

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*)
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Vibrio harveyi* secara *in vitro***

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

Oleh:

**ARFIN RESKININGRUM
125080500111022**



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

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*)
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Vibrio harveyi* 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:

**ARFIN RESKININGRUM
125080500111022**



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

SKRIPSI
PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK PEGAGAN (*Centella asiatica*)
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Vibrio harveyi* secara *in vitro*

Oleh :

ARFIN RESKININGRUM
125080500111022

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 29 April 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. :
Tanggal :

Dosen Penguji I

(Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, M.Si)
NIP. 19671010 199702 1 001
Tanggal:

Dosen Penguji II

(M. Fakhri, S.Pi, MP, M.Sc)
NIP. 19860717 201504 1 001
Tanggal:

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

(Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS)
NIP. 19550213 198403 1 001
Tanggal:

Dosen Pembimbing II

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

Mengetahui,
Ketua Jurusan
Manajemen Sumberdaya Perairan

(Dr.Ir. Arning W. Ekawati, MS)
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal:

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

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

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

Malang, Mei 2016

Mahasiswa

Arfin Reskingrum

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji Syukur kehadiran Allah SWT, Tuhan pelimpah kasih dan pencurah rahmat. Berkat karunia dan rahmat-Nya lah, penulis dapat menyelesaikan laporan hasil Skripsi ini tepat pada waktunya tanpa adanya halangan yang berarti. Penulis juga ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno MS selaku Dosen Pembimbing Akademik, pembimbing Praktek Kerja Magang (PKM) dan pembimbing skripsi yang telah banyak memberikan motivasi, saran, bimbingan, arahan dan nasihat bagi penulis selama masa studi.
2. Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, saran dan arahan kepada penulis selama penelitian.
3. Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, M. Si selaku Dosen Penguji I, serta M. Fakhri, S.Pi, MP, M.Sc selaku Dosen Penguji II yang senantiasa memberikan masukan serta bimbingan hasil penelitian hingga Skripsi ini dapat tersusun tepat pada waktunya.
4. Ayah dan Ibu, serta adik tercinta yang senantiasa memberikan doa dan dukungan moril maupun materil kepada penulis selama penelitian hingga Skripsi ini selesai.
5. Seluruh rekan - rekan tim harveyi: Annisa Farhana Dewi, Ellyda Hasan, Muniroh Ulfah, Okky Septia Raharja, Rusmawanto, Release Aurora, Siti Nur Siyami dan seluruh rekan-rekan Tim Skripsweet yang telah banyak membantu penulis dan selalu memberikan dukungan dan motivasi untuk terselesaikannya laporan skripsi ini.
6. Serta pihak-pihak yang membantu selama penelitian.

RINGKASAN

Arfin Reskingrum. Pengaruh Pemberian Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. harveyi* Secara *In Vitro*. Di bawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS. dan Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M. Sc

Kegiatan sektor Budidaya di bidang perikanan, dewasa ini telah berkembang pesat. Namun terdapat beberapa hal yang menjadi kendala dalam kegiatan budidaya perikanan itu sendiri. Terutama dari kendala hama dan penyakit. Penyakit dapat menimbulkan kematian pada ikan/udang yang dibudidayakan serta menyebabkan kerugian cukup besar terhadap proses budidaya itu sendiri. Bakteri *V. harveyi* merupakan salah satu bakteri yang menimbulkan penyakit *vibriosis* pada ikan atau udang khususnya yang hidup di perairan laut, yang biasanya menimbulkan warna kulit menjadi kusam dan memerah, serta hilangnya nafsu makan serta pembengkakan pada bagian kulit luar tubuh. Penggunaan dari antibiotik serta obat-obat kimia untuk mengatasi adanya penyakit tersebut dapat menimbulkan sifat resisten terhadap bakteri serta dapat membahayakan lingkungan perairan. Oleh karena itu diperlukan suatu bahan alami sebagai pengganti antibiotik yang lebih aman dan ramah lingkungan untuk di perairan yaitu salah satunya dengan menggunakan ekstrak pegagan (*C. asiatica*) yang mengandung senyawa flavonoid, fenol dan saponin yang merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari sampai bulan Maret 2016. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui daya hambat ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental yaitu dengan menguji hubungan suatu sebab dengan akibat yang dilakukan dalam suatu sistem tertutup yang kondisinya terkontrol dan teknik pengambilan datanya dengan cara observasi langsung, yaitu pengamat merekam apa yang tengah terjadi pada saat itu juga. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), menggunakan 5 perlakuan dosis ekstrak pegagan yaitu : dosis (A) 50 ppm ; (B) 100 ppm ; (C) 150 ppm ; (D) 200 ppm dan (E) 250 ppm. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak pegagan memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan rata-rata diameter daya hambat terbesar yaitu pada dosis 250 ppm sebesar 4,07 mm. Hubungan antara perbedaan dosis ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap diameter daya hambat bakteri *V. harveyi* menghasilkan hubungan atau grafik secara linear, dimana persamaannya didapatkan $y = 0,01x + 1,5377$ dengan nilai koefisien determinasi $R^2 = 0,9986$.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini bahwa hasil uji daya hambat bakteri dengan menggunakan uji cakram menunjukkan dosis ekstrak pegagan (*C. asiatica*) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dengan dosis maksimal sebesar 250 ppm dan dosis minimum ekstrak sebesar 50 ppm.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan skripsi mengenai Pengaruh Pemberian Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *in vitro*. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana (S-1) pada Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terimakasih sebesar – besarnya kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku dosen pembimbing I yang telah memberi pengarahan dan motivasi kepada penulis.
2. Bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc selaku dosen pembimbing II, yang senantiasa memberikan motivasi, gagasan, dukungan serta masukan kepada penulis untuk terus belajar.
3. Bapak Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, M. Si dan Bapak M. Fakhri, S. Pi, MP, M.Sc selaku dosen penguji yang telah memberikan arahan dan masukan dalam penyusunan laporan skripsi ini.

Penulis menyadari, bahwa pembuatan skripsi ini masih jauh dari sempurna, hal ini disebabkan oleh kekurangan dan keterbatasan pengetahuan yang penulis miliki. Dengan segala kerendahan hati, penulis mengharap semoga laporan skripsi ini dapat bermanfaat dan berguna bagi segenap pihak yang membutuhkan.

Malang, Mei 2016

Penulis

DAFTAR ISI

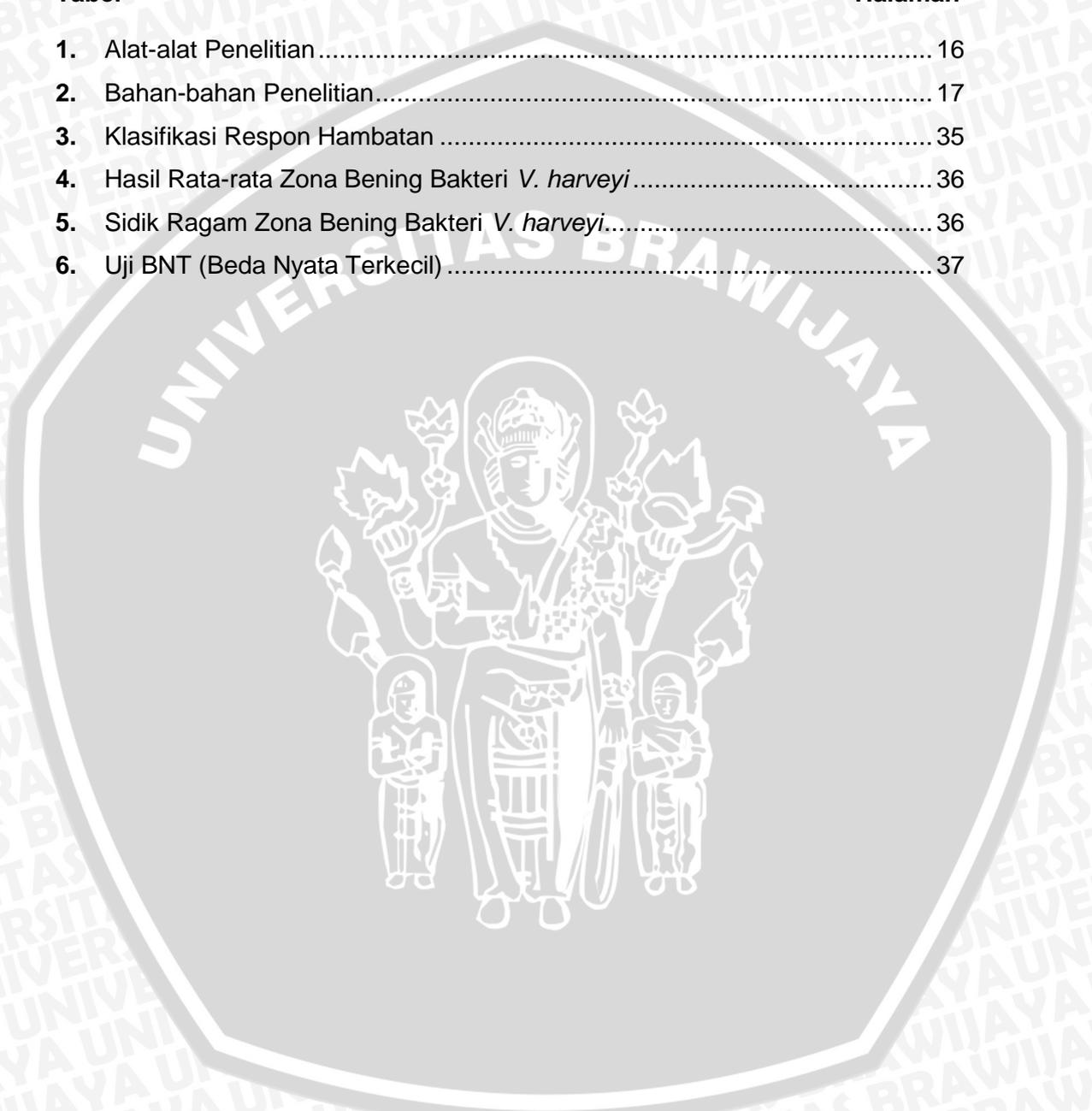
	Halaman
SAMPUL.....	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN.....	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI.....	iv
UCAPAN TERIMAKASIH.....	v
RINGKASAN.....	vi
KATA PENGANTAR.....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR LAMPIRAN.....	xii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Hipotesis.....	4
1.5 Kegunaan Penelitian.....	4
1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Biologi Pegagan (<i>Centella asiatica</i>).....	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran.....	7
2.1.3 Bahan Aktif Pegagan (<i>C. asiatica</i>).....	8
2.1.4 Mekanisme Senyawa Pegagan Sebagai Antibakteri.....	9
2.2 Biologi Bakteri <i>V. harveyi</i>	9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	9
2.2.2 Infeksi dan Tanda Penyerangan.....	10
2.3 Uji Daya Hambat Bakteri <i>V.harveyi</i> secara <i>In vitro</i>	13
3. METODE PENELITIAN.....	16
3.1 Materi Penelitian.....	16
3.1.1 Alat penelitian.....	16
3.1.2 Bahan Penelitian.....	17
3.2 Metode Penelitian.....	19
3.3 Pengambilan Data.....	19

3.4 Rancangan Penelitian	20
3.5 Prosedur Penelitian	21
3.5.1 Persiapan Penelitian.....	21
3.5.2 Pelaksanaan Penelitian	28
3.5.3 Identifikasi Bakteri <i>V. harveyi</i>	30
3.6 Parameter Uji	32
3.6.1 Parameter Utama	32
3.6.2 Parameter Penunjang.....	32
3.7 Analisa Data	32
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	33
4.1 Daya Hambat Ekstrak Pegagan (<i>C. asiatica</i>).....	33
4.2 Suhu Inkubator Selama Inkubasi Bakteri <i>V. harveyi</i>	41
5. KESIMPULAN DAN SARAN	42
5.1 Kesimpulan	42
5.2 Saran	42
DAFTAR PUSTAKA.....	43
LAMPIRAN	47



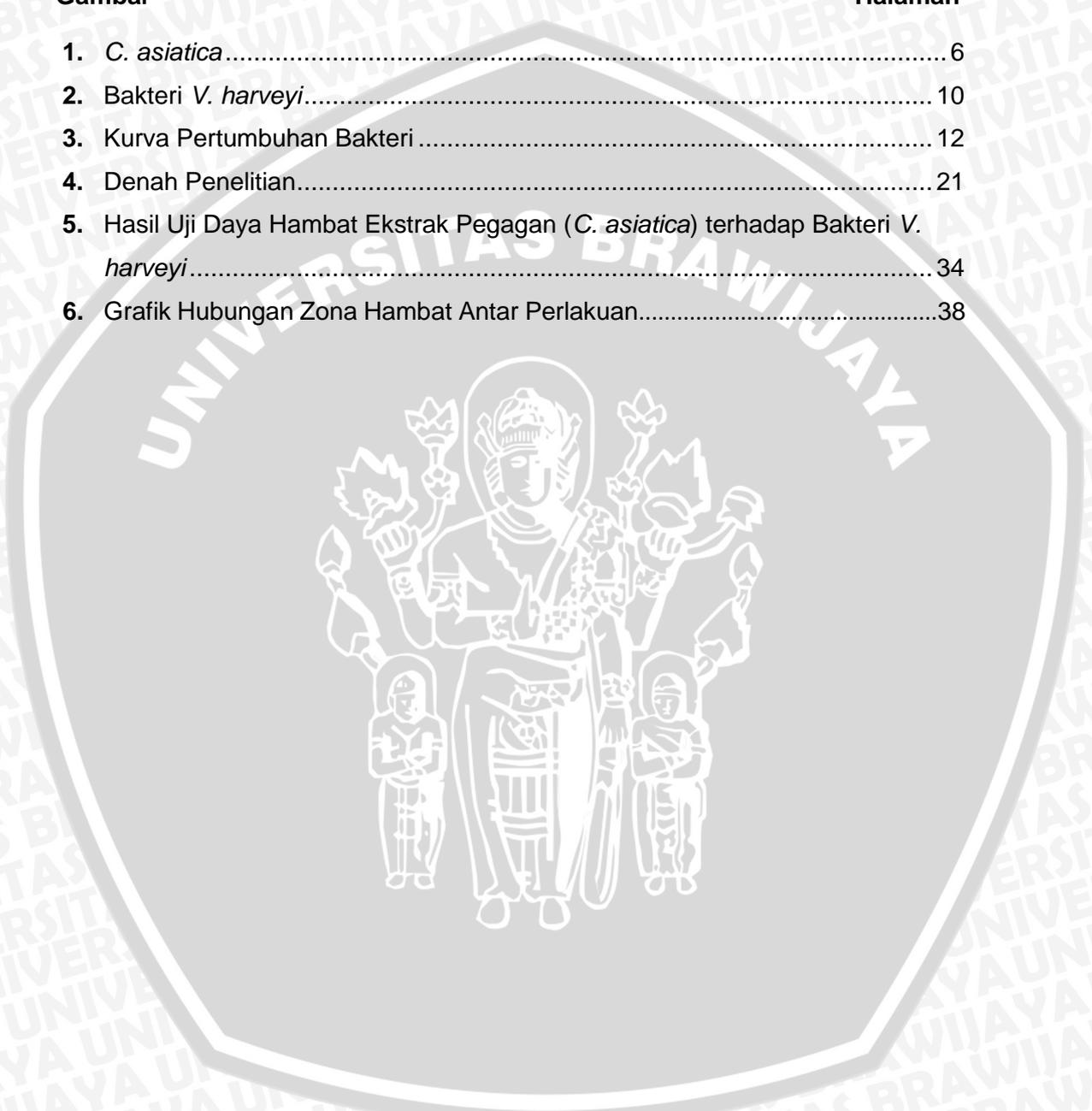
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat-alat Penelitian	16
2. Bahan-bahan Penelitian.....	17
3. Klasifikasi Respon Hambatan	35
4. Hasil Rata-rata Zona Bening Bakteri <i>V. harveyi</i>	36
5. Sidik Ragam Zona Bening Bakteri <i>V. harveyi</i>	36
6. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)	37



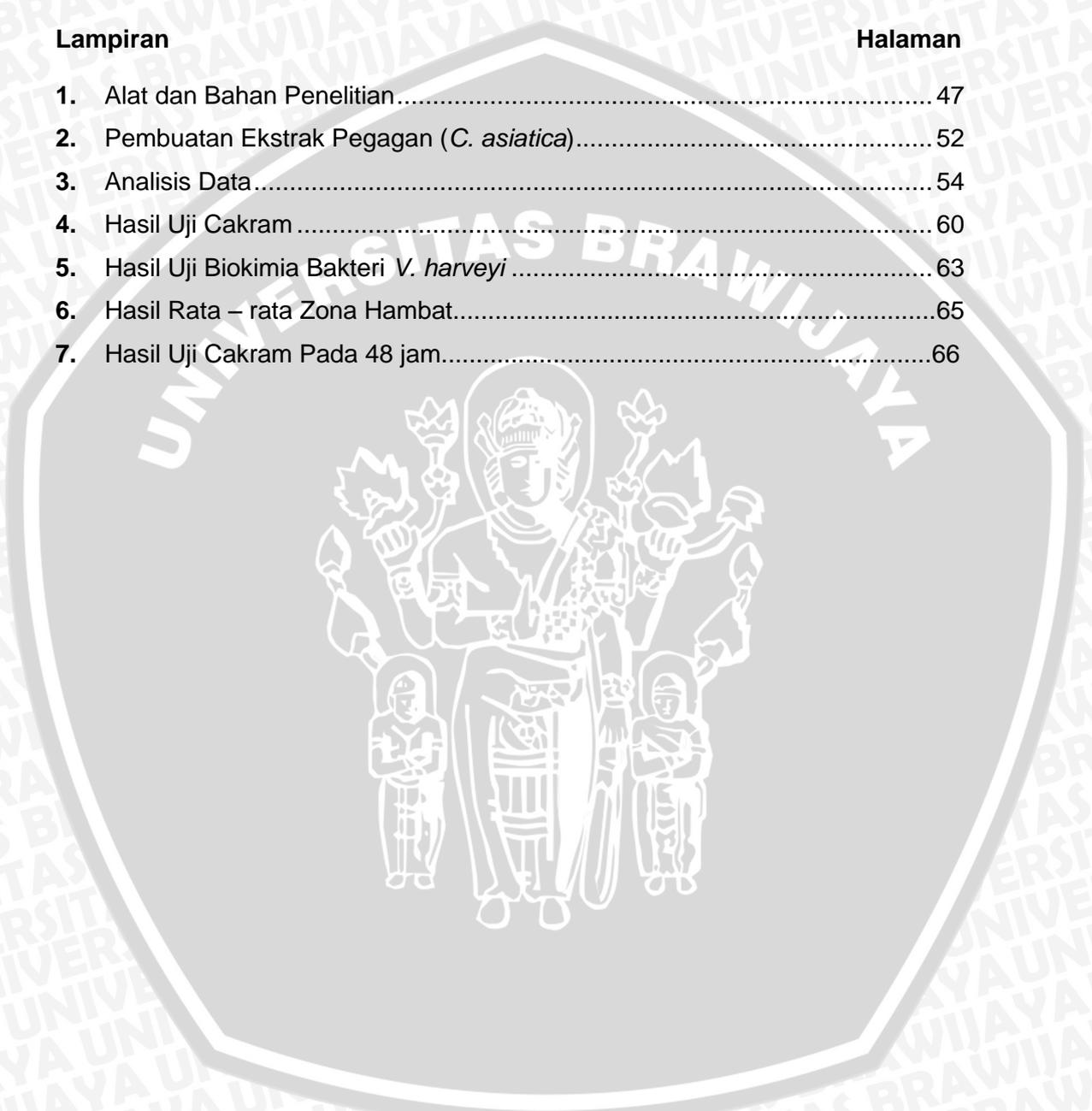
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>C. asiatica</i>	6
2. Bakteri <i>V. harveyi</i>	10
3. Kurva Pertumbuhan Bakteri	12
4. Denah Penelitian.....	21
5. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Pegagan (<i>C. asiatica</i>) terhadap Bakteri <i>V. harveyi</i>	34
6. Grafik Hubungan Zona Hambat Antar Perlakuan.....	38



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan Bahan Penelitian.....	47
2. Pembuatan Ekstrak Pegagan (<i>C. asiatica</i>).....	52
3. Analisis Data.....	54
4. Hasil Uji Cakram	60
5. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>V. harveyi</i>	63
6. Hasil Rata – rata Zona Hambat.....	65
7. Hasil Uji Cakram Pada 48 jam.....	66



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perairan umum adalah suatu genangan air yang relatif luas yang dimiliki dan dikuasai oleh negara serta dimanfaatkan untuk kepentingan dan kesejahteraan masyarakat. Perairan umum meliputi danau, waduk, rawa, dan sungai. Pada umumnya perairan umum dimanfaatkan oleh masyarakat untuk kegiatan transportasi, penangkapan ikan, sebagai sumber air untuk kehidupan rumah tangga, serta sebagai tempat kegiatan budidaya perikanan yang meliputi lahan basah berupa rawa pasang surut (Sumantriyadi, 2014).

