UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK KASAR DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*) TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila* SECARA *IN VITRO*

SKRIPSI

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Oleh :

SELLY TRIWIJAYANTI

NIM. 125080501111014

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK KASAR DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*) TERHADAP 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 Kelutan
Universitas Brawijaya

Oleh :

SELLY TRIWIJAYANTI

NIM. 125080501111014

FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

SKRIPSI

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK KASAR DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*) TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila* SECARA *IN VITRO*

Oleh :

SELLY TRIWIJAYANTI

NIM. 125080501111014

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 10 Mei 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. :
Tanggal :

Menyetujui,

Dosen Penguji I

(Dr. Ir. Maftuch, M. Si)
NIP. 19660825 199203 1 001
Tanggal : 02 JUN 2016

Dosen Pembimbing I

(Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS)
NIP. 19550213 198403 1 001
Tanggal: 02 JUN 2016

Dosen Penguji II

(Ir. Heny Suprastyani, MS)
NIP. 19620904 198701 2 001
Tanggal: 02 JUN 2016

Dosen Pembimbing II

(Muhammad Fakhri, S.Pi., MP., M.Sc)
NIP. 19860717 201504 1 001
Tanggal: 02 JUN 2016

Mengetahui,
Ketua Jurusan
Manajemen Sumberdaya Perairan

(Dr.Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS)
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal:
02 JUN 2016

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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

Malang, Mei 2016

Mahasiswa

Selly Triwijayanti

UCAPAN TERIMAKASIH

Syukur Alhamdulillah saya ucapkan ke hadirat Allah SWT, karena atas limpahan rahmat serta karunia-Nya, sehingga saya dapat menyelesaikan laporan hasil Skripsi dengan baik dan tepat waktu tanpa ada halangan yang berarti. Penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS., dan Muhammad Fakhri, S. Pi., MP., M. Sc., selaku dosen pembimbing I dan II yang telah memberikan arahan, petunjuk dan bimbingan sejak penyusunan usulan hingga penyelesaian laporan Skripsi ini
2. Dr. Ir. Maftuch, M. Si dan Ir. Heny Suprastyani, MS., selaku dosen penguji I dan II yang telah memberikan masukan hingga laporan Skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
3. Orang tua saya, Tuti Fuji Astuti, S. Pd., dan kakak saya Yessy Dwijayanti, S. Pd., yang telah memberi doa dan dukungan baik moril maupun materi.
4. Laboran Lab. Parasit dan Penyakit Ikan (Ibu Titin) FPIK Universitas Brawijaya, yang bersedia membantu dari awal hingga akhir penelitian.
5. Tim Penyakit juga saya ucapkan banyak terima kasih yang selalu memberikan bantuan hingga terselesaikannya laporan skripsi ini.
6. Teman - teman BP 2012, sahabat – sahabat (Debbi, Rosa, Ulfah, Amalina, Nikzha, Vita dan Ami), Teman Kost (Rosita, Green, Irene, Elfrida, Kak Ila, dan Kak Enggar) telah banyak memberikan bantuan ikut berperan dalam memperlancar penelitian dan penulisan laporan ini.

Malang, Mei 2016

Penulis

repository.ub.ac.id

RINGKASAN

SELLY TRIWIJAYANTI. Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro***.** Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.** dan **Muhammad Fakhri, S.Pi, MP., M. Sc.**

