

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK KASAR DAUN KATUK
(*Sauropus androgynus*) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI
Aeromonas hydrophila SECARA *IN VITRO***

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

Oleh :

INTAN PERMATASARI

NIM. 125080500111025



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK KASAR DAUN KATUK
(*Sauropus androgynus*) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI
Aeromonas hydrophila SECARA *IN VITRO***

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

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

Oleh :

INTAN PERMATASARI

NIM. 125080500111025



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK KASAR DAUN KATUK
(*Sauropus androgynous*) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI
Aeromonas hydrophila SECARA IN VITRO

Oleh :
INTAN PERMATASARI
NIM. 125080500111025

Telah dipertahankan di depan penguji
Pada tanggal 13 Mei 2016
Dan dinyatakan memenuhi syarat

Dosen Penguji I

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

02 JUN 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

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

02 JUN 2016

Dosen Penguji II

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

02 JUN 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing II

(Ir. Ellana Sanoesi, MP)
NIP. 19630924 199803 2 002
Tanggal :

02 JUN 2016

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP



(Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS)
NIP. 19620805 198803 2 001
Tanggal :

02 JUN 2016

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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

Malang, Mei 2016

Mahasiswa,

Intan Permatasari



UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyadari bahwa penulisan ini tidak terlepas dari dukungan moril dan materil dari semua pihak. Melalui kesempatan ini, dengan kerendahan hati perkenankan penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar – besarnya kepada :

- Allah SWT yang telah meridhoi dan memberi kelancaran dalam penyusunan laporan ini.
- Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, M.S selaku dosen pembimbing I yang telah banyak memberikan saran, bimbingan, arahan dan nasehat bagi penulis.
- Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku dosen pembimbing II yang telah banyak memberikan saran, bimbingan, nasehat dan dukungan kepada penulis.
- Dr. Ir. M.Fadjar, M.Sc selaku dosen penguji I yang telah banyak memberikan saran dan dukungan kepada penulis.
- M. Fakhri, S.Pi, MP, M.Sc selaku dosen penguji II yang telah memberikan saran dan dukungan kepada penulis.
- Kedua orang tua yang senantiasa memberikan do'a, dukungan dan motivasi serta adikku tersayang yang selalu memberikan semangat tiada henti.
- Seluruh rekan – rekan tim skripsweet yang telah banyak membantu penulis dan selalu memberikan dukungan dan motivasi
- Teman – teman dari AQUASEAN yang telah membantu dan memberi dukungan dalam penyelesaian laporan skripsi ini

Malang, Mei 2016

Penulis,

RINGKASAN

Intan Permatasari. Uji Efektifitas Ekstrak Kasar Daun Katuk (*S. androgynus*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.** dan **Ir. Ellana Sanoesi, MP**

Budidaya merupakan salah satu upaya yang dapat digunakan untuk meningkatkan produksi dan nilai produk perikanan, terutama jenis – jenis biota yang memiliki nilai ekonomis penting. Salah satu kendala dalam kegiatan perikanan adalah timbulnya penyakit. Penyakit dapat menimbulkan kematian pada ikan budidaya yang menyebabkan kerugian besar pada kegiatan budidaya. Bakteri *A. hydrophila* merupakan jenis bakteri yang sangat berbahaya bagi ikan. Infeksi dari bakteri ini mampu menimbulkan wabah penyakit dengan tingkat kematian 80 – 100% dalam waktu yang singkat. Penggunaan antibiotik serta obat-obat kimia untuk mengatasi hal tersebut dapat bersifat resisten terhadap bakteri serta dapat membahayakan lingkungan perairan. Oleh karena itu diperlukan suatu bahan alami sebagai pengganti antibiotik yang lebih aman bagi lingkungan perairan yaitu dengan menggunakan ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) yang mengandung senyawa flavonoid dan fenol yang merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada tanggal 21 Januari sampai tanggal 5 Maret 2016. Tujuan penelitian ini adalah untuk menjelaskan efektifitas pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) terhadap daya hambat dari bakteri *A. hydrophila* secara *In Vitro*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental yaitu dengan menguji hubungan suatu sebab (*cause*) dengan akibat (*effect*) 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 kasar daun katuk (*S. androgynus*) yaitu :dosis (A) 9,26 ppt, dosis (B) 18,52 ppt, dosis (C) 27,77 ppt, dosis (D) 37,03 ppt dan dosis (E) 46,29 ppt. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali.

Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun katuk memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan rata-rata diameter daya hambat berkisar antara 4,98 mm sampai 11,27 mm. Hubungan antara perbedaan dosis ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) terhadap diameter daya hambat bakteri *A. hydrophila* menghasilkan hubungan atau grafik secara linear, dimana persamaannya didapatkan $y = 2,635 + 0,176x$ dengan nilai koefisien determinasi $R^2 = 0,801$.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini bahwa hasil uji efektifitas antibakterial dengan menggunakan uji cakram menunjukkan perbedaan dosis ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan dosis optimal yaitu pada dosis ekstrak kasar daun katuk sebesar 27,77 ppt.

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji dan syukur ke hadirat Allah SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, penulis dapat menyajikan Skripsi yang berjudul Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Daun Katuk (*S. androgynus*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila* Secara *In Vitro*. Skripsi ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan - Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari dalam penulisan laporan ini masih terdapat kekurangan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik yang bersifat membangun demi kesempurnaan laporan ini.



Malang, Mei 2016

Mahasiswa,

Intan Permatasari

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iii
UCAPAN TERIMA KASIH	iv
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR	ix
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR LAMPIRAN	xi
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Hipotesis	5
1.5 Tempat dan Waktu	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Biologi Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	7
2.1.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan	8
2.2 Tumbuhan daun Katuk (<i>Sauropus androgynus</i>)	9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	9
2.2.2 Habitat dan Penyebaran daun katuk	10
2.2.3. Bahan aktif daun katuk (<i>S.androgynus</i>)	11
2.3 Aktivitas mikroba	11
2.4 Uji Efektivitas Antibakteri Secara <i>In Vitro</i> dengan Uji Cakram.....	14
3. METODE PELAKSANAAN	15
3.1 Materi Penelitian.....	15
3.1.1 Alat Peneitian	15
3.1.2 Bahan Penelitian	16
3.2 Metode Penelitian.....	17
3.3 Rancangan Penelitian	17
3.4 Prosedur Penelitian	19
3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	19
3.4.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan	21
3.4.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Katuk.....	21
3.4.4 Pembuatan Media	22
3.4.4.1 TSA (<i>Tryptone Soya Agar</i>)	22
3.4.4.2 TSB (<i>Tryptone Soy Broth</i>)	23

3.4.5 Pembiakan Bakteri <i>A. hydrophila</i>	23
3.5 Pelaksanaan Penelitian.....	25
3.5.1 Penentuan Dosis Ekstrak kasar Daun Katuk (<i>S. androgynus</i>).....	25
3.5.2 Pelaksanaan Penelitian Uji Cakram (<i>In vitro</i>).....	26
3.6 Parameter Uji.....	28
3.7 Analisa Data.....	28
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	29
4.1 Identifikasi Bakteri <i>A. hydrophila</i>	29
4.2 Daya Hambat Anti Bakterial Ekstrak Kasar Daun Katuk (<i>S. androgynus</i>) dengan Uji Cakram (<i>In Vitro</i>).....	30
4.3 Hasil dari Parameter Penunjang	39
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	41
5.1 Kesimpulan	41
5.2 Saran	41
DAFTAR PUSTAKA.....	42
LAMPIRAN.....	46



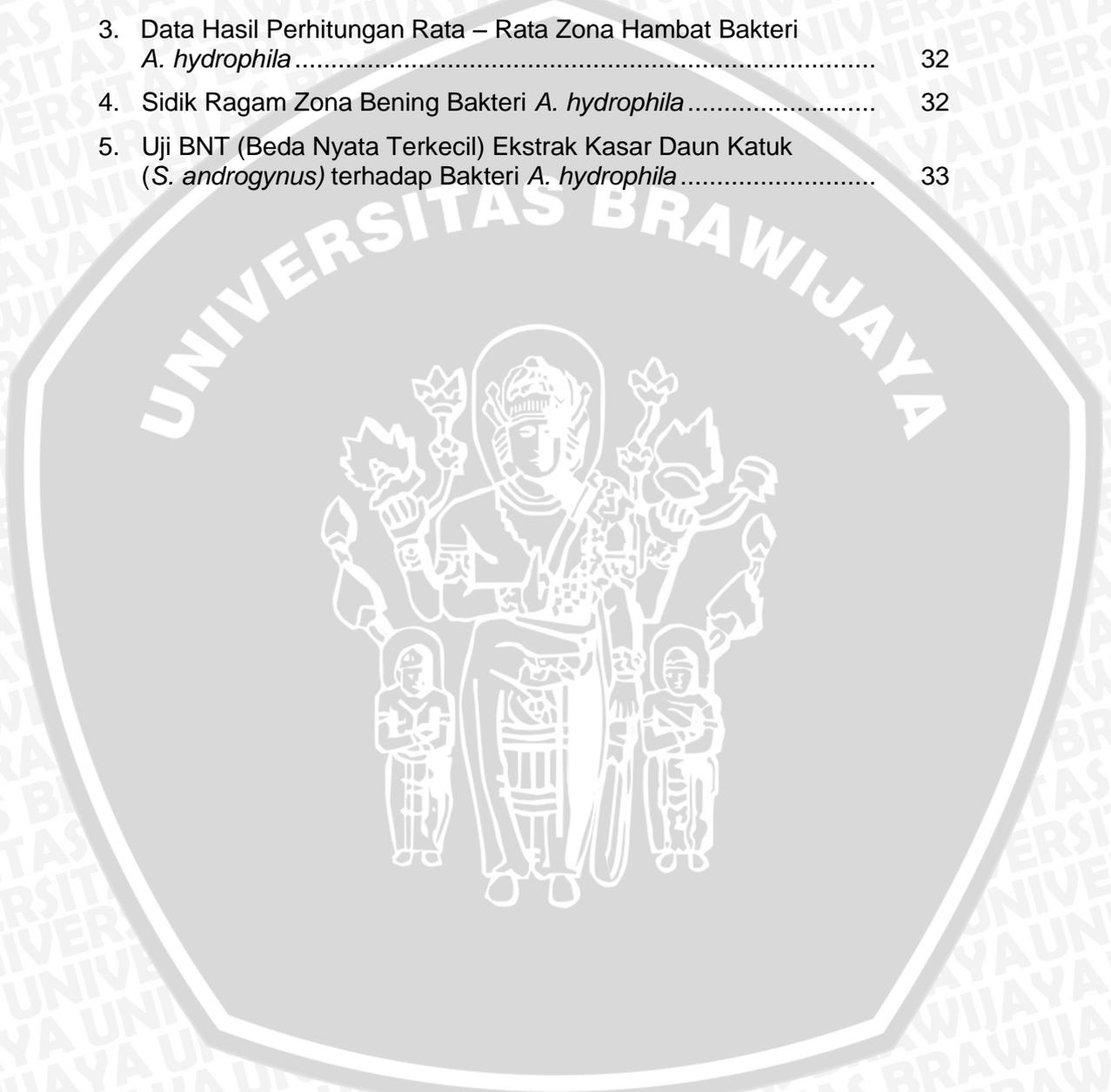
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>A. hydrophila</i> Perbesaran 1000x	6
2. Tanaman Katuk (<i>S. androgynus</i>).....	9
3. Denah Penelitian Uji Cakram	19
4. Bakteri <i>A. hydrophila</i>	29
5. Hasil Uji Daya Hambat Bakteri <i>A. hydrophila</i> setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Katuk (<i>S. androgynus</i>)	31
6. Grafik Hubungan Pengaruh Dosis Ekstrak Kasar Daun Katuk (<i>S. androgynus</i>) terhadap Diameter Zona Hambat Bakteri <i>A. hydrophila</i>	34
7. Kerangka C ₆ -C ₃ -C ₆ Flavonoid	36



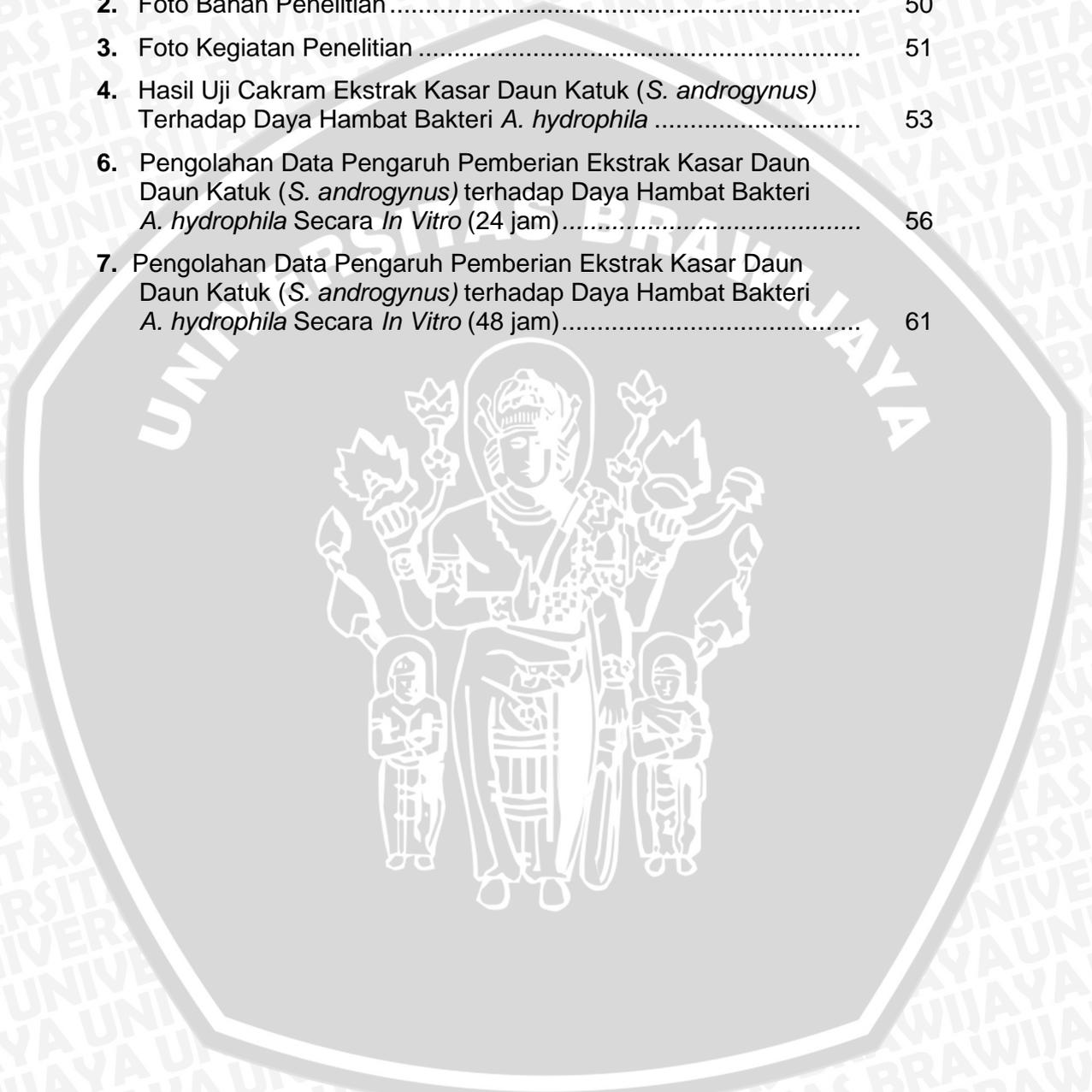
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat – alat yang digunakan dalam Penelitian	15
2. Bahan – bahan yang digunakan dalam Penelitian.....	16
3. Data Hasil Perhitungan Rata – Rata Zona Hambat Bakteri <i>A. hydrophila</i>	32
4. Sidik Ragam Zona Bening Bakteri <i>A. hydrophila</i>	32
5. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) Ekstrak Kasar Daun Katuk (<i>S. androgynus</i>) terhadap Bakteri <i>A. hydrophila</i>	33



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Foto Alat Penelitian	46
2. Foto Bahan Penelitian	50
3. Foto Kegiatan Penelitian	51
4. Hasil Uji Cakram Ekstrak Kasar Daun Katuk (<i>S. androgynus</i>) Terhadap Daya Hambat Bakteri <i>A. hydrophila</i>	53
6. Pengolahan Data Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Daun Katuk (<i>S. androgynus</i>) terhadap Daya Hambat Bakteri <i>A. hydrophila</i> Secara <i>In Vitro</i> (24 jam)	56
7. Pengolahan Data Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Daun Katuk (<i>S. androgynus</i>) terhadap Daya Hambat Bakteri <i>A. hydrophila</i> Secara <i>In Vitro</i> (48 jam)	61



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya merupakan salah satu upaya yang dapat digunakan untuk meningkatkan produksi dan nilai produksi perikanan, terutama jenis – jenis biota yang memiliki nilai ekonomis penting. Pengembangan usaha budidaya sendiri dilakukan untuk biota yang memenuhi kriteria tertentu antara lain *stock* atau populasi di alamnya sudah mengalami penurunan atau mendekati kepunahan. Usaha penangkapan sendiri dari alam cukup sulit dan mahal, padahal permintaan dari konsumen yang sangat tinggi dan berkesinambungan masih tergantung pada alam (Akbar, Marsoedi, Soemarno dan Kusnendar, 2012).