Salah satu kendala dalam kegiatan akuakultur atau budidaya adalah munculnya penyakit pada biota budidaya. Timbulnya penyakit dapat disebabkan karena kualitas lingkungan perairan yang kurang baik. Selain itu penggunaan teknik budidaya yang kurang tepat dan kontaminasi dari alat – alat budidaya maupun pekerjanya juga dapat menyebabkan timbulnya penyakit (Harmita dan Radji, 2006).

Penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Gangguan terhadap ikan dapat disebabkan oleh organisme lain, pakan maupun kondisi lingkungan yang kurang menunjang kehidupan ikan. Dengan demikian timbulnya serangan penyakit ikan di kolam merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, kondisi lingkungan dan organisme penyakit. Interaksi yang tidak sesuai ini dapat menyebabkan ikan stress, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit (Prajitno, 2005). Adapun pada dasarnya, penyakit yang terjadi pada ikan tidak datang begitu saja, melainkan melalui proses hubungan antara tiga faktor, yaitu kondisi kualitas air

(lingkungan), kondisi ikan (inang), dan adanya jasad parasit. Apabila kondisi kualitas air baik, demikian pula kondisi ikannya, dan jasad pathogen yang ada tergolong yang tidak membahayakan, maka penyakit tidak akan terjadi bila jumlah dan kualitas pakan memadai (Kordi, 2001).

Menurut Suyanto dan Mujiman (2003), penyakit udang dapat timbul karena berbagai penyebab, yaitu seperti adanya protozoa, bakteri, cendawan atau virus. Apabila terjadi kondisi kualitas air yang kurang baik, maka udang dapat terserang penyakit dengan mudah. Maka solusi yang tepat adalah menjaga kualitas air pada tempat budidaya. Penyakit yang sering menyerang udang adalah penyakit *Vibriosis*.

Penyakit *Vibriosis* adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio sp.* Yang tergolong dalam family *Vibrionaceae* yang memiliki alat gerak berupa flagel. Bakteri ini menyerang ikan /udang. Pada ikan sehat bakteri ini sering ditemukan di bagian usus (intestine). Serangan dari bakteri ini terjadi setelah ikan mengalami luka atau setelah terinfeksi oleh ektoparasit contohnya, *Trichodina sp.*, *Cryptocaryon sp.* dan lain sebagainya (Kordi, 2004).

Menurut Afrianto, Evi, Zafran dan Hendi (2015), penyakit vibriosis yang menyerang ikan ataupun udang disebabkan oleh bakteri *Vibrio spp.* Bakteri ini berbentuk batang dengan memiliki ukuran tubuh 0,5 x 1,0 – 2,0 mm, bersifat gram negatif. Penyakit ini potensial menyerang pada ikan laut. Resiko kematian yang diakibatkan karena terinfeksi bakteri ini mencapai 50%. Terutama menyerang pada ikan atau udang yang berumur masih muda.

Penanggulangan penyakit dapat dilakukan dengan cara pencegahan dan pengobatan. Pengobatan yang biasa dilakukan adalah memberikan bahan kimia atau sejenisnya, tetapi penggunaan bahan kimia ini mempunyai dampak lingkungan yang kurang baik. Penggunaan antibiotik dalam perkembangannya sebagai antibakteri ternyata menimbulkan resistensi terhadap organisme target

seperti *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* dan *Aeromonas salmonicida* serta *Vibrio harveyi* (Roihanah, Sukoso dan Andayani, 2011). Pernyataan tersebut sesuai dengan pendapat Khairuman dan Khairul (2004), bahwa pencegahan yang bias dilakukan agar tidak terserang penyakit bakteri adalah dengan menjaga kualitas air dan mengurangi padat penebaran. Pencegahan lain dengan menggunakan Furance (obat antibakteri). Jenis bakteri yang menyerang larva udang adalah *Aeromonas sp.*, *Pseudomonas sp.*, dan *Vibrio sp.*

Pendapat tersebut didukung oleh Saptiani, Slamet dan Sutrisno (2012), bahwa penanggulangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri *V. harveyi* dapat menggunakan bahan kimia dan antibiotik. Namun dalam penggunaan bahan tersebut apabila dilakukan secara terus-menerus dengan dosis yang tidak tepat, maka dapat mengakibatkan resisten terhadap bakteri *V. harveyi* tersebut. Cara pemakaian bahan kimia dan antibiotik, masih dilakukan di sebagian tempat pembenihan karena belum ditemukannya alternatif pencegahan yang efektif dan tepat terhadap serangan penyakit vibriosis. Pada bahan alami terdapat senyawa bioaktif yang dapat digunakan sebagai alternatif untuk menanggulangi penyakit pada ikan, udang, dan biota akuatik lainnya. Oleh karena itu, diperlukan pengembangan alternatif bahan antibakteri dari tanaman obat. Salah satunya dengan menggunakan Pegagan (*Centella asiatica*). Tanaman pegagan ini mengandung senyawa aktif yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri yaitu saponin.

Menurut Ramadhan, Roslaili dan Elmatris (2015), pegagan memiliki sifat antibakteri. Kandungan pegagan yang berfungsi sebagai antibakteri, antara lain saponin dan flavonoid. Derivat dari senyawa saponin yaitu asiaticoside bersifat lipofilik serta dapat membentuk senyawa kompleks dengan membran sel melalui ikatan hidrogen, lalu menghancurkan permeabilitas dinding sel bakteri.

1.2 Rumusan Masalah

Penyakit pada ikan dan udang merupakan salah satu kendala dalam kegiatan budidaya. Penggunaan antibiotik yang terbukti banyak mengandung bahan kimia dapat mengganggu ekosistem perairan. Salah satu cara untuk mengatasi masalah tersebut, maka digunakan alternatif bahan alami seperti ekstrak pegagan (*Centella asiatica*).

Berdasarkan uraian yang telah dipaparkan, maka didapat permasalahan sebagai berikut:

- Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak pegagan (*C. asiatica*) dengan uji cakram berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* ?

1.3 Tujuan

- Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat dari bakteri *V. harveyi* secara *In vitro*.

1.4 Hipotesis

H₀ : Diduga pemberian ekstrak pegagan (*C. asiatica*) dengan dosis yang berbeda tidak berpengaruh pada daya hambat bakteri *V. harveyi* .

H₁ : Diduga pemberian ekstrak pegagan (*C. asiatica*) dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh pada daya hambat bakteri *V. harveyi*.

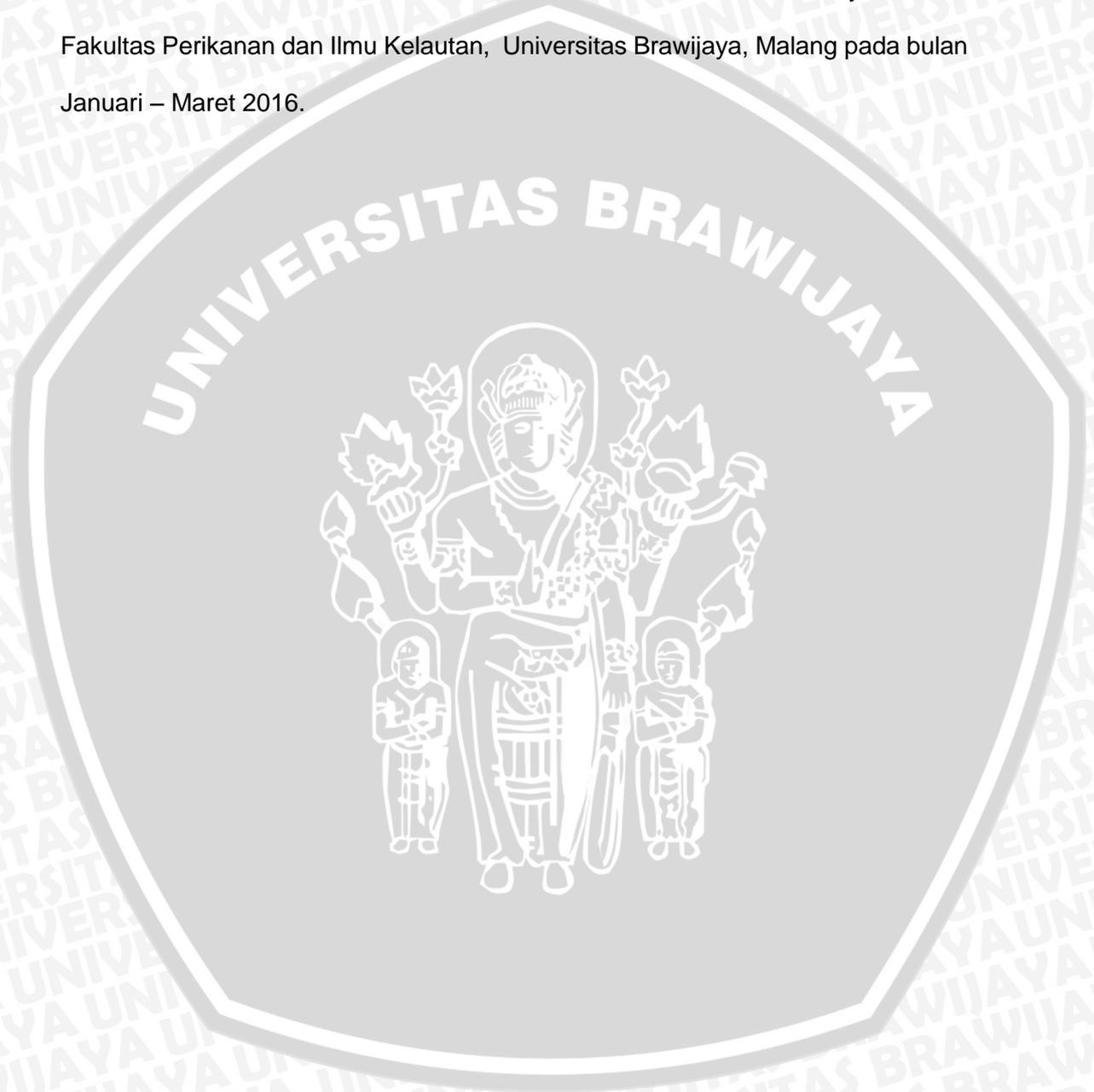
1.5 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* sehingga bermanfaat dan berguna bagi pembudidaya ikan atau udang dalam mencari alternatif bahan alami yang nantinya dapat digunakan sebagai pengobatan terhadap penyakit *vibriosis* yang ditimbulkan dari bakteri *V. harveyi*

dengan tidak menambah racun bagi ikan atau udang serta meminimalisir pencemaran lingkungan tempat budidaya.

1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

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



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Pegagan (*C. asiatica*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Rasy (2013), gambar tanaman pegagan disajikan pada **Gambar**

1. Klasifikasi dari tanaman pegagan adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnolophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Rosidae
Ordo	: Apiales
Famili	: Apiaceae
Genus	: Centella
Spesies	: <i>Centella asiatica</i>



Gambar 1. *C. asiatica* (Winarto dan Surbakti, 2003)

Pegagan merupakan tanaman herbal, batang berupa stolon yang menjalar diatas permukaan tanah, panjang 10-80 cm. Daun - daun tanaman ini diperlukan untuk bahan baku obat herbal, berasa agak pahit. Helai daunnya berbentuk seperti ginjal, dengan tepian daun bergerigi. Pangkal daun lebat, panjang daun kira- kira 1 cm sampai 7 cm dengan lebar 1,5 hingga 9 cm, memiliki tangkai yang panjang (Kartasapoetra, 1992).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Anonimus (2010) berpendapat, tanaman pegagan atau biasa disebut gagan (*C. asiatica*) ditemukan di daerah tropis. Di Indonesia, pegagan dapat tumbuh di dataran rendah hingga ketinggian 2500 mdpl. Pegagan juga tumbuh di padang rumput, tepian parit, bebatuan dan di tepi jalan. Di wilayah Indonesia sendiri, pegagan tumbuh liar di berbagai daerah. Seperti di Aceh pegagan dikenal dengan nama daun kaki kuda, pegago, pugago, di Jawa disebut antanan, Bali menyebutnya dengan ganggangan hingga Sulawesi dikenal dengan sebutan pagaga. Hal ini menunjukkan bahwa penyebaran pegagan v hampir ada di seluruh wilayah Indonesia yang beriklim tropis.

Pegagan (*C. asiatica*) adalah tanaman yang banyak tumbuh di perkebunan, ladang, tepi jalan, serta pematang sawah. Tumbuhan ini berasal dari daerah Asia tropik dan tersebar di Asia Tenggara termasuk Indonesia, Cina, India, Jepang, Australia dan menyebar ke berbagai negara lainnya. Nama yang biasa dikenal selain pegagan ini adalah daun kaki kuda atau antaman. Sejak zaman dahulu, pegagan digunakan sebagai obat gangguan syaraf, kulit dan memperbaiki peredaran darah (Wong, 2011).

Pegagan termasuk tanaman tahunan daerah tropis yang berbunga sepanjang tahun. Tanaman ini tumbuh menjalar di atas permukaan tanah. Bentuk daunnya seperti ginjal, berangkai panjang, dan tepinya bergerigi. Pegagan menyukai tanah yang lembab dan cukup terkena sinar matahari atau tempat teduh. Pegagan dapat diperbanyak dengan memindahkan sebagian tanaman berikut akarnya yang masih dibalut dengan tanah (Sa'adah, 2007). Pegagan berasal dari Asia tropik, menyukai tanah yang agak lembab, cukup sinar atau agak terlindung serta dapat ditemukan di dataran rendah sampai dengan ketinggian 2500 m di atas permukaan laut (Musyarofah, Susanto, Azis dan Kartosoerwarno, 2007).

2.1.3 Bahan Aktif Pegagan (*C. asiatica*)

Bahan aktif yang terdapat dalam pegagan salah satunya zat saponin. Menurut pendapat Rohyani, Aryanti dan Suripto (2015), saponin dalam tumbuhan yang dimanfaatkan sebagai bahan baku obat dapat dikarakterisasi dari rasa pahit dan kemampuannya untuk menghemolisa pada sel darah merah. Saponin dapat larut dalam air membentuk buih seperti buih sabun, hal ini disebabkan karena saponin memiliki molekul kimia amphiphilik. Zat aktif saponin juga sering dimanfaatkan untuk meracuni ikan karena dapat menghambat pembuluh darah ikan mengikat oksigen. Pendapat tersebut didukung oleh Ramadhan, Roslaili dan Elmatris (2015), bahwa manfaat antibakteri dari pegagan (*Centella asiatica*) didapatkan karena mengandung zat antibakteri, diantaranya adalah saponin, tannin, alkaloid, dan flavonoid. Pegagan juga mengandung zat kimia diantaranya adalah *asiaticoside* yang termasuk bagian dari saponin, *asiaticoside* bersifat lipofilik dan dapat membentuk senyawa kompleks dengan membran sel melalui adanya ikatan hidrogen, serta dapat menghancurkan permeabilitas dari dinding sel bakteri.

Menurut Rismana, Kusumaningrum, Rosidah, Nizar dan Yulianti (2013), ekstrak pegagan mengandung bahan aktif *triterpenoid* seperti *asiaticoside*, *asiatic acid*, *madecassoside* dan *madecassic acid* mempunyai efek sebagai antinosiseptik dan antiinflamasi. Menurut Winarto dan Surbakti (2003), kandungan zat kimia pada pegagan antara lain *asiaticoside*, *thankunside*, *isothankunside*, *madecassoside*, *brahmaside*, *brahmic acid*, *modasiatic acid*, *meso-inositol*, *centellose*, *carotenoid*, garam K, Na, Ca, Fe, *vellarine*, *tannin*, *mucilago*, resin, pektin, gula, protein, fosfor, dan vitamin B serta mengandung sedikit vitamin C dan sedikit minyak atsiri.

Kristina, Edy dan Putri (2009) mengatakan, efek farmakologis pegagan di antaranya ialah anti infeksi, anti racun, penurun panas, peluruh air seni, anti lepra,

dan anti sipilis. Daun pegagan berguna juga sebagai astrigensia dan tonikum. Pegagan juga dikenal untuk revitalitas tubuh dan otak yang lelah serta untuk kesuburan wanita.

2.1.4 Mekanisme Senyawa Pegagan (*Centella asiatica*) Sebagai Antibakteri

Menurut Prajitno (2005), antibakteri merupakan sesuatu zat yang mampu mengganggu metabolisme dan pertumbuhan mikroba. Zat tersebut apabila mampu mengganggu metabolisme dan pertumbuhan bakteri disebut antibakteri. Mekanisme kerja antimikroba antara lain dengan jalan merusak dinding sel, mendenaturasi protein sel, merusak membran sitoplasma dan menghambat kerja enzim di dalam sel.

Pegagan mengandung zat kimia diantaranya adalah *asiaticoside* (termasuk bagian dari saponin), yang memiliki manfaat untuk penyembuhan luka dan juga antilepra. Pegagan juga mempunyai efek antibakteri. Kandungan pegagan yang berfungsi sebagai antibakteri, antara lain saponin. Kandungan *triterpenoid* (saponin) pada pegagan dapat meningkatkan aktivasi makrofag. Meningkatnya aktivasi makrofag akan meningkatkan kemampuan fagositosis dan sekresi interleukin, sehingga memacu sel B untuk menghasilkan antibodi terhadap antigen yang masuk ke dalam tubuh (Ramadhan, Nelvita, Roslaili dan Elmatris, 2015).