Pencapaian produksi terhadap target belum mampu dicapai yaitu dengan rata-rata capai 89,4%. Ada beberapa hal yang menjadi penyebab tidak tercapainya target volume produksi pada kurun waktu tersebut Salah satu kendala tersebut adalah masalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophila.* Upaya untuk mencegah dan menanggulangi serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada kegiatan budidaya ikan nila diantaranya adalah dengan penggunaan antibiotik. Namun, penggunaan antibiotik sebagai pengendalian infeksi berbagai bakteri ini tidak cukup efektif, karena antibiotik dapat menyebabkan bakteri patogen tersebut bersifat resisten. Salah satu alternatif pemecahannya yaitu dengan menggunakan bahan-bahan alami. Kelebihan menggunakan bahan-bahan alami yaitu aman bagi lingkungan, bersifat antibakteri, murah dan mudah untuk didapatkan. Salah satunya yaitu daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) mengandung saponin, alkaloid, flavonoid pada batang dan daun, fenol dan terpenoid pada daun. Oleh karena itu diadakan penelitian ini untuk menjelaskan pengaruh dan menentukan dosis yang efektif dalam penggunaan ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap daya hambat bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari sampai bulan Maret 2016. Tujuan penelitian ini adalah untuk menjelaskan pengaruh dan menentukan dosis yang efektif dalam penggunaan ekstrak daun kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap daya hambat bakteri *Aeromonas 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 kenikir yaitu : dosis (A) 10 ppt ; (B) 20 ppt ; (C) 30 ppt ; (D) 40 ppt dan (E) 50 ppt. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun kenikir memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan rata-rata diameter daya hambat terbesar yaitu pada dosis 50 ppt yaitu sebesar 10.17 mm. Hubungan antara perbedaan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap diameter daya hambat bakteri *A. hydrophila* menghasilkan hubungan atau grafik secara linear, dimana persamaannya didapatkan y = 3,245 + 0,14x nilai koefisien determinasi R^2 = 91,9% dan nilai korelasi r = 0, 919.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini bahwa hasil uji efektivitas antibakterial dengan menggunakan uji cakram menunjukkan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dengan dosis yang efektif yaitu sebesar 40 ppt.

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

KATA PENGANTAR

Puji Syukur saya panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena atas limpahan rahmat dan karunia-Nya, sehingga saya dapat menyusun laporan skripsi dengan judul Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*) Terhadap Bakteri *A. hydrophila* Secara *in Vitro* ini terselesaikan.

Laporan ini disusun berdasarkan hasil penelitian yang dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Februari – Maret 2016. Laporan skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan pada Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya.

Saya menyadari bahwa laporan skripsi ini masih belum sempurna, sehingga saya mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi perbaikan dan kesempurnaan laporan skripsi ini di masa mendatang. saya berharap laporan skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan informasi yang berguna bagi pembaca.

Malang, Mei 2016

Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

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

HALAMAN PENGESAHAN ..... **iii**

PERNYATAAN ORISINALITAS ..... **iv**

UCAPAN TERIMAKASIH ..... **v**

RINGKASAN ..... **vi**

KATA PENGANTAR ..... **vii**

DAFTAR ISI ..... **viii**

DAFTAR GAMBAR ..... **x**

DAFTAR TABEL ..... **xi**

DAFTAR LAMPIRAN ..... **xii**

1. PENDAHULUAN **1**
1.1 Latar Belakang 1
1.2 Perumusan Masalah 3
1.3 Tujuan Penelitian 3
1.4 Hipotesis 4
1.5 Waktu dan Tempat penelitian 4

2. TINJAUAN PUSTAKA
2.1 Biologi *Aeromonas hydrophila* 5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi 5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran 6
2.1.3 Reproduksi Bakteri 6
2.1.4 Fase Pertumbuhan Bakteri 7
2.1.5 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan bakteri 8
2.1.6 Infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* 9
2.2 Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) 9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi 9
2.2.2 Habitat dan Penyebaran 10
2.2.3 Bahan Aktif Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) 11
2.2.4 Mekanisme Senyawa Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) sebagai Antimikroba 11
2.3 Uji Efektifitas Antibakteri dengan Uji Cakram 12

3. METODE PENELITIAN
3.1 Materi Penelitian 14
3.1.1 Alat penelitian 14
3.1.2 Bahan Penelitian 15
3.2 Metode Penelitian 15
3.3 Rancangan Penelitian 16
3.4 Prosedur Penelitian 18
3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan 18
3.4.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan 19
3.4.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*) 20
3.4.4 Pembuatan Media 21
3.5 Pelaksanaan Penelitian 24
3.5.1 Prosedur Pelaksanaan Uji Cakram 24
3.5.2 Uji Difusi Kertas Cakram 25
3.5.3 Parameter Uji 25
3.6 Analisa Data 25