Gusrina (2008^a), mengatakan bahwa potensi perikanan budidaya diperkirakan secara nasional mencapai 15,59 juta hektar (ha) yang terdiri dari potensi air tawar 2,23 juta ha, air payau 1,22 juta ha dan budidaya laut 12,14 juta ha. Namun untuk pemanfaatannya hingga saat ini baru mencapai 10,1 persen untuk budidaya ikan air tawar, 40 persen pada budidaya air payau, dan 0,01 persen untuk budidaya laut. Sehingga secara nasional produksi perikanan hanya mencapai 1,48 juta ton.

Pada budidaya ikan di masyarakat, salah satu masalah yang sering dihadapi adalah terjadinya serangan hama dan penyakit ikan. Prajitno (2005) mengatakan bahwa 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. Serangan penyakit justru cenderung terjadi di kolam dengan kepadatan tinggi, sebab intensitas terjadinya gesekan tubuh ini dapat menjadi media penyebaran organisme

penyakit. Daya tahan tubuh ikan yang mengalami luka akan segera menurun, sehingga mudah terserang penyakit.

Berkembangnya penyakit ikan pada dasarnya tidak datang begitu saja, melainkan melalui proses hubungan tiga faktor, diantaranya kualitas air (lingkungan), kondisi ikan (inang), dan adanya jasad pantogen (jasad penyakit). Dengan demikian, timbulnya serangan penyakit ini merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara lingkungan, ikan, dan jasad pantogen / organisme penyakit. Interaksi yang tidak serasi ini menyebabkan mekanisme pertahanan diri yang dimiliki menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit (Kordi, 2004).

Adanya perkembangan ilmu dan teknologi yang semakin maju mengakibatkan kegiatan budidaya mulai mengalami peningkatan dari sistem tradisional ke sistem yang lebih intensif. Tanjung, Sudarno dan Laksmi (2008) mengatakan bahwa pemeliharaan intensif yang biasa digunakan meliputi padat penebaran dengan kepadatan tinggi serta pemberian pakan buatan yang dapat menjadi sumber penumpukan bahan organik yang berasal dari sisa pakan yang tidak termakan dan feses. Tingginya bahan organik di perairan ini dapat memicu berkembangnya penyakit terutama penyakit bakterial.

A. hydrophila merupakan salah satu bakteri yang biasa menyerang ikan air tawar. Bakteri ini termasuk jenis bakteri yang berbahaya bagi ikan terutama ikan yang tidak bersisik. Serangan bakteri tersebut terjadi bila ikan berada dalam kondisi seperti : pakan yang tidak seimbang kandungan gizinya, lingkungan air yang kandungan organiknya tinggi, fluktuasi parameter kualitas air yang besar, infeksi sekunder yang disebabkan oleh serangan parasit dan faktor genetik (ikan tidak cukup kebal oleh serangan bakteri). Ciri – ciri serangan bakteri tersebut adalah adanya bercak merah pada kulit, insang dan organ bagian dalam. Umumnya bila tidak diobati dapat menyebabkan penyebaran yang sangat luas dan menyebabkan kematian ikan secara massal (Gusrina, 2008^b).

Berbagai upaya penanggulangan terhadap penyakit ini dilakukan dengan cara pencegahan maupun pengobatan. Akan tetapi sejauh ini upaya tersebut belum memberikan hasil seperti yang diharapkan. Berbagai jenis antibiotika telah digunakan secara luas namun karena kurang memahami cara pemakaian yang benar maka akibatnya selain tidak efektif bahkan berdampak negatif yaitu timbulnya daya resisten terhadap obat. Selain itu efek pemakaian antibiotika dalam penanggulangan penyakit ini cukup tinggi. Hal ini karena banyak antibiotika tidak mempunyai nilai toksisitas yang selektif. Terkadang justru terlalu beracun bagi inangnya. Pemakaian antibiotika mempunyai efek langsung yaitu dapat menimbulkan pencemaran pada perairan sekitarnya (Prajitno, 2007).

Alternatif yang dapat digunakan adalah dengan memanfaatkan obat – obat herbal. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri adalah dengan menggunakan daun katuk (*Sauropus androgynus*). Kandungan kimia dalam daun katuk berkhasiat untuk melindungi struktur sel, meningkatkan efektivitas vitamin C, anti inflamasi, mencegah keropos tulang dan sebagai antibiotik alami. Fungsi lainnya yaitu berperan langsung sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi mikroorganisme seperti bakteri atau virus dan juga meningkatkan imunitas tubuh (Susanti, Budiman dan Warditiani, 2014).

1.2 Rumusan Masalah

Bakteri *A. hydrophila* merupakan salah satu penyebab penyakit pada berbagai jenis ikan air tawar. Pada kondisi stress bakteri ini dapat menjadi patogen yang bersifat oportunistik pada penyakit *Hemorrhagic septicaemia* (penyakit bercak merah). Bakteri ini sangat berpengaruh dalam budidaya ikan air tawar dan sering menimbulkan wabah penyakit dengan tingkat kematian (80 –

100 %) dalam waktu yang singkat yaitu sekitar 1 – 2 minggu (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012).

Untuk menanggulangi penyakit dapat dilakukan upaya pencegahan dan pengobatan. Upaya pencegahan dapat dilakukan melalui karantina, vaksinasi, dan desinfeksi. Sedangkan upaya pengobatan dapat menggunakan antibiotik kemoterapeutik. Pengobatan dengan antibiotik akan membawa efek samping jika digunakan dalam jangka waktu lama, karena bakteri akan resisten terhadap antibiotik yang digunakan. Selain itu dapat juga mengganggu keseimbangan ekosistem perairan, disamping itu harganya relatif mahal (Prajitno, 2005).

Salah satu upaya untuk bisa mengatasi dampak negatif dari penggunaan bahan kimia dan antibiotik adalah dengan menggunakan bahan obat alternatif yang relatif lebih aman, ramah lingkungan, mudah didapat dan diaplikasikan serta mudah terurai secara alami di perairan. Bahan obat yang dapat digunakan untuk menanggulangi penyakit MAS adalah bagian daun dari tumbuhan daun katuk (*S. androgynus*) (Rosidah dan Wila, 2012).

Daun katuk (*S. androgynus*) mempunyai banyak manfaat dalam kehidupan sehari – hari, baik sebagai bahan pangan maupun obat alami dan dapat digunakan untuk campuran pakan pada ternak. Hasil skrining fitokimia menunjukkan bahwa daun katuk (*S. androgynus*) mengandung senyawa aktif yang termasuk golongan alkaloid, triterpenoid, saponin, tannin, polifenol, glikosida dan flavonoid (Susanti, Budiman dan Warditiani, 2014).

Berdasarkan uraian tersebut dapat diperoleh rumusan masalah sebagai berikut :

- Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) dengan dosis yang berbeda terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjelaskan efektifitas pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) terhadap daya hambat dari bakteri *A. hydrophila* secara *In vitro*.

1.4 Hipotesis

H₀ : Diduga pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) dengan dosis yang berbeda tidak berpengaruh terhadap daya hambat dari bakteri *A. hydrophila*.

H₁ : Diduga pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) dengan dosis yang berbeda berpengaruh terhadap daya hambat dari bakteri *A. hydrophila*.

1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada tanggal 21 Januari sampai tanggal 5 Maret 2016.

2. TINJAUAN PUSTAKA

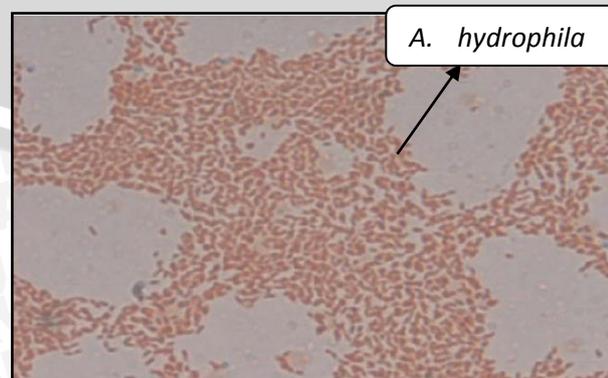
2.1 Biologi Bakteri *Aeromonas hydrophila*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

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

Devisio	: Protophyta
Class	: Schyzomycetes
Ordo	: Pseudomonadales
Sub Ordo	: Pseudomonadineae
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Species	: <i>Aeromonas hydrophila</i>

Bakteri *A. hydrophila* (Gambar 1), adalah bakteri yang berbentuk batang dengan ukuran $0,7 - 0,8 \mu\text{m} \times 1,0 - 1,5 \mu\text{m}$, bersifat fakultatif aerob yaitu bakteri yang dapat berkembang dalam keadaan ada atau tanpa adanya oksigen meskipun perkembangannya lebih cepat pada lingkungan yang ada oksigen. Pertumbuhan maksimal bakteri ini pada kisaran suhu $28^{\circ}\text{C} - 41^{\circ}\text{C}$ sedang pertumbuhan minimum pada suhu $0^{\circ}\text{C} - 5^{\circ}\text{C}$. Bakteri ini akan tumbuh dengan baik pada pH $5,5 - 9,0$ (Prajitno, 2007).



Gambar 1. *A. hydrophila* Perbesaran 1000x (Herupradoto dan Gandul, 2010)

A. hydrophila merupakan penyebab wabah penyakit yang berbahaya. Penyakit ini dapat menyerang ikan dari semua kelompok umur. Penyakit *A. hydrophila* ini dapat menyebabkan kematian hingga 80%. Warna berubah menjadi pucat dan kulit melepuh merupakan tanda – tanda awal dari penyakit ini. Hal terpenting dari penyakit ini adalah menghindari stress. Stress disini dapat diakibatkan oleh serangan protozoa, kebersihan yang tidak memadai, banyaknya kandungan bahan organik dalam air, rendahnya kandungan oksigen dan paparan kronis dari polutan industri. Semua faktor penyebab stress pada penyakit ini harus bisa dihindarkan bahkan dihilangkan (Kabata, 1985).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Genus *Aeromonas* mempunyai habitat di lingkungan perairan tawar. Keberadaan *Aeromonas* di suatu perairan erat kaitannya dengan jumlah kandungan bahan organik di perairan atau sedimen dasar. Bakteri ini diakui sebagai patogen dari hewan akuatik yang berdarah dingin. Penyakit ini disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* ini lebih banyak menyerang ikan yang hidup di daerah tropis dan sub tropis dibandingkan dengan daerah dingin. Karena di daerah tropis dan sub tropis kandungan bahan organiknya lebih tinggi dibandingkan dengan daerah dingin. Di daerah tropis dan sub tropis penyakit *Haemorrhagic septicaemia* pada umumnya muncul pada musim kemarau (panas) karena pada musim tersebut kandungan bahan organiknya cukup tinggi (Prajitno, 2007).

Di daerah tropik dan sub tropic *Haemorrhagic Septicaemia* yang di sebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* pada umumnya muncul pada musim panas (kemarau) dimana saat itu kandungan bahan organiknya tinggi. Bakteri ini diakui sebagai panthogen dari hewan akuatik berdarah dingin. Bakteri *A. hydrophila*

banyak ditemukan pada insang, kulit, hati dan ginjal. Ada juga yang berpendapat bakteri ini dapat hidup pada saluran pencernaan (Kabata, 1985).

2.1.3 Infeksi Bakteri *A. hydrophila* dan Gejalanya

A. hydrophila umumnya menyebabkan infeksi pada seluruh tubuh disertai dengan pendarahan pada organ dalam tubuh ikan. Bakteri ini dapat menyebar secara cepat pada padat penebaran tinggi yang bisa mengakibatkan kematian benih sampai 90%. Penyakit yang dapat ditimbulkan oleh bakteri *A. hydrophila* antara lain : timbulnya bercak – bercak merah pada permukaan tubuh, kulit beradang yang akhirnya timbul ulkus – ulkus seperti bisul, pendarahan pada hati, pendarahan sirip, pendarahan otot, lendir berdarah rektum, serta pembentukan cairan – cairan berdarah. Bakteri *Aeromonas* spp. ini juga dapat menyebar pada padat penebaran tinggi dan sering ditemukan dalam rongga perut ikan air tawar di daerah panas. Ikan yang terinfeksi jenis bakteri ini biasanya mati dalam waktu satu minggu. Bakteri ini ternyata sangat patogenik bagi ikan air tawar (Prajitno, 2005).

Tanda – tanda patogen dari *Motile Aeromonas Septicaemia* berhubungan erat dengan pecahnya pembuluh darah kecil akibat pendarahan yang disebabkan oleh larutnya hemolisis dan ditandai dengan lesi pada kulit dan permukaan organ atau lebih jauhnya di dalam jaringan. Lesi eksternal memiliki banyak variasi mulai dari bercak merah di area permukaan tubuh yang luas atau seringkali dengan nekrosis sirip atau ekor. Gejala klinis lainnya juga dapat berupa ulcer di bagian sirip atau dorsal dan biasanya menyebabkan borok yang bisa menjadi besar sehingga menyebabkan cacat pada permukaan tubuh ikan (Inglis, Roberts dan Bromage, 2001).

2.2 Tumbuhan Daun Katuk (*S. androgynus*)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi dari daun katuk menurut Rukmana dan Harahap (2003), daun katuk dapat diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Subdivisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledonae
Ordo	: Euphorbiales
Famili	: Euphorbiaceae
Genus	: <i>Sauropus</i>
Spesies	: <i>Sauropus androgynus</i> (L.) Merr.

Tanaman katuk (Gambar 2), termasuk tanaman berbentuk perdu berumupun dengan ketinggian 3-5 m, batangnya tumbuh tegak dan berkayu. Jika ujung batang di pangkas, akan tumbuh tunas – tunas baru yang berbentuk percabangan. Daunnya kecil – kecil mirip daun kelor, berwarna hijau. Bunganya kecil – kecil berwarna merah gelap sampai kekuning – kuning, denga bintik – bintik merah. Bunga tersebut akan menghasilkan buah berwarna putih yang di dalamnya terdapat biji berwarna hitam (Santoso, 2008).



Gambar 2. Tanaman Katuk (*S. androgynus*) (Santoso, 2008).