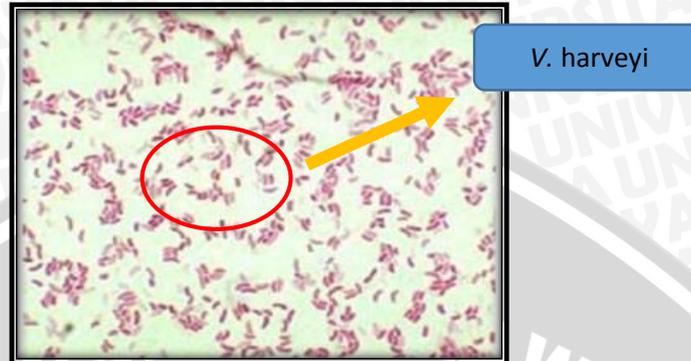
2.2 Biologi Bakteri *V. harveyi*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Gambar bakteri *V. harveyi* disajikan pada **Gambar 2**. Menurut Garrity, Julia dan Timothy (2004), Bakteri *V.harveyi* dapat diklasifikasikan sebagai berikut:

Kingdom : Prokaryota
Divisi : Bacteria
Ordo : Eubacteriales

Family : Vibrionaceae
Genus : Vibrio
Spesies : *Vibrio harveyi*



Gambar 2. Bakteri *V. harveyi* dengan perbesaran 100 × (Rizka, Andi (2013))

Menurut Prajitno (2007), penyakit kunang-kunang adalah jenis penyakit udang yang hanya ditemukan di daerah tropis. Penyakit ini dimulai dikenal sejak berkembangnya usaha hatchery udang windu di beberapa Negara tropis seperti Indonesia, Thailand, Philipina, Equador dan Taiwan. Di Indonesia sendiri dilaporkan telah menyerang daerah yang terdapat banyak hatchery misalnya di daerah Jawa Timur (Situbondo, Besuki, dan Banyuwangi), Jawa Barat (Serang, Pandeglang, Pelabuhan Ratu dan Indramayu), Jawa Tengah (Jepara), Sulawesi Selatan (Bone), Bali dan Lampung.

Suginta, Duangkamon, Mamiko dan Tamo (2010), *V. harveyi* merupakan golongan bakteri Gram negatif yang terdapat di perairan laut dan menyebabkan timbulnya penyakit *luminous vibriosis* pada udang, dan menyebabkan penyakit serius lainnya pada budidaya udang. Bakteri Gram negatif, pada dinding sel mengandung peptidoglikan dan juga lipopolisakarida, yang memiliki fungsi untuk melindungi sel.

2.2.2 Infeksi dan Tanda Penyerangan

Terdapat beberapa gejala kelainan yang terjadi pada udang yang dipelihara apabila terserang penyakit, yaitu yang disebabkan karena kualitas air

yang kurang baik untuk pertumbuhan dari udang. Berakibat udang menunjukkan beberapa kelainan yang berakibat pada menurunnya produksi dan kualitas udang yang dihasilkan juga menurun dan kurang baik (Jay dan Ahmad, 2003).

Septicemic vibriosis adalah penyakit yang menyerang larva ikan atau udang di wilayah Asia seperti China, Indonesia dan Thailand. Tubuh udang yang diserang menjadi keruh, tidak bisa bergerak, udang cenderung mengurangi kontak dengan cahaya, lambung kosong, meningkatnya permukaan kulit yang rusak dan cenderung berenang tenggelam. *Vibriosis* bersifat akut dan ganas, penyakit ini mampu memusnakan populasi ikan dan udang dalam tempo 1-3 hari semenjak gejala awal tampak (Prajitno, 2007).

Afrianto, Evi, Zafran dan Hendi (2015) mengatakan, ikan atau udang yang terserang penyakit *vibriosis* terlihat mengalami *anorexia*, yaitu warna tubuhnya berubah menjadi lebih gelap, warna insang menjadi cenderung memucat. Apabila terjadi infeksi akut menyebabkan tubuh ikan membengkak dan luka pada kulit yang mengeluarkan nanah serta akan terbentuk *granuloma* dan pendarahan di rongga perut apabila mengalami infeksi kronik.

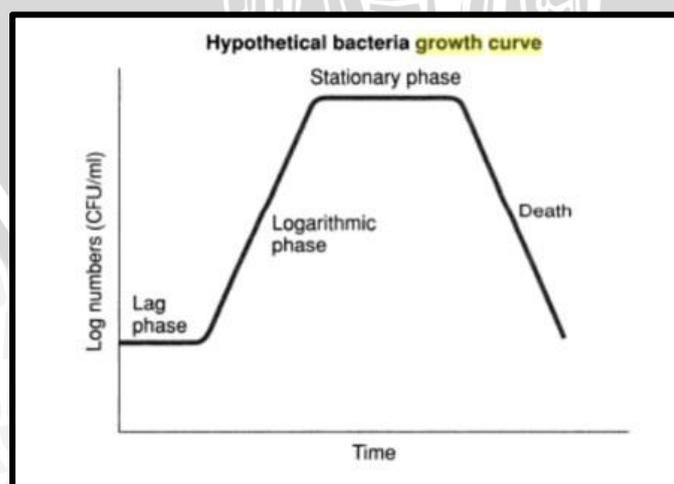
Nasi, Slamet dan Sarjito (2013), mengatakan bahwa salah satu penyebab kematian pada benih/larva udang adalah serangan dari bakteri. Bakteri *Vibriosis* menyerang larva udang yaitu pada saat udang dalam keadaan stress atau lemah, sehingga sering dikatakan bahwa bakteri termasuk *opportunistik pathogen*. Bakteri dan virus serta parasit dan berbagai jenis penyakit yang muncul di perairan berdampak pada penurunan hasil produksi budidaya perikanan. Akibat infeksi dari patogen tersebut, banyak organisme perairan yang dibudidayakan mengalami kematian massal sehingga menimbulkan kerugian ekonomi yang cukup tinggi.

2.2.3 Pertumbuhan

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai penambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pada organisme prokariot seperti bakteri, pertumbuhan merupakan penambahan volume dan ukuran sel dan juga sebagai penambahan jumlah sel. Pertumbuhan sel bakteri biasanya mengikuti suatu pola pertumbuhan tertentu berupa kurva pertumbuhan sigmoid disajikan pada **Gambar 3**.

3.

Perubahan kemiringan pada kurva tersebut menunjukkan transisi dari satu fase perkembangan ke fase lainnya. Nilai logaritmik jumlah sel biasanya lebih sering dipetakan daripada nilai aritmatik. Logaritma dengan dasar 2 sering digunakan, karena setiap unit pada ordinat menampilkan suatu kelipatan-dua dari populasi. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi empat fase utama : fase lag (fase lamban atau *lag phase*), fase pertumbuhan eksponensial (fase pertumbuhan cepat atau *log phase*), fase stationer (fase statis atau *stationary phase*) dan fase penurunan populasi (*decline*). Fase-fase tersebut mencerminkan keadaan bakteri dalam kultur pada waktu tertentu. Di antara setiap fase terdapat suatu periode peralihan dimana waktu dapat berlalu sebelum semua sel memasuki fase yang baru (Kartz, 2005).



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Bakteri, menunjukkan empat fase pertumbuhan: a= fase lag; b=fase eksponensial; c=fase stasioner dan d=fase kematian populasi (Kratz, 2005).

Menurut Duguid, Marmion dan Swain (1978), Terdapat empat fase utama pertumbuhan bakteri, yaitu:

- a) Fase lag, adalah fase dimana belum ada kegiatan penambahan sel, akan tetapi kemungkinan terjadi perubahan ukuran sel dan terjadi aktifitas metabolik. Pada fase ini, sel bakteri melakukan adaptasi untuk pertumbuhan terhadap lingkungan hidupnya.
- b) Fase eksponensial, pada fase ini sel-sel membelah dengan laju yang konstan dan merupakan sebagai akibat dari pembelahan biner. Jumlah sel bakteri pada fase ini meningkat sepuluh kali lipat dalam jangka waktu tertentu, mereka akan meningkatkan 100 kali lipat dan atau 1000 kali lipat dalam periode waktu tertentu.
- c) Fase stasioner, pada fase ini pertumbuhan eksponensial berhenti, laju multiplikasi berkurang sampai berhenti sama sekali dan sel-sel masuk ke dalam fase diam. secara teori terjadi keseimbangan antara pertumbuhan dan kematian pada sel bakteri. Pada fase ini, sel bakteri masih melakukan aktivitas metabolik yakni dengan metabolisme endogen dengan menyediakan energi dan zat yang diperlukan untuk mempertahankan hidup.
- d) Fase kematian, pada fase ini terjadi penurunan laju pertumbuhan dan juga penurunan jumlah sel bakteri. Hal tersebut disebabkan karena nutrisi yang dibutuhkan sel bakteri sudah habis dan kondisi lingkungan yang tidak sesuai.

2.3 Uji Daya Hambat Bakteri *V.harveyi* secara *In vitro*

Menurut Vipra, Srividya, Raghu, Panchali, Netravathi, Pallavi, Bharathi dan Sriram (2013), minimum inhibitory concentration (MIC), dapat didefinisikan sebagai konsentrasi yang terendah (secara konvensional diuji dalam dua kali pengenceran) dari suatu antibiotik dimana isolat terlihat tidak dapat menghasilkan

pertumbuhan dari bakteri setelah diinkuasi selama semalam. MIC dapat ditentukan dengan menggunakan media agar atau teknik pengenceran.

Pada uji antibakteri dapat dilakukan dengan dua metode yaitu metode difusi dan dilusi. Metode difusi (*Diffusion Test*) yaitu metode untuk menentukan daya hambat dari bahan antibakteri. Sedangkan metode dilusi (*Dillution Test*) adalah metode yang digunakan untuk mengetahui MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dan MBC (*Minimum bactericidal Concentration*) pada suatu bahan antibakteri. MIC adalah konsentrasi terendah dari suatu bahan antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sedangkan MBC adalah konsentrasi terendah dari suatu bahan antibakteri yang dapat membunuh suatu mikroorganisme tertentu (Rinawati, 2012).

Menurut Sarida, Tarsim dan Iwan (2010), menguji bakteri patogen secara *in vitro* penting dilakukan dengan tujuan untuk mengetahui kerentanan bakteri terhadap suatu bahan antibakteria. Salah satu metode yaitu metode difusi *disk* adalah metode yang sesuai untuk menentukan kerentanan bakteri terhadap suatu bahan antibakteria. Terdapat diameter zona hambat pertumbuhan bakteri yang akan tampak di sekitar *disk* yang berhubungan dengan nilai minimal. Bahan atau zat antibakteria yang terdifusi ke permukaan media tumbuh bakteri akan membentuk seperti lingkaran hambatan di area padat pertumbuhan bakteri. Tingkat sensitivitas dari suatu zat antibakteria ditunjukkan melalui kepekaan bakteri dengan membentuk zona hambat (*inhibiting zone*) di sekitar media pertumbuhan bakteri.

Menurut Kusmiyati dan Ni Wayan (2007), metode kertas cakram adalah metode dimana meletakkan kertas cakram yang telah direndam dengan larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, maka pertumbuhan bakteri diamati untuk memastikan ada atau tidaknya daerah hambatan disekeliling kertas cakram. Sedangkan metode pengenceran adalah

metode yang mengencerkan zat antimikroba dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang ditambahkan sejumlah mikroba uji yang telah ditentukan jumlahnya. Pada selang waktu yang telah di tentukan, maka dilakukan pemindahan dari tabung reaksi ke dalam tabunglain yang berisi media steril dan kemudian diinkubasikan dan diamati penghambatan pertumbuhan dari mikroba atau bakteri tersebut. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Trianto, Edi, Suryono dan Rahayu (2004), bahwa untuk pengukuran zona hambatan, apabila uji yang dilakukan menunjukkan hasil yang positif pada diameter zona hambat yang telah diukur maka hasil tersebut (x) dikurangi dengan 6 mm dimana diketahui sebagai ukuran dari kertas cakram.



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* secara *in vitro* disajikan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Alat-alat Penelitian

No	Alat	Kegunaan
1.	Tabung reaksi	Sebagai tempat untuk peremajaan bakteri di media miring
2.	Rak Tabung Reaksi	Sebagai tempat meletakkan tabung reaksi
3.	Erlenmeyer	Sebagai tempat pembuatan media
4.	Pinset	Sebagai alat untuk mengambil kertas cakram
5.	Gelas ukur	Sebagai tempat mengukur media cair
6.	<i>Beaker glass</i>	Sebagai tempat tabung reaksi saat proses sterilisasi
7.	Inkubator	Sebagai tempat inkubasi bakteri
8.	Jarum osse	Sebagai alat untuk mengambil dan menanam bakteri
9.	Mikropipet	Sebagai alat untuk mengambil larutan ukuran 100-1000 μl
10.	<i>Autoclave</i>	Sebagai untuk mensterilisasi alat dan bahan
11.	Lemari pendingin	Sebagai tempat penyimpanan bakteri dan bahan
12.	Blender	Sebagai alat menghaluskan bahan kering menjadi simplisia
13.	Timbangan digital	Sebagai alat untuk menimbang dengan ketelitian 10^{-3}
14.	Timbangan analitik	Sebagai alat untuk menimbang dengan ketelitian 10^{-2}
15.	Oven	Sebagai alat untuk mengeringkan petri setelah proses sterilisasi

16.	<i>Laminary Air Flow</i> (LAF)	Sebagai tempat penanaman bakteri dalam kondisi steril
17.	Bunsen	Sebagai alat untuk pembakaran dan pengkondisian steril
18.	<i>Sprayer</i>	Sebagai tempat alkohol
19.	<i>Rotary vacum evaporator</i>	Sebagai alat untuk memisahkan cairan dan padatan pada proses pembuatan ekstrak
20.	<i>Blue tip</i>	Sebagai alat untuk menuang campuran bakteri dalam media TSB
21.	Spatula	Sebagai alat untuk mengaduk dan mengambil ekstrak
22.	Nampan	Sebagai alat untuk meletakkan alat dan bahan
23.	Cawan petri	Sebagai tempat untuk menanam bakteri dan meletakkan kertas cakram
24.	Vortex	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
25.	Hot plate	Sebagai alat untuk memanaskan media
26.	Gunting	Sebagai alat untuk memotong benang
27.	Toples kaca	Sebagai tempat saat proses maserasi
28.	Botol film	Sebagai tempat untuk mengencerkan ekstrak

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak pegagan (*C.asiatica*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* secara *in vitro* disajikan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Bahan-bahan Penelitian

No	Bahan	Kegunaan
1.	Pegagan (<i>C. asiatica</i>)	Sebagai bahan ekstrak yang akan diujikan daya hambat
2.	Bakteri <i>V. harveyi</i>	Sebagai bahan penelitian
3.	TCBSA (<i>Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar</i>)	Sebagai media hidup bakteri <i>V. harveyi</i>

4. TSA (*Tryptic Soy Agar*) Sebagai media peremajaan bakteri
 5. TSB (*Tryptitone Soy Broth*) Sebagai media pengencer bakteri
 6. Alkohol 70% Sebagai bahan aseptis
 7. DMSO 10% Sebagai pelarut ekstrak
 8. Etanol 96% Sebagai bahan pelarut saat proses maserasi
 9. Akuades Sebagai pelarut media
 10. Spiritus Sebagai bahan bakar pada bunsen
 11. Kertas Saring Sebagai bahan untuk menyaring hasil maserasi
 12. Tali Sebagai bahan untuk mengikat alat saat proses sterilisasi
 13. *Aluminium foil* Sebagai bahan untuk menutupi seluruh bagian toples kaca saat proses maserasi
 14. Kertas berkas atau Koran Sebagai bahan pembungkus alat saat proses sterilisasi
 15. Kertas Cakram ukuran 6 mm Sebagai bahan untuk mengetahui besar zona bening dari ekstrak yang digunakan
 16. Kertas label Sebagai pemberi tanda pada setiap perlakuan
 17. Kapas Sebagai bahan untuk menutup alat saat proses sterilisasi
 18. Tissue Sebagai bahan untuk mengeringkan alat setelah dicuci
 19. NaCl Sebagai bahan campuran dari media TCBSA
 20. KCl Sebagai bahan campuran dari media TCBSA
 21. Mgso4 Sebagai bahan campuran dari media TCBSA
-

3.2 Metode Penelitian

Metode Penelitian dalam penelitian ini adalah menggunakan metode eksperimen. Menurut pendapat Vredenburg (1983), metode eksperimen merupakan suatu metode yang menerapkan hubungan berdasarkan dugaan sementara di antara sebab akibat (hipotesa), yaitu suatu dugaan sementara dari pengetahuan ilmiah yang telah ada. Suatu hipotesa memiliki hubungan antara dua variabel atau lebih.

Penelitian dengan menggunakan metode eksperimental ini bersifat menguji, artinya semua variabel yang diuji harus diukur dengan menggunakan instrumen pengukuran atau tes yang sudah distandardisasikan atau dibakukan (Hamdi dan Bahruddin, 2014). Penelitian eksperimen merupakan jenis penelitian yang dikembangkan untuk mempelajari fenomena dalam kerangka korelasi sebab-akibat. Selain itu penelitian eksperimen ini merupakan suatu bentuk rancangan penelitian yang memperlakukan dan memanipulasi subjek penelitian dengan kontrol secara ketat (Rajab, 2008).

3.3 Pengambilan Data

Pengambilan data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah dengan cara observasi secara langsung. Menurut Mania (2008), secara umum, observasi merupakan cara atau metode menghimpun keterangan atau data yang dilakukan dengan mengadakan pengamatan dan pencatatan secara sistematis terhadap fenomena yang sedang dijadikan sasaran pengamatan. Observasi sangat diperlukan jika observer belum memiliki banyak keterangan tentang masalah yang diselidikinya. Sehingga observer dapat memperoleh gambaran yang jelas tentang masalahnya serta petunjuk-petunjuk cara memecahkannya.

Pengamatan atau observasi merupakan suatu prosedur yang berencana, antara lain meliputi melihat, mendengar, dan mencatat sejumlah dan taraf aktifitas

tertentu atau situasi tertentu yang ada kaitannya dengan permasalahan yang sedang diteliti. Jadi dalam melakukan observasi bukan hanya mengunjungi, melihat atau menonton saja, akan tetapi disertai keaktifan jiwa atau perhatian khusus dan melakukan pencatatan-pencatatan (Notoatmodjo, 2010).

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), di mana setiap perlakuan dilakukan sebagai satuan tersendiri, tidak ada hubungan pengelompokan. Sugito (2009), mengatakan RAL merupakan rancangan paling sederhana dan juga merupakan prioritas utama dalam pemilihan rancangan lingkungan. RAL hanya menggolongkan terhadap banyaknya macam perlakuan saja, dan digunakan bila kondisi percobaan homogen, yaitu kondisi lingkungan yang dijadikan pengamatan dan waktu dilakukannya perlakuan dalam penelitian. Rumus dari model RAL adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

- Y_{ij} : 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

Perlakuan yang diberikan adalah perbedaan konsentrasi ekstrak pegagan (*C.asiatica*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi*. Dasar dari penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui konsentrasi yang tepat dan efektif terhadap penggunaan ekstrak pegagan (*C.asiatica*). Tingkat dosis yang dipakai dalam pengukuran ini adalah 5 perlakuan dengan 3 ulangan beserta kontrol positif dan kontrol negatif yaitu :

Untuk denah penelitian disajikan pada **Gambar 4**.