4. HASIL DAN PEMBAHASAN
4.1 Daya Antibakterial Ekstrak Kasar Daun Kenikir 27
4.2 Hasil dari Parameter Penunjang 34

5. KESIMPULAN DAN SARAN
5.1 Kesimpulan 36
5.2 Saran 36

DAFTAR PUSTAKA 37

LAMPIRAN 41

DAFTAR GAMBAR

Gambar **Halaman**

1. Bakteri *A. hydrophila* 5
2. Daun Kenikir (*C. caudatus*) 10
3. Denah Penelitian Uji Cakram 17
4. Grafik Uji Polynomial Orthogonal 33

DAFTAR TABEL

Tabel **Halaman**

1. Alat-alat yang digunakan untuk penelitian 14
2. Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian 15
3. Hasil Rata – Rata Zona Bening Bakteri *A. hydrophila* 27
4. Klasifikasi Respon Hambatan 31
5. Hasil Perhitungan Sidik Ragam Zona Bening Bakteri *A. hydrophila* 31
6. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) 32

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran **Halaman**

1. Hasil Uji Biokimia Bakteri *A. hydrophila*..... 41
2. Alat Penelitian..... 42
3. Bahan Penelitian..... 47
4. Pembuatan Ekstrak Daun Kenikir (*C. caudatus*) 50
5. Analisis Data Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*) Terhadap Diameter Hambatan (mm) Bakteri *A. hydrophila* secara *In Vitro*..... 52
6. Hasil Uji Cakram Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila* 55
7. Penentuan Dosis Ekstrak Daun Kenikir (*C. caudatus*) 58

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Produksi ikan nila dari tahun 2010 hingga tahun 2013 mengalami peningkatan yang cukup signifikan dengan rata-rata kenaikan 34,85%. Jika dilihat dari trend capaian produksi terhadap target tahunan menunjukkan bahwa selama kurun waktu tahun 2010 - tahun 2013 target tersebut belum mampu dicapai yaitu dengan rata-rata capai 89,4%. Ada beberapa hal yang menjadi kendala tidak tercapainya target volume produksi pada kurun waktu tersebut (KKP, 2013).

Salah satu kendala tersebut adalah masalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila.* Masalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri sering menjadi faktor penyebab menurunnya produksi ikan budidaya. (Prajitno, 2007). *A. hydrophila* merupakan bakteri yang secara normal ditemukan dalam ait tawar. Infeksi *A. hydrophila* dapat terjadi akibat perubahan kondisi lingkungan, stress, perubahan temperature air yang terkontaminasi dan ketika *host* (inang) tersebut telah terinfeksi oleh virus, bakteri, atau parasit lainnya (infeksi sekunder), oleh karena itu bakteri ini disebut dengan bakteri yang bersifat pathogen *oportunistik.* Penularan bakteri *A. hydrophila* sangat cepat melalui perantara air, kontak bagian tubuh ikan, atau peralatan budidaya yang terkontaminasi bakteri. Bakteri ini bersifat pathogen, menyebar secara cepat pada padat penebaran yang tinggi dan dapat mengakibatkan kematian benih sampai 100% (Haryani, Grandiosa, Buwono, dan Santika, 2012).

Upaya untuk mencegah dan menanggulangi serangan bakteri *A. hydrophila* pada kegiatan budidaya ikan nila diantaranya adalah dengan penggunaan antibiotik. Namun, penggunaan antibiotik sebagai pengendalian infeksi berbagai bakteri ini tidak cukup efektif, karena antibiotik dapat

menyebabkan bakteri patogen tersebut bersifat resisten. (Aniputri, Hutabarat, dan Subandiyono, 2014).

Salah satu alternatif pemecahannya yaitu dengan menggunakan bahan - bahan alami. Kelebihan menggunakan bahan - bahan alami yaitu aman bagi lingkungan, bersifat antibakteri, murah dan mudah untuk didapatkan. Salah satunya yaitu daun Kenikir (*C. caudatus*) yang mengandung saponin, alkaloid, flavonoid pada batang dan daun, serta fenol dan terpenoid pada daun. Kenikir memiliki aktifitas antimikroba baik pada bakteri Gram positif, bakteri Gram negatif dan fungi (Karimy, Julendra, Hayati, Sofyan, Damayanti dan Priyowidodo, 2013).

Berdasarkan penelitian sebelumnya bahwa ekstrak daun kenikir berpengaruh terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* secara *in vitro* dengan konsentrasi ekstrak daun kenikir yang daya hambatnya paling optimal ialah konsentrasi 90% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 11,5 mm dan konsentrasi 100% rata-rata diameter zona hambat sebesar 11,7 mm (Dwiyanti, Ibrahim dan Trimulyono, 2014).

Penelitian mengenai daya hambat bakteri *A. hydrophila* menggunakan ekstrak kasar daun kenikir belum pernah dilakukan. Oleh karena itu dilakukan penelitian ini untuk menjelaskan pengaruh ekstrak kasar daun kenikir terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro* dan menentukan dosis yang efektif dalam penggunaan ekstrak daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*.

1.2 Perumusan Masalah

Penyakit merupakan salah satu kendala dalam kegiatan budidaya. Salah satu penyebabnya yaitu adanya patogen penyakit seperti bakteri *A. hydrophila,* yaitu salah satu bakteri yang dapat menimbulkan berbagai penyakit pada ikan air tawar. 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 kenikir (*C. caudatus*) yang mengandung senyawa alkaloid, saponin, flavonoid dan fenol yang merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan latar belakang di atas maka didapatkan perumusan masalah sebagai berikut:

- Apakah pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) dapat berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila*?
- Berapa dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) yang efektif dalam menghambat bakteri *A. hydrophila*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini yaitu:

- Untuk menjelaskan pengaruh pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*.
- Untuk Menentukan dosis yang efektif dalam pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang dapat diambil dari penelitian ini antara lain:

H_0 : Pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) dengan dosis yang berbeda tidak berpengaruh terhadap daya hambat dari bakteri *A. hydrophila.*

H_1 : Pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) dengan dosis yang berbeda berpengaruh terhadap daya hambat dari bakteri *A. hydrophila.*

1.5 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilakukan pada bulan Januari - Maret 2016 di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi *A. hydrophila*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *A. hydrophila* adalah sebagai berikut ini (Garrity, Bell, dan Lilburn, 2004):

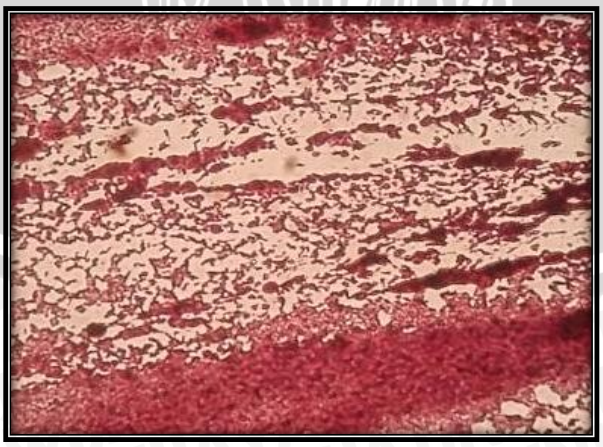
Order : Aeromonadales

Family : Aeromonadaceae

Genus : Aeromonas

Spesies : *A. hydrophila*

Aeromonas adalah bakteri yang memiliki sifat oksidatif dan anaerobik fakultatif, sehingga dapat hidup dilingkungan perairan dengan atau tanpa oksigen. Bakteri ini tidak memiliki kemampuan untuk membentuk spora. *Aeromonas* sp. dapat dijumpai dilingkungan air payau dan air tawar. Bakteri ini memiliki kemampuan untuk bergerak. Bakteri ini berbentuk batang dan memiliki diameter sel berkisar 0,3 - 1 µm dan 1 - 3,5 µm. Bakteri ini memiliki alat gerak berupa flagel (Afrianto, Liviawaty, Jamaris, dan Hendi, 2015). Bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Gambar 1 berikut ini.



Gambar 1. Bakteri *A. hydrophila* dengan Perbesaran 1000x (Dokumentasi pribadi, 2016).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Genus *Aeromonas* mempunyai habitat di lingkungan perairan tawar. Keberadaan *Aeromonas* di suatu perairan erat hubungannya dengan jumlah kandungan bahan orgnaik di perairan atau sedimen dasar. Bakteri ini diakui sebagai pathogen dari hewan aquatik yang berdarah dingin. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* ini lebih banyak menyerang ikan di daerah tropis dan daerah sub tropis dibandingkan dengan daerah dingin, karena daerah tropis dan daerah sub tropis kandungan bahan organiknya lebih tinggi dibandingkan dengan daerah dingin (Prajitno, 2005).

Bakteri ini memiliki alat gerak berupa flagel dan memiliki suhu optimum pertumbuhan 28^{o}C, akan tetapi mampu bertahan hidup pada suhu 4^{o}C dan 37^{o}C. Bakteri *Aeromonas* menyukai lingkungan kolam yang tercemar bahan organik. Bakteri ini dapat bertahan hidup dalam air atau sedimen selama beberapa hari hingga beberapa minggu, tetapi tidak dapat berkembangbiak (Afrianto, liviawaty, Jamaris dan Hendi, 2015).

2.1.3 Reproduksi Bakteri

Bakteri *A. hydrophila* berkembang biak secara aseksual, yaitu berkembangbiak dengan memanjangkan sel yang diikuti dengan pembelahan inti yang disebut pembelahan biner. Waktu yang diperlukan untuk pembelahan satu sel menjadi dua sel kurang lebih 10 menit (Prajitno, 2005).

Bakteri dapat bereproduksi secara aseksual. Reproduksi aseksual biasa dilakukan bakteri dengan cara pembelahan biner. Pembelahan biner dapat berlangsung melalui tiga fase yaitu:

a) Fase pertama : sitoplasma terbelah oleh sekat yang tumbuh tegak lurus.
b) Fase kedua : tumbuhnya sekat akan diikuti oleh dinding menlintang.
c) Fase ketiga : terbentuk dua sel baru yang identik.

Pada kondisi normal, bakteri dapat melakukan pembelahan setiap 20 menit sekali (Sudjadi dan Laila, 2006).

2.1.4 Fase Pertumbuhan Bakteri

Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri fakultatif anaerob, yaitu bakteri yang dapat berkembang dalam keadaan dengan atau tanpa oksigen, meskipun perkembangannya lebih cepat pada lingkungan yang ada oksigen. Bakteri fakultatif anaerob akan tersebar di seluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair, bersifat heterotropik, yaitu mampu mengoksidasi bermacam-macam persenyawaan organik sebagai sumber karbon. Pertumbuhan maksimal bakteri pada kisaran suhu 28^{o}C - 41^{o}C, sedang pertumbuhan minimum bakteri pada suhu 0^{o}C - 5^{o}C. Bakteri akan tumbuh dengan baik pada pH 5,5 - 9,0 (Prajitno, 2005).

Pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat. Dalam kondisi normal, bakteri membelah diri menjadi dua setiap 20 menit. Catatan waktu demikian dikenal sebagai waktu generasi. Jadi, dalam waktu 40 menit bakteri membelah diri menjadi empat sel, dalam waktu satu jam menjadi delapan sel. Pertumbuhan dapat dibagi menjadi empat fase, yaitu:

1. Fase Lag : fase bakteri beradaptasi terhadap lingkungan yang baru, pada fase ini bakteri belum mencapai pertumbuhan maksimum.
2. Fase Log : fase pertumbuhan mencapai maksimum, pada fase ini terjadi peningkatan jumlah, disebut juga fase eksponensial.
3. Fase Stasioner : fase pertumbuhan mencapai titik nol, pada fase ini tidak terjadi penambahan jumlah sel bakteri.

4. Fase Penurunan : disebut juga fase kematian, pada fase ini, sel berhenti memperbanyak diri dan rata-rata kematian meningkat (Sudjadi dan Laila, 2006).

2.1.5 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan Bakteri

a) Lingkungan

Ada beberapa faktor yang mempengaruhi laju pertumbuhan dan aktivitas bakteri diantaranya adalah pH, suhu, nutrisi, tekanan osmosis, pengeringan dan lain sebagainya. Suhu dan pH merupakan faktor yang penting bagi pertumbuhan bakteri, karena masing-masing spesies bakteri mempunyai suhu dan pH optimum untuk pertumbuhannya (Waluyo, 2007).

Pertumbuhan maksimal bakteri *A. hydrophila* pada kisaran suhu sebesar 28^{o}C - 41^{o}C. Pertumbuhan minimum bakteri pada suhu 0^{o}C - 5^{o}C. Bakteri *A. hydrophila* akan tumbuh dengan baik pada kisaran pH 5,5 - 9,0 (Prajitno, 2005).

b) Nutrien

Pada umumnya, bakteri memperoleh nutrisi atau atau makanan melalui dua cara, yaitu secara autotrof dan heterotrof. Berdasarkan cara memperoleh makanan, bakteri dapat dibedakan atas bakteri autrotof dan bakteri heterotrof. Bakteri autotrof adalah kelompok bakteri yang dapat membuat makanannya sendiri. Artinya, kelompok bakteri tersebut membuat makanannya dengan cara mengubah materi zat anorganik menjadi zat organik sebagai bahan makanannya. Sedangkan bakteri heterotrof adalah bakteri yang tidak mampu membuat makanannya sendiri. Dalam hal ini, pemenuhan kebutuhan makanan sangat bergantung pada kehadiran makhluk hidup lain, makhluk hidup yang sudah mati dan bangkai (Sudjadi dan Laila, 2006).

Dalam memproduksi energi, bakteri *A. hydrophila* ada yang bersifat autotrof dan heterotrof. Bakteri autotrof adalah bakteri yang dapat memanfatkan

dari sinar matahari sebagai sumber energinya, disebut bakteri tingkat tinggi. Sedangkan sisanya merupakan bakteri sejati (Prajitno, 2005).

2.1.6 Infeksi Bakteri *A. hydrophila*

Proses infeksi bakteri patogen *A. hydrophila* ke dalam tubuh organisme adalah diawali dengan melekatnya bakteri pada permukaan kulit dengan memanfaatkan pili, flagela dan kait untuk bergerak dan melekat kuat pada lapisan terluar tubuh ikan yaitu sisik yang dilindungi oleh zat kitin. Selama proses berlangsung bakteri *A. hydrophila* memproduksi enzim kitinase yang berperan dalam mendegradasi lapisan kitin sehingga bakteri dapat dengan mudah masuk kedalam organisme yang akan diinfeksi. Selain memanfaatkan kitinase bakteri *A. hydrophila* juga mengeluarkan enzim lainnya seperti lesitinase dalam upaya masuk kedalam aliran darah (Mangunwardoyo, Ismayasari, dan Riani, 2010).

Infeksi bakteri *Aeromonas* spp. Bersifat sekunder yaitu bakteri akan masuk dalam tubuh ikan jika ada kerusakan jaringan yang disebabkan oleh kerusakan fisik ataupun karena serangan virus atau mikroorganisme lainnya. *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 yang tinggi yang bisa mengakibatkan kematian pada benih sampai 90% (Prajitno, 2005).

2.2 Biologi Daun Kenikir (*C. caudatus*)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi dari daun kenikir adalah sebagai berikut (Sharifuldin, 2014):

Kingdom : Plantae

Subkingdom : Viridaeplantae

Infrakingdom : Streptophyta

Division : Tracheophyta

Class : Magnoliopsida

Order : Asteranae

Family : Asterales

Genus : Cosmos

Species : *C. caudatus* Kunth

ketinggian tanaman kenikir dapat mencapai 1,5 m. Batangnya segi empat dengan alur membujur dan mempunyai banyak percabangan. Daunnya berbentuk menyirip dan pada bagian tepi bergerigi. Bunganya berbentuk cawan berwarna jingga. Buahnya keras berbentuk seperti jarum berwarna hijau ketika muda dan berubah menjadi cokelat ketika sudah tua atau masak. Sementara bijinya berwarna hitam (Hidayat, Wahyuni, dan Andalusia, 2008). Daun kenikir (*C. caudatus*) disajikan pada Gambar 2 berikut ini:

Gambar 2. Daun kenikir (*C. caudatus*) (Dokumentasi pribadi, 2016)

2.2.2 Habitat dan Penyebaran

Tanaman kenikir dapat tumbuh dengan baik didaratan rendah sampai ketinggian 700 m dpl pada kondisi tanah yang liat, gembur, dan memiliki berdrainase baik. Kenikir menyukai tempat yang terbuka dengan sinar matahari penuh sepanjang hari. Sebagian besar budidayanya dilkukan dengan menggunakan biji karena tamanan kenikir memang mudah sekali tumbuh karena

berada ditanah yang gembur dan sedikit lembab (Hidayat, Romade dan Naputitupulu, 2015).

Tanaman ini berasal dari dataran amerika. Saat ini penyebarannya sudah sangat luas, terutama di daerah-daerah tropis, dimana sinar matahari dapat diperoleh sepanjang tahun. Ketinggian tanaman kenikir dapat mencapai sekitar 1,5 m (Hidayat, Wahyuni dan Andalusia, 2008).

2.2.3 Bahan Aktif Daun Kenikir (*C. caudatus*)

Kenikir yang memiliki nama latin *C. caudatus* Kunth biasa tumbuh di perkebunan atau tepi sungai. Tumbuhan ini memiliki tinggi 0,6 - 2,5 m. Ciri lainnya berupa batang yang licin atau berbulu tipis, bentuk daun menyirip 3 - 4 cm, serta memiliki bungan berwarna kemerahan atau ungu. Kenikir memiliki kandungan golongan senyawa yaitu alkaloid, flavonoid, tannin dan polifenolat (Safita, Sakti dan Syafnir, 2015).

Kenikir (*C. caudatus*) juga diketahui mengandung saponin, alkaloid, flavonoid pada batang dan daun, fenol dan terpenoid pada daun. Kenikir memiliki aktifitas antimikroba baik pada bakteri Gram positif, bakteri Gram negatif dan fungi (Karimy, Julendra, Hayati, Sofyan, Damayanti dan Priyowidodo, 2013).

Daun ekstrak *C. caudatus* mengandung fitokimia seperti terpenoid, asam lemak, flavonoid, alkaloid, tanin dan saponin yang memiliki aktivitas antimikroba. Berbagai jenis *phytochemical* pada ekstrak *C. caudatus* yang memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan patogen (Yusoff, Noor dan Rukayadi, 2015).

2.2.3 Mekanisme Senyawa Daun Kenikir (*C. caudatus*) sebagai Antimikroba

Antimikroba adalah suatu zat yang mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroba. Apabila zat tersebut mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri disebut antibakteri. Mekanisme kerja antimikroba antara lain dengan jalan merusak dinding sel, merusak membran

sitoplasma, mendenaturasi protein sel dan menghambat kerja enzim dalam sel (Prajitno, 2007).

Flavonoid merupakan senyawa aktif yang berfungsi untuk mengganggu sintesis dinding bakteri sehingga terjadi kebocoran plasma yang diakhiri dengan lisisnya bakteri, selain itu flavonoid berfungsi untuk menghambat DNA gyrase dan menghambat aktivitas enzim ATPase bakteri. Flavonoid juga dapat menghambat metabolisme energi bakteri. Alkaloid merupakan senyawa yang lebih berefek pada bakteri Gram positif dibanding pada bakteri gram negatif. Alkaloid bekerja sebagai DNA interkalator dan penghambat sintesis DNA dengan cara menghambat topoisomerase (Dewi, Joharman dan Budiarti, 2013).

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

Metode cakram merupakan cara yang mudah untuk menetapkan kerentanan organisme terhadap antibiotik adalah dengan menginokulasi pelat agar dengan biakan dan membiarkan antibiotik berdifusi ke media agar. Cakram yang telah mengandung antibiotik diletakkan di permukaan pelat agar yang mengandung organisme yang diuji. Konsentrasi menurun sebanding dengan luas bidang difusi. Pada jarak tertentu pada masing–masing cakram, antibiotik terdifusi sampai pada titik antibiotik tersebut tidak lagi menghambat pertumbuhan mikroba. Efektivitas antibiotik ditunjukkan oleh zona hambatan. Zona hambatan tampak sebagai area jernih atau bersih yang mengelilingi cakram tempat zat dengan antivitas antimikroba terdifusi. Diameter zona dapat diukur dengan penggaris dan hasil dari eksperimen ini merupakan satu antibiogram (Harmita dan Radji, 2008).

Uji cakram, yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba dan dibandingkan dengan antibiotik kanamycin. Lempeng

Tryptic Soya Agar (TSA) ditandai dengan nama, tanggal dan mikroorganisme yang akan diuji. Kapas lidi (*cotton swap*) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut. Mikroorganisme kemudian disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian lempeng agar diputar 900 dan dibuat olesan kedua, dengan lempeng agar diputar 450 dan dibuat olesan ketiga. Lempeng agar dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan pada permukaan lempeng agar (Roihanah, Sukoso, dan Andayani, 2012).

Kultur bakteri uji yang telah diinkubasi selama 24 jam, diuji aktivitas antibakterinya dengan cara mengisi cawan petri dengan 0,1 ml bakteri uji dan 15 ml media NA steril secara aseptic, dihomogenkan kemudian dibiarkan hingga memadat. Kertas cakram (diameter 6 mm) diresapkan dalam ekstrak daun kenikir (*C. caudatus*). Kertas cakram tersebut kemudian diletakkan di atas permukaan media bakteri menggunakan pinset. Media bakteri yang sudah dipasangi bahan antibakteri, kemudian diinkubasi pada suhu 37^{o}C selama 24 jam. Diameter zona hambat diukur menggunakan penggaris untuk menentukan efektifitas antibakteri. Zona hambat diukur dengan cara mengurangi diameter keseluruhan (cakram + zona hambatan) dengan diameter cakram. Uji daya antibakteri dilakukan dengan menggunakan metode kertas cakram dengan tujuan untuk mengetahui besarnya diameter zona hambatan pertumbuhan bakteri. Zona hambat adalah zona bening yang terdapat di sekitar kertas cakram (Putri, 2014).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1 sebagai berikut:

Tabel 1. Alat-alat yang digunakan untuk penelitian

No	Alat	Kegunaan
1	Timbangan digital	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-2}.
2	Cawan Petri	Sebagai tempat uji cakram.
3	Erlenmeyer 500 ml	Sebagai tempat pembuatan media.
4	Bunsen	Untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada saat perlakuan .
5	Beaker glass 1000 ml	Sebagai tempat maserasi.
6	Gelas ukur 100 ml	Sebagai alat untuk mengukur larutan.
7	Tabung Reaksi	Sebagai tempat untuk peremajaan bakteri.
8	*Hotplate*	Sebagai alat pemanas media.
9	Nampan	Sebagai tempat menyimpan alat.
10	Spatula	Sebagai alat untuk mengambil sampel.
11	Vortex Mixer	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan.
12	Blender	Sebagai alat untuk menghaluskan sampel.
13	Autoklaf	Sebagai alat untuk mensterilisasi peralatan yang akan digunakan.
14	Lemari pendingin	Sebagai tempat penyimpan bahan pada suhu dingin.
15	Mikropipet 10-100µl Mikropipet 100-1000µl	Sebagai alat untuk mengambil bahan yang berbentuk cair.
16	Jarum *osse*	Untuk mengambil sampel.
17	Washing bottle	Sebagi tempat menyimpan aquades.
18	Sprayer	Sebagai tempat menyimpan alkohol untuk sterilisasi.
19	*Rotary Vacuum Evaporator*	Sebagai alat untuk evaporasi.
20	Rak tabung reaksi	Sebagai tempat untuk meletakkan tabung reaksi.
21	Botol film	Sebagai tempat penyimpanan sampel.
22	*Laminary Air Flow* (LAF)	Sebagai tempat dilakukannya perlakuan.
23	Inkubator	Sebagai alat untuk menginkubasi.
24	Bunsen	Untuk pengkondisian aseptis.
25	Oven	untuk mengeringkan cawan petri.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2 sebagai berikut:

Tabel 2. Bahan-bahan yang digunakan untuk penelitian

No	Bahan	Kegunaan
1	Daun Kenikir (*C. caudatus*)	Sebagai bahan yang akan digunakan sebagai ekstraksi.
2	Aquades	Sebagai bahan pelarut.
3	Etanol 96%	Sebagai bahan pelarut.
4	Tisu	Sebagai bahan pembersih.
5	Kertas saring Whattman No.41	Sebagai alat untuk menyaring bahan setelah maserasi.
6	Alumunium foil	Sebagai bahan untuk menutupi seluruh bagian beaker glass pada saat maeserasi.
7	Bakteri A. *hydrophila*	Sebagai bakteri yang digunakan pada saat perlakuan.
8	Alkohol 70%	Sebagai bahan sterilisasi.
9	Kapas	Sebagai bahan untