkan menunjukkan respon yang meningkat seiring dengan bertambahnya dosis ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata* L) dari dosis 80 ppm, 90 ppm, 100 ppm, 110 ppm, 120 ppm. Hasil perhitungan uji statistik dapat dilihat pada Lampiran 9.

Menurut Chomnawang *et al.*, (2005), dilihat dari cara kerjanya antibakteri dibagi menjadi dua yaitu anti bakteri yang bersifat bakteristatik dan bakteriosidal. Bakteristatik adalah zat yang dapat mengambat pertumbuhan bakteri sedangkan bakteriosidal adalah zat yang dapat membunuh bakteri.

Hasil penelitian Uji Daya hambat bakteri *A. hydrophila* setelah pemberian ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) menghasilkan sifat bakteriostatik terhadap bakteri *A. hydrophila*.

Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) dan uji cakram yang telah didapatkan bahwa ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* hal tersebut dilihat dari panjangnya zona bening yang terjadi perubahan ukuran. Bahan aktif yang diduga berperan sangat penting dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* adalah flavonoid.

Menurut Haryani *et al.*, (2012), Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol. Flavonoid dan flavonol disintesis tanaman dalam responnya dalam infeksi mikroba. Mekanisme senyawa flavonoid dalam mengganggu aktifitas bakteri adalah dengan mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sitoplasma, hal tersebut didukung dengan pernyataan Brooks *et al.*, (2005), bahwa flavonoid efektif bekerja sebagai bakteriostatik karena diduga dapat menghambat dan merusak dinding sel atau membran sel bakteri yang terdiri dari lapisan protein, mekanisme kerja senyawa-senyawa fenol termasuk flavonoid sebagai antibakteri adalah dengan mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sel. Penghambatan dan perusakan dinding dan membran sel ini dapat dilakukan dengan terbentuknya ikatan-ikatan hidrogen dan kovalen antara bahan aktifnya yang bersifat hidrofobik sehingga mengganggu integrasi dinding dan membran sel bakteri.

Volk dan Wheeler (1993) menjelaskan bahwa senyawa flavonoid dapat merusak membran sitoplasma yang dapat menyebabkan hilangnya metabolit penting dan menginaktifkan sistem enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino meresap keluar dan mencegah masuknya bahan-bahan aktif ke dalam sel. Pada perusakan membran sitoplasma, ion H⁺ dari

senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipida akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma akibatnya membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan dan bahkan kematian.

Parameter penunjang dari penelitian ini yaitu lama waktu perendaman kertas cakram pada perlakuan ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) dengan dosis yang berbeda. Perendaman kertas cakram yang dilakukan selama ± 15 menit. Lama waktu perendaman tersebut dilakukan agar bahan aktif dapat meresap ke dalam kertas cakram dan mencegah rusaknya kertas cakram akibat terlalu lama dilakukan perendaman. Hasil penelitian yang sudah dilakukan, lama perendaman kertas cakram memberikan pengaruh terhadap resapan bahan aktif ke dalam kertas cakram karena semakin lama perendaman maka bahan aktif yang meresap pada kertas cakram akan semakin banyak. Hal tersebut sesuai dengan pernyataan Wiyanto (2010), menyatakan bahwa perendaman kertas cakram dilakukan selama 15 menit agar bahan aktif ekstrak yang digunakan dapat meresap ke dalam kertas cakram yang digunakan sehingga mampu menghambat bakteri pada saat perlakuan di dalam penelitian.

KESIMPULAN DAN SARAN

4.3 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian yang sudah dilakukan, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) mampu menghambat bakteri *A. hydrophila* dan bersifat bakteristatik dilihat dari diameter zona bening yang dihasilkan dari semua perlakuan yang sudah ditentukan selama penelitian. Diameter zona bening yang dihasilkan semakin meningkat seiring dengan semakin tinggi dosis perlakuan yang digunakan. Perlakuan dengan dosis 80 ppm sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan ukuran diameter rata-rata zona bening $3.35 \pm 0,28$.mm.