A1	B1	C1	D1	E1	K (+)
A1	B2	C2	D2	E2	K (-)
E3	C3	A3	B3	D3	

Gambar 4. Denah Penelitian

Keterangan Gambar :

- A : Perlakuan dengan dosis 50 ppm
- B : Perlakuan dengan dosis 100 ppm
- C : Perlakuan dengan dosis 150 ppm
- D : Perlakuan dengan dosis 200 ppm
- E : Perlakuan dengan dosis 250 ppm
- 1 – 3 : Ulangan
- K+ : Perlakuan ekstrak pegagan (*C. asiatica*) 100%
- K- : Perlakuan dengan dosis 0 ppm

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

a. Uji Pendahuluan Penentuan Dosis Daya Hambat Pegagan (*C. asiatica*)

Uji pendahuluan pada kegiatan awal penelitian dilakukan dengan melakukan uji difusi kertas cakram pada media TCBSA yang sudah ditanam bakteri *V. harveyi* dengan menggunakan ekstrak pegagan (*C. asiatica*) sebagai antibakteri. Dalam uji pendahuluan ini dosis ekstrak pegagan yang digunakan adalah 0 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 750 ppm dan 1000 ppm. Kemudian didapatkan hasil dosis yang dipakai yaitu antara 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 pmm dan 250 ppm, karena dalam penelitian pendahuluan pada kisaran dosis tersebut telah menunjukkan hasil kenaikan nilai zona hambat ekstrak pegagan terhadap bakteri *V. harveyi*.

b. Sterilisasi Alat dan Bahan

Untuk sterilisasi alat dapat dilakukan dengan autoclave dengan cara sebagai berikut :

- 1.) Alat-alat yang akan digunakan dicuci hingga bersih, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas dan diikat menggunakan benang.
- 2.) Air dituang ke dalam autoclave, kemudian alat yang telah dibungkus kertas dimasukkan ke dalam autoclave dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara diagonal.
- 3.) Saklar dinyalakan, kemudian tombol sirine yang berwarna merah 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 suhu menunjukkan angka 0 (nol), kemudian saklar listrik dimatikan, buka kran uap lalu buka penutup autoclave dengan cara diagonal.
- 6.) Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil dan siap digunakan.

c. Sterilisasi Tempat Perlakuan

Sterilisasi tempat dilakukan untuk menghindari kontaminasi dengan bakteri yang berada diluar tempat penelitian. Sterilisasi tempat dapat dilakukan dengan cara kimia menggunakan alkohol 70% maupun cara fisika dengan pembakaran langsung maupun dengan penyinaran menggunakan sinar UV. Pada penelitian ini sterilisasi tempat dilakukan dengan menggunakan sinar UV yang terdapat pada *laminary air flow* selama kurang lebih 15 menit, kemudian *laminary air flow* dapat digunakan untuk kegiatan aseptis.

d. Pembuatan Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*)

Proses pembuatan ekstrak dimulai dengan menyiapkan pegagan kering yang didapatkan dari Balai Medika Tanaman Obat Batu, Jawa Timur sebanyak 1 kg. Selanjutnya pegagan kering tersebut di giling dengan menggunakan blender sampai halus dihasilkan dalam bentuk bubuk atau simplicia. Kemudian simplicia pegagan diambil sebanyak 100 gr dengan cara ditimbang dengan menggunakan timbangan digital. Persiapan perendaman (maserasi) dimana serbuk pegagan yang telah dikeringkan tadi sebanyak 100 gr di dimaserasi dalam etanol 90%, dimana untuk menghasilkan etanol 90% sebanyak 1000 ml dari konsentrasi etanol 96% adalah dengan cara dicampurkan ke dalam erlenmeyer sejumlah 62,5 ml aquades ditambah dengan dengan 937,5 ml etanol 96%, kemudian dihomogenkan dengan cara digoyangkan dan etanol dengan konsentrasi 90% dapat digunakan. Menurut Khotimah, Mulyohadi, Sutiman dan Mochamad (2015), dengan menggunakan simplisia pegagan sebesar 100 gr dengan pelarut ethanol 90% sebanyak 900 ml dan diuapkan pada suhu 67 ° C, maka akan dapat menghasilkan komposisi senyawa aktif pada *C. asiatica* yang disebut asiaticoside dan bahan aktif lainnya. Proses maserasi dilakukan selama 3 x 24 jam dalam suhu kamar. Dilakukan proses pengadukan berulang setiap 24 jam sekali dengan cara menggoyangkan toples maserasi. Larutan yang didapat kemudian disaring dengan kertas saring kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* dengan kecepatan 80 rpm dengan suhu 78°C selama 6 jam sehingga dihasilkan ekstrak pegagan.

e. Pembuatan media

Bakteri *V. harveyi* diperoleh dari BBPAP Jepara dengan kepadatan 10⁸ sel/ml sebanyak 10 ml. Bakteri yang digunakan untuk mengetahui pengaruh

ekstrak pegagan (*C. asiatica*) adalah bakteri dengan kepadatan 10^8 sel/ml.

Pembiakan bakteri meliputi pembuatan media diantaranya sebagai berikut:

- **Media TSA (*Tryptitone Soy Agar*)**

Prosedur pembuatan media TSA miring yang akan digunakan untuk peremajaan bakteri adalah sebagai berikut:

- 1.) Media TSA ditimbang sebanyak 2 gram dengan menggunakan timbangan digital dan dilarutkan dengan 50 ml aquades dan dicampur dengan 0,92 gram NaCl, 0,347 gram $MgSO_4$ dan 0,032 gram KCl.
- 2.) Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen / *aluminium foil*, kemudian media dipanaskan dihomogenkan diatas *hotplate* sampai mendidih dan tercampur rata.
- 3.) Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30^\circ C$ karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
- 4.) Media dituang ke tabung reaksi sebanyak 10 ml dan disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu $121^\circ C$ selama 15 menit kemudian tabung reaksi diletakkan secara miring
- 5.) Media yang tidak langsung digunakan dapat disimpan dalam lemari pendingin.

- **Media TCBSA (*Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar*)**

Prosedur pembuatan Media TCBSA (*Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar*) yang akan digunakan untuk uji cakram adalah sebagai berikut:

- 1.) 400 ml akuades dicampur dengan 7,36 gram NaCl, 2,78 gram $MgSO_4$ dan 0,3 gram KCl
- 2.) Dimasukkan kedalam erlenmeyer kemudian ditutup kapas dan *aluminium foil* serta diikat menggunakan benang kasur, dan disterilisasi di dalam autoklaf

- 3.) TCBSA ditimbang sebanyak 35,2 gram, dicampurkan ke dalam larutan akuades dan 3 garam (KCl, NaCl dan MgSO₄) secara aseptis di dalam LAF
- 4.) Kemudian media dihomogenkan pada kondisi hangat diatas *hotplate* sampai tercampur rata
- 5.) Media ditunggu hingga tidak terlalu panas kemudian dituangkan ke dalam cawan petri dan ditunggu hingga padat
- 6.) Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin, apabila akan digunakan maka dapat dipanaskan kembali

- **Media TSB (*Tryptitone Soy Broth*)**

Prosedur pembuatan media TSB (*Tryptitone Soy Broth*) yang akan digunakan untuk pengenceran bakteri dalam metodesebar adalah sebagai berikut:

- 1.) TSB ditimbang 0,32 gram kemudian dilarutkan dalam 10 ml akuades dalam erlenmeyer kemudian dicampur dengan 0,184 gram NaCl, 0,069 gram MgSO₄ dan 0,007 gram KCl.
- 2.) Erlenmeyer ditutup kapas dan alumunium foil lalu dibungkus dengan kertas perkamen dan diikat dengan benang kasar.
- 3.) Kemudian disterilkan dalam autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit.
- 4.) Media yang akan digunakan untuk pembiakan bakteri dibiarkan dingin karena bakteri akan mati bila diinokulasi pada media yang masih panas.

f. Pembiakkan Bakteri *V. harveyi*

Bakteri *V. harveyi* diperoleh dari BBPAP Jepara dengan kepadatan 10⁸ sel/ml. Adapun prosedur yang dilakukan dalam pembiakkan bakteri *V. harveyi* menggunakan beberapa media adalah sebagai berikut:

- **Media TSA**

- 1.) Pertama yang harus dilakukan yaitu dicuci peralatan yang akan digunakan seperti erlenmeyer, sendok media dan spatula, lalu disiapkan media TSA (*Tryptitone Soy Agar*) miring

- 2.) Jarum osse dipanaskan diatas bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum ose disentuhkan ke biakan murni *V. harveyi* kemudian digores secara zigzag. Media TSA yang telah ditanam bakteri *V. harveyi* dibiarkan selama 12 - 24 jam dalam inkubator pada suhu 33°C.

- **Media TSB**

- 1.) Larutan TSB disiapkan sebanyak 0,58 gram dalam erlenmeyer sebanyak 10 ml.
- 2.) Jarum osse dipanaskan diatas bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum osse disentuhkan kebiakan murni *V. harveyi* sebanyak 1 osse, kemudian dicelupkan ke dalam TSB.
- 3.) Larutan TSB dibiarkan 12 - 24 jam dalam inkubator pada suhu 30 °C.
- 4.) Disiapkan cawan petri yang berisi media TCBSA.
- 5.) Setelah TSB menjadi keruh karena ditumbuhi oleh bakteri, maka dengan menggunakan metode sebar bakteri ditanam ke media TCBSA dengan menggunakan mikropipet sebesar 100µ.

g. Penentuan Dosis Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*)

Penentuan dosis ekstrak pegagan ini didapatkan dari uji pendahuluan. Selanjutnya, untuk menentukan dosis yang diinginkan, maka ditimbang ekstrak pegagan kemudian ditambahkan larutan DMSO 10%. Berikut merupakan cara perhitungan untuk penentuan dosis. Adapun cara untuk menadapatkan DMSO 10% yaitu:

- 1.) DMSO murni dan aquades disiapkan dengan perbandingan 1:9. Sama besar dengan 1 ml DMSO murni ditambah 9 ml aquades.
- 2.) DMSO murni dituang sebanyak 10 ml ke dalam erlenmeyer
- 3.) Aquades ditambahkan sebanyak 90 ml ke dalam erlenmeyer
- 4.) Dihomogenkan dengan cara digoyangkan
- 5.) DMSO 10% sebanyak 100 ml siap untuk digunakan

Untuk pengenceran ekstrak dengan DMSO 10%, dilakukan beberapa langkah, yaitu sebagai berikut:

Pertama dilakukan penyetakan ke dalam botol film sebesar 1000 ppm (mg/ml) dengan perbandingan ekstrak pegagan sebesar 10 mg dan DMSO 10% sebesar 10 ml, dihomogenkan dengan menggunakan *vortex mixer* hingga ekstrak larut dalam larutan DMSO. Kemudian dilakukan pengenceran pada setiap dosis yang diinginkan dengan mengambil dari stok 1000 ppm yang telah dibuat sebelumnya.

Untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada **Lampiran 3**.

1.) Dosis 50 ppm

Diambil larutan ekstrak stok ke dalam botol film sebesar 0,15 ml menggunakan mikropipet, ditambahkan DMSO 10 % sebesar 2,85 ml. Kemudian dihomogenkan dan menghasilkan dosis 50 ppm sebanyak 3 ml.

2.) Dosis 100 ppm

Diambil larutan ekstrak stok ke dalam botol film sebesar 0,30 ml menggunakan mikropipet, ditambahkan DMSO 10 % sebesar 2,70 ml. Kemudian dihomogenkan dan menghasilkan dosis 100 ppm sebanyak 3 ml.

3.) Dosis 150 ppm

Diambil larutan ekstrak stok ke dalam botol film sebesar 0,45 ml menggunakan mikropipet, ditambahkan DMSO 10 % sebesar 2,55 ml. Kemudian dihomogenkan dan menghasilkan dosis 150 ppm sebanyak 3 ml.

4.) Dosis 200 ppm

Diambil larutan ekstrak stok ke dalam botol film sebesar 0,60 ml menggunakan mikropipet, ditambahkan DMSO 10 % sebesar 2,40 ml.

Kemudian dihomogenkan dan menghasilkan dosis 200 ppm sebanyak 3 ml.

5.) Dosis 250 ppm

Diambil larutan ekstrak stok ke dalam botol film sebesar 0,75 ml menggunakan mikropipet, ditambahkan DMSO 10 % sebesar 2,25 ml. Kemudian dihomogenkan dan menghasilkan dosis 250 ppm sebanyak 3 ml.

3.5.2 Pelaksanaan Penelitian

- **Uji Cakram**

Metode difusi kertas cakram menurut Kusmiyati dan Ni Wayan (2007), metode kertas cakram adalah metode dimana meletakkan kertas cakram yang telah direndam dengan larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, maka pertumbuhan bakteri diamati untuk memastikan ada atau tidaknya daerah hambatan disekeliling kertas cakram. Sedangkan metode pengenceran adalah metode yang mengencerkan zat antimikroba dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang ditambahkan sejumlah mikroba uji yang telah ditentukan jumlahnya. Pada selang waktu yang telah ditentukan, maka dilakukan pemindahan dari tabung reaksi ke dalam tabung lain yang berisi media steril dan kemudian diinkubasikan dan diamati penghambatan pertumbuhan dari mikroba atau bakteri tersebut.

Uji cakram digunakan untuk mengetahui kemampuan ekstrak dalam dosis tertentu yang dapat menghambat bakteri yang bersifat bakteriostatik (menghambat bakteri) serta untuk mengetahui kemampuan senyawa yang terdapat didalam ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri setelah di inkubasi selama 24 jam. Hal ini dapat dilihat dari perubahan ukuran zona bening yang dihasilkan setelah masa inkubasi. Sedangkan sifat antibakteri bakteriosidal (membunuh bakteri) adalah kemampuan senyawa dalam

ekstrak yang dapat membunuh bakteri setelah diinkubasi selama 48 jam, atau ukuran zona bening yang dihasilkan berukuran sama atau tidak berubah.

Kertas cakram yang telah direndam dengan ekstrak pegagan diletakkan di atas lempengan agar yang telah ditanam dengan bakteri *V. harveyi* yang akan diuji daya hambatnya. Penghambatan pertumbuhan bakteri oleh zat antibakteri dalam ekstrak dapat terlihat dari bagaian yang bening di sekitar zona pertumbuhan bakteri tersebut.

Uji cakram digunakan untuk mengetahui tanaman pada dosis tertentu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang bersifat bakteriostatik (menghambat bakteri) setelah diinkubasi selama 24 jam yang ditandai dengan terdapatnya zona bening setelah dilakukan inkubasi, juga bakteri yang bersifat bakteriosidal (membunuh bakteri) setelah diinkubasi selama 48 jam yang ditandai dengan ukuran zona bening tidak mengalami perubahan. Adapun prosedur uji cakram adalah sebagai berikut:

- 1.) Disiapkan cawan petri yang telah terdapat media TCBSA dan dosis ekstrak pegagan (*C. asiatica*) yang telah ditentukan untuk uji cakram.
- 2.) Dilakukan penanaman bakteri pada media TCBSA dengan cara metode sebar yaitu dengan menuangkan media TCBSA kemudian biakan bakteri dari media TSB menggunakan mikropipet sebanyak 100 μ per cawan, dituang pada seluruh permukaan media agar dan diratakan dengan menggunakan *triangle* hingga merata.
- 3.) Sebelumnya, direndam kertas cakram steril ukuran 6 mm ke dalam ekstrak pegagan (*C. asiatica*) selama 15 menit berdasarkan dosis perlakuan yang telah ditentukan di dalam botol film.
- 4.) Kemudian kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak pegagan (*C. asiatica*) ditiriskan dan diletakkan pada permukaan lempeng agar dengan menggunakan pinset.

- 5.) Jarak kertas cakram dengan tepi cawan petri tidak boleh kurang dari 15 mm. Jika jumlah kertas cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram tidak boleh kurang dari 24 mm dan saat meletakkan kertas cakram tidak boleh bergeser, karena mengurangi validasi pengukuran.
- 6.) Seluruh perlakuan dilakukan secara aseptis di LAF (*Laminary Air Flow*)
- 7.) Dibaca hasil setelah diinkubasi pada suhu ruang 33°C selama 2 kali 24 jam atau selama 48 jam dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong digital.

- Identifikasi Bakteri *V. harveyi*

Prosedur yang harus dilakukan untuk identifikasi bakteri adalah pewarnaan gram, adapun langkah-langkahnya adalah sebagai berikut:

- 1.) Objek *glass* dibersihkan dengan alkohol 70%
- 2.) Jarum ose dipijarkan dengan menggunakan bunsen, ditinggu hingga dingin, lalu bakteri diambil dari media kemudian diratakan diatas objek *glass*
- 3.) Objek *glass* difiksasi diatas bunsen
- 4.) Ditetesi kristal violet 2-3 tetes, ditunggu 1menit
- 5.) Bilas dengan air mengalir dan kering anginkan
- 6.) Ditetesi lugol, tunggu hingga 1 menit, dibilas dengan aquades dan kering anginkan
- 7.) Ditetesi alkohol, ditunggu 30 detik, dibilas dengan air dan kering anginkan
- 8.) Ditetesi safranin, ditunggu 20 detik
- 9.) Bilas dengan air mengalir, dan kering anginkan, serta amati dibawah mikroskop

3.5.3 Identifikasi Bakteri *V. harveyi*

Bakteri *V. harveyi* merupakan bakteri gram negatif yang sering menyerang pada ikan air laut. Untuk meminimalisir adanya infeksi dari bakteri ini maka dapat

dilakukan alternatif pengujian dengan menggunakan ekstrak pegagan (*C. asiatica*) yang memiliki senyawa antibakteri. Daya antibakteria dari ekstrak pegagan dapat diketahui dengan dilakukan uji daya hambat dengan menggunakan kertas cakram yang telah direndam dengan beberapa dosis dari ekstrak pegagan yang telah ditentukan.

Pada Penelitian ini, bakteri *V. harveyi* yang digunakan merupakan isolat murni yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau Jepara. Kemudian dilakukan peremajaan bakteri pada media miring menggunakan media TSA (*Tryptitone Soya Agar*), sedangkan untuk peremajaan dengan metode gores pada media cair yang menggunakan media TSB (*Tryptitone Soya Broth*).