Katuk sering ditanam beberapa batang sekaligus sebagai tanam pagar. Batangnya tumbuh tegak, saat masih muda batang berwarna hijau. Setelah tua, warna batang menjadi putih kelabu keputihan. Batang berkayu dengan percangan jarang. Daunnya merupakan daun majemuk yang berjumlah genap. Bungannya berbentuk untik dan berwarna putih semu kemerahan. Kelopaknya keras. Buahnya berbentuk bulat, berukuran kecil, seperti kancing dan berwarna putih dengan bijinya beruang empat. (Muhlisah, 2007).

2.2.2 Habitat dan Penyebaran daun Katuk (*S. androgynus*)

Lingkungan yang paling ideal untuk membudidayakan tanaman katuk adalah daerah – daerah yang mempunyai suhu udara berkisar antara 21°C – 32°C, dengan kelembapan (RH) antara 50% - 80% dan curah hujan antara 750 mm – 2.500 mm/tahun, serta bulan kering tidak lebih dari enam bulan. Jika curah hujan lebih dari 2.500 mm/tahun, harus diimbangi dengan pengaturan atau pengelolaan drainase tanah secara baik. Di Indonesia, tanaman katuk dapat tumbuh dan berproduksi dengan baik di daerah dataran rendah sampai dataran tinggi (pegunungan) yang memiliki ketinggian antara 5 m – 1.300 m dpl. Tanaman ini juga toleran terhadap keadaan teduh (naungan) sehingga cocok di tanam di lahan pekarangan (Rukmana dan Harahap, 2003).

Penyebaran tanaman katuk (*S. androgynus*) di Indonesia sendiri tersebar dengan nama daerah masing – masing. Masyarakat Minangkabau menyebut katuk dengan nama *simani*. Selain menyebut katuk, masyarakat Jawa biasanya menyebut katuk dengan nama *katukan* atau *babing*. Sementara itu, masyarakat Madura menyebutnya dengan nama *kerakur* dan orang Bali lebih mengenal tanaman ini dengan sebutan *kayumanis*. Tanaman Katuk sudah dikenal oleh masyarakat Indonesia sejak abad ke- 16 (Santoso, 2008).

2.2.3 Bahan aktif daun Katuk (*S. androgynus*)

Tanaman katuk mempunyai banyak manfaat dalam kehidupan sehari – hari sehingga dikenal sebagai tanaman yang bersifat multi manfaat. Salah satu khasiat tanaman katuk yang telah diketahui oleh masyarakat adalah untuk melancarkan Air Susu Ibu (ASI). Di samping itu, tanaman daun katuk merupakan salah satu tanaman yang berfungsi sebagai tanaman obat. Hasil penelitian Kelompok Kerja Nasional Tumbuhan Obat Indonesia menunjukkan beberapa senyawa kimia antara lain alkaloid papaverin, lemak, vitamin, mineral, saponin, flavonoid dan tannin. Beberapa senyawa kimia yang terdapat dalam tanaman katuk diketahui berkhasiat sebagai obat (Rukmana dan Harahap, 2003).

Daun katuk mengandung senyawa fitokimia yang berkhasiat sebagai obat. Daun katuk mengandung sedikitnya tujuh senyawa aktif yang dapat merangsang pembentukan hormon – hormon steroid (diantaranya progesteron, estradiol, testosteron dan glukokortid) dan senyawa elksanoid (seperti prostaglandin, prostasiklin, tromboksan, lipoksin, leukotrin). Selain itu hasil analisis laboratorium juga menunjukkan daun katuk mengandung senyawa aktif saponin, alkaloid, tannin, fenoik, flavonoid, steroid, dan glikosida (Retnani, Permana, Kumalasari dan Taryati, 2004).

2.3 Aktivitas antimikroba

Antimikroba adalah suatu zat yang mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroba. Apabila zat tersebut mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri maka zat tersebut dapat disebut sebagai antibakteri. Mekanisme antimikroba antara lain dengan jalan merusak dinding sel, merusak membran sitoplasma, mendenaturasi protein dan menghambat kerja enzim dalam sel (Prajitno, 2007).

Secara umum antimikroba yang mempengaruhi pembentukan dinding sel atau permeabilitas membrane sel bekerja bakterisidal sedangkan pada sintesis protein bekerja bakteriostatik. Istilah bakterisidal digunakan untuk zat yang dapat membunuh bakteri dan bakteriostatik adalah suatu keadaan yang mencegah pertumbuhan bakteri sehingga populasi bakteri tetap (Pelczar dan Chan, 1986).

Menurut Laili (2007), cara kerja antimikroba dalam melakukan efeknya terhadap mikroorganisme adalah sebagai berikut :

- **Merusak Dinding Sel**
Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya dan mengubahnya setelah selesai dibentuk. Tersusun atas peptidoglikan, asam terkonat, protein, lipoprotein dan polisakarida.
- **Mengubah Permeabilitas Membran**
Membran sitoplasma tersusun atas protein dan fosfolipid, bersifat permiable, berfungsi mengatur lewatnya subtansi keluar-masuk sel, kerusakan membrane mengakibatkan nukleotida dan enzim merembes keluar dan bahan-bahan yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidupnya terhambat masuk.
- **Merusak Sitoplasma**
Sitoplasma terdiri atas 80% air, asam nukleat, protein, karbohidrat, lipid, ion organik dan sebagai senyawa dengan berat molekul rendah. Adanya konsentrasi beberapa zat kimia dapat menyebabkan koagulasi komponenkomponen seluler yang vital.
- **Menghambat Kerja Enzim dan Sintesis Nukleat dan Protein**
Penghambat kerja enzim untuk beberapa zat kimia akan merugikan gugus enzim sulfaridrin sehingga mengganggu proses metabolisme. Selain itu, DNA, RNA dan protein memegang peranan penting di dalam proses

kehidupan normal sel, sehingga mengganggu pada pembentukan fungsi – fungsi zat – zat tersebut yang menyebabkan kerusakan.

Saponin merupakan salah satu senyawa glikosida dan sterol yang berfungsi sebagai senyawa aktif permukaan, selain kemampuannya bisa dideteksi dalam membentuk busa. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri yaitu dapat menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel. Saponin dapat menjadi antibakteri karena zat aktif permukaannya mirip detergen, akibatnya saponin menurunkan tegangan permukaan dinding sel bakteri dan merusak permeabilitas membrane. Rusaknya membran sel ini dapat mengganggu kelangsungan hidup bakteri (Nusantri, 2015).

Senyawa turunan fenol yaitu flavonoid merupakan salah satu antibakteri yang bekerja dengan mengganggu fungsi membran sitoplasma. Senyawa fenol ini akan menyebabkan kerusakan membran sitoplasma. Ion H^+ dari senyawa fenol ini akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolida pada dinding sel akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat, akibatnya membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan mengalami hambatan dalam pertumbuhan bahkan menyebabkan kematian (Yunus, Arisandi, dan Abida, 2009).

Senyawa lain yang berkhasiat dalam menghambat antibakteri adalah tannin. Tannin merupakan senyawa metabolit pada tumbuhan yang bersifat sebagai antibakteri dengan membentuk ikatan yang stabil dengan protein sehingga terjadi koagulasi protoplasma bakteri. Selain itu, tannin dapat digunakan sebagai obat antiradang, antidiare, pengobatan infeksi pada kulit dan mulut dan pengobatan luka bakar. Oleh karena itu, tannin sebagai antibakteri sering digunakan dalam pengobatan (Miranti, Prasetyorini dan Suwary, 2013).

2.4 Uji Efektivitas Antibakteri Secara *In Vitro* dengan Uji Cakram

Pengukuran aktivitas bakteri dapat dilakukan melalui dua cara yaitu dengan metode difusi dan metode pengenceran. Metode difusi merupakan metode yang sering digunakan, metode ini dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode lubang / sumuran, metode silinder, dan metode kertas cakram (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

Metode cakram kertas merupakan metode yang biasa digunakan untuk menguji aktivitas antimikroba suatu antibiotik terhadap mikroorganisme patogen penyebab penyakit. Metode ini dilakukan dengan meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah di inokulasi dengan bakteri. Pencelupan cakram pada larutan uji hingga seluruh permukaan cakram basah. Pengamatan dilakukan setelah bakteri di inokulasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat zona bening di sekitar cakram. Pemilihan metode ini karena mudah dan sederhana untuk menentukan aktivitas antibakteri sampel yang di uji. Kertas cakram yang digunakan berdiameter 0,5 cm (Mulyadi, Wuryanti dan Ria, 2013).

Metode pengenceran yaitu mengencerkan zat antimikroba dan dimasukkan ke dalam tabung – tabung reaksi steril. Ke dalam masing – masing tabung itu ditambahkan sejumlah mikroba uji yang telah diketahui jumlahnya. Pada interval waktu tertentu, dilakukan perpindahan tabung reaksi ke dalam tabung – tabung berisi media steril yang lalu diinkubasikan dan diamati penghambatan pertumbuhan (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1, sementara untuk foto peralatan penelitian disajikan pada Lampiran 1.

Tabel 1. Alat – Alat yang digunakan dalam Penelitian

Alat	Fungsi
Timbangan digital	Sebagai alat untuk menimbang berat ekstrak kasar daun katuk, media TSA dan TSB yang dibutuhkan
Autoclave	Sebagai alat untuk mensterilisasi alat dan bahan yang hendak digunakan
Lemari pendingin	Sebagai wadah penyimpanan bahan penelitian
Hotplate	Sebagai alat untuk memanaskan media TSA sehingga homogen
Cawan petri	Sebagai wadah pengkulturan bakteri <i>A. hydrophila</i>
Laminary Air Flow	Sebagai tempat pengkulturan bakteri <i>A. hydrophila</i> dalam keadaan steril
Rak tabung	Sebagai tempat tabung reaksi
Pinset	Sebagai alat untuk mengambil kertas cakram
Inkubator	Sebagai wadah penyimpanan bakteri uji
Toples Kaca	Sebagai wadah perendaman daun katuk saat proses maserasi
Tabung reaksi	Sebagai wadah dari larutan
Erlenmeyer	Sebagai wadah dari media TSA dan TSB
Gelas ukur	Sebagai alat untuk mengukur volume larutan
Jarum osse	Sebagai alat untuk mengambil dan mengkultur bakteri <i>A. hydrophila</i> pada media TSA
Spatula	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
Beaker glass	Sebagai wadah larutan
Rotary vacuum evaporator	Sebagai alat untuk mendapatkan ekstrak kasar daun katuk
Mikropipet	Sebagai alat untuk mengambil larutan dalam skala mikrometer
Blender	Sebagai alat untuk menggiling daun katuk kering
Oven	Sebagai alat untuk mengeringkan daun katuk
Bunsen	Sebagai tempat spiritus
Korek gas	Sebagai sumber api untuk menyalakan bunsen
Sprayer	Sebagai wadah alkohol 70%

Tabel 1. (Lanjutan)

Alat	Fungsi
Nampan	Sebagai wadah alat dan bahan penelitian
Vortex	Sebagai alat untuk menghomogenkan bahan – bahan yang digunakan
Gunting	Sebagai alat untuk memotong tali kasur

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini ini disajikan pada Tabel 2 sementara untuk foto bahan penelitian disajikan pada Lampiran 2.

Tabel 2. Bahan – Bahan yang digunakan dalam Penelitian

Bahan	Fungsi
Daun katuk (<i>S. androgynus</i>)	Sebagai bahan yang hendak diuji kemampuan daya hambatnya
<i>Cotton Swap</i>	Sebagai bahan untuk menggosokkan bakteri <i>A. hydrophila</i> pada media TSA saat hendak uji cakram
Bakteri <i>A. hydrophila</i>	Sebagai bahan uji daya hambat
Alkohol 70%	Sebagai bahan pengkondisian aseptis pada tangan
TSA (<i>Triptycase Soy Agar</i>)	Sebagai bahan tumbuh bakteri dalam bentuk agar
TSB (<i>Triptycase Soy Broth</i>)	Sebagai bahan tumbuh bakteri dalam bentuk cair
Tali Kasur	Sebagai bahan untuk mengikat kertas koran pada saat proses sterilisasi
<i>Tissue</i>	Sebagai bahan untuk membersihkan alat yang telah digunakan
DMSO 10%	Sebagai bahan pengencer ekstrak kasar daun katuk
Kapas	Sebagai bahan untuk menutup tabung reaksi dan erlenmeyer yang hendak disterilkan
Etanol 90%	Sebagai bahan pelarut daun katuk pada proses perendaman
Kertas Saring	Sebagai bahan untuk menyaring ekstrak basah daun katuk
Akuades	Sebagai bahan pelarut dalam pengenceran bakteri <i>A. hydrophila</i>
Alumunium Foil	Sebagai bahan untuk menutup ujung tabung reaksi dan <i>Erlenmeyer</i> pada saat disterilkan
Spiritus	Sebagai bahan bakar dari bunsen
Kertas cakram 6mm	Sebagai bahan untuk mengetahui besar daya hambat ekstrak kasar daun katuk
Kertas Koran	Sebagai bahan untuk membungkus alat yang di autoklaf

Tabel 2. (Lanjutan)

Bahan	Fungsi
Kertas label	Sebagai bahan untuk menandai pada cawan petri
Lap kering	Sebagai bahan untuk membersihkan alat – alat yang digunakan
Plastik	Sebagai bahan untuk menyimpan cawan petri
Sarung tangan	Sebagai bahan pengkondisian aseptis pada tangan
Karet gelang	Sebagai bahan mengikat tutup toples maserasi
Masker	Sebagai bahan pengkondisian aseptis

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimental. Penelitian eksperimental merupakan salah satu jenis penelitian yang memanipulasi (mengatur atau merekayasa) atau mengontrol (mengendalikan) situasi alamiah menjadi situasi artifisial (buatan) dengan tujuan penelitian. Penelitian ini akan memungkinkan peneliti menarik kesimpulan dari hubungan sebab – akibat diantara variabel – variabel dan hubungannya bersifat empirik, bukan hanya berdasarkan penalaran (logika) (Amirin, 1986).

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung. Observasi merupakan suatu metode pengumpulan data dimana sumber informasinya berupa penampakan keadaan, suasana atau perilaku. Penampakan – penampakan tersebut diamati oleh peneliti pengumpulan data dan merekamnya. Alat perekamnya berupa lembaran – lembaran isian atau ceklis (pedoman observasi) (Faisal, 1981).

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). RAL merupakan rancangan yang paling sederhana diantara rancangan – rancangan percobaan yang baku. RAL dipandang lebih berguna dalam percobaan laboratorium, beberapa percobaan rumah kaca atau dalam beberapa

percobaan rumah tertentu yang mempunyai sifat relatif homogen denah perancangan lebih mudah, flexible dalam penggunaan jumlah perlakuan dan jumlah ulangan . Penggunaan RAL akan tepat bila bahan relatif homogen atau homogen dan bila jumlah perlakuan terbatas (Gaspersz, 1991).

Data Percobaan RAL diabstraksikan melalui model :

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

Keterangan :

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

μ = nilai tengah populasi (rata – rata)

τ_i = pengaruh aditif (koefisien regresi parsial) dari perlakuan ke – i

ε_{ij} = pengaruh kesalahan (galat) percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Penelitian ini menggunakan rancangan acak lengkap dengan satu faktor yaitu perbedaan dosis ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) terhadap bakteri *A. hydrophylla* pada cawan petri selama 48 jam. Pengamatan yang dilakukan berdasarkan pengukuran besarnya zona hambat yang muncul pada media agar padat dengan satuan millimeter (mm). Penelitian ini memiliki 5 perlakuan dengan 3 kali ulangan yang ditambah dengan kontrol positif dan kontrol negatif. Sementara untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 3.

A : Perlakuan pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*)

dengan dosis 9,26 ppt.

B : Perlakuan pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*)

dengan dosis 18,52 ppt.