5.2 Saran

- Hasil penelitian menunjukkan daun sirsak (*A. muricata L*) dapat dimanfaatkan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan dosis 80 ppm (dosis terendah), namun belum didapatkan dosis optimal, oleh karena itu perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan dosis optimalnya tersebut.
- Ekstrak kasar daun sirsak (*A. muricata L*) dapat diaplikasikan sebagai bahan obat namun sebelumnya harus dilakukan uji *in vivo* terlebih dahulu untuk membuktikan keefektifan bahan tersebut.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajizah, Aulia; Thihana; Mirhanuddin. 2007. **Potensi Ekstrak Kayu Ulin (*Eusideroxylon zwageri*) Dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara In Vitro.** On_line. Tersedia di: http://bioscientiae.unlam.ac.id/v4n1/v4n1_ajizah.pdf. Skripsi. (Diakses 5 januari 2015)
- Angka, S.L. 2001. **Stido karakteristik dan patologi *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele sangkuriang.** Makalah Falsafah Sains. IPB. 30 hlm
- Aulia, Ismi Arsyi. 2008. **Uji aktivitas Antibakteri Fraksi Etil Asetat Ekstrak Etanolik Daun Arbenan (*Duchesnea indica* (andr.) Focke) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa* Multiresisten Antibiotik Beserta Profil Kromatografi Lapis Tipisnya.** On_line. Tersedia di: <http://etd.eprints.ums.ac.id/1517/1/K100040115.pdf>. Skripsi (Diakses, 5 januari 2015)
- Brooks, G. F. Butel, J.S Morse. 2005. **Mikrobiologi Kedokteran.** Alih Bahasa. Salemba Medika. Jakarta. 317-27 hlm.
- Chomnawang, M.T, Surassno S., Nukoolkarn, V.S., and Gristanapan, W. 2005. **Antimicrobial effects of Thai medicinal plants against acneinducing bacteria.** Jethnopharmacol 101. 330-333 hlm.
- Dwidjoseputro, D. 2010. **Dasar – dasar Mikrobiologi.** Penerbit Djambatan. Jakarta. 214 hlm.
- Gufron, H. 2014. **Uji Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) Secara In Vitro.** FPIK. Universitas Brawijaya. 33 hlm.
- Gunawan, I. 2007. **Penapisan awal ekstraksi senyawa bioaktif sebagai antibakteri serta uji toksisitas dan uji minimum inhibitory (MIC) dari karang lunak asal perairan pulau panggang, kepulauan seribu.** Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 18-19 hlm.
- Hanafiah, K. A.. 2013. **Rancangan Percobaan: Teori dan Aplikasi** Edisi 3. PT Raja Grafindo Persada. Jakarta. 259 hlm.
- Haryani, A., R, Grandiosa., I,D, Buwono dan A, Santika. 2012. **Uji efektivitas daun pepaya (*Carica papaya*) untuk pengobatan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas koki (*Carrasius auratus*).** *Jurnal Perikanan dan Kelautan.* 3(3): 213-220. 18 hlm.
- Herupradoto, B, G. A. Yuliani. 2010. **Karakterisasi Protein Spesifik *Aeromonas hydrophila* Penyebab Penyakit Ulser pada Ikan Mas.** *Jurnal Veteriner.* 11 No. 3 : 158-162. 69 hlm.
- Ibrahim, A., Y.T. Adiputra., A. Setyawan dan S. Hudaidah. 2013. **Potensi ekstrak kulit buah dan biji rambutan (*Neiphelium lappaceum*) sebagai senyawa anti bakteri patogen pada ikan.** *E-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan.* 1(2) : 135-144. 25 hlm.