Hasil Uji bikomia dari bakteri *V. harveyi*, disajikan pada **Lampiran 5**. Dari gambar diatas menunjukkan bahwa bakteri tersebut merupakan bakteri gram negatif, hal tersebut ditandai dari bentuk koloni dari bakteri tersebut yaitu berbentuk batang dan juga warna merah dari preparat tersebut. Menurut Pratita dan Putra (2012), pada pewarnaan gram, hasil yang didapat akan ditentukan dari komposisi dinding sel pada bakteri. Pada pewarnaan gram, reagen yang digunakan ada 4 jenis, yaitu kristal violet, iodin, alkohol dan safranin. Bakteri gram positif akan mempertahankan warna ungu dari kristal violet sehingga ketika diamati dengan mikroskop akan menunjukkan warna ungu sedangkan bakteri gram negatif tidak dapat mempertahankan warna ungu dari kristal violet tetapi zat warna safranin dapat terserap pada dinding sel sehingga pada saat dilihat menggunakan mikroskop akan memperlihatkan warna merah. Hasil pewarnaan Gram dapat digunakan untuk mengetahui bentuk morfologi dari keempat jenis isolat yaitu warna dan bentuk sel bakteri tersebut.

3.6 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama pada penelitian ini adalah parameter uji yang berupa ukuran diameter zona bening yang dihasilkan setelah uji difusi kertas cakram dengan menggunakan ekstrak pegagan (*C. asiatica*) dalam satuan milimeter (mm).

3.6.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang adalah parameter uji yang berupa suhu inkubasi yang digunakan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri *V. harveyi* selama penelitian.

3.7 Analisa Data

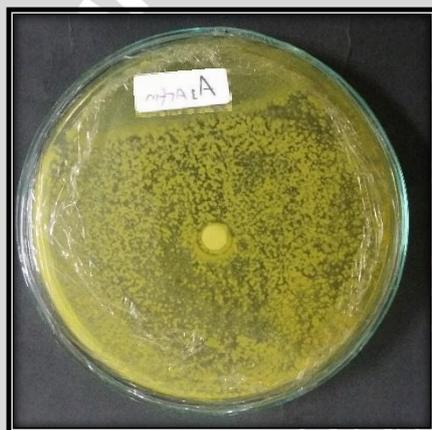
Berdasarkan hasil uji daya hambat (zona bening) ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. harveyi* maka dilakukan analisa data secara statistik dengan menggunakan analisa keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Uji ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon zona hambat (zona bening) yang diukur atau uji F.

Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yaitu untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Kemudian untuk mengetahui hubungan antar perlakuan dengan diameter zona hambat (zona bening) digunakan uji polynomial orthogonal yang memberikan keterangan mengenai pengaruh keterangan terbaik.

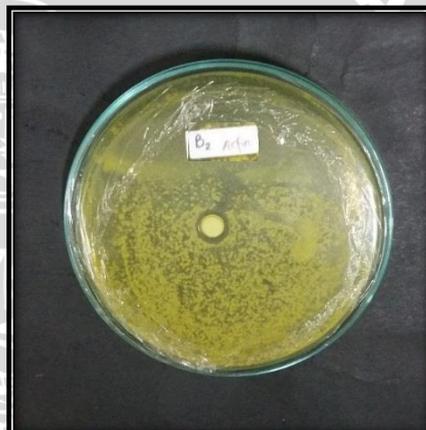
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Daya Hambat (Zona Bening) Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*) terhadap Bakteri *V. harveyi* secara *In vitro*

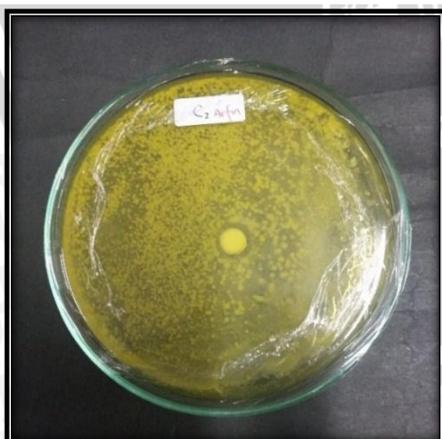
Berdasarkan hasil pengamatan selama penelitian mengenai uji daya hambat ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*, maka didapat gambar hasil penelitian zona bening yang disajikan pada **Gambar 6**. Adapun hasil Uji daya hambat ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. harveyi* pada tiap dosis perlakuan dan setiap ulangan, disajikan pada **Lampiran 4**.



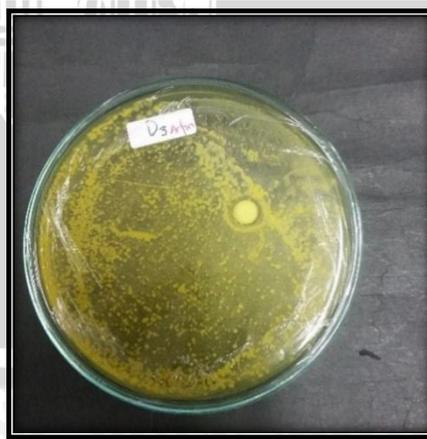
Perlakuan A dosis 50 ppm



Perlakuan B dosis 100 ppm



Perlakuan C dosis 150 ppm



Perlakuan D dosis 200 ppm



Perlakuan E dosis 250 ppm

Gambar 5. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*) terhadap Bakteri *V. harveyi*

Hasil uji daya hambat pada penelitian ini diperoleh tidak adanya pertumbuhan bakteri *V. harveyi* disekitar kertas cakram yang telah direndam dengan menggunakan perlakuan dosis yang berdeda. Diameter pada zona bening tersebut dipengaruhi oleh adanya jumlah dosis yang berbeda pada setiap perlakuan. Semakin tinggi dosis yang digunakan, maka zona bening yang dihasilkan akan semakin besar, sedangkan semakin rendah dosis yang digunakan, maka diameter zona bening yang dihasilkan semakin kecil. Berdasarkan **Gambar 5**, perlakuan dosis tertinggi pada perlakuan E sebesar 250 ppm sedangkan perlakuan dosis terendah yaitu pada perlakuan A sebesar 50 ppm. Hal tersebut dipengaruhi oleh banyaknya bahan aktif dari ekstrak pegagan yang diserap oleh kertas cakram.

Salah satu zat yang ada pada pegagan adalah saponin yang memiliki sifat antibakteri. Pernyataan tersebut sesuai dengan pendapat menurut Rijayanti (2014), bahwa pada pegagan memiliki zat saponin yang bekerja sebagai zat antibakteri yaitu dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim pada suatu sel. Saponin dapat menjadi anti bakteri karena zat aktif permukaannya mirip detergen, akibatnya saponin akan menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan

merusak permeabilitas membran. Rusaknya membran sel ini sangat mengganggu kelangsungan hidup bakteri.

Dari hasil gambar uji daya hambat ekstrak pegagan dapat dilihat bahwa semakin tinggi perlakuan yang diberikan, maka zona hambat atau zona bening yang terbentuk semakin melebar. Pernyataan tersebut sesuai dengan pernyataan Kanto, Sari dan Agus (2009), diameter zona bening atau zona hambat yang dihasilkan oleh suatu ekstrak berbanding lurus dengan jumlah konsentrasi ekstrak yang digunakan sehingga perbedaan besar kecilnya zona bening atau zona hambat yang dihasilkan masing - masing konsentrasi berbanding dengan jumlah bahan aktif yang digunakan.

Adapun untuk mengetahui klasifikasi respon hambatan ekstrak pegagan *C. asiatica* terhadap bakteri *V. harveyi*, disajikan pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Klasifikasi Respon Hambatan Menurut Davis dan Stout (1971),

Diameter zona bening	Respon hambatan pertumbuhan
< 5 mm	Lemah
5 – 10 mm	Sedang
>10 – 20 mm	Kuat
>20 – 30 mm	Sangat kuat

Berdasarkan tabel klasifikasi zona hambatan diatas, maka pada perlakuan setiap dosis ekstrak pegagan respon hambatannya sama, yaitu pada perlakuan A (50 ppm), didapatkan hasil rata-rata 2,04 mm dan hasil tersebut termasuk dalam klasifikasi respon hambat lemah. Pada perlakuan B dengan dosis 100 ppm didapatkan hasil rata-rata zona bening 2,56 mm . Perlakuan C dengan dosis 150 ppm didapatkan hasil rata-rata zona bening sebesar 3,04 mm. Perlakuan D dengan dosis 200 ppm didapatkan hasil rata-rata zona bening 3,49 mm, dan perlakuan E dengan dosis 250 ppm diperoleh hasil rata-rata zona bening sebesar

4,07 mm. Dari kelima perlakuan tersebut maka termasuk pada klasifikasi respon hambatan kategori lemah. Hal ini dikarenakan dari perlakuan A hingga E hasil rata-rata zona bening yang dihasilkan bernilai < 5 mm.

Berikut hasil perhitungan rata-rata zona bening dengan menggunakan lima perlakuan dosis yang berbeda dan tiga kali ulangan disajikan pada **Tabel 4**.

Tabel 4. Hasil Rata-rata Zona Bening Bakteri *V. harveyi*

Perlakuan	Ulangan (mm)			Total	Rata-rata (mm)
	1	2	3		
A (50 ppm)	2,06	2,08	1,97	6,11	2,04±0,06
B (100 ppm)	2,43	2,55	2,69	7,67	2,56±0,13
C (150 ppm)	3,06	3,00	3,07	9,13	3,04±0,04
D (200 ppm)	3,34	3,51	3,63	10,48	3,49±0,15
E (250 ppm)	3,99	4,15	4,08	12,22	4,07±0,08
TOTAL				45,61	

Pada tabel pengamatan zona bening didapatkan nilai diameter rata – rata zona bening tertinggi pada perlakuan E yaitu sebesar 4,07 mm. Sedangkan nilai diameter rata – rata zona bening terendah pada perlakuan A yaitu sebesar 2,04 mm. Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh perbedaan perlakuan ekstrak pegagan terhadap zona bening, maka dilakukan uji sidik ragam. Tabel uji sidik ragam yang disajikan pada **Tabel 5**, Untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada **Lampiran 3**.

Tabel 5. Sidik Ragam Zona Bening Bakteri *V. harveyi*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	7,54076	1,88519	190,5515	3,48	5,99
Acak	10	0,0989	0,009893	**		
Total	14					

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata

Pada tabel sidik ragam didapatkan hasil bahwa uji daya hambat ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. harveyi* berbeda sangat nyata.

Hal ini dikarenakan nilai F. Hitung lebih besar dari pada nilai F 5 % dan F 1 % atau nilai dari 190,55 lebih besar dari nilai 3,48 dan 5,99. Maka Ho ditolak yang berarti perlakuan tersebut berbeda sangat nyata. Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang disajikan pada **Tabel 6**, untuk perhitungan lengkapnya pada **Lampiran 3**.

Tabel 6. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*) terhadap Bakteri *V. harveyi*

Perlakuan	Rata-rata	A	B	C	D	E	Notasi
		2,04	2,56	3,04	3,49	4,07	
A	2,04	—					a
B	2,56	0,52**	—				b
C	3,04	1,01**	0,49**	—			c
D	3,49	1,46**	0,94**	0,45**	—		d
E	4,07	2,04**	1,52**	1,03**	0,58**	—	e

Keterangan :

ns : tidak berbeda nyata

* : berbeda nyata

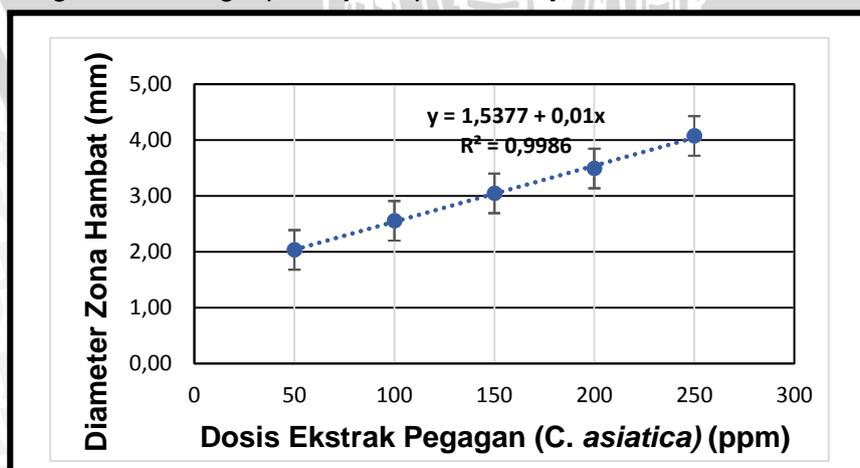
** : berbeda sangat nyata

Pada hasil uji BNT (**Tabel 6.**) didapatkan hasil bahwa pada perlakuan E dengan dosis 250 ppm memberikan pengaruh berbeda sangat nyata dengan perlakuan A (50 ppm), B (100 ppm), C (150 ppm) dan D (200 ppm), dikarenakan pada perlakuan tersebut memiliki kemampuan menghambat paling baik daripada dosis lainnya juga ditunjukkan ukuran zona hambat bakteri yang lebih besar dari perlakuan lainnya. Hasil perlakuan tersebut menunjukkan bahwa perlakuan A dengan dosis 50 ppm tidak memberi pengaruh yang signifikan terhadap perlakuan B(100 ppm); C (150 ppm); D (200 ppm) dan E (250 ppm), sehingga diberi notasi a. Perlakuan B (100 ppm) terhadap perlakuan A (50 ppm) memberikan pengaruh yang sangat berbeda nyata, sehingga diberi notasi b. Perlakuan C (150 ppm) terhadap perlakuan B (100 ppm) berpengaruh berbeda sangat nyata, maka diberi notasi c. Perlakuan D (200 ppm) terhadap perlakuan C (150 ppm), memberikan pengaruh berbeda sangat nyata, sehingga diberi notasi d. Sedangkan perlakuan E (250 ppm) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A

(50 ppm), perlakuan B (100 ppm), perlakuan C (150 ppm) dan perlakuan D (200 ppm), maka dapat diberi notasi e. Adanya daya hambat pada ekstrak pegagan (*C. asiatica*) karena ekstrak pegagan memiliki beberapa zat antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri *V. harveyi*, diantaranya yaitu flavonoid.

Flavonoid merupakan senyawa turunan dari fenol yang mudah larut dalam air, serta merupakan zat antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri *V. harveyi*. Mekanisme kerja dari flavonoid itu sendiri yaitu dengan cara mendenaturasi protein dan merusak membran sel bakteri dengan cara melarutkan lemak yang terdapat pada dinding sel. Senyawa ini mampu melakukan migrasi dari fase cair ke fase lemak. Menyebabkan terjadinya kerusakan pada membran sel serta mengakibatkan terhambatnya aktivitas dan biosintesa dari enzim yang diperlukan dalam reaksi metabolisme. Kondisi ini pada akhirnya menyebabkan kematian pada bakteri (Rohyani, Evy dan Suropto, 2015).

Untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antar perlakuan dengan zona bening maka perlu dilakukan uji polinomial ortogonal. Hasil perhitungan uji polinomial orthogonal yang berupa grafik disajikan pada **Gambar 6**. Untuk perhitungan lebih lengkap disajikan pada **Lampiran. 3**.



Gambar 6. Grafik Hubungan Zona Hambat antar Perlakuan Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*) terhadap Bakteri *V. harveyi*

Berdasarkan **Gambar 6**, grafik hubungan zona hambat antar perlakuan ekstrak pegagan terhadap bakteri *V.harveyi* menunjukkan perpotongan garis secara linear dengan persamaan $y = 1,5377 + 0,01x$ dengan koefisien nilai determinasi (R^2) sebesar 0,9986. Pada dosis 50 ppm hingga 250 ppm grafik mengalami peningkatan atau bertambah besarnya zona hambat, hasil perhitungan lengkapnya pada **Lampiran 3**. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak pegagan mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri *V. harveyi*.

Hubungan antara pemberian ekstrak pegagan (*C. asiatica*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dengan rata-rata ukuran zona hambat yang dihasilkan menunjukkan respon yang meningkat seiring dengan bertambahnya dosis ekstrak pegagan (*C. asiatica*). Dari grafik tersebut menunjukkan bahwa perlakuan terbaik yaitu pada perlakuan E dengan dosis 250 ppm dengan nilai rata-rata zona hambat sebesar 4,07 mm karena pada perlakuan tersebut mempunyai kemampuan menghambat paling baik daripada dosis lainnya, hal tersebut juga ditunjukkan juga dengan lebar dari zona hambat bakteri uji.

Penghambatan bakteri yang terbentuk diakibatkan senyawa aktif yang terkandung dari ekstrak pegagan. Salah satu senyawa yang terdapat pada tanaman pegagan adalah fenol. Fenol adalah senyawa antioksidan yang dapat merusak lapisan dinding sel dari suatu bakteri. Mekanisme kerja senyawa fenol dalam membunuh sel bakteri, yaitu dengan cara mendenaturasi protein sel bakteri. Akibat terdenaturasinya protein sel bakteri, maka semua aktivitas metabolisme sel bakteri akan terhenti, sebab semua aktivitas metabolisme sel bakteri dikatalisis oleh enzim yang merupakan protein (Hugo, 1971).

Menurut Noviana (2004), ion H^+ yang terdapat pada senyawa fenol dapat merusak 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, sehingga sitoplasma mengalami kebocoran isi sel yang mengakibatkan terganggunya fungsi nukleotida dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan hingga mengalami kematian.

Hasil penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* menghasilkan sifat bakteristatik pada bakteri *V. harveyi* dengan perlakuan dosis ekstrak pegagan maksimum 250 ppm dengan hasil diameter zona bening sebesar 4,07 mm serta respon daya hambat yang termasuk lemah. Maka disarankan untuk menggunakan dosis tertinggi yaitu 250 ppm dan masih harus diteliti lebih lanjut. Dilihat dari cara kerjanya antibakteri dibagi menjadi dua yaitu antibakteri bersifat bakteristatik dan antibakteri yang bersifat bakteriosida. Antibakteri bakteriosida adalah berarti bersifat mematikan, apabila digunakan pada dosis biasa maka berkhasiat mematikan bakteri, sedangkan antibakteri bakteristatik merupakan antibakteri yang apabila digunakan dalam dosis biasa akan dapat menghentikan pertumbuhan dan perbanyakan bakteri (Tjay dan Kirana, 2007).

Selain itu, dari hasil pengamatan membuktikan bahwa pemberian ekstrak pegagan (*C. asiatica*) dengan dosis 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm bersifat bakteristatik, hal tersebut diketahui setelah inkubasi selama 48 jam terlihat bahwa zona hambat dari masing-masing perlakuan rata-rata mengalami penurunan.

Pada hasil penelitian ini, antibakteri yang terdapat di dalam ekstrak pegagan (*C. asiatica*) termasuk memiliki pengaruh terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* atau disebut memiliki sifat antibakteri bakteristatik yaitu bersifat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Hasil yang diperoleh juga menunjukkan bahwa pengaruh yang diberikan oleh ekstrak pegagan terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* dengan perlakuan dosis ekstrak pegagan maksimum 250 ppm dan dosis minimum 50 ppm memiliki pengaruh yang signifikan dan termasuk dalam kategori

respon daya hambat lemah, atau disebut ekstrak pegagan tersebut tidak menghambat secara optimal. Sehingga perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan dosis optimum.

4.2 Suhu Inkubator Selama Inkubasi Bakteri *V. harveyi*

Menurut Pelczar dan Chan (2008), suhu merupakan faktor utama yang mempengaruhi laju pertumbuhan bakteri. Umumnya pertumbuhan bakteri ditandai dengan bertambahnya jumlah massa melebihi massa yang ada didalam inokulan asalnya, yaitu bertambahnya massa bakteri berbanding lurus (proporsional) dengan penambahan komponen sel. Proses bakteri setelah ditanam dan diberi perlakuan dalam penelitian adalah di inkubasi selama 24 sampai 48 jam. Selama masa inkubasi, suhu yang digunakan adalah 33 °C. Menurut Prajitno (2005), suhu optimum yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio* berkisar antara 30 °C - 35 °C. Pada suhu 40 °C dan 45 °C bakteri tersebut tidak dapat tumbuh serta pada suhu 55 °C bakteri akan mengalami kematian. Parameter penunjang merupakan parameter yang digunakan selama penelitian. Pada penelitian ini parameter penunjang yang digunakan adalah suhu.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* secara *In Vitro*, maka diperoleh kesimpulan bahwa ekstrak pegagan berpengaruh terhadap zona hambat bakteri *V. harveyi* dengan nilai rata-rata zona hambat (zona bening) terbesar pada perlakuan E yaitu dengan dosis 250 ppm menghasilkan rata-rata zona hambat sebesar 4,07 mm dan termasuk dalam kategori respon daya hambat lemah dan bersifat bakteriostatik.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* secara *In Vitro* didapatkan disarankan untuk menggunakan ekstrak pegagan untuk menghambat bakteri *V. harveyi* dengan dosis tertinggi yaitu 250 ppm, serta perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk mendapatkan dosis yang optimum dalam pengaruh ekstrak pegagan terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi*. Serta dapat dilakukan penelitian *in vivo* pada organisme.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, Eddy; Evi Liviawaty; Zafran Jamaris dan Hendi. 2015. Penyakit Ikan. Penebar Swadaya. 220 hlm.
- Anonim. 2010. Serial Data Ilmiah Terkini Tanaman Obat Pegagan *Centella asiatica* (L.). Direktorat Obat Asli Indonesia Badan Pengawas Obat Dan Makanan RI.
- Davis, W. W dan T. R. Stout. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. America Society for Microbiology. **22** (4): 659-665.
- Duguid, J. P., B. P. Marmion dan R. H. A. Swain. 1978. Medical Microbiology. Churchill Livingstone. Edinburgh. 666 hlm.
- Garrity, George. M; Julia A. Bell dan Timothy G. Lilburn. 2004. Taxonomic Outline Of The Prokaryotes Bergey's Manual Of Systematic Bacteriology, Second Edition. Michigan State University. New York. 401 hlm.
- Hamdi, A. S. dan E. Bahrudin. 2014. Metode Penelitian Kuantitatif Aplikasi Dalam Pendidikan. Deepublish. Yogyakarta. 171 hlm.
- Harmita dan M. Radji. 2006. Buku Ajar Analisa Hayati Edisi 3. Penerbit Buku Kedokteran EGC : Jakarta. 41 hlm
- Hugo, W. B. 1971. *Inhibition and Destruction of the Microbial Cell*. Academic Press Inc. New York. 748 hlm.
- Kanto; S. Haryanti dan A. Triyono. 2004. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L) DC.) Terhadap Pertumbuhan Mikroba *E. coli*, *S. aureus* dan *C. albicans*. Jurnal Tanaman Obat Tradisional. **2** (1) : 22 – 36.
- Kartasapoetra, G. 1992. Budidaya Tanaman Berkhasiat Obat. Rineka Cipta, Jakarta. 84 hlm.
- Khairuman dan Khairul Amri. 2004. Budidaya Udang Galah Secara Intensif. Agromedia Pustaka, Jakarta. 90 hlm.
- Khotimah, Husnul; Mulyohadi; Sutiman, B.S dan Widodo, M.A. 2015. *Decreasing a-synuclein aggregation by methanolic extract of Centella asiatica in zebrafish Parkinson's model*. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. **5** (11) : 948 – 954.
- Kratz, Rene Fester. 2005. *Microbiology The Easy Way*. Barron's Educational Series. Hauppauge, New York. 526 hlm.
- Kristina, Natalini Nova; Edy, D.K dan Putrl, K.L. 2009. Analisa Fitokimia dan Penampilan Polapita Protein Tanaman Pegagan (*Centella asiatica*) Hasil Konservasi *In vitro*. Bull. Littro. **20** (1): 11-20.

- Kusmiyati dan Ni Wayan Sri Agustini. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. **8**(1): 48-53.
- Mania, S. 2008. Observasi Sebagai Alat Evaluasi Dalam Dunia Pendidikan Dan Pengajaran. *Lentera Pendidikan*. **11** (2): 220-233.
- Musyarofah, N., S. Susanto, S.A. Azis dan S. Kartosoewarno. 2007. Respon Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) Terhadap Pemberian Pupuk Alami di Bawah Naungan. *Bul. Agron*. **35** (2) : 217 – 224.
- Nasi, Lina; Slamet Budi Prayitno dan Sarjito. 2013. Kajian Bakteri Penyebab Vibriosis Pada Udang Secara Biomolekuler. Universitas Diponegoro, Semarang. *Jurnal Biomolekuler*. **8**(4): 1-22.
- Notoatmodjo, S. 2010. Metodologi Penelitian Kesehatan. Rineka Cipta. Jakarta. 243 hlm.
- Noviana, L. 2004. Identifikasi Senyawa Flavonoid Dari Propolis Lebah Madu (*Apis mellifera*) dan Uji Aktivitasnya Sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus*. Skripsi. Fakultas Matematika dan IPA Universitas Brawijaya : Malang. 61 hlm.
- Pelczar, M. J dan E. C. S. Chan. 1986. Dasar - Dasar Mikrobiologi I. UI Press : Jakarta. 443 hlm.
- Prajitno, A. 2005a. Diktat Parasit dan Penyakit Ikan. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya, Malang. 103 hlm.
- _____. 2007b. Penyakit Ikan – Udang: Bakteri. UM Press : Malang. 113 hlm.
- Pratita, M. Y. E. dan S. R. Putra. 2012. Isolasi Dan Identifikasi Bakteri Termofilik Dari Sumber Mata Air Panas Di Songgoriti Setelah Dua Hari Inkubasi. *Jurnal Teknik Pomits*. **1** (1): 1-5.
- Rajab, W. 2008. Buku Ajar Epidemiologi Untuk Mahasiswa Kebidanan. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 163 hlm.
- Ramadhan, Nelvita Sari; Roslaili Rasyid dan Elmatris Sy. 2015. Daya Hambat Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) yang Diambil di Batusangkar terhadap Pertumbuhan Kuman *Vibrio cholerae* secara *In Vitro*. *Jurnal Kesehatan Andalas*. **4**(1): 202-206.
- Rasy, Viksan. 2013. 30 Tanaman Herbal Untuk Pengobatan Tradisional. Penerbit Sakti, Yogyakarta. 160 hlm.
- Rijayanti, Rika P. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Manggan Bacang (*Mangifera foetida* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Kedokteran*. **5** (2): 156-160.
- Rinawati, Nanin Dwi. 2012. Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete* L.) Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*. Institut Teknologi Sepuluh Nopember, Surabaya. *Jurnal Biologi*. **12**(3): 1-13.

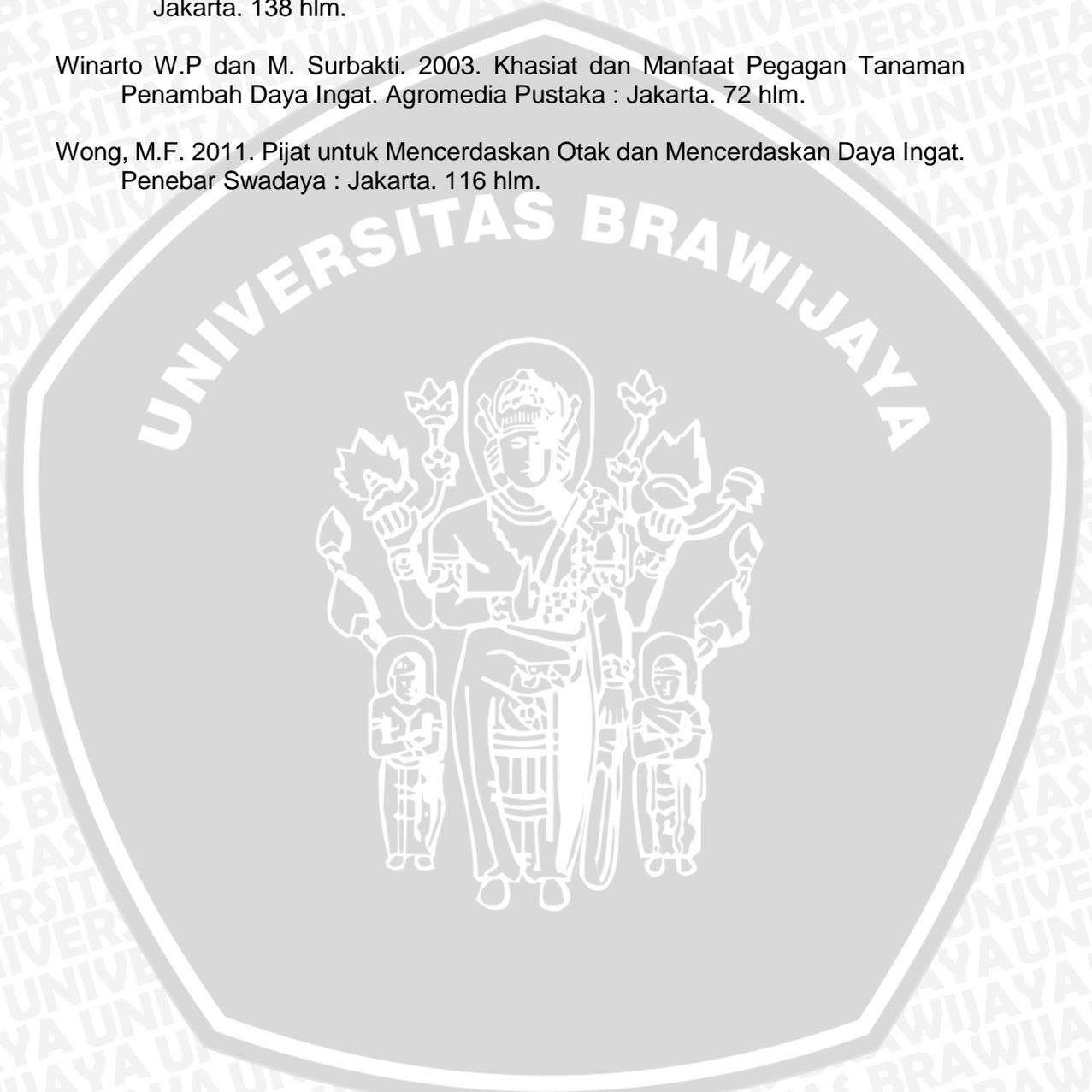
- Risman, E; S. Kusumaningrum, I; Rosidah; Nizar dan E. Yulianti. 2013. Pengujian Stabilitas Sediaan Antiacne Berbahan Baku Aktif Nanopartikel Kitosan/ Ekstrak Manggis – Pegagan. *Bul. Penelit. Kesehat.* 41 (4) : 207 – 216.
- Rizka, Andi. 2013. Skrining Bakteri Symbion Spons Asal Perairan Pulau Polewali Dan Pulau Sarapollompo Sebagai Penghasil Antibakteri Terhadap Bakteri Patogen Pada Manusia Dan Ikan. Penelitian Ilmiah. Universitas Hasanuddin, Makassar.
- Rohyani, Immy Suci; Evy Aryanti dan Suropto. 2015. Kandungan fitokimia beberapa jenis tumbuhan lokal yang sering dimanfaatkan sebagai bahan baku obat di Pulau Lombok. *PROS SEM NAS MASY BIODIV INDON.* 1 (2):388-391.
- Roihanah S; Sukoso dan Andayani S. 2011. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria sp.* Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In vitro*. *J. Exp. Life Sci.* 1(2): 95-99.
- Sa'adah, S. 2007. Mengenal Tanaman yang Berkhasiat Obat. Azka Pres : Jakarta. 91 hlm.
- Saptiani, Gina; Slamet Budi Prayitno dan Sutrisno Anggoro. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap Pertumbuhan *Vibrio harveyi* Secara *in vitro*. *Jurnal Veteriner.* 13 (3): 257-262.
- Sarida, Munti; Tarsim dan Iwan Faizal. 2010. Pengaruh Ekstrak Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In vitro*. *Jurnal Penelitian Sains.* 13(3): 59-63.
- Suginta, Wipa; Duangkamon Chuenark; Mamiko Mizuhara dan Tamo Fukamizo. 2010. *Novel b-N-acetylglucosaminidases from Vibrio harveyi 650: Cloning, expression, enzymatic properties, and subsite identification.* *BMC Biochemistry:* 11-40.
- Sugito, Yogi. 2009. Metode Penelitian Metode Percobaan dan Penulisan Karya Ilmiah. UB Press, Malang. 175 hlm.
- Sumantriyadi. 2014. Pemanfaatan Sumberdaya Perairan Rawa Lebak Untuk Perikanan. *Jurnal Ilmu-ilmu Perikanan dan Budidaya Perairan.* 9(1): 59-65.
- Suyanto, Rachmatun, S dan Ahmad Mujiman. 2003. Budidaya Udang Windu. Penebar Swadaya, Depok. 207 hlm.
- Tjay, Tan Hoan dan Kirana Rahardja. 2007. Obat-obat penting Khasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya. Elex Media Komputindo Gramedia, Jakarta. 915 hlm.
- Trianto, Agus; Edi Wibowo; Suryono dan Rahayu Sapta. 2004. Ekstrak Daun Mangrove *Aegiceras corniculatum* Sebagai Antibakteri *Vibrio harveyi* dan *Vibrio parahaemolyticus*. *Jurnal Ilmu Kelautan.* 9(4): 186-189.

Vipra,Aradhana; Srividya Narayanamurthy Desai; Raghu Patil Junjappa; Panchali Roy; Nethravathi Poonacha; Pallavi Ravinder; Bharathi Sriram dan Sriram Padmanabhan. 2013. *Determining the Minimum Inhibitory Concentration of Bacteriophages: Potential Advantage*. Advances in Microbiology journal. 181-190.

Vredenburg, Jacob. 1983. *Metode dan Teknik Penelitian Masyarakat*. Gramedia, Jakarta. 138 hlm.

Winarto W.P dan M. Surbakti. 2003. *Khasiat dan Manfaat Pegagan Tanaman Penambah Daya Ingat*. Agromedia Pustaka : Jakarta. 72 hlm.

Wong, M.F. 2011. *Pijat untuk Mencerdaskan Otak dan Mencerdaskan Daya Ingat*. Penebar Swadaya : Jakarta. 116 hlm.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian



Cawan Petri



Autoclave



Inkubator



Oven



Autoclave Destruksi



Rak Tabung



Lemari Pendingin Penyimpanan Bakteri



Lemari Pendingin Penyimpanan Bahan



Timbangan Analitik



Timbangan Digital



Laminary Air Flow



Hot Plate

Lampiran 1. (Lanjutan)



Vortex Mixer



Micropipet dan Blue tip



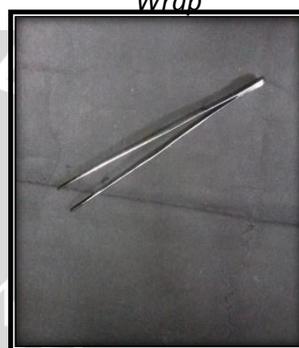
Aluminium Foil dan Plastik Wrap



Bunsen dan Korek Api



Erlenmeyer



Pinset



Corong Kaca



Pipet Volume dan Bola Hisap



Rotary Evaporator



Botol film



Gelas Ukur



Toples Kaca

Lampiran 1. (Lanjutan)



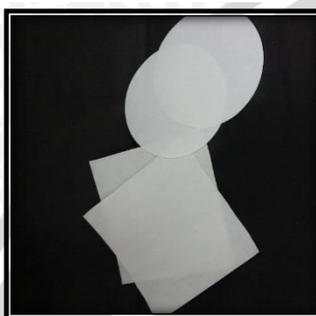
Nampan



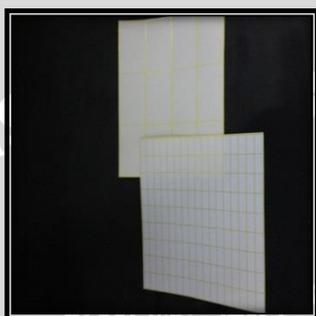
Botol Sprayer



Gunting dan Cutter



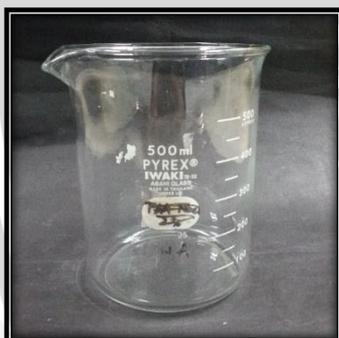
Kertas Saring



Kertas Label



Benang Kasur



Beaker Glass



Sendok Media



Spatula



Triangle



Tabung Reaksi



Jangka Sorong Digital

Lampiran 1. (Lanjutan)



Kapas



Tissue



Alkohol 70% dan Ethanol 96%



DMSO 10%



Kertas Cakram Diameter 6 mm



Aquades Hydrobatt



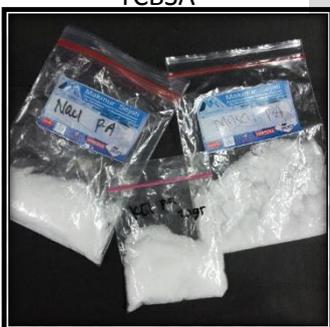
TCBSA



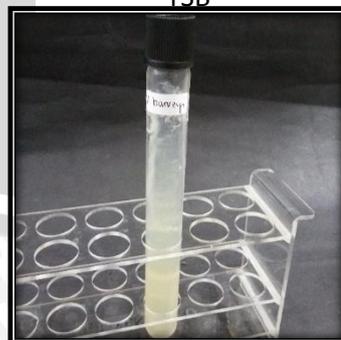
TSB



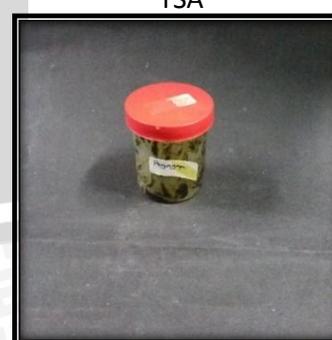
TSA



NaCl, KCl dan MgSo4



Isolat Murni Bakteri *V. harvey*



Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*)

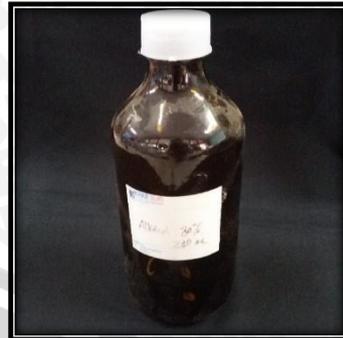
Lampiran 1. (Lanjutan)



Kristal violet



Iodin 5%



Alkohol 80%



Safranin



Pipet Tetes



Mikroskop



Lampiran 2. Pembuatan Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*)



Disiapkan tanaman pegagan



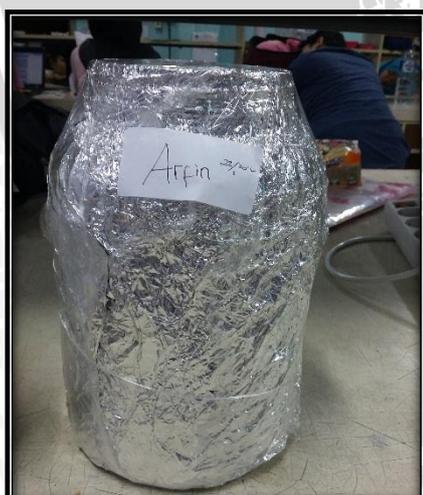
Dijemur hingga kering



Diberi Ethanol 90%



Dihaluskan pegagan hingga menjadi bubuk



Dilakukan maserasi selama 3 X 24 jam



Disaring hasil maserasi



Lampiran 2. (Lanjutan)



Dilakukan evaporasi



Dihasilkan ekstrak pegagan
(*C. asiatica*)



Lampiran 3. Analisis Data Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*) terhadap Diameter Hambatan (mm) Bakteri *V. harveyi* Secara *In Vitro*

- Data Rata-rata Diameter Hambatan (mm) Bakteri *V. harveyi*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (50 ppm)	2,06	2,08	1,97	6,11	2,04
B (100 ppm)	2,43	2,55	2,69	7,67	2,56
C (150 ppm)	3,06	3	3,07	9,13	3,04
D (200 ppm)	3,34	3,51	3,63	10,48	3,49
E (250 ppm)	3,99	4,15	4,08	12,22	4,07
Total				45,61	

Perhitungan:

1.) JK:

FK	138,6848
JK TOTAL	7,6397
JK PERLAKUAN	7,54076
JK ACAK	0,0989

$$\begin{aligned} \text{a. Faktor Koreksi (FK)} &= \frac{G^2}{N} \\ &= \frac{45,61^2}{15} \\ &= 138,68 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{b. Jumlah Kuadrat (Total)} &= \sum x_{ij}^2 - FK \\ &= (A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + E3^2) - FK \\ &= (2,06^2 + 2,08^2 + 1,97^2 + \dots + 4,08^2) - FK \\ &= 7,46 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{c. Jumlah Kuadrat} & \\ \text{(Perlakuan)} &= \frac{\sum (\sum X_i)^2}{r} - FK \\ &= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2}{r} - FK \\ &= \frac{6,11^2 + 7,67^2 + 9,13^2 + 10,48^2 + 12,22^2}{3} - 138,68 \\ &= \frac{37,33 + 58,83 + 83,36 + 109,83 + 149,33}{3} - 138,68 \\ &= 7,55 \end{aligned}$$

Lampiran 3. (Lanjutan)

$$\begin{aligned} \text{d. JK galat} &= \text{JK Perlakuan} - \text{JK Total} \\ &= 7,46 - 7,55 \\ &= 0,09 \end{aligned}$$

- e. db Total = $(n \times r) - 1$
 = $(5 \times 3) - 1$
 = 14
- f. db Perlakuan = $n - 1$
 = $5 - 1$
 = 4
- g. db Galat = db Total – db Perlakuan
 = $14 - 4$
 = 10

2.) Tabel Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
		7,5407				
Perlakuan	4	6	1,88519 0,00989	190,5515	3,48	5,99
Acak	10	0,0989	3	**		
Total	14					

Keterangan : ** Berbeda Sangat Nyata

Karena F hitung lebih besar dari F tabel maka diperoleh hasil berbeda sangat nyata. Sehingga dilanjutkan uji BNT

- Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

$$SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{\pi (\text{Ulangan})}} = \sqrt{\frac{2 \times (0,009)}{3}} = 0,08$$

$$\text{BNT 5\%} = T \text{ tabel 5\% (db acak)} \times SED = 0,18$$

$$\text{BNT 1\%} = T \text{ tabel 1\% (db acak)} \times SED = 0,25$$

- Tabel Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		2,04	2,56	3,04	3,49	4,07	
A	2,04	–					a
B	2,56	0,52**	–				b
C	3,04	1,01**	0,49**	–			c
D	3,49	1,46**	0,94**	0,45**	–		d
E	4,07	2,04**	1,52**	1,03**	0,58**	–	e

Keterangan :

- (ns) non signifikan
- (*) Berbeda nyata
- (**) Berbeda sangat nyata

Lampiran 3. (Lanjutan)

Urutan perlakuan terbaik dari uji BNT adalah E – D – C – B – A.
Selanjutnya dilakukan uji polinomial orthogonal

- Tabel Uji Polinomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	6,11	-2	2	-1	1
B	7,67	-1	-1	2	-4
C	9,13	0	-2	0	6
D	10,48	1	-1	-2	-4
E	12,22	2	2	1	1
Q= $\sum c_i \cdot T_i$		15,03	0,25	0,49	0,51
Hasil Kuadrat		10	14	10	70
Kr= $(\sum c_i^2) \cdot r$		30	42	30	210
JK=Q ² /Kr		7,53003	0,001488	0,008003	0,001239

$$\begin{aligned} \text{JK Regresi} &= 7,53003 + 0,001488 + 0,008003 + 0,001239 \\ &= 7,54076 \end{aligned}$$

- Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	4	7,54076			3,48	5,99
Linier	1	7,53003	7,53003	761,121	**	
Kuadratik	1	0,00148	0,00148	0,15041	ns	
Kubik	1	0,00800	0,00800	0,80896	ns	
Kuartik	1	0,00123	0,00123	0,12519	ns	
2. Acak	10	0,0989	0,00989			
Total	14					

Lampiran 3. (Lanjutan)

Dari hasil sidik ragam terlihat bahwa regresi linier berbeda sangat nyata, berarti regresi yang sesuai untuk kurva respon ini adalah regresi linier.

Mencari persamaan linier $y = b_0 + b_1x$

x	y	Xy	X ²
50	2.06	103	2500
50	2.08	104	2500
50	1.97	98.5	2500
100	2.43	243	10000
100	2.55	255	10000
100	2.69	269	10000
150	3.06	459	22500
150	3.00	450	22500
150	3.07	460.5	22500
200	3.34	668	40000
200	3.51	702	40000
200	3.63	726	40000
250	3.99	997.5	62500
250	4.15	1037.5	62500
250	4.08	1020	62500
Σx = 2250	45.61	7593	412500
Rerata= 150	3.040		

$$\begin{aligned}
 B_1 &= \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y)/n}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \\
 &= \frac{7593 - (2250 \cdot 45.61)/15}{412500 - \frac{(2250)^2}{15}} \\
 &= \frac{7593 - 6841.5}{412500 - 337500} \\
 &= \frac{751.5}{75000} \\
 &= 0,01002
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 B_0 &= \bar{y} - b_1 \bar{x} \\
 &= 3,040 - (0,01002 \cdot 150) \\
 &= 3,040 - 1,503 = 1,537
 \end{aligned}$$

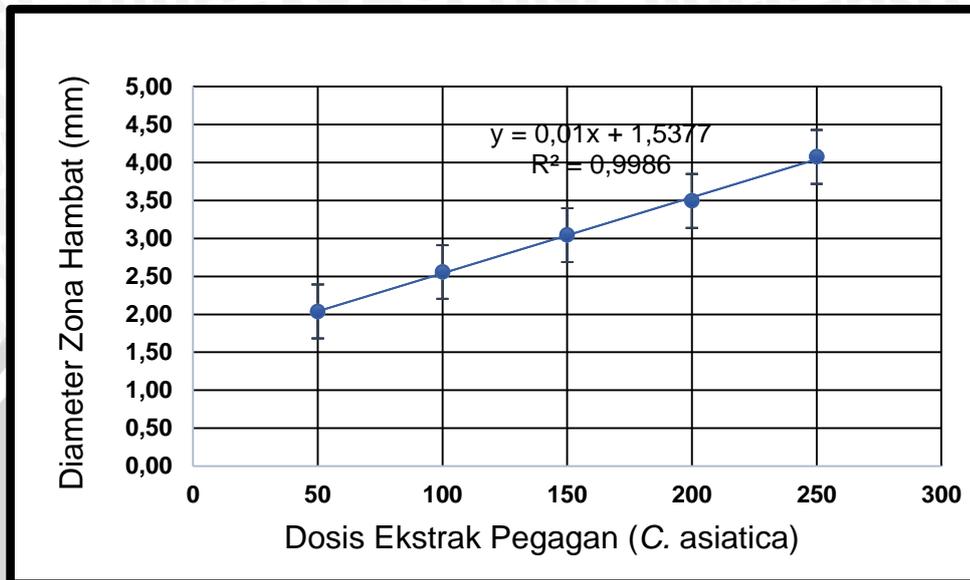
Persamaan linier : $y = b_0 + b_1x$ $y = 1,537 + 0,01002 x$

$$\begin{aligned}
 R^2 &= \frac{JK \text{ regresi}}{JK \text{ total terkorelasi}} \\
 &= \frac{JK \text{ regresi}}{JK \text{ regresi} + JK \text{ acak}} \\
 &= \frac{7,54076}{7,54076 + 0,0989}
 \end{aligned}$$

$$= \frac{7,54076}{7,63966}$$

$$= 0,9986$$

- Grafik Uji Sensitivitas Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. harveyi* Secara *In Vitro*



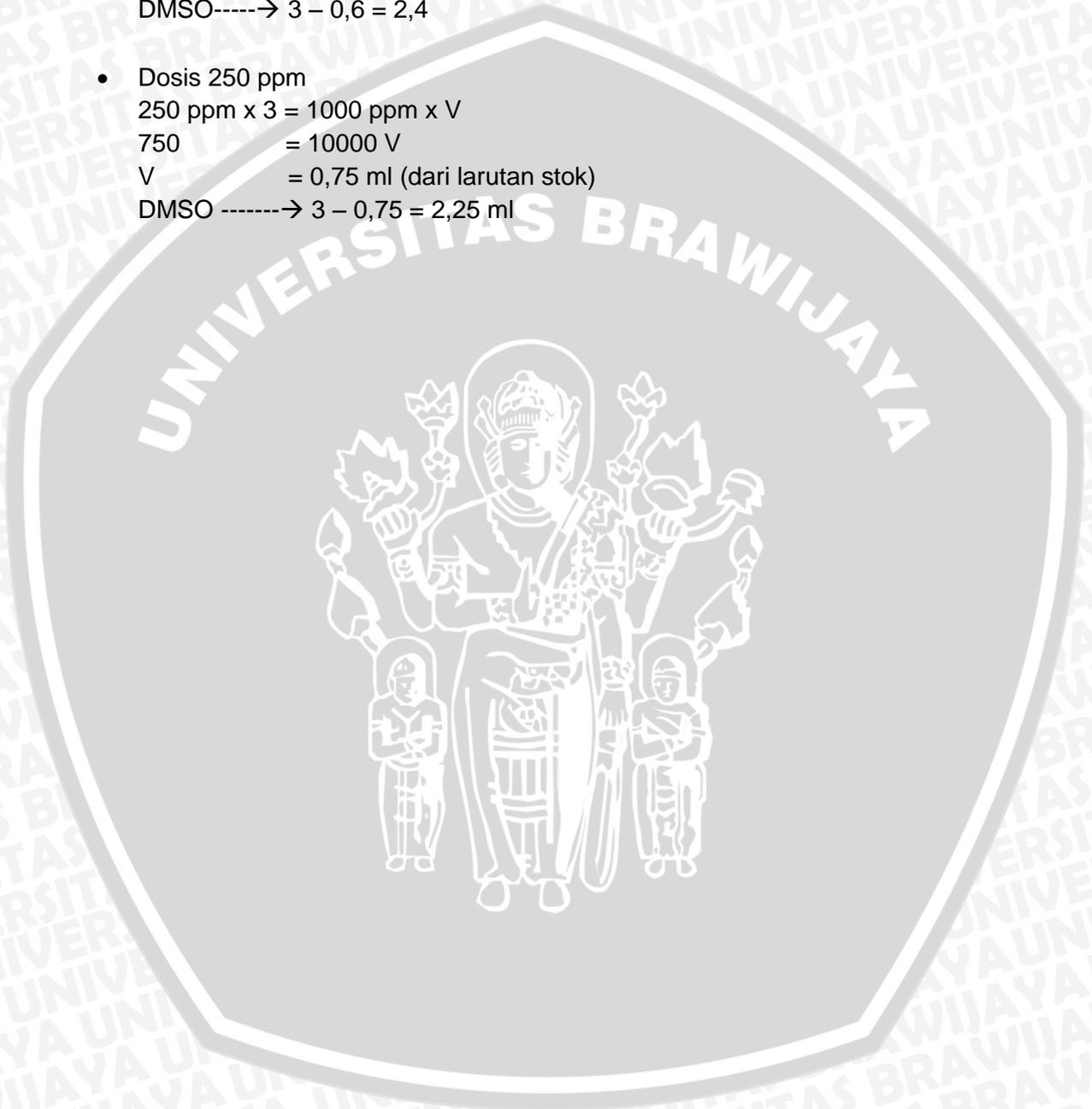
- Pembuatan larutan ekstrak
 Stok : 1000 ppm
 $1000 \text{ ppm} = 1000 \text{ mg}/1000 \text{ ml}$
 $10 \text{ mg}/10 \text{ ml}$
- 10 mg ekstrak pegagan + 10 ml DMSO 10%, dihomogenkan.

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

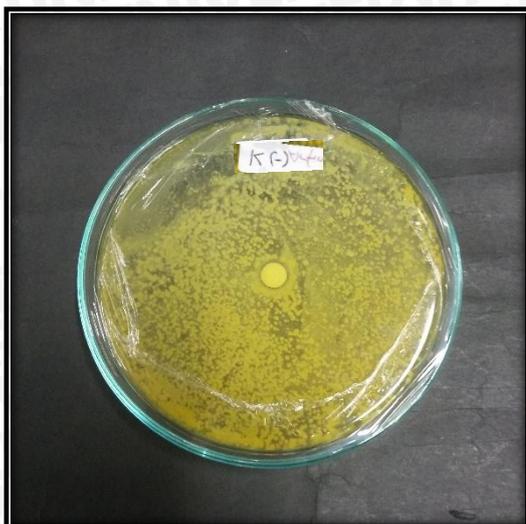
- Dosis 50 ppm:
 $50 \text{ ppm} \times 3 = 1000 \text{ ppm} \times V$
 $150 \text{ ppm} = 1000 V$
 $V = 0,15 \text{ ml}$ (dari larutan stok)
 DMSO ----→ $3 - 0,15 = 2,85 \text{ ml}$
- Dosis 100 ppm:
 $100 \text{ ppm} \times 3 = 1000 \text{ ppm} \times V$
 $300 \text{ ppm} = 1000 V$
 $V = 0,3 \text{ ml}$ (dari larutan stok)
 DMSO -----→ $3 - 0,3 = 2,7 \text{ ml}$
- Dosis 150 ppm:
 $150 \text{ ppm} \times 3 = 1000 \text{ ppm} \times V$
 $450 \text{ ppm} = 1000 \text{ ppm} \times V$

$V = 0,45 \text{ ml}$ (dari larutan stok)
DMSO ----- $\rightarrow 3 - 0,45 = 2,55 \text{ ml}$

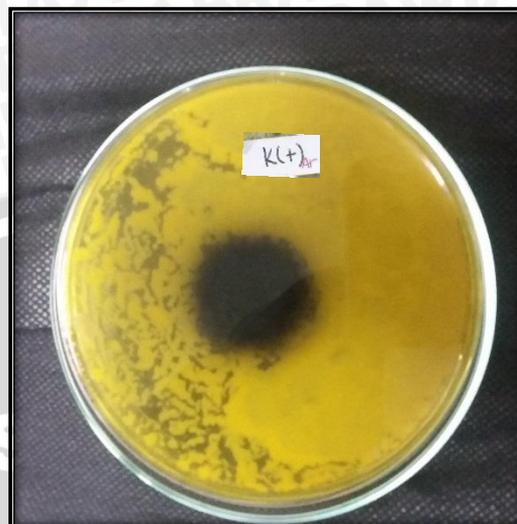
- Dosis 200 ppm
 $200 \text{ ppm} \times 3 = 1000 \text{ ppm} \times V$
 $600 = 1000 V$
 $V = 0,6$
DMSO----- $\rightarrow 3 - 0,6 = 2,4$
- Dosis 250 ppm
 $250 \text{ ppm} \times 3 = 1000 \text{ ppm} \times V$
 $750 = 1000 V$
 $V = 0,75 \text{ ml}$ (dari larutan stok)
DMSO ----- $\rightarrow 3 - 0,75 = 2,25 \text{ ml}$



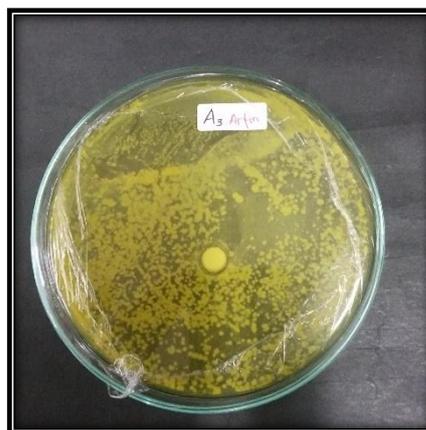
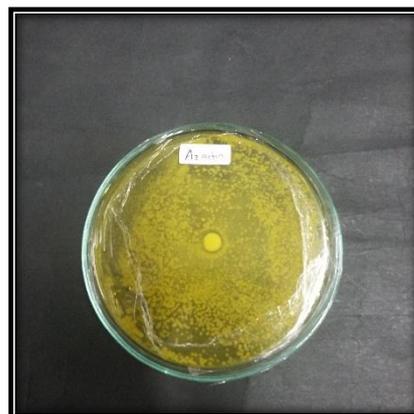
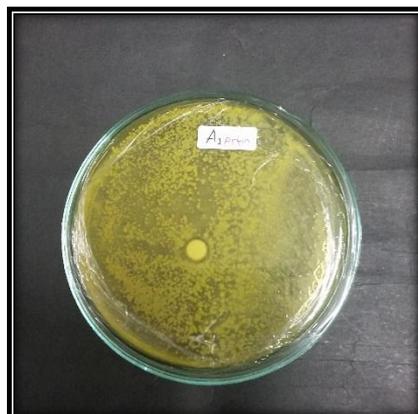
Lampiran 4. Hasil Uji Cakram Pengaruh Pemberian Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. harveyi*



Perlakuan K (-)

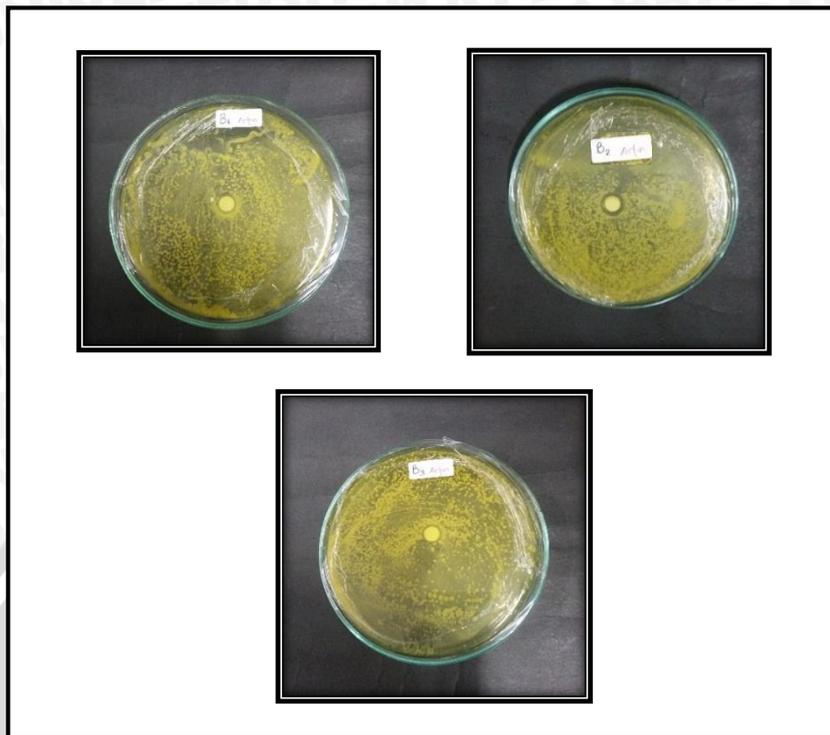


Perlakuan K (+) 100%

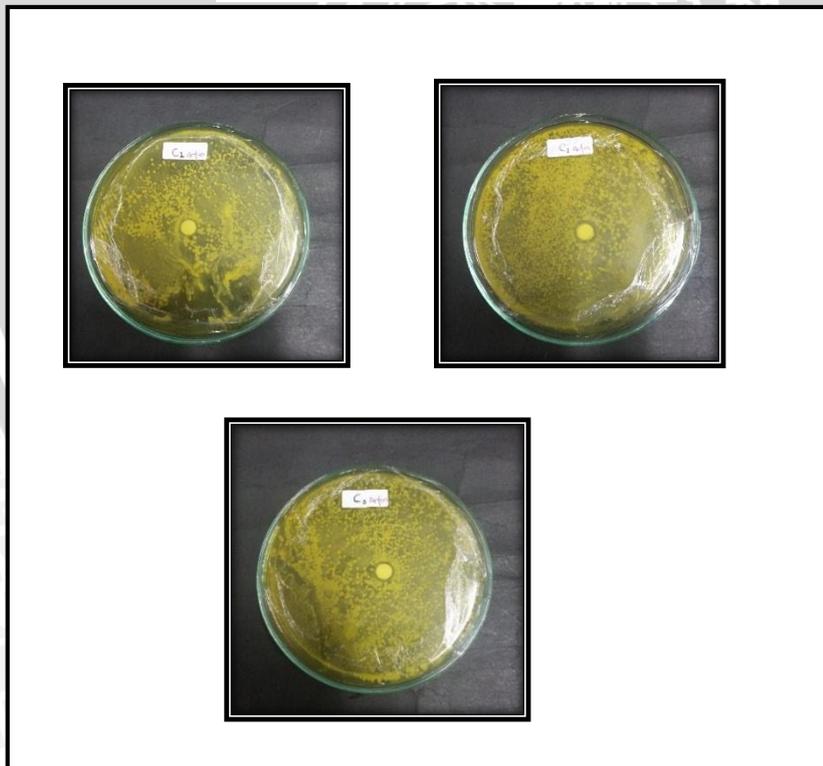


Perlakuan A1, A2, A3 (50 ppm)

Lampiran 4. (Lanjutan)

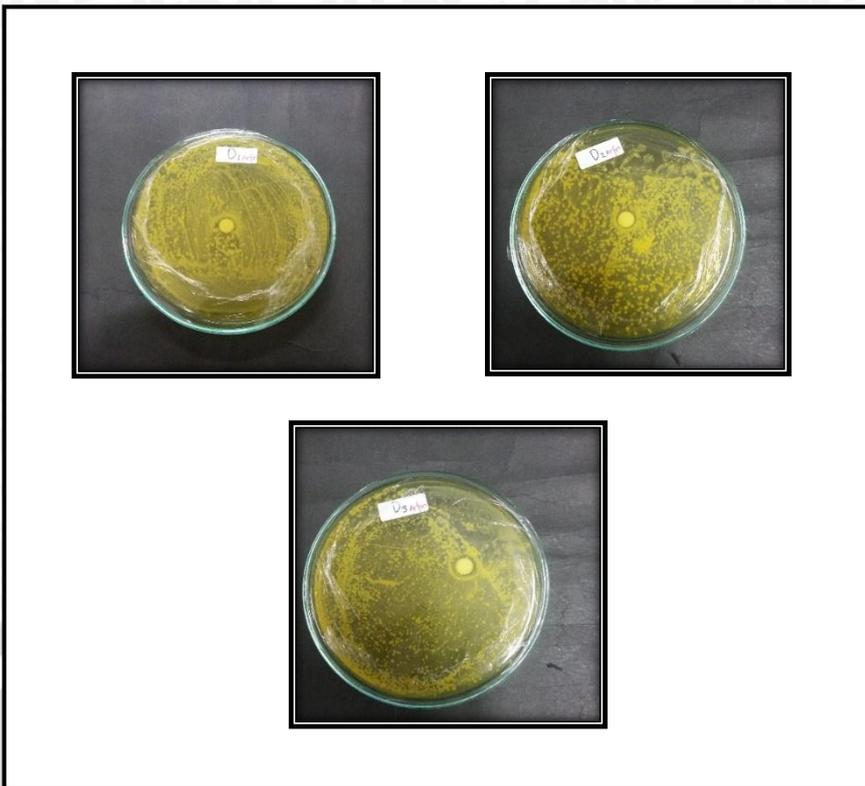


Perlakuan B1, B2, B3 (100 ppm)

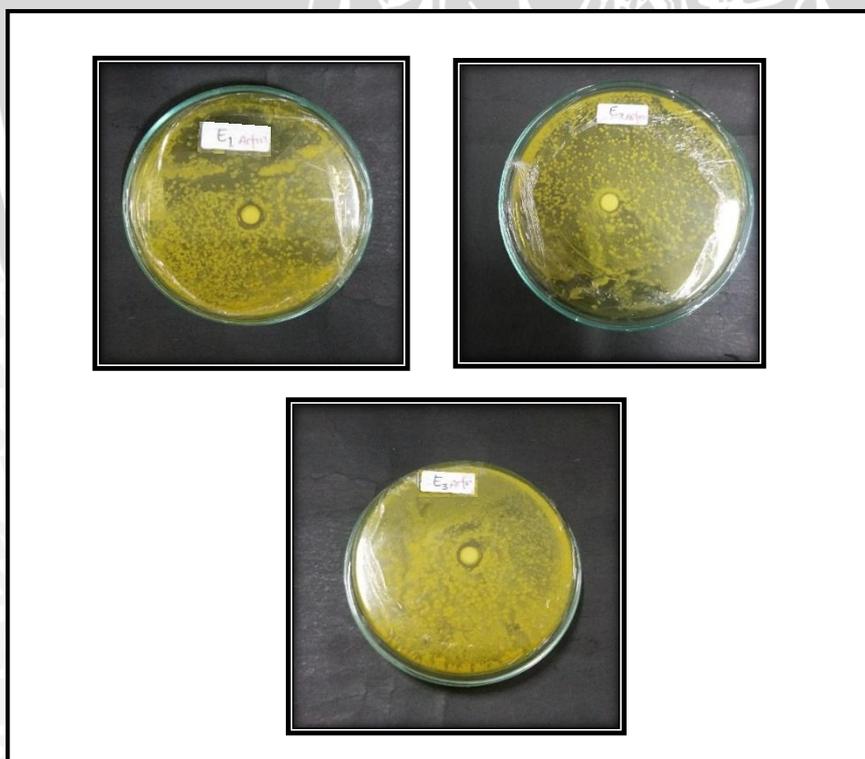


Perlakuan C1, C2, C3 (150 ppm)

Lampiran 4. (Lanjutan)



Perlakuan D1, D2, D3 (200 ppm)



Perlakuan E1, E2, E3 (250 ppm)

Lampiran 5. Hasil Uji Biokimia Bakteri *V. harveyi*

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

Alamat surat: PO Box 1 Jepara, Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418
Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724
Email : bbbapjpr@rad.net.id Website : udang-bbbap.com

LAPORAN HASIL UJI

Hal : Uji biokimia Identifikasi Bakteri
Asal : Lab. Mikrobiologi
Alamat : BBAPAP Jepara
Metode : Cowan and stell's, Manual for Identification of medical bacteria
Hasil

Uji Bio Kimia	<i>Vibrio harveyi</i>
TCBS	+
Bentuk	batang
Cat Gram	—
Swaming	—
Growth with 0% NaCl	—
Arginine decarboxilase	—
Lysine decarboxilase	+
Ornithine decarboxilase	+
Nitrat reduced	+
Oxidase	+
Gas from Glucose	—
Indol	+
ONPG	—
VP	—
Resisten to :	
0/129 10 µg	+
0/129 150 µg	—
ampicillin 10 µg	+
Starch Hydrolysis	+
Urea Hydrolysis	+
Acid from :	
L-arabinose	—
Arbutin	—
Salicin	+
Sucrose	+
Xylose	—
Growth on :	
Ethanol	—
Propanol	—

Lab. Mikrobiologi BBPAP Jepara



Lampiran 6. Hasil Rata – rata Zona Hambat

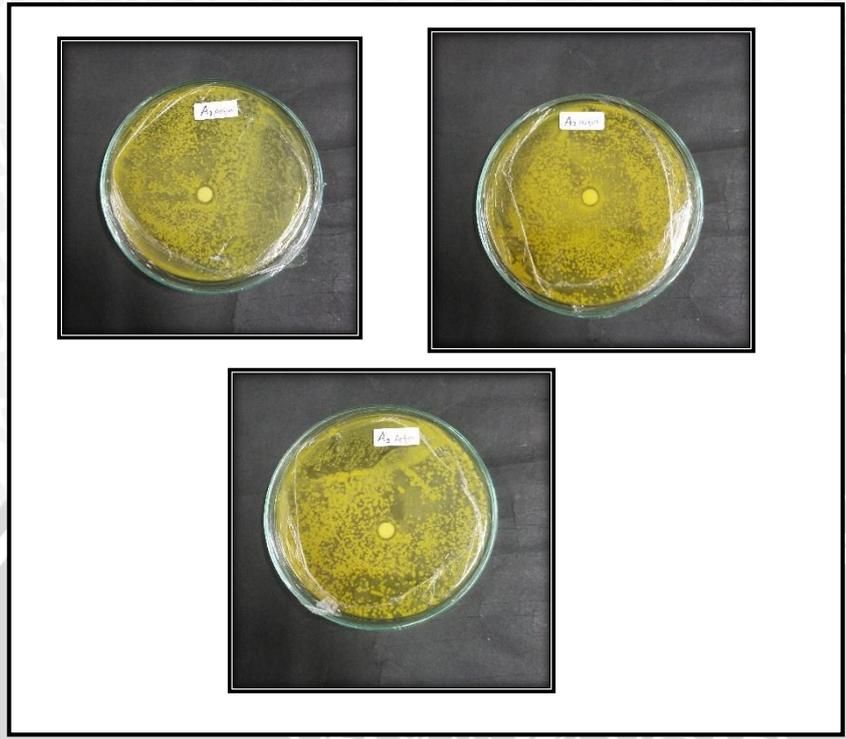
24 jam

Perlakuan (ppm)	Ulangan (mm)			Total	Rerata (mm)
	1	2	3		
A (50)	2,06	2,08	1,97	6,11	2,04
B (100)	2,43	2,55	2,69	7,67	2,56
C (150)	3,06	3	3,07	9,13	3,04
D (200)	3,34	3,51	3,63	10,48	3,49
E (250)	3,99	4,15	4,08	12,22	4,07
				45,61	

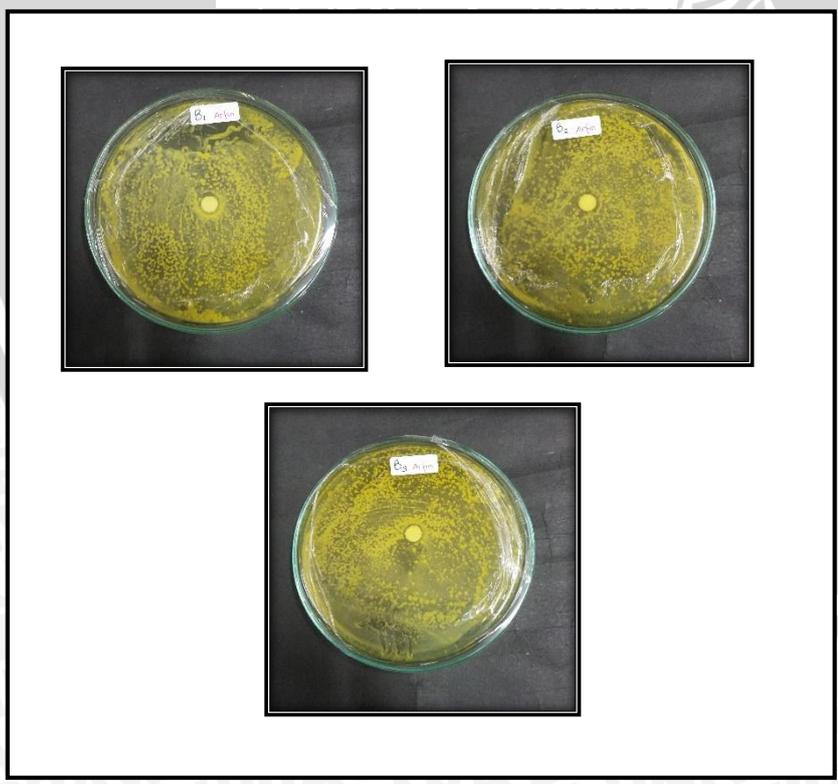
48 jam

Perlakuan (ppm)	Ulangan (mm)			Total	Rerata (mm)
	1	2	3		
A (50)	1,56	1,66	2,64	5,86	1,95
B (100)	2,2	2,27	2,41	6,88	2,29
C (150)	1,9	3,14	1,92	6,96	2,32
D (200)	2,31	2,38	2,84	7,53	2,51
E (250)	1,6	1,49	1,84	4,93	1,64
				32,16	

Lampiran 7. Hasil Uji Cakram Pada 48 jam



Perlakuan A1, A2, A3 (50 ppm)



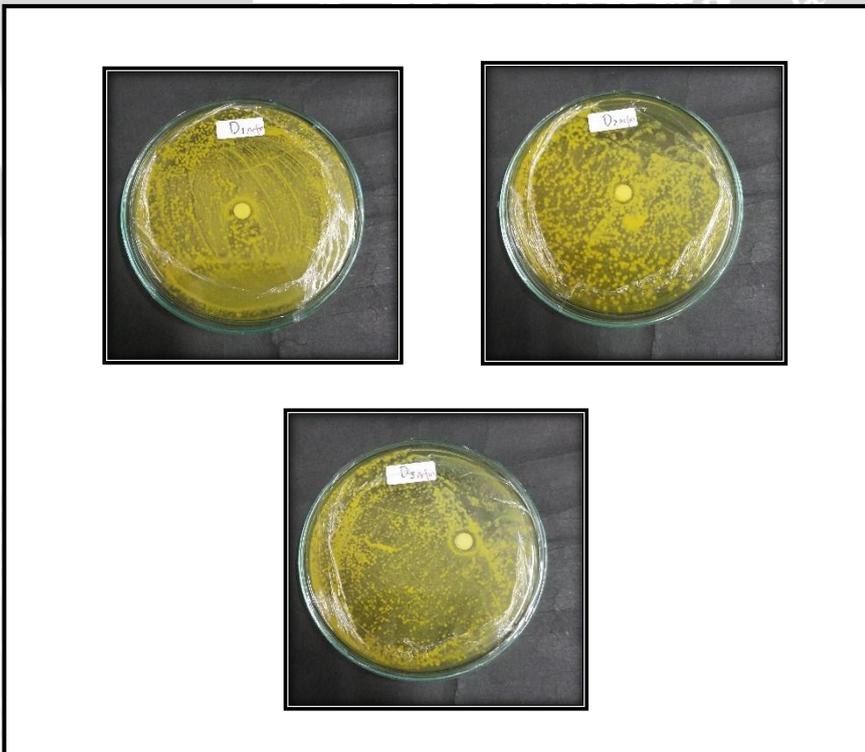
Perlakuan B1, B2, B3 (100 ppm)



Lampiran 7. (Lanjutan)

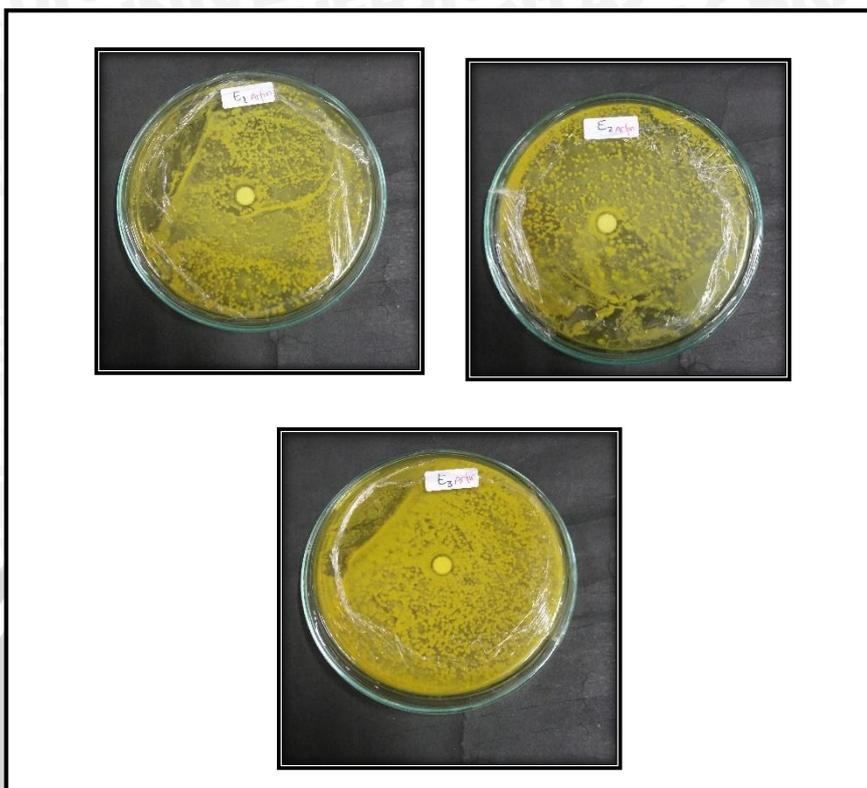


Perlakuan C1, C2, C3 (150 ppm)



Perlakuan D1, D2, D3 (200 ppm)

Lampiran 7. (Lanjutan)



Perlakuan E1, E2, E3 (250 ppm)