C : Perlakuan pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*)

dengan dosis 27,77 ppt.

D : Perlakuan pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*)

dengan dosis 37,07 ppt.

E : Perlakuan pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*)

dengan dosis 46, 29 ppt.

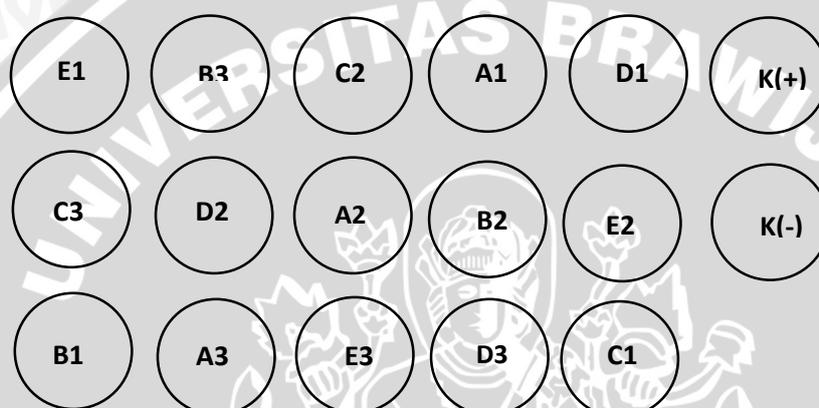
K (-) : Perlakuan pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) dengan

dosis 0% (kontrol negatif)

K (+) : Perlakuan pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) murni

(kontrol positif)

Untuk denah penelitian disajikan pada Gambar 3 dibawah ini :



Gambar 3. Denah Penelitian Uji Cakram

Keterangan :

A,B,C, D dan E = Perlakuan

1,2 dan 3 = Ulangan

K (+) = Kontrol positif

K(-) = Kontrol negatif

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Adapun hal yang harus dilakukan sebelum melakukan sebuah penelitian adalah sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan. Hal ini bertujuan untuk membunuh semua mikroorganisme yang tidak dikehendaki yang menempel pada

alat dan maupun bahan. Langkah kerja dalam sterilisasi alat dan bahan adalah sebagai berikut :

- Alat – alat yang digunakan dicuci menggunakan sabun cuci, dan ditunggu hingga kering.
- Setelah kering, kemudian dibungkus dengan menggunakan plastik tahan panas atau diikat dengan menggunakan kertas koran dan diikat menggunakan benang. Sterilisasi bahan digunakan dengan cara memasukkan bahan ke dalam Erlenmeyer atau ke dalam tabung reaksi.
- Mulut tabung reaksi ataupun erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas hingga benar – benar rapat lalu dibungkus dengan menggunakan kertas aluminium foil dan dirapatkan dengan menggunakan tali.
- Semua alat dan bahan yang sudah siap dimasukkan kedalam autoklaf.
- Aquadest secukupnya dituang ke dalam *autoclave*, kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam *autoclave* dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris.
- Tombol ON dinyalakan, setelah mencapai suhu 121°C dan tekanan menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit dengan cara membuka dan atau menutup kran uap yang berada di bagian atas tutup *autoclave*.
- Tombol OFF ditekan, ditunggu beberapa saat sampai suhu menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka kran uap lalu buka penutup *autoclave* dengan cara simetris.
- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

3.4.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan

Selain alat dan bahan, sterilisasi tempat dan laboran harus steril guna menghindari kontaminasi dengan mikroorganisme yang tidak diinginkan. Tempat perlakuan seperti meja yang akan digunakan untuk penelitian maupun tangan laboring yang bersinggungan harus berada dalam kondisi aseptis. Sterilisasi tempat dapat dilakukan dengan cara kimia menggunakan alkohol 90 % maupun cara fisika dengan pembakaran langsung maupun dengan penyinaran dengan sinar UV.

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Daun katuk

Proses pembuatan ekstrak kasar *daun katuk* (*S. androgynus*) dimulai dengan menyiapkan daun katuk yang sudah kering, sementara foto tahapan pembuatan ekstrak disajikan pada Lampiran 3. Adapun proses pembuatan yang dilakukan untuk mendapatkan daun katuk (*S. androgynus*) kering dengan cara sebagai berikut :

- Daun katuk dipetik satu persatu sebanyak 2 kg kemudian daun segar dicuci dengan air bersih dan dipotong kecil – kecil untuk mempercepat proses pengovenan.
- Daun yang sudah bersih kemudian dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 40°C. Pengovenan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air dari daun sehingga mudah untuk mendapatkan senyawa antibakteri.
- Setelah di oven langkah selanjutnya yaitu dilakukan proses penggilingan dengan menggunakan *blender* hingga di dapat berat daun katuk sebesar 500 gram.
- Setelah bahan yang akan digunakan sudah siap kemudian dilakukan persiapan perendaman (maserasi) dimana serbuk daun katuk sebanyak 333,33 gram dimaserasi dalam etanol 90% dengan perbandingan 1 : 6

sebanyak 1,8 L selama 3 x 24 jam dan dilakukan dalam suhu kamar. Pembuatan ekstrak dilakukan dengan metode maserasi pelarut etanol 90%. Etanol 90% merupakan campuran hidroalkohol yang mudah bercampur, sehingga dalam proses ekstraksi dapat menyari kandungan kimia baik yang bersifat polar maupun non polar (Ansel, 1989).

- Larutan yang sudah didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* pada suhu 50°C dengan kecepatan 80 rpm sehingga dihasilkan ekstrak kasar daun katuk yang kental sebanyak 21,38 gram.

3.4.4 Pembuatan Media

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari BBPAB Jepara dengan kepadatan 10^8 sel/l sebanyak 10 ml. Bakteri yang digunakan untuk uji efektifitas ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) adalah bakteri dengan kepadatan 10^8 sel/ml. Pemiakan bakteri meliputi pembuatan media diantaranya sebagai berikut :

3.4.4.1 TSA (*Tryptone Soya Agar*)

Penelitian ini menggunakan bakteri *A. hydrophila* sehingga media yang digunakan adalah media TSA (*Tryptone Soya Agar*). Dosis yang digunakan dalam pembuatan TSA sebesar 40 gram/ L. Langkah – langkah dalam pembuatan media TSA adalah sebagai berikut :

- Ditimbang 11,2 gram TSA.
- Dimasukkan dalam erlenmeyer berisi 280 ml akuades.
- Diaduk pada kondisi hangat diatas *hotplate* sampai tercampur rata.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen / alumunium foil kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30^\circ\text{C}$ karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.

- Dituang pada cawan petri tunggu dingin dan gunakan atau simpan pada lemari pendingin dengan diberi label.
- Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin.
- Panaskan lagi apabila akan digunakan kembali.

3.4.4.2 TSB (*Tryptitone Soy Broth*)

TSB (*Tryptitone Soy Broth*) merupakan media cair yang digunakan untuk kultur bakteri *A. hydrophila*. Langkah yang dilakukan dalam pembuatan media ini adalah sebagai berikut :

- TSB ditimbang 6 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades dalam erlenmeyer kemudian diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kuning.
- Erlenmeyer ditutup kapas dan aluminium foil lalu dibungkus dengan kertas perkamen dan diikat, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Media yang akan digunakan untuk pembiakan bakteri dibiarkan dingin karena bakteri akan mati bila diinokulasi pada media yang masih panas.

3.4.5 **Pembiakan Bakteri *A. hydrophila***

Penelitian ini menggunakan bakteri *A. hydrophila* yang didapat dari isolate murni yang berasal dari Balai Besar Budidaya Air Payau Jepara. Isolat murni yang kemudian diremajakan pada media agar miring yaitu dengan menggunakan media TSA (*Tryptic Soy Agar*). Adapun tahapan dalam peremajaan bakteri pada media agar miring adalah sebagai berikut :

- Siapkan media agar miring yang masih steril (untuk bakteri *A. hydrophilla* menggunakan media TSA).
- Panaskan jarum ose yang akan digunakan sampai berwarna merah menyala kemudian dinginkan jarum ose pada ujung media agar TSA.

- Buka penutup kapas pada tabung reaksi berisi bakteri kemudian panaskan ujung tabung terlebih dahulu di atas bunsen.
- Ambil satu inokulan bakteri dari hasil peremajaan sebelumnya kemudian goreskan pada media agar yang masih steril di dekat bunsen yang menyala.
- Setelah itu, media hasil goresan tadi di inkubasi di inkubator selama 24 jam dengan suhu 37° C untuk melihat pertumbuhan bakteri.

Untuk mendapatkan bakteri dalam bentuk cair, maka bakteri diremajakan kembali dengan metode gores menggunakan media cair yaitu TSB (*Tryptic Soy Broth*). Adapun langkah – langkahnya adalah sebagai berikut :

- Larutan TSB disiapkan sebanyak 6 gram dalam *erlenmeyer* sebanyak 200 ml.
- Jarum ose dipanaskan di atas bunsen sampai berpijar untuk menghindari kontaminasi.
- Setelah dingin jarum ose disentuhkan kebiakan murni *A. hydrophila* kemudian dicelupkan ke TSB yang sudah dingin
- Larutan TSB dibiarkan 12 – 24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C. Setelah 24 jam, media TSB akan keruh menandakan bakteri telah tumbuh.
- Untuk melihat kepadatan bakteri dapat menggunakan Metode Mc. Farland yaitu suatu metode dengan mencocokkan kekeruhannya berdasarkan kepadatan bakteri pada Mc. Farland. Kepadatan bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu 10⁸ CFU/ml. Kepadatan bakteri 10⁸ CFU/ml didapatkan dengan cara mencocokkan kepadatan bakteri pada media cair TSB dengan Mc. Farland berdasarkan kekeruhannya. Hasil dari Mc Farland yaitu 10⁸ CFU/ml, sehingga untuk mendapatkan bakteri dengan kepadatan 10⁸ CFU/ml.
- Disiapkan cawan petri yang sudah berisi media TSA

Bakteri yang sudah dibiakkan kemudian diambil sebanyak 1 ml yang sudah di encerkan 0,9 % kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi.

- Bakteri disebar dengan cara penyebaran pada seluruh media TSA secara merata menggunakan metode cawan sebar (*spread plate*).
- Bakteri di ambil menggunakan mikro pipet sebanyak 0,1 ml dan disebar menggunakan batang penyebar atau *hockey stick* yang terlebih dahulu di sterilisasi dengan cara di bakar, ketika sudah dingin batang penyebar dapat digunakan.
- Media yang telah berisi bakteri yang telah disebar kemudian dinkubasi dalam inkubator dengan suhu 37°C selama 24 jam.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Daun katuk (*S. androgynus*)

Persiapan perendaman (maserasi) dimana serbuk daun katuk sebanyak 333,33 gram dimaserasi dalam etanol 90% sebanyak 1,8 liter selama 3 x 24 jam dalam suhu kamar. Larutan yang didapat kemudian disaring dengan kertas saring lalu diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak daun katuk, selanjutnya dilakukan penentuan dosis (ppt) untuk menentukan dosis ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) dan ditambahkan larutan pengencer DMSO 10%.

- Pembuatan ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) dosis 9,26 ppt.

Ekstrak kasar buah daun katuk ditimbang sebesar 0,15 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan DMSO 10% sebanyak 2,85 ml sehingga dihasilkan 3 ml ekstrak kasar buah daun katuk dengan dosis 9,26 ppt.

- Pembuatan ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) dosis 18,52 ppt.

Ekstrak kasar buah daun katuk ditimbang sebesar 0,3 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan DMSO 10% sebanyak 2,7 ml sehingga dihasilkan 3 ml ekstrak kasar buah daun katuk dengan dosis 18,52 ppt.

- Pembuatan ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) dosis 27,77 ppt.

Ekstrak kasar buah daun katuk ditimbang sebesar 0,45 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan DMSO 10% sebanyak 2,55 ml sehingga dihasilkan 3 ml ekstrak kasar buah daun katuk dengan dosis 27,77 ppt.

- Pembuatan ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) dosis 37,07 ppt.

Ekstrak kasar buah daun katuk ditimbang sebesar 0,6 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan DMSO 10% sebanyak 2,4 ml sehingga dihasilkan 3 ml ekstrak kasar buah daun katuk dengan dosis 37,07 ppt.

- Pembuatan ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) dosis 46,29 ppt.

Ekstrak kasar buah daun katuk ditimbang sebesar 0,75 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan DMSO 10% sebanyak 2,25 ml sehingga dihasilkan 1 ml ekstrak kasar buah daun katuk dengan dosis 46,29 ppt.

3.5.2 Pelaksanaan Penelitian Uji Cakram (*In Vitro*)

Uji cakram merupakan pengujian untuk antibakteri dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang mengandung bahan antibakteri sesuai dengan dosis perlakuan (Pelczar dan Chan, 1986).

Uji cakram digunakan untuk mengetahui pada dosis tertentu yang dapat menghambat bakteri yang bersifat bakteristatik (menghambat bakteri) setelah pengamatan 24 jam, maupun bakterisidal (membunuh bakteri) setelah pengamatan 48 jam. Kertas cakram yang telah direndam dengan zat antibakteri

diletakkan di atas media padat yang telah disemai dengan mikroorganisme yang diuji. Setelah diinkubasi, penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antibakteri terlihat sebagai wilayah yang jernih (daerah hambatan) di sekeliling cakram (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

Adapun langkah – langkah pelaksanaan Uji cakram pada penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Disiapkan yang telah terdapat media TSA .
- Disiapkan dosis ekstrak kasar daun katuk untuk uji cakram.
- Penanaman bakteri pada media TSA dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri dari media TSB dengan menggunakan metode sebar.
- Metode sebar dilakukan dengan cara menuang 20 ml media TSA steril terlebih dahulu ke dalam cawan Petri dan biarkan sampai media dingin.
- Bakteri yang sudah diencerkan kemudian diambil menggunakan mikro pipet sebanyak 0,1 ml.
- Kemudian disebar dengan batang penyebar atau *hockey stick* yang di sterilisasi menggunakan etanol dan dibakar. Biasanya penyebaran dilakukan pada suhu 37°C.
- Kertas cakram steril ukuran 6 mm direndam ke dalam ekstrak kasar daun katuk selama 15 menit berdasarkan dosis yang telah ditentukan.
- Kertas cakram yang direndam ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) ditiriskan dan diletakkan pada permukaan lempeng agar.
- Dibaca hasil setelah diinkubasi pada suhu ruang 37°C selama 24 jam dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong.
- 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.
- Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh bergeser, karena mengurangi validasi pengukuran.

3.6 Parameter Uji

Parameter uji dalam penelitian ini terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama yaitu diameter daerah hambatan yang diukur dengan menggunakan kertas cakram yang dinyatakan dengan mm ditambah daerah bening yang ada di sekeliling kertas cakram. Parameter penunjangnya adalah suhu inkubator selama inkubasi yakni sebesar 37° C dan lama perendaman kertas cakram selama 15 menit.

3.7 Analisa Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata dengan selang kepercayaan 95 % dan selang kepercayaan 99% maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk menentukan perbedaan antar perlakuan. Sementara untuk mengetahui hubungan pengaruh dosis ekstrak daun katuk (*S. andrigynus*) terhadap diameter zona hambat dilakukan dengan uji polynomial orthogonal.