- Jaedun, A. 2011. **Metodologi Penelitian Eksperimen**. Artikel. Fakultas Teknik UNY. Yogyakarta. 59-62 hlm.
- Jannah. R. N. 2010. **Uji Efektifitas Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata L*) sebagai Pestisida Nabati terhadap Pengendalian Hama Tanaman Sawi (*Brassica juncea L*)**. Skripsi Jurusan Biologi FKIP UMS: Surakarta. 18 hlm.
- Kamaludin, I. 2011. **Efektifitas ekstrak lidah buaya *Aloe vera* untuk pengobatan infeksi *Aeromonas hydrophila* pada ikan lele dumbo *Clarias sp.* Melalui pakan**. Skripsi. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 10 hlm.
- Kordi, M.G.K.H. 2011. **Marikultur prinsip dan praktik budidaya laut**. Lily Publisher. Yogyakarta. 618 hlm.
- Mangan, Y. 2009. **Solusi Sehat Mencegah Dan Mengatasi Kanker**. Agromedia Pustaka: Jakarta. 218 hlm.
- Mariyono dan A. Sundana. 2002. **Teknik pencegahan pengobatan penyakit bercak merah pada ikan air tawar yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila***. *Buletin Teknik Pertanian*. 7(1): 33-36. 36-38 hlm.
- Martin, J. 2004. ***Aeromonas hydrophyla***. <http://web.mst.edu> . Diakses 3 Desember 2015.
- Noverita., D. Fitria., dan E. Sinaga. 2009. **Isolasi dan uji aktivitas antibakteri Jamur endofit dari daun dan rimpang *Zingiber ottensii val.*** *Jurnal Farmasi Indonesia*. 4(4): 173-174.
- Permatasari, G. A. A, I. N. K Besung, H. Mahatmi. 2013 **Daya Hambat Perasan Daun Sirsak Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli***. *Jurnal Indonesia Medicus Veterinus* 2013 2(2) : 162 – 169.
- Putra, D. Y. 2011. **Peran Sektor Perikanan Dalam Perekonomian Dan Pernerapan Tenaga Kerja di Indonesia: Analisi Input-Output**. Universitas Andalas. Padang. 8 hlm
- Putri, R,W., W, Tjajaningsih dan D, Handijatno. 2008. **Daya antibakteri pigmen pyocyanin dari isolate *Pseudomonas aeruginosa* terhadap *Aeromonas hydrophila* secara in vitro**. *Jurnal berkala ilmiah perikanan*. 3(1): 65-73.
- Rey, a., N. Verjan., W. Ferguson., dan C. Iregui. 2009. **Pathogenesis of *Aeromonas hydrophila* strain KJ99 infection and its extracellular products in two species of fish**. Paper. *Veterinary Record*. 7 hlm.
- Sarida, M. Tarsim., I. Faizal. 2010. **Pengaruh Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia L.*) dalam menghambat Pertumbuhan Bakteri *Vibrio harveyi* secara *In Vitro***. *J. Penelitian Sains* Vol. 13 (3D).
- Simanjuntak, M. 2008. **Ekstraksi dan fraksinasi komponen ekstrak daun tumbuhan senduduk (*Melastoma malabathricum. L*) serta pengujian efek sediaan krim terhadap penyembuhan luka bakar**. Skripsi. Universitas Sumatra Utara. Medan. Halaman 7. Tidak dipublikasikan.

- Sjahid, L. R. 2008. **Isolasi dan Identifikasi Flavonoid dari Daun Dewandaru (*Eugenia uniflora* L.)**. Skripsi Universitas Muhammadiyah Surakarta: Surakarta.
- Subasinghe, R.P., Bondad-Reantaso, M.G., McGladdery, S.E., 2001. Aquaculture development, Health and wealth. In: Subasinghe, R.P., Bueno, P., Phillips, M.J., Hough, C., Mc Gladdery, S.E., Arthur, J.R. (Eds.), **Aquaculture in the Third Millennium**. Technical Proceedings of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium. NACA, Bangkok and FAO, Rome, Italy.
- Subroto, A. dan Saputro, H. 2006. **Gempur Penyakit Dengan Sarang Semut**. Penebar Swadaya: Jakarta.
- Suryawiria, U. 2005. **Mikrobiologi Dasar**. Papas Sinar Sinanti. Jakarta.
- Tarigan, R.R. 2014. **Pengaruh pemberian larutan daun pepaya (*Carica papaya* L.) Terhadap ikan Lele Dumbo (*Clarias* sp.) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* ditinjau dari hematologi**. Skripsi. Halaman 10. Tidak dipublikasikan.
- Tenrirawe, A. 2011. **Pengaruh Ekstrak Daun Sirsak *Annona muricata* L Terhadap Mortalitas Larva *Helicoverpa armigera* H. Pada Jagung**. 13 hlm.
- Volk, W.A and M.F. Wheeler. 1993. **Mikrobiologi Dasar**. Edisi Kelima. Jilid 1. Penerbit Erlangga. Jakarta.
- Wardani, R,K., W, Tjahjaningsih dan B, S, Raharjda. 2012. **Uji Efektifitas Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper Rocatum*) Terhadap Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Secara *In Vitro***. Jurnal perikanan dan Kelautan.4(1): 59-64 hlm.
- Wintoko, F., A. Setyawan., S. Hudaidah., dan M. Ali. 2013. **Imunogenisitas *heat killed* vaksin inaktif**. *E-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. 2(1): 205-206 hlm.
- Wiyanto,D,B. 2010. **Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus Alvarezii* dan *Eucheuma Denticullatum* Terhadap Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Dan *Vibrio harveyii***. *Jurnal Kelautan*. 3(1): 1-17.
- Wullur, A., J. Skaduw, A. Wardani. 2011. **Identifikasi Alkaloid Pada Daun Sirsak (*Annona muricata* L.)** 12 hlm.
- Zuhud A.M. 2011. **Manfaat Daun Sirsak**. Agro Media. Jakarta. 75 hlm.

Lampiran 1. Alat Penelitian



Timbangan Digital



Timbangan Analitik



Inkubator



Oven



Autoklaf



Kulkas



Hotplate



Vortex Mixer



Laminary Air Flow

Lampiran 1. (Lanjutan)



Spektrofotometer



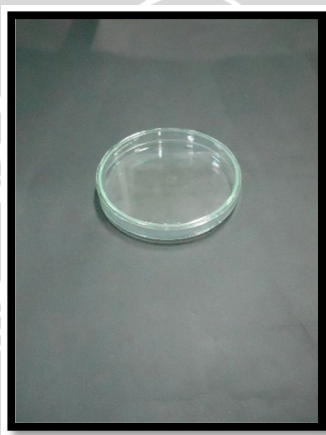
Mikropipet 10-100 µl



Mikropipet 100-1000 µl



Bunsen



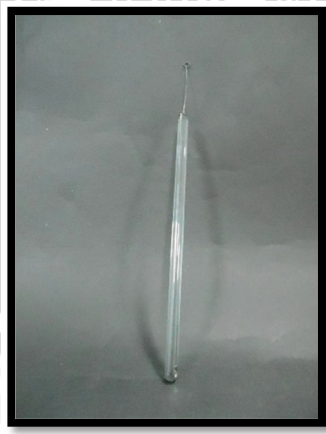
Cawan Petri



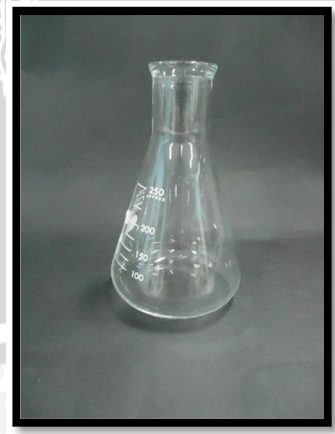
Jangka Sorong



Tabung Reaksi



Jarum Ose



Erlenmeyer



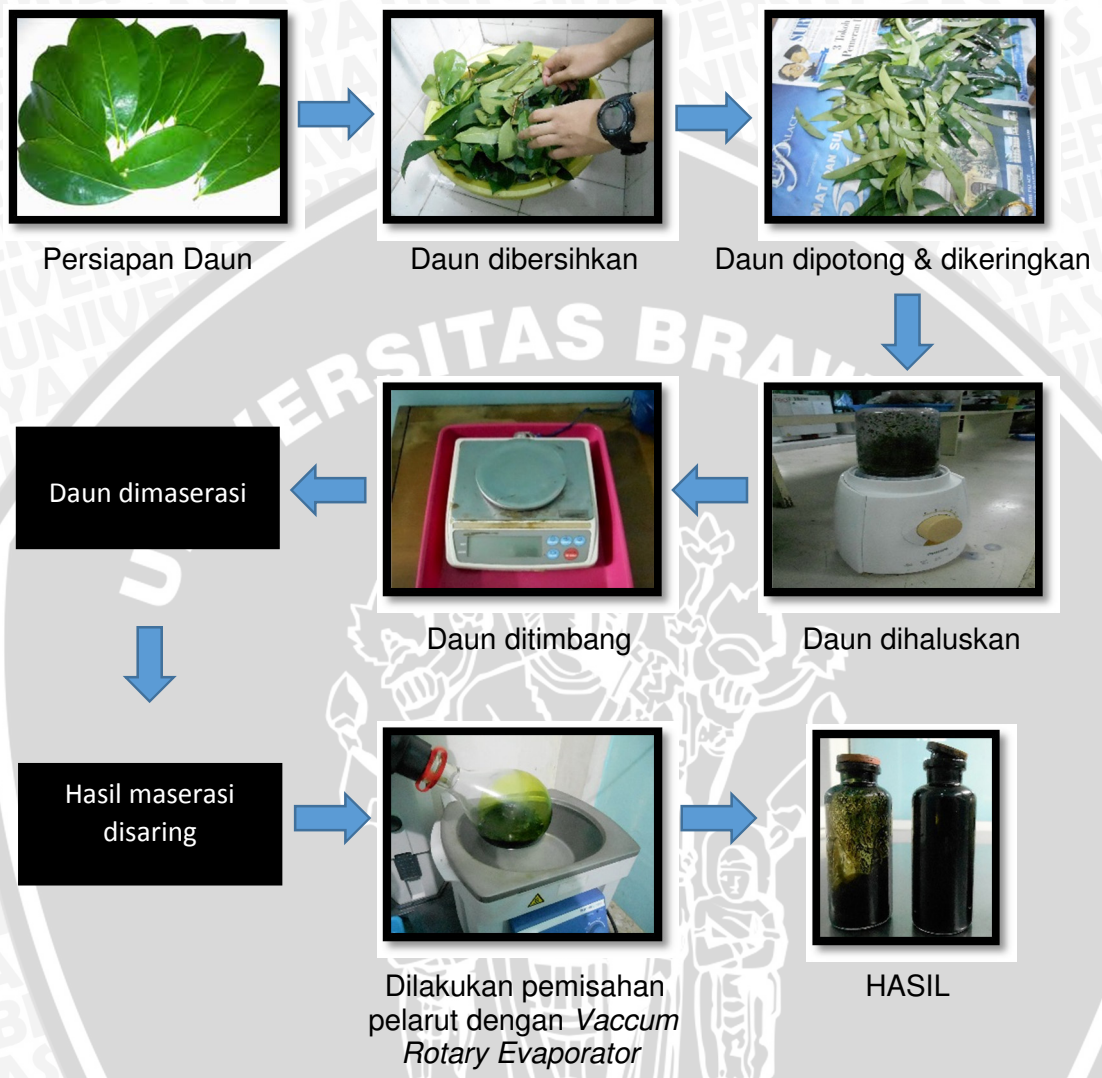
Lampiran 2. Komposisi Media

NO	NAMA MEDIA	KOMPOSISI
1	Nutrient Broth (NB)	- Pepton from Meat 5 g/l - Meat extract 3 g/l
2	Triptic Soy Agar (TSA)	- Pepton from Casein 15 g/l - Pepton from Soymeal 5 g/l - Sodium Chloride 5 g/l - Agar-agar 15 g/l
3	Mueller Hinton Broth (MHB)	- Beef dehydrated infusion from 300,0 g/l - Casein hydrolysate 17,5 g/l - Starch 1,5 g/l

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 3. Proses Ekstraksi Daun Sirsak (*A. muricata* L)



Lampiran 4. Hasil Uji Biokimia Bakteri *A. hydrophilla* dari BBPBAP Jepara



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
 DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA
 BALAI BESAR PENGEMBANGAN BUDIDAYA AIR PAYAU
 LABORATORIUM UJI BBPBAP JEPARA

Alamat surat : PO Box 1 Jepara , Kantor : Jl. Cik Lanang-Bulu Jepara 59418
 Telp. : (0291) 591125, Faximile : (0291) 591724

HASIL UJI BIOKIMIA *Aeromonas hydrophilla*

Uji Bio Kimia	<i>Aeromonas hydrophilla</i>
Gram	—
Bentuk	Batang
Katalase	+
Oksidase	+
H2S	—
Indol	—
Motil	+
OF medium	Fermentatif
VP	+
Gelatin	+
Urea	—
Glukosa	+
Sukrosa	+

Lab. Mikrobiologi BBPBAP Jepara

Penyelia

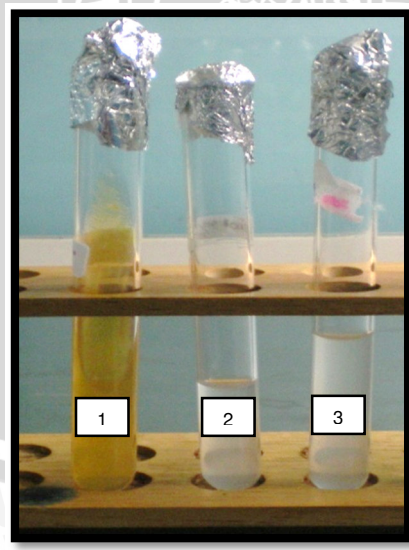
[Signature]
 Sri Murni Astuti, SP.
 No. 10651/06/199103 2001



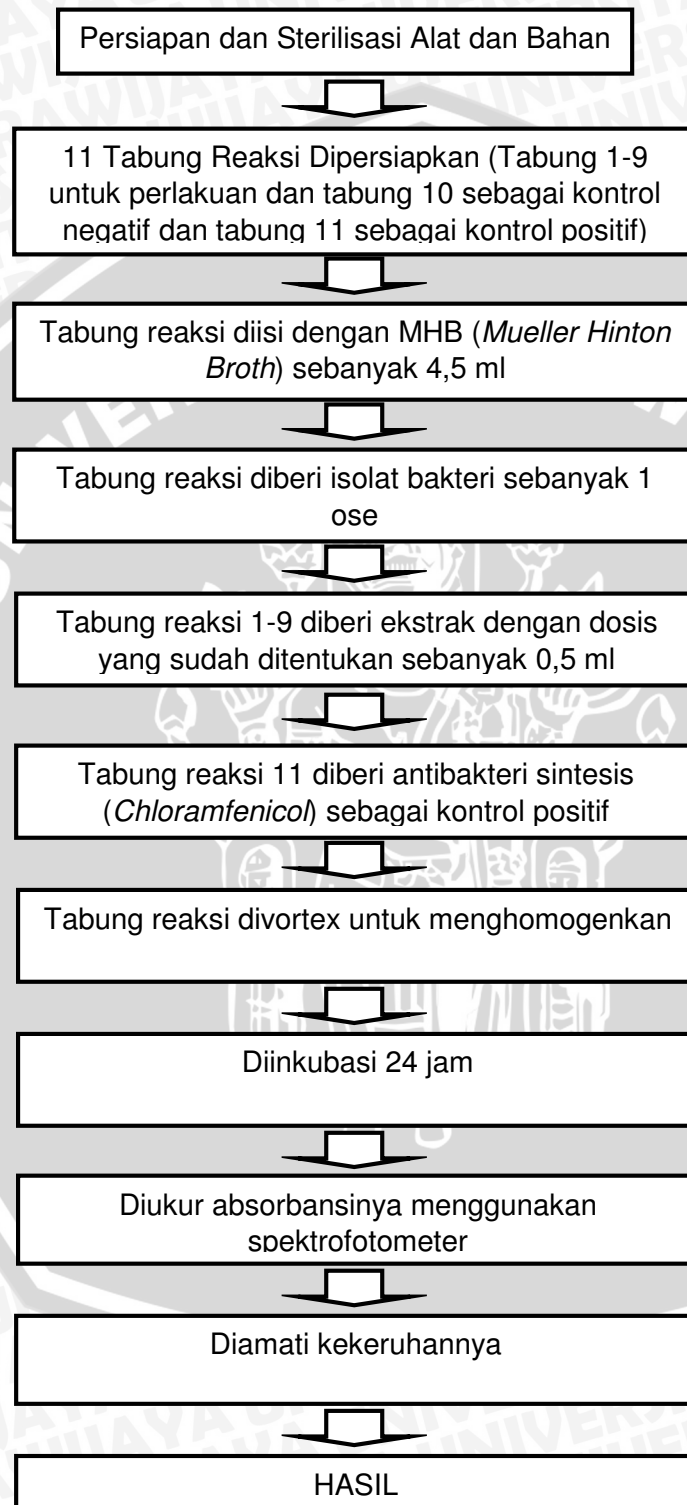
Lampiran 5. Gambar Isolat Murni dan Hasil Peremajaan Bakteri *A. hydrophila* pada Media Agar Miring

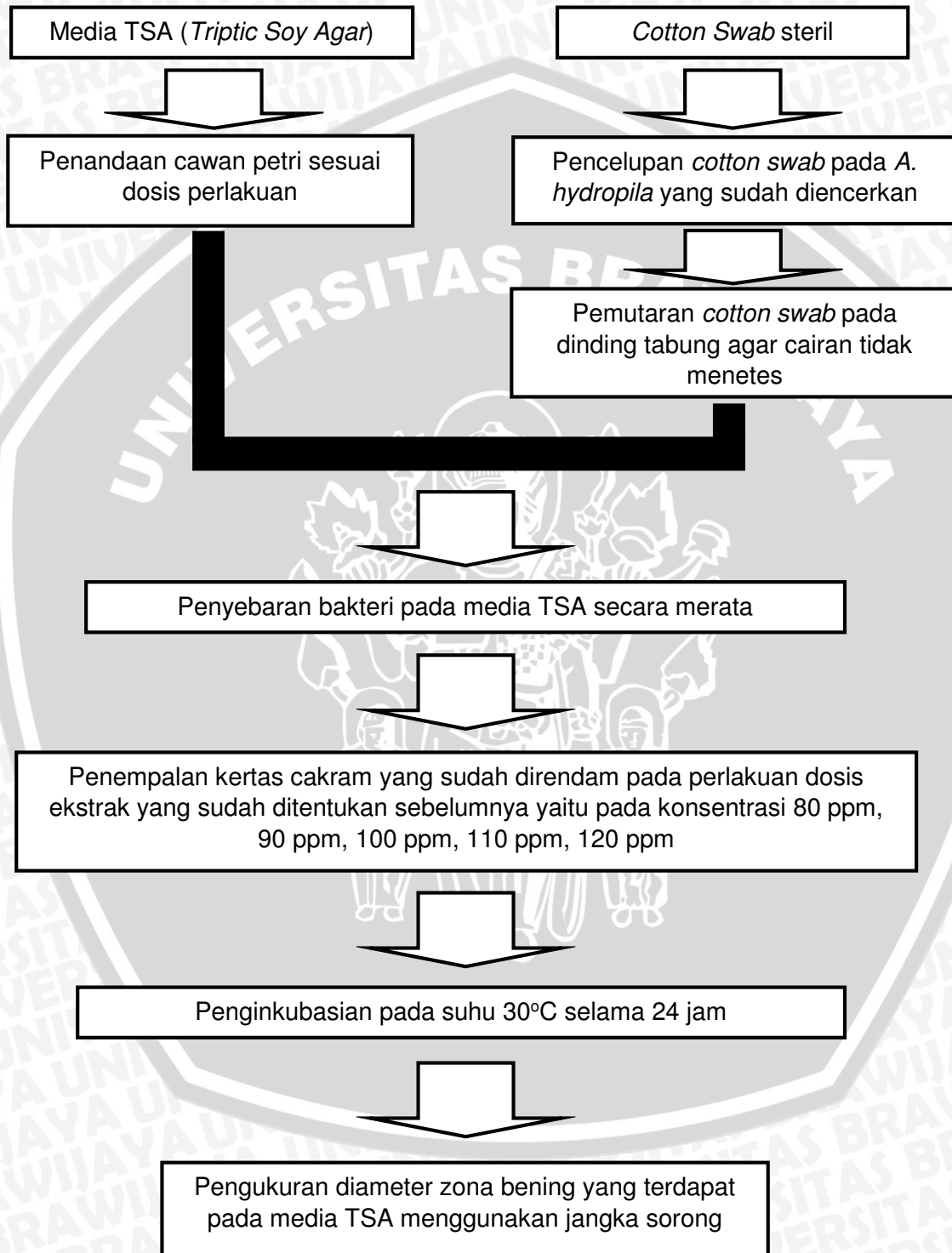


Lampiran 6. Gambar Hasil Pengenceran Bakteri



(1) Isolat bakteri, (2) Standar Mc Farlan 10^8 , (3) Hasil Pengenceran 10^7

Lampiran 7. Skema Kerja Uji MIC (Minimum Inibiting Concentration)

Lampiran 8. Skema Kerja Uji Cakram

Lampiran 9. Perhitungan Statistik Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Sirsak (*A. muricata L*)

Perlakuan	Zona Bening (mm)			Total	Rerata ± Standar Deviasi
	1	2	3		
A (80 ppm)	3,3	3,65	3,1	10,05	3,35 ± 0,28
B (90 ppm)	4,65	5,1	5,45	15,2	5,07 ± 0,40
C (100 ppm)	7,1	7	7,45	21,55	7,18 ± 0,24
D (110 ppm)	9,45	9,1	8,65	27,2	9,07 ± 0,40
E (120 ppm)	10,65	10,45	11,45	32,55	10,85 ± 0,53
				106,55	

➤ **Perhitungan**

FK	$\frac{106,55^2}{5 \times 3}$	756,86
JK Total	$(A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + D3^2) - FK$	109,87
JK Perlakuan	$\frac{(\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2 + \sum D^2)}{3} - FK$	108,40
JK Acak	JK Total - JK Perlakuan	1,47
KT	JK/db	

➤ **Analisa Keragaman**

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	108,42	27,10	184,35	3,48	5,99
Acak	10	1,47	0,14	**		
Total	14					

F 5% < F.hitung > F 1% = berbeda sangat nyata

Keterangan :

** : berbeda sangat nyata

➤ **Uji BNT**

SED	$\sqrt{\frac{2 \times \text{KT acak}}{3}}$	0,31
BNT 5%	t tabel 5 % (db acak) x SED	0,56
BNT 1 %	t tabel 1 % (db acak) x SED	0,86

Lampiran 8. (Lanjutan)

➤ **Tabel uji BNT Bobot Pemeliharaan**

	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		3,35	5,07	7,18	9,07	10,85	
A	3,35	-	-	-	-	-	a
B	5,07	1,72**	-	-	-	-	b
C	7,18	3,83**	2,12**	-	-	-	c
D	9,07	5,72**	4,00**	1,88**	-	-	d
E	10,85	7,50**	5,78**	3,67**	1,78**	-	e

Keterangan :

** : sangat berbeda nyata

➤ **Uji polinomial orthogonal**

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A (80 ppm)	10,05	-2	2	-1	1
B (90 ppm)	15,2	-1	-1	2	-4
C (100 ppm)	21,55	0	-2	0	6
D (110 ppm)	27,2	1	-1	-2	-4
E (120 ppm)	32,55	2	2	1	1
Q= Σci*Ti		57	-0,3	-1,5	2,3
Hasil Kuadrat		10	14	10	70
Kr=(Σci^2)*r		30	42	30	210
JK=Q^2/Kr		108,300	0,002	0,075	0,025

JK Regresi 108,402

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	108,402	108,402		3,48	5,99
Linier	1	108,300	108,300	736,734	**	
Kuadratik	1	0,002	0,002	0,014	ns	
Kubik	1	0,075	0,075	0,510	ns	
Kuartik	1	0,025	0,025	1,171	ns	
Acak	10	1,470	0,147			
Total	14					

R^2 Linier = JK Linier/ (JK Linier+ JK Acak) = 0,986608

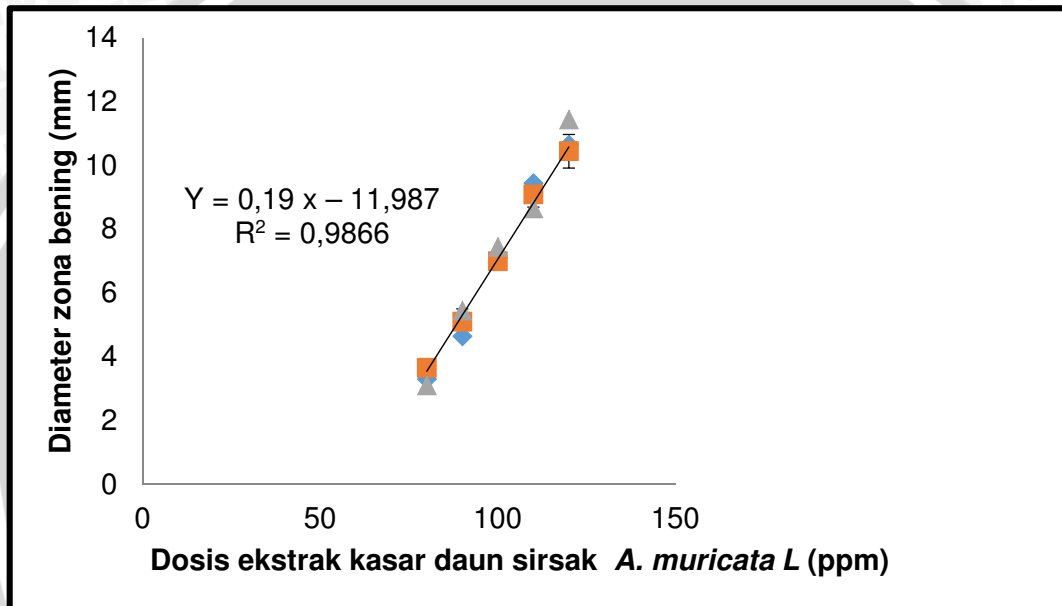
R^2 Kuadratik = JK Kuadratik/ (JK Kuadratik+JK Acak) = 0,001456

Lampiran 8. (Lanjutan)

$$R^2 \text{ Kubik} = \text{JK Kubik} / (\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}) = 0,048544$$

$$R^2 \text{ Kuartik} = \text{JK Kuartik} / (\text{JK Kuartik} + \text{JK Acak}) = 1$$

Nilai regresi linier lebih besar dari nilai regresi kuadratik, kubik dan kuartik sehingga grafik yang dibuat adalah grafik linier.



x	y
80	3,35
90	5,07
100	7,18
110	9,07
120	10,85

Keterangan :

X = Konsentrasi Ekstrak (ppm)

Y = Zona Bening (mm)