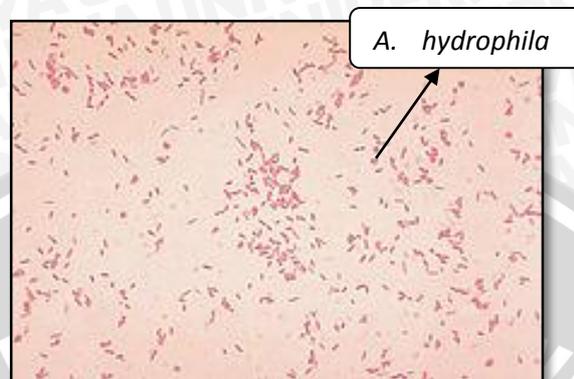
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi Bakteri *A. hydrophila*

Proses identifikasi bakteri dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *A. hydrophila*. Pada penelitian ini, proses identifikasi dilakukan dengan uji pewarnaan gram. Menurut Kismiyati, Subekti, Yusuf dan Kudarwati (2009), uji pewarnaan gram bertujuan untuk menentukan bakteri tersebut termasuk ke dalam kelompok bakteri gram negatif atau bakteri gram positif. Cara kerja dari pewarnaan gram yaitu dengan suspensikan bakteri dengan ose, kemudian letakkan pada obyek dan difiksasi, tetesi dengan larutan gram A yang mengandung Kristal violet, kemudian tetesi dengan larutan gram B yang mengandung lugol, tetesi dengan larutan gram C yang mengandung alkohol, dan yang terakhir dengan larutan gram D yang mengandung safranin. Tahap selanjutnya di keringkan dengan menggunakan kertas serap dan tambahkan minyak emersi dan amati di bawah mikroskop. Bila hasil pewarnaan yang diperoleh berwarna merah, maka bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif, sedangkan apabila diperoleh berwarna ungu maka bakteri tersebut adalah gram positif.

Berdasarkan hasil pewarnaan, bakteri *A. hydrophila* merupakan gram negatif yang sering menyerang ikan air tawar. Menurut Fitri dan Yasmin (2011), perbedaan warna pada bakteri gram positif dan gram negatif menunjukkan bahwa adanya perbedaan struktur sel antara kedua jenis bakteri tersebut. Bakteri gram positif memiliki dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tebal, sedangkan bakteri gram negatif memiliki kandungan lipid yang tinggi. Waluyo (2011), juga mengatakan bahwa dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks dibandingkan dengan bakteri gram positif. Membran pada bakteri gram negatif kaya akan lipid (11 – 22%). Lapisan luar dari bakteri gram negatif mempunyai

struktur sebagai unit membran terdiri dari fosfolida seperti membran plasma, tetapi mengandung lipid lainnya, polisakarida dan protein. Gambar hasil uji pewarnaan disajikan pada Gambar 4.

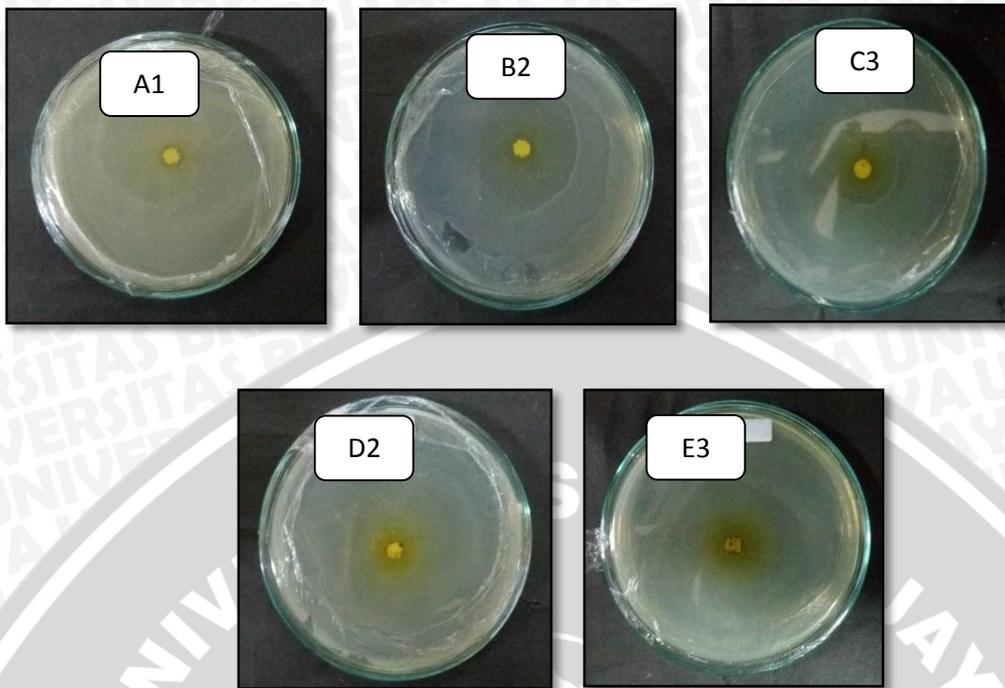


Gambar 4. Bakteri *A. hydrophila* Pembesaran 100x

Untuk mengatasi infeksi yang ditimbulkan oleh bakteri ini maka dilakukan pengujian dengan menggunakan ekstrak daun katuk (*S. androgynus*) yang memiliki senyawa bakteri. Untuk mengetahui daya anti bakterial dari ekstrak, maka dilakukan uji daya hambat dengan menggunakan kertas cakram yang direndam dalam dosis dari ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*).

4.2 Daya Hambat Anti Bakterial Ekstrak Kasar Daun Katuk (*S. androgynus*) dengan uji cakram (*In vitro*)

Penelitian ini menggunakan dosis ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) antara lain sebesar 9,26 ppt, 18,52 ppt, 27,77 ppt, 37,03 ppt dan 46,29 ppt. Penentuan dosis ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) ini didasarkan pada penelitian pendahuluan. Kemampuan daya anti bakterial ekstrak terhadap bakteri ditentukan dengan cara mengukur diameter daya hambat yang muncul di sekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong. Berikut adalah hasil pengamatan zona bening pada kertas cakram selama penelitian yang direndam dengan ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) seperti disajikan pada Gambar 5. Sementara foto setiap perlakuan disajikan di Lampiran 4.



Gambar 5. Hasil Uji Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila* setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Katuk (*S. androgynus*)

Berdasarkan hasil pengamatan selama penelitian, dari kelima dosis yang di ujikan menunjukkan adanya zona bening di sekitar kertas cakram yang direndam dengan ekstrak kasar daun katuk. Hal ini mengindikasikan bahwa ekstrak kasar daun katuk memiliki efektifitas dalam menghambat pertumbuhan bakteri yang ditimbulkan oleh adanya senyawa flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak kasar daun katuk. (*S. androgynus*).

Hal ini sesuai dengan pernyataan Eng Khoo, Azrina dan Amin (2015), bahwa daun katuk (*S. androgynus*) adalah tanaman obat yang mengandung antioksidan dalam jumlah cukup tinggi. Selain senyawa alkaloid, glikosida dan saponin, komponen flavonoid juga ditemukan dalam daun katuk. Flavonoid merupakan senyawa bioaktif yang potensial untuk aktivitas antioksidan, pencegahan serta pengobatan penyakit. Selain itu komponen fenol yang terkandung dalam daun katuk (*S. androgynus*) mampu menghambat pertumbuhan kedua bakteri baik bakteri gram positif maupun bakteri gram negatif

Untuk mengetahui nilai dari pengukuran zona bening dilakukan pengolahan data yang secara lengkap disajikan pada Lampiran 5. Hasil rata – rata pengukuran daya hambat ekstrak daun katuk (*S. androgynus*) terhadap bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro* disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Data Hasil Perhitungan Rata – Rata Zona Hambat Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata – rata
	1	2	3		
A (9,26 ppt)	4,55	4,48	5,92	14,95	4,98 ± 0,81
B (18,52 ppt)	6,29	7,6	6,04	19,93	6,64 ± 0,84
C (27,77 ppt)	10,77	11,45	7,93	30,15	10,05 ± 1,87
D (37,03 ppt)	10,82	9,65	10,51	30,98	10,33 ± 0,61
E (46,29 ppt)	9,44	10,74	13,64	33,82	11,27 ± 2,15
Total				129,83	

Berdasarkan hasil yang disajikan pada Tabel 3, didapatkan bahwa nilai rata – rata dosis ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) terbesar adalah pada perlakuan E dengan dosis 46,29 ppt, menghasilkan diameter zona hambat sebesar 11,27 mm. sedangkan untuk nilai rata – rata terkecil diperoleh pada perlakuan A dengan dosis ekstrak 9,26 ppt yaitu sebesar 4,98 mm. Setelah pengukuran diameter zona hambat, kemudian dilanjutkan dengan perhitungan sidik ragam yaitu untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Hasil sidik ragam pengaruh ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) dengan dosis yang berbeda terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Tabel 4, sementara untuk perhitungan secara lengkap disajikan pada Lampiran 5.

Tabel 4. Sidik Ragam Zona Bening Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	87,372	21,843	11,104**	3,48	5,99
Acak	10	19,671	1,967			
Total	14	107,043				

Keterangan: ** = Berbeda Sangat Nyata

Berdasarkan hasil yang diperoleh pada Tabel 4, untuk sidik ragam zona bening bakteri *A. hydrophila* didapatkan bahwa pengaruh pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* adalah berbeda sangat nyata karena F hitung lebih besar dari F Tabel 5% (selang kepercayaan 95%) dan F Tabel 1% (selang kepercayaan 99%) atau nilai 11,104 lebih besar daripada 3,48 dan 5,99. Maka H_0 ditolak yang berarti perlakuan pemberian ekstrak kasar daun katuk berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila*. Selanjutnya dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan (rata – rata) yang berbeda sangat nyata seperti disajikan pada Tabel 5, sementara untuk perhitungan secara lengkap disajikan pada Lampiran 5.

Tabel 5. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) Ekstrak Kasar Daun Katuk (*S. androgynus*) terhadap Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Rata – Rata	A	B	C	D	E	Notasi
		4,98	6,64	10,05	10,32	11,27	
A	4,98	-	-	-	-	-	a
B	6,64	1,66 ^{ns}	-	-	-	-	a
C	10,05	5,07 ^{**}	3,41 [*]	-	-	-	b
D	10,33	5,45 ^{**}	3,68 ^{**}	0,27 ^{ns}	-	-	b
E	11,27	6,29 ^{**}	4,63 ^{**}	1,22 ^{ns}	0,95 ^{ns}	-	b

Keterangan : ns = Tidak Berbeda Nyata

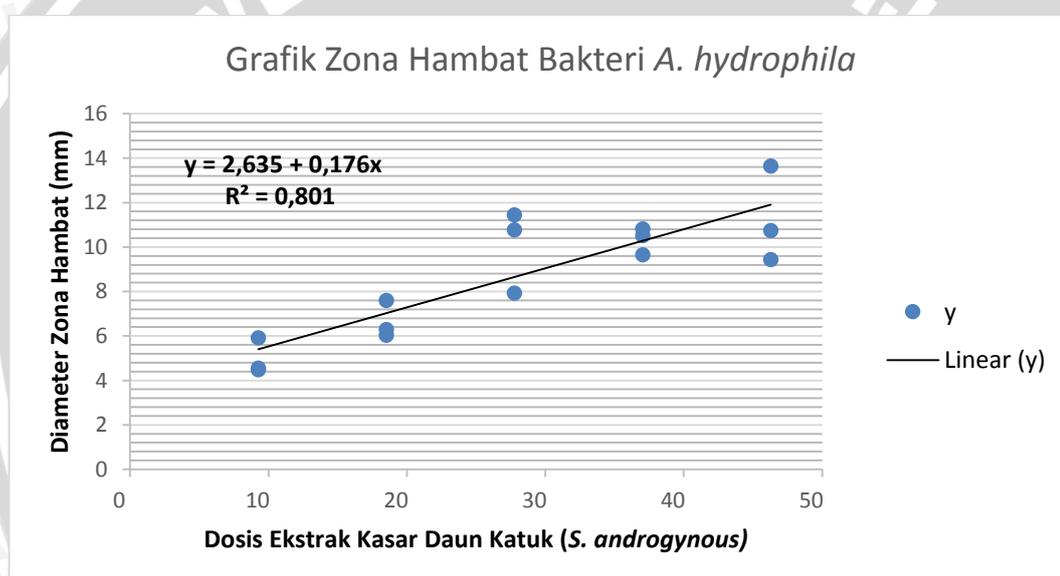
* = Berbeda Nyata

** = Berbeda Sangat Nyata

Pada uji BNT (Tabel 5) didapatkan perbedaan notasi yang di berikan pada masing – masing perlakuan. Pada perlakuan A dan B memiliki notasi a karena kedua perlakuan ini tidak berbeda nyata, sedangkan pada perlakuan C, D dan E diberikan notasi b karena perlakuan C, D dan E berbeda nyata dengan perlakuan A dan B. Sehingga dapat disimpulkan urutan perlakuan terbaiknya adalah E / D / C – B / A. Dari hasil uji BNT juga dapat diketahui bahwa dosis yang optimal dalam menghambat bakteri *A. hydrophila* adalah perlakuan C dengan dosis 27,77 ppt.

Perbedaan pemberian notasi pada setiap perlakuan ini menunjukkan bahwa perbedaan dosis pada masing – masing perlakuan memberikan hasil yang berbeda sangat nyata. Kesimpulan dari uji BNT ini didapatkan dari hasil selisih antar perlakuan (rata – rata) yang dibandingkan dengan nilai BNT 5% dan nilai BNT 1% yang disajikan pada Lampiran 5.

Untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antara perlakuan dengan parameter yang di uji yaitu daya hambat bakteri *A. hydrophila*, maka dilakukan uji polynomial orthogonal. Berikut adalah hasil uji polynomial orthogonal seperti disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Grafik Hubungan Pengaruh Dosis Ekstrak Kasar Daun Katuk (*S. androgynus*) terhadap Diameter Zona Hambat Bakteri *A. hydrophila*.

Berdasarkan hasil uji polynomial orthogonal, menunjukkan bahwa hubungan antara perbedaan dosis ekstrak daun katuk (*S. androgynus*) terhadap diameter daya hambat bakteri *A. hydrophila* menghasilkan hubungan atau grafik secara linear. Dari grafik tersebut disajikan bahwa perlakuan ini menghasilkan garis perpotongan yang berbentuk linear dengan persamaan $y = 2,635 + 0,176x$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,801. Grafik tersebut menunjukkan bahwa dosis maksimal ekstrak daun katuk yang dapat

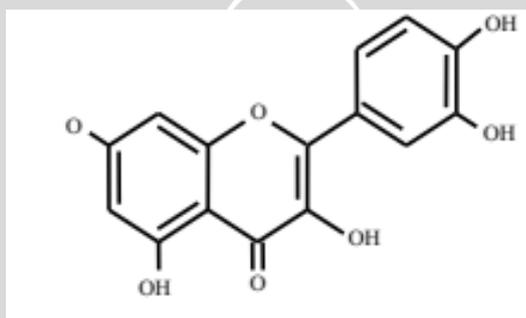
menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* terdapat pada dosis E (46,29 ppt) dengan diameter rata – rata sebesar 11,27 mm.

Dari hasil tersebut didapatkan bahwa pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) terhadap diameter zona hambat bakteri *A. hydrophila* menunjukkan respon yang meningkat seiring dengan bertambahnya dosis yang diberikan. Semakin tinggi dosis ekstrak kasar daun katuk yang diberikan, maka diameter zona hambat yang terbentuk akan semakin besar. Hal ini ditunjukkan dari peningkatan diameter zona hambat pada setiap perlakuan yang mengalami peningkatan dari dosis ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) 9,26 ppt hingga dosis ekstrak kasar daun katuk 46,29 ppt. Terjadinya peningkatan diameter zona hambat ini disebabkan karena semakin tinggi dosis yang diberikan maka kandungan senyawa aktif yang terdapat dalam dosis tersebut semakin banyak. Tingginya kandungan senyawa aktif dalam ekstrak kasar daun katuk akan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* secara maksimal. Hasil ini juga didukung oleh pernyataan Roslizawaty, Ramadani, Fakhurrizi dan Heerialfian (2013), bahwa efektifitas suatu zat antibakteri dipengaruhi oleh konsentrasi zat tersebut. Meningkatnya konsentrasi zat menyebabkan kandungan senyawa aktif yang berfungsi sebagai antibakteri bertambah, sehingga kemampuan dalam menghambat suatu bakteri juga akan semakin besar.

Hasil penelitian Fatimah, Yuliana dan Aris (2014), menambahkan bahwa semakin tinggi konsentrasi ekstrak daun katuk (*S. androgynus*) dalam menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus* maka semakin besar pula zona hambat yang terbentuk yang dapat dilihat dari bertambahnya luas zona hambat pada setiap perlakuan.

Senyawa bioaktif yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah senyawa flavonoid yang terkandung dalam ekstrak kasar daun

katuk (*S. androgynus*). Menurut Redha (2010), flavonoid (Gambar 7) merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam senyawa phenolik dengan struktur kimia $C_6-C_3-C_6$. Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatic B dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan sebagai dasar pembagian ke dalam sub kelompoknya. Flavonoid sendiri berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam dan berada dalam bentuk glukosida (mengandung rantai samping glukosa) atau dalam bentuk aglikon.



Gambar 7. Kerangka $C_6-C_3-C_6$ Flavonoid (Redha, 2010).

Flavonoid berperan langsung sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme seperti bakteri itu sendiri. Menurut Ariyanti, Darmayasa dan Sudirga (2012), mekanisme yang menyebabkan penghambatan dalam pertumbuhan bakteri diduga disebabkan adanya interaksi senyawa fenol dan turunannya dengan sel bakteri. Senyawa – senyawa ini berikatan dengan protein pada bakteri melalui ikatan non spesifik membentuk kompleks protein fenol. Pada konsentrasi rendah, terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian, kemudian merusak membran sitoplasma dan menyebabkan kebocoran isi sel, sehingga pertumbuhan bakteri

terhambat. Sedangkan pada konsentrasi tinggi, zat tersebut berkoagulasi dengan protein seluler dan membran sitoplasma mengalami lisis.

Senyawa lain yang berperan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* adalah saponin yang terkandung dalam ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*). Menurut Nuria, Faizatul dan Sumantri (2009), bahwa mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Darsana, Besung dan Mahatmi (2012), menambahkan bahwa saponin dapat berperan sebagai antibakteri karena zat aktifnya mirip detergen, saponin berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan kemudian mengikat membran sitoplasma sehingga mengganggu dan mengurangi kestabilan membran sel. Hal ini yang menyebabkan membran sitoplasma bocor dan mengakibatkan kematian sel.

Selain flavonoid dan saponin, kandungan tannin dalam daun katuk juga berperan sebagai antibakteri. Menurut Rijayanti (2014), mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transkriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk. Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuannya untuk menginaktivkan adhesin sel mikroba, menginaktivkan enzim, dan mengganggu transport protein pada lapisan dalam sel.

Pengaruh pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* memiliki nilai rata – rata diameter berkisar antara 4,98 mm sampai 11,27 mm yang berarti memiliki aktivitas antibakteri sedang. Hal ini sesuai dengan pernyataan Davis dan Stout (1971), daya antibakteri berdasarkan diameter zona hambat terbagi menjadi lemah (diameter < 5 mm). sedang (diameter 5 – 10 mm), kuat (diameter 10 – 20 mm) dan sangat kuat (diameter > 20 mm).

Untuk mengetahui sifat antibakteri dari ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) maka dilakukan pengamatan setelah inkubasi selama 48 jam. Untuk perhitungan lengkapnya di sajikan pada Lampiran 6. Dari hasil pengamatan selama 48 jam, dapat di simpulkan bahwa diameter daya hambat dari masing – masing perlakuan mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstra kasar daun katuk (*S. androgynus*) bersifat bakteriostatik. Hal ini sesuai dengan pendapat Lukman, Zaraswati, Indah dan Doddy (2015), suatu senyawa dikatakan bersifat bakteriostatik apabila senyawa antimikroba tersebut hanya dapat menghambat pertumbuhan bakteri jika pemberian senyawa antimikroba terus dilakukan. Namun apabila telah habis, atau pemberian senyawa antimikroba dihentikan maka pertumbuhan dan perbanyakan dari bakteri yang dihambat akan kembali meningkat yang ditandai dengan berkurangnya diameter zona hambat pada masa inkubasi kedua.

Hal ini disebabkan kemampuan biologis yang dimiliki bakteri sangat berbeda tergantung jenis bakteri. Pelczar dan Chan (1986) mengatakan bahwa bakteri gram positif cenderung lebih sensitif terhadap komponen antibakteri dikarenakan struktur dinding sel bakteri gram positif lebih sederhana. Sedangkan bakteri gram negatif relatif lebih kompleks dan berlapis tiga, yaitu lapisan luar yang berupa lipoprotein, lapisan tengah yang berupa lipopolisakarida dan lapisan dalam peptidoglikan. Bakteri *A. hydrophila* merupakan salah satu bakteri gram negatif dan memiliki struktur dinding sel yang tebal.

Faktor lain yang mempengaruhi zona hambat adalah kepekaan pertumbuhan antibakteri, reaksi antara bahan aktif dengan medium dan temperatur inkubasi. Mutu ekstrak yang digunakan juga akan mempengaruhi diameter zona hambat yang terbuat. Semakin baik suatu mutu ekstrak maka zona hambat yang terbentuk akan semakin baik. Menurut Sawitti, Mahatmi dan Besung (2013), kecilnya zona hambat yang terbentuk dapat dipengaruhi oleh

mutu ekstrak daun. Mutu ekstrak dipengaruhi oleh dua faktor utama yaitu faktor biologi dan faktor kimia. Faktor biologi meliputi spesies tanaman, lokasi tanaman asal, waktu pemanenan, penyimpanan bahan baku, umur serta bagian tanaman yang digunakan. Sementara untuk faktor kimia, yaitu meliputi faktor eksternal seperti ukuran bahan, penyaring yang digunakan dalam ekstraksi, kandungan logam berat dan pestisida pada tanaman dan metode ekstraksi yang digunakan. Faktor internal yang mempengaruhi mutu ekstrak meliputi: jenis, komposisi kualitatif, komposisi kuantitatif, dan kadar rata-rata senyawa aktif yang terkandung dalam daun

4.2 Hasil dari Parameter Penunjang

Parameter penunjang merupakan parameter pendukung yang digunakan selama penelitian. Pada penelitian ini parameter penunjang yang digunakan adalah suhu inkubator selama inkubasi dan lama perendaman kertas cakram. Parameter penunjang pertama yaitu suhu inkubator yang merupakan faktor utama yang akan mempengaruhi laju pertumbuhan bakteri selama inkubasi. Pelczar dan Chan (1998), menyatakan bahwa umumnya pertumbuhan bakteri akan ditandai dengan bertambahnya jumlah massa melebihi masa yang ada di dalam inokulan asalnya, yaitu bertambahnya massa bakteri akan berbanding lurus (proporsional) dengan penambahan komponen selular yang lain seperti DNA, RNA dan protein.

Suhu yang digunakan selama masa inkubasi 24 – 48 jam dalam penelitian ini adalah 33°C. Hal ini sesuai dengan pernyataan Prajitno (2007), pertumbuhan maksimal bakteri *A. hydrophila* pada kisaran suhu 28°C – 41°C sedangkan pertumbuhan minimum pada suhu 0°C – 5°C. Bakteri akan tumbuh dengan baik pada pH 5,5 – 9,0.

Parameter penunjang yang kedua adalah lama perendaman kertas cakram. Ukuran kertas cakram yang digunakan yaitu 6 mm. Lama perendaman kertas cakram ini bertujuan agar ekstrak daun katuk (*S. androgynus*) benar – benar menyerap sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan baik. Lama perendaman kertas cakram pada penelitian ini adalah selama 15 menit. Hal ini sesuai dengan pernyataan Noverina, Fitria, dan Sinaga (2009), pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode Kirby – Bauer atau metode cakram kertas. Kertas cakram kosong sebelumnya dipanaskan dalam oven pada suhu 70°C selama 15 menit, kemudian dimasukkan ke dalam larutan uji selama 15 menit sebelum diletakkan pada media uji. Kemudian secara aseptik, kertas cakram akan menyerap supernatant tersebut. Masing – masing dari kertas cakram diletakkan pada permukaan media uji yang telah berisi mikroba uji.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang uji efektifitas ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynous*) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro* diperoleh kesimpulan bahwa hasil uji efektifitas antibakterial dengan menggunakan uji cakram menunjukkan konsentrasi ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynous*) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan dosis optimalnya adalah 27,77 ppt. namun masih bersifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri). Rata – rata diameter zona hambat dari penelitian ini berkisar antara 4,98 mm sampai 11,27 mm yang berarti ekstrak daun katuk (*S. androgynous*) memiliki aktivitas antibakteri sedang.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini, disarankan menggunakan ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Serta perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian ekstrak kasar daun katuk (*S. androgynus*) untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* yang menyerang ikan air tawar secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Akbar, S., Marsoedi., Soemarno dan E. Kusnendar. 2012. Pengaruh Pemberian Pakan Yang Berbeda Terhadap Pertumbuhan Ikan Kerapu Macan (*Ephinephelus Fuscoguttatus*) Pada Fase Pendederan Di Keramba Jaring Apung (KJA). *Jurnal Teknologi Pakan*. **1** (2): 93-101.
- Amirin, T.M .1986. Menyusun Rencana Penelitian. CV. Rajawali : Jakarta. 172 hlm.
- Ansel, H.C. 1989. Pengantar Bentuk Sediaan Farmasi. UI Press : Jakarta. 617 hlm.
- Ariyanti, N. K., I. B. G. Darmayasa, S. K. Sudirga. 2012. Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis* Miller) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. *Jurnal Biologi*. **16** (1): 1-4.
- Darsana, I.G.O., I.N.K Besung dan H. Mahatmi. 2012. Potensi daun binahong (*Androdera cordifolia* (Tenore) Steenis) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *In vitro*. *Indonesia Medicus Veterinus*. **1** (3) : 337 – 351.
- Davis,W.W and Stout, T.R. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotic assay : I. factors influencing variability and error. *Appl Microbial*. **22** (4) : 659 – 665.
- Eng Khoo, H., A. Azlan dan A. Ismail. 2015. *Sauropus androgynus* leaves for health benefits : Hype and the Science. *The Natural Product Journal*. **5** (1) : 115 – 123.
- Faisal, S. 1981. Dasar dan Teknik Penelitian Keilmuan Sosial. Usaha Nasional : Surabaya. 84 hlm.
- Fatimah, S., Yuliana, P dan Aris M. 2014. Efektifitas ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynus*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Jurnal unimus*. **1** (1) : 1- 5.
- Fitri, L. da Y.Yasmin. 2011. Isolasi dan pengamatan morfologi koloni bakteri konolitik. *Jurnal Ilmiah Pend Biologi. Biologi Edukasi*. **3** (2) : 20 – 25.
- Gaspersz, V. 1991. Teknik Analisis dalam Penelitian Percobaan. Tarsito : Bandung. 623 hlm.
- Gusrina. 2008^a. Budidaya Ikan. Jilid 1. PT. Macanan Jaya Cemerlang : Klaten. 221 hlm.
- _____. 2008^b. Budidaya Ikan. Jilid 3. PT. Macanan Jaya Cemerlang : Klaten. 510 hlm.

- Herupradoto, B. A. dan G. A. Yuliani. 2010. Karakterisasi Protein Spesifik *Aeromonas hydrophila* Penyebab Penyakit Ulser pada Ikan Mas. *Veteriner*. **11** (3): 158-162
- Holt, J.G. 1979. The Sorter Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. The William and Wilkins Company Baltimore. USA. 157 hlm.
- Inglis, V., R.J. Roberts dan N.R Bromage. 2001. Bacterial Disease of Fish. Blackwell Science Ltd : London. 312 hlm.
- Kabata, Z. 1985. Parasiter and Disease of fish Culture in Tropics. London: Taylor and Franchis Ltd. 317 hlm.
- Kismiyati S. Subekti, R.W.N Yusuf, dan R. Kusdawarti. 2009. Isolasi dan identifikasi bakteri gram negatif pada luka ikan mas koki (*Carrasius auratus*) akibat infeksi ektoparasit *Argulus* sp. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Ilmu Kelautan*. **1** (2) : 129 – 34.
- Kordi, K.M.G.H. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. PT. Rineka Cipta dan PT. Bina Adiaksara : Jakarta. 190 hlm.
- Kusmiyati dan N.W.S Agustini. 2007. Uji aktivitas senyawa antibakteri dari mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. **8** (1) : 48 – 53.
- Laili, U. 2007. Pengaruh pemberian ekstrak temulawak (*Curcuma xanthorrhiza Roxb*) terhadap prevalensi dan kelulushidupan ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Malang : Malang. 53 hlm. Tidak dipublikasikan.
- Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2012. Pelacakan gen *Aerolysin* dari *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas yang diberi pakan ekstrak bawang putih. *Jurnal Veteriner*. **13** (1) : 43 – 50.
- Lukman, J.B., Zaraswati.D., Indah R., dan Doddy. 2015. Efektifitas ekstrak alga *Euncheuma cotton*, *Turbinaria decurrens* dan *Ulva reticulate* sebagai antimikroba terhadap *Streptococcus mutans*. *Jurnal Digital Unhas*. **1** (1) : 1 – 7.
- Miranti, M., Prasetyorini, dan C. Suwary. 2013. Perbandingan aktivitas antibakteri ekstrak etanol 30 % dan 96 % kelopak bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*. *Ekologia*. **13** (1) : 9 – 18.
- Muhlisah, F. 2007. Tanaman Obat Keluarga (TOGA). Penebar Swadaya : Jakarta. 81 hlm.
- Mulyadi, M., Wuryanti dan P.S Ria. 2013. Konsentrasi hambat minimum (KHM) alang – alang (*Imperata cylindrica*) dalam etanol melalui difusi cakram. *Chem Info*. **1** (1) : 35 – 42.
- Noverita, D., Fitria dan E. Sinaga. 2009. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri jamur Endofit dan daun rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia*. **4** (4) : 171 – 176.

- Nuria, MC., A.Faizatun dan Sumantri. 2009. Ujin aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella thypi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu – Ilmu Pertanian Mediargo*. **5** (2) : 26 -37
- Nusantri, M. 2015. Potensi ekstrak daun katuk (*Sauropus androgynous* (L). Merr.) terhadap aktivitas mikrobisida sel neutrofil yang dipapar *Streptococcus mutans*. *Skripsi*. Universitas Jember : Jember. 75 hlm. Tidak dipublikasikan
- Pelczar, M.J dan E.C.S. Chan. 1986. Dasar – Dasar Mikrobiologi I. Universitas Indonesia. Jakarta. 443 hlm.
- Prajitno, A. 2005. Diktat Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan. Universitas Brawijaya : Malang. 103 hlm.
- _____. 2007. Penyakit Ikan – Udang Bakteri. Universitas Negeri Malang Press : Malang. 115 hlm.
- Redha,A. 2010. Flavonoid : Struktur Antioksidatif dan Perannya dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. **9** (2) : 196 – 202.
- Retnani, Y., I.G.Permana., N.R Kumalasari dan Taryati. 2004. Teknik Membuat Biskuit Pakan Ternak dari Limbah Pertanian. Penebar Swadaya : Bogor. 81 hlm.
- Rijayanti, R.P. 2014. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun mangga bacang (*Mangifera foetida* L.) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *In vitro*. *Jurnal Untan*. **1** (1) : 1 – 18
- Rosidah dan W.M.Afizia. 2012. Potensi ekstrak daun jambu biji sebagai antibakterial untuk menanggulangi serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan Gurame (*Osphronemus gouramy lacepede*). *Jurnal Akuatika*. **III** (1) : 19 – 27.
- Roslizawaty., N.Y. Ramadani., Fakhurrrazi dan Herrialfian. 2013. Aktivitas antibakterial ekstrak etanol dan rebusan sarang semut (*Myremecodia* sp.) terhadap bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Medika Veterinaria*. **7** (2) : 91 – 94.
- Rukmana, R dan I. M. Harahap. 2003. Katuk, Potensi dan Manfaatnya. Kanisius : Yogyakarta. 36 hlm.
- Santoso, H.B. 2008. Ragam dan Khasiat Tanaman Obat. Sehat Alami dari Halaman Asri. PT Agromedia Pustaka : Jakarta. 142 hlm.
- Sawitti, M.Y., H. Mahatmi dan I.N.K. Besung. 2013. Daya hambat perasn daun sambiloto terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. *Indonesia Medicus Veterinus*. **2** (2) : 142 – 150.
- Sukendar. 1997. Pengenalan morfologi katuk (*Sauropus androgynous* Merr L). *Warta Tumbuhan Obat Indonesia*. **3** (3) : 53 – 58.

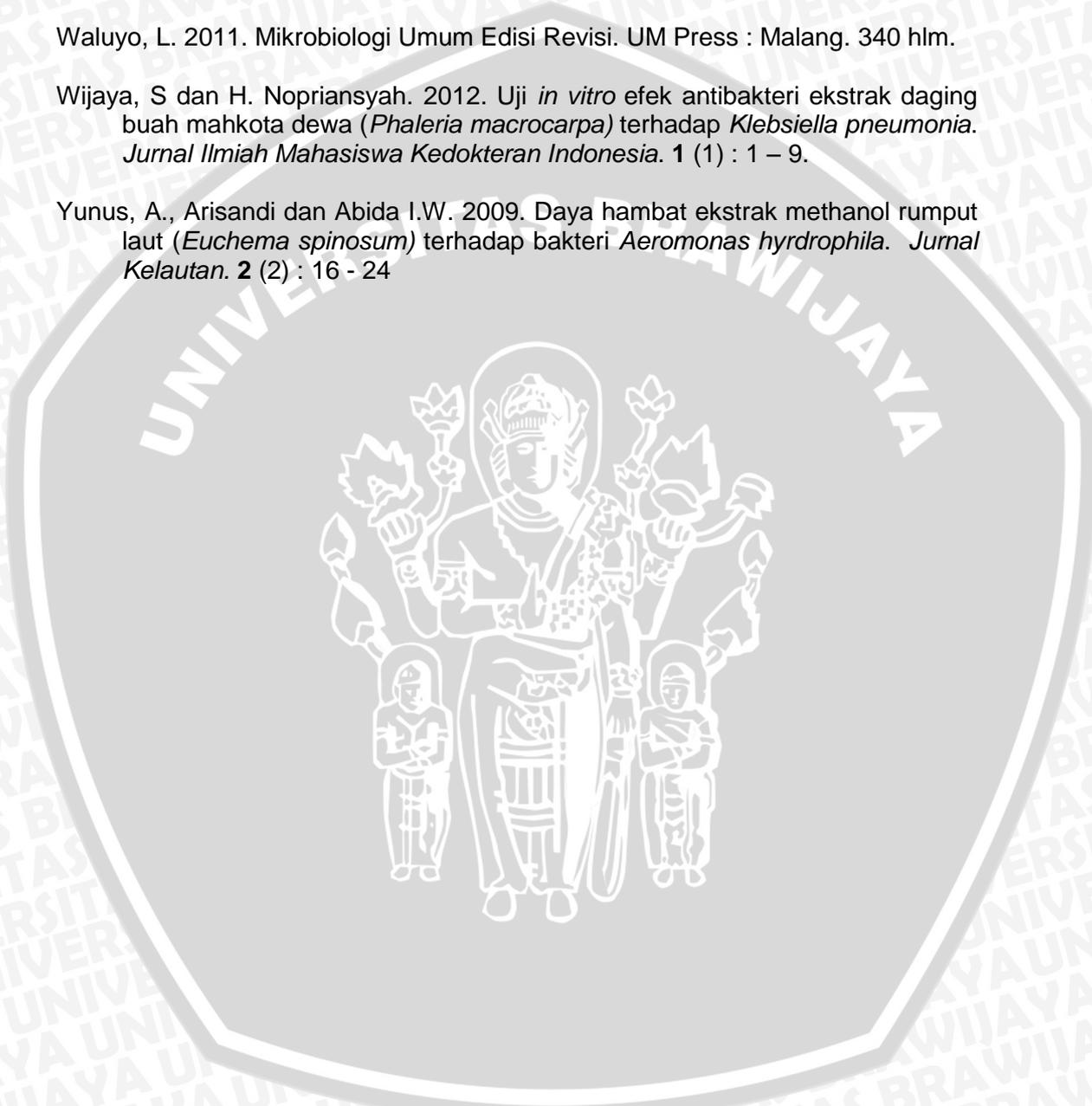
Susanti, N.M.P ., Budiman, I. N. A dan Warditiani, N.K. 2014. Skrining fitokimia ekstrak etanol 90% daun katuk (*Sauropus androgynous* (L.) Merr.). *Jurnal Farmasi Udayana*. 1 (1) : 83 – 86.

Tanjung, K.N., Sudarono dan L. Sulmartiwi. 2008. Efektivitas ekstrak kulit jeruk lemon (*Citrus limonum*) terhadap daya hambat pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* secara *In vitro*. *Berkala Ilmiah Perikanan*. 3 (1) : 89 – 93.

Waluyo, L. 2011. Mikrobiologi Umum Edisi Revisi. UM Press : Malang. 340 hlm.

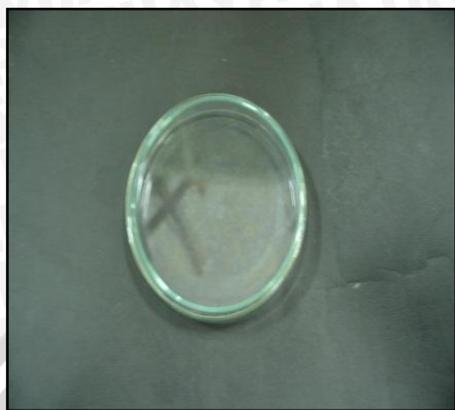
Wijaya, S dan H. Nopriansyah. 2012. Uji *in vitro* efek antibakteri ekstrak daging buah mahkota dewa (*Phaleria macrocarpa*) terhadap *Klebsiella pneumonia*. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kedokteran Indonesia*. 1 (1) : 1 – 9.

Yunus, A., Arisandi dan Abida I.W. 2009. Daya hambat ekstrak methanol rumput laut (*Euchema spinosum*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Kelautan*. 2 (2) : 16 - 24



LAMPIRAN

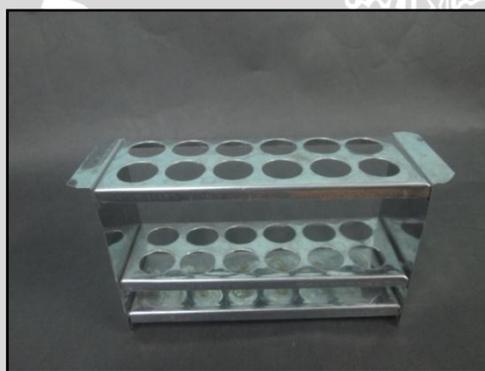
Lampiran 1. Foto Alat Penelitian



Cawan Petri



Autoclave



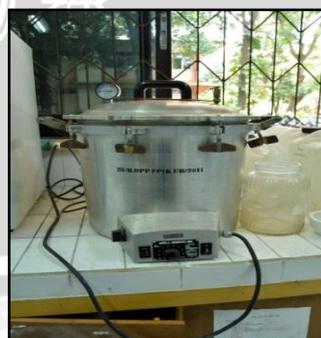
Rak Tabung Reaksi



Inkubator



Oven



Autoclave Destruksi

Lampiran 1. (Lanjutan)



Lemari Pendingin Penyimpanan Bakteri



Lemari Pendingin Penyimpanan Bahan



Timbangan Sartorius



Timbangan Digital



Laminar Air Flow



Hot Plate

Lampiran 1. (Lanjutan)



Vortex Mixer



Micropipet



Jangka Sorong Digital



Bunsen dan Korek api



Gelas ukur



Erlenmeyer

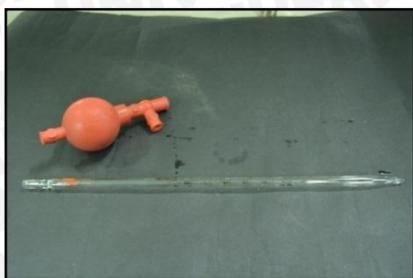


**Jarum ose, Spatula
Dan Pinset**



Corong Kaca

Lampiran 1 (Lanjutan)



Pipet Volume dan Bola Hisap



Beaker Glass



Tabung Reaksi



Blue Tip



Botol film



Gunting

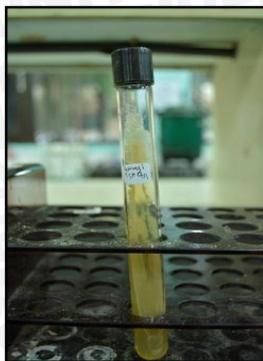


Nampan



Rotary Vacum Evaporator

Lampiran 2. Foto Bahan Penelitian



Isolat Murni Bakteri
A. hydrophila



Media TSA



Kapas dan Benang Kasur



Alkohol 70 %



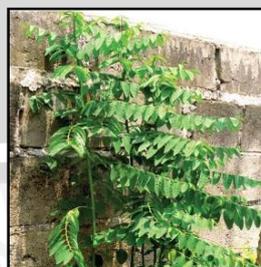
DMSO 10 %



Media TSB



Serbuk daun Katuk
(*S. androgynus*)



Tanaman Katuk
(*S. androgynus*)

Lampiran 3. Foto Kegiatan Penelitian



Proses maserasi daun katuk (*S. androgynus*)



Penyaringan filtrat daun katuk (*S. androgynus*)



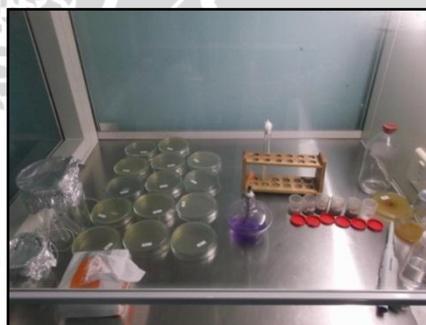
Proses evaporasi filtrat



Peremajaan Bakteri *A. hydrophila*



Penuangan media pada cawan



Persiapan Uji *In vitro*



Penimbangan ekstrak daun katuk (*S. androgynus*)



Penghomogenan ekstrak dengan pelarut

Lampiran 3. (Lanjutan)



Kultur Bakteri ke media TSB



Penanaman bakteri pada cawan



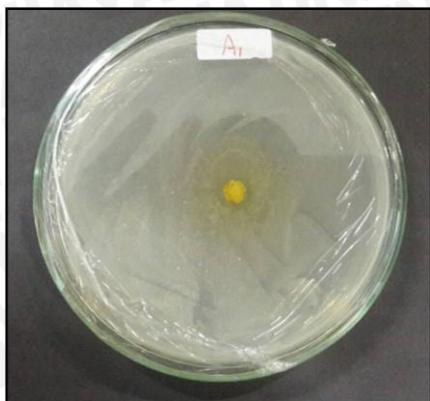
Peletakkan kertas cakram pada media uji



Pengukuran Diameter Zona Hambat



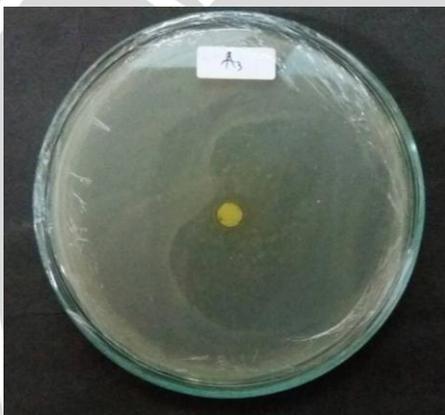
Lampiran 4. Hasil Uji Cakram Ekstrak Kasar Daun Katuk (*S. androgynus*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila*



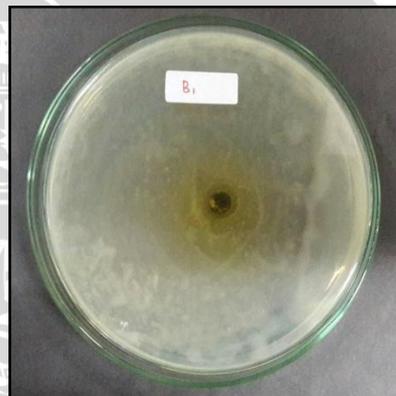
Perlakuan A1 = 9,26 ppt



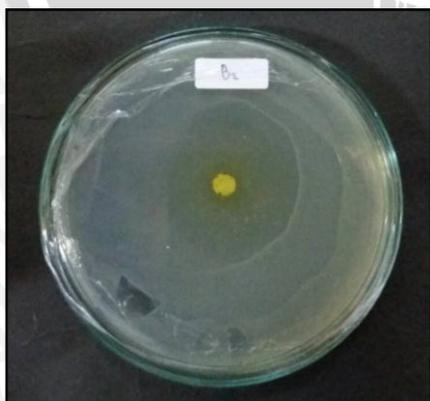
Perlakuan A2 = 9,26 ppt



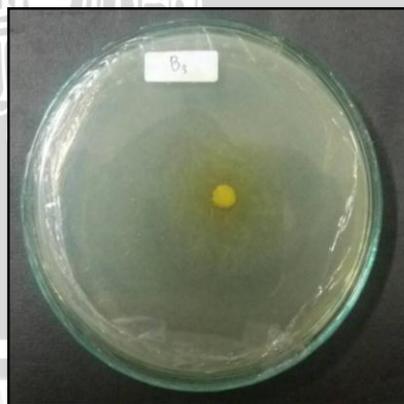
Perlakuan A3 = 9,26 ppt



Perlakuan B1 = 18,52 ppt

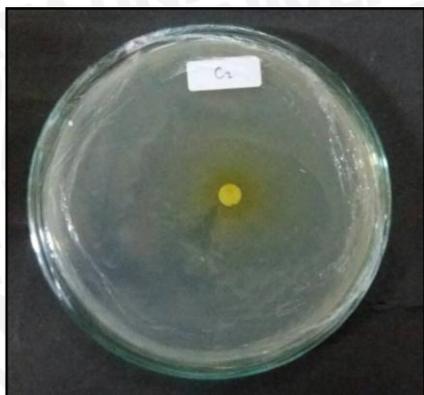


Perlakuan B2 = 18,52 ppt

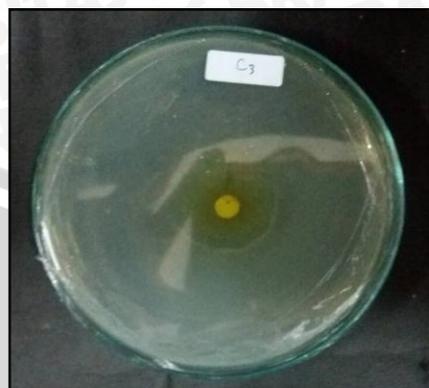


Perlakuan B3 = 18,52 ppt

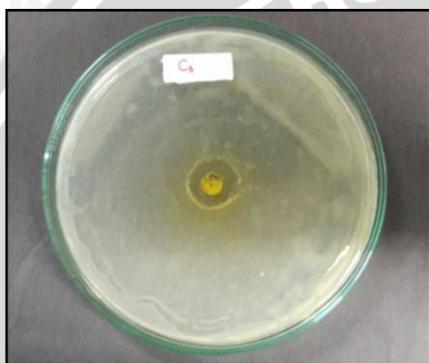
Lampiran 4 (Lanjutan)



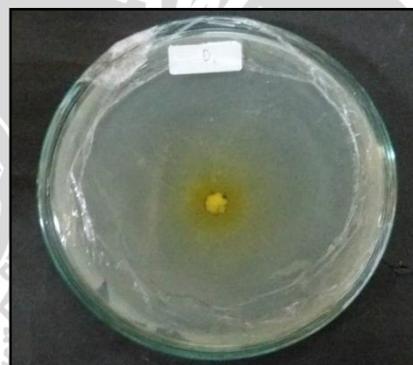
Perlakuan C1 = 27,77 ppt



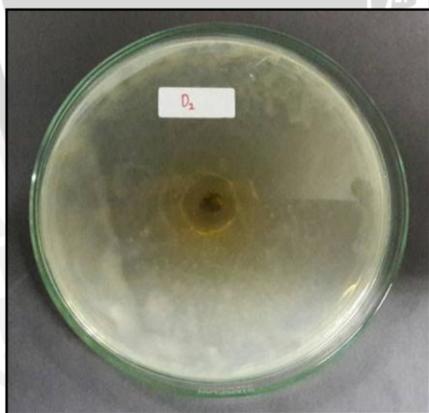
Perlakuan C2 = 27,77 ppt



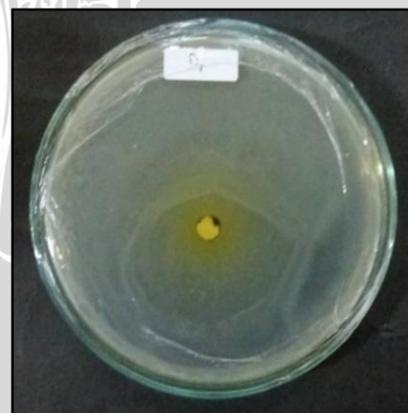
Perlakuan C3 = 27,77 ppt



Perlakuan D1 = 37, 03 ppt

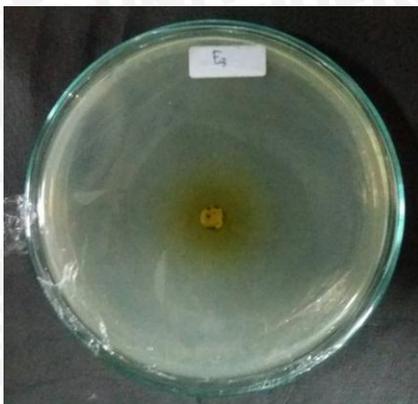


Perlakuan D2 = 37, 03 ppt

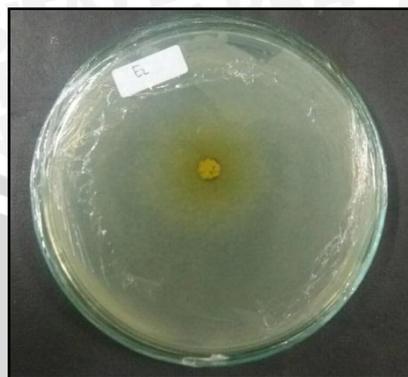


Perlakuan D3 = 37, 03 ppt

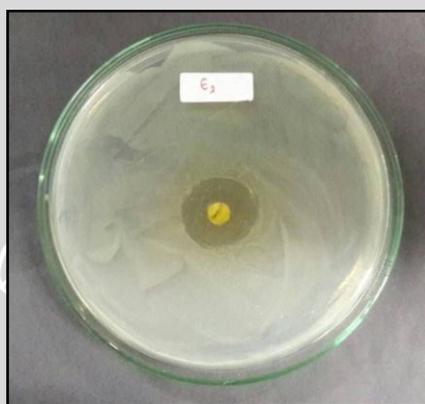
Lampiran 4 (Lanjutan)



Perlakuan E1 = 46,29 ppt



Perlakuan E2 = 46,29 ppt



Perlakuan E3 = 46,29 ppt

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 5. Pengolahan Data Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Katuk (*S. androgynus*) terhadap Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila* secara *In vitro* (24 jam)

- Data Rata – Rata Diameter Hambatan (mm) Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata – rata
	1	2	3		
A (9,26 ppt)	4,55	4,48	5,92	14,95	4,98
B (18,52 ppt)	6,29	7,6	6,04	19,93	6,64
C (27,77 ppt)	10,77	11,45	7,93	30,15	10,05
D (37,03 ppt)	10,82	9,65	10,51	30,98	10,33
E (46,29 ppt)	9,44	10,74	13,64	33,82	11,27
Total				129,83	

Perhitungan :

1. Perhitungan JK

FK	1123,722
JK Total	107,043
JK Perlakuan	87,372
JK Acak	19,671

Perhitungan:

1. Faktor Koreksi (FK)

$$= \frac{G^2}{N}$$

$$= \frac{129,83^2}{15}$$

$$= 1123,722$$

2. Jumlah Kuadrat (JK total) = $\sum x_{ij}^2 - FK$

$$= (A^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + E3^2) - FK$$

$$= (4,55^2 + 4,48^2 + 5,92^2 + \dots + 13,64^2) - 1123,722$$

$$= 107,043$$

3. JK Perlakuan

$$= \frac{\sum (\sum xi)^2}{r} - FK$$

$$= \frac{(TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2)}{3} - FK$$

$$= \frac{14,95^2 + 19,93^2 + 30,15^2 + 30,98^2 + 33,92^2}{3} - 1123,722$$

$$= 87,372$$

4. JK galat

$$= JK \text{ Total} - JK \text{ Perlakuan}$$

Lampiran 5 (lanjutan)

$$= 107,043 - 87,372$$

$$= 19,671$$

$$5. \text{ db Total} = (n \times r) - 1$$

$$= (5 \times 3) - 1$$

$$= 14$$

$$6. \text{ db Perlakuan} = n - 1$$

$$= 5 - 1$$

$$= 4$$

$$7. \text{ db Galat} = \text{db Total} - \text{db Perlakuan}$$

$$= 14 - 4$$

$$= 10$$

- Tabel Analisa Sidik Ragam dengan Uji F tabel

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	87,372	21,843	11,104**	3,48	5,99
Acak	10	19,671	1,967			
Total	14	107,043				

Keterangan: ** = Berbeda Sangat Nyata

Berdasarkan hasil analisa sidik ragam di atas menunjukkan bahwa nilai F hitung (11,104) lebih besar dari F tabel 5% yaitu 3,48 maupun F tabel 1% sebesar 5,99 maka H_0 ditolak, hal ini berarti bahwa perbedaan perlakuan berpengaruh sangat nyata. Setelah H_0 ditolak, selanjutnya apabila ingin diketahui antar perlakuan (rata-rata) mana yang berbeda nyata, maka untuk mengetahui hal tersebut dilakukan uji nilai tengah (rata-rata) antar perlakuan atau disebut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Lampiran 5 (lanjutan)

- Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) Ekstrak Kasar Daun Katuk (*S. androgynus*) terhadap Bakteri *A. hydrophila*

$$\text{Perhitungan SED} = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ acak}}{\text{ulangan}(r)}} = \sqrt{\frac{2 \times 1,9671}{3}} = 1,145$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= t \text{ Tabel 5\% (db acak)} \times \text{SED} \\ &= 2,228 \times 1,145 = 2,551 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 1\%} &= t \text{ Tabel 1\% (db acak)} \times \text{SED} \\ &= 3,169 \times 1,145 = 3,628 \end{aligned}$$

- Tabel Uji BNT

Perlakuan	Rata – Rata	A	B	C	D	E	Notasi
		4,98	6,64	10,05	10,32	11,27	
A	4,98	-	-	-	-		a
B	6,64	1,66 ^{ns}	-	-	-		a
C	10,05	5,07 ^{**}	3,41 [*]	-	-		b
D	10,33	5,45 ^{**}	3,68 ^{**}	0,27 ^{ns}	-		b
E	11,27	6,29 ^{**}	4,63 ^{**}	1,22 ^{ns}	0,95 ^{ns}		b

Keterangan : ns = Tidak Berbeda Nyata

* = Berbeda Nyata

** = Berbeda Sangat Nyata

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 (5%)	14,95	-2	2	-1	1
B (10%)	19,93	-1	-1	2	-4
C (15%)	30,15	0	-2	0	6
D (20%)	30,98	1	-1	-2	-4
E (25%)	33,82	2	2	1	1
Q= Σci*Ti		48,79	-13,67	-3,23	26,03
Hasil Kuadrat		10	14	10	70
Kr= (Σci ²)*r		30	42	30	210
JK=Q ² /Kr		8.70	0.00	2.34	
Total Regresi	11.04	79,348	4,449	0,347	3,226

Lampiran 5 (lanjutan)

• Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	4	87,372			3,48	5,99
Linier	1	79,348	79,348	4,033*		
Kuadratik	1	4,449	4,449	0,226 ^{ns}		
Kubik	1	0,347	0,347	0,017 ^{ns}		
Kuartik	1	3,226	3,226	0,164 ^{ns}		
2. Acak	10	19,671	0.76			
Total	14	107,043				

Keterangan : ns = tidak berbeda

* = berbeda nyata

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

Mencari persamaan linear $y = b_0 + b_1x$

X	Y	xy	x ²
9.26	4.55	42.133	85.7476
9.26	4.48	41.4848	85.7476
9.26	5.92	54.8192	85.7476
18.52	6.29	116.491	342.99
18.52	7.6	140.752	342.99
18.52	6.04	111.861	342.99
27.77	10.77	299.083	771.173
27.77	11.45	317.967	771.173
27.77	7.93	220.216	771.173
37.03	10.82	400.665	1371.22
37.03	9.65	357.34	1371.22
37.03	10.51	389.185	1371.22
46.29	9.44	436.978	2142.76
46.29	10.74	497.155	2142.76
46.29	13.64	631.396	2142.76
$\sum x = 416.61$	129.83	4057.52	14141.7
Rerata = 27.774	8.65533		

$$B_1 = \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y)/n}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$= \frac{4057,52 - (416,61 \cdot 129,83)/15}{14141,7 - \frac{(416,61)^2}{15}}$$

Lampiran 5 (lanjutan)

$$= \frac{4057,52 - 3605,898}{14141,7 - 11570,93}$$

$$= \frac{451,622}{2570,77}$$

$$= 0,176$$

$$B_0 = \bar{y} - b_1 \bar{x}$$

$$= 8,655 - (0,176 \cdot 15)$$

$$= 8,655 - 4,875 = 2,635$$

$$\text{Persamaan linier : } y = b_0 + b_1x \rightarrow y = 2,635 + 0,176x$$

$$R^2 = \frac{JK \text{ regresi}}{JK \text{ total terkorelasi}}$$

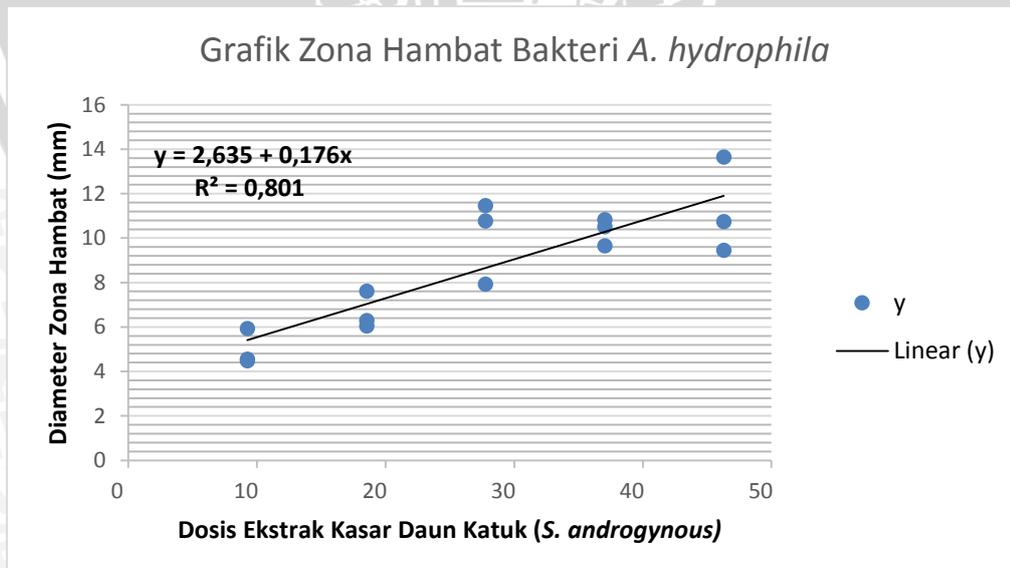
$$= \frac{JK \text{ regresi}}{JK \text{ regresi} + JK \text{ acak}}$$

$$= \frac{79,348}{79,348 + 19,671}$$

$$= \frac{79,348}{99,019}$$

$$= 0,801$$

- Grafik Uji Efektifitas Ekstrak Kasar Daun Katuk (*S. androgynus*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila* Secara *In Vitro*



Lampiran 6. Pengolahan Data Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Katuk (*S. androgynus*) terhadap Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila* secara *In vitro* (48 jam)

- Data Rata – Rata Diameter Hambatan (mm) Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata – rata
	1	2	3		
A (9,26 ppt)	2,18	2,96	2,27	7,41	2,47 ± 0,43
B (18,52 ppt)	2,49	4,19	3,74	10,42	3,47 ± 0,88
C (27,77 ppt)	3,22	3,4	3,45	10,07	3,36 ± 0,12
D (37,03 ppt)	6,87	4,87	3,98	15,72	5,24 ± 1,48
E (46,29 ppt)	2,85	9,15	2,85	14,85	4,95 ± 3,64
Total				58,47	

Perhitungan :

1. Perhitungan JK

FK	227,916
-----------	---------

JK Total	49,047
-----------------	--------

JK Perlakuan	16,260
---------------------	--------

JK Acak	32,786
----------------	--------

Perhitungan :

$$\begin{aligned}
 1. \text{ Faktor Koreksi (FK)} &= \frac{G^2}{N} \\
 &= \frac{58,47^2}{15} \\
 &= 227,916
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \text{ Jumlah Kuadrat (JK total)} &= \sum x_{ij}^2 - FK \\
 &= (A^2 + B^2 + C^2 + \dots + E^2) - FK \\
 &= (2,18^2 + 2,96^2 + 2,27^2 + \dots + 2,85^2) - 227,916 \\
 &= 49,047
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 8. \text{ JK Perlakuan} &= \frac{\sum (\sum x_i)^2}{r} - FK \\
 &= \frac{(TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2)}{3} - FK \\
 &= \frac{7,41^2 + 10,42^2 + 10,07^2 + 15,72^2 + 14,85^2}{3} - 227,916 \\
 &= 16,260
 \end{aligned}$$

Lampiran 6 (Lanjutan)

3. JK galat = JK Total -JK Perlakuan
= 49,047 – 16,260
= 32,786
4. db Total = (n x r) - 1
= (5 x 3) - 1
= 14
5. db Perlakuan = n - 1
= 5 – 1
= 4
6. db Galat = db Total - db Perlakuan
= 14 - 4
= 10

- Tabel Analisa Sidik Ragam dengan Uji F tabel

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	16,260	4,065	1,239 ^{ns}	3,48	5,99
Acak	10	32,785	3,278			
Total	14	49,047				

Keterangan: ns = Tidak berbeda nyata

Berdasarkan hasil analisa sidik ragam di atas menunjukkan bahwa nilai F hitung (1,239) lebih kecil dari F tabel 5% yaitu 3,48 maupun F tabel 1% sebesar 5,99. Hal ini menunjukkan setelah inkubasi selama 48 jam terjadi penurunan zona hambat. Sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstra kasar daun katuk bersifat bakteriostatik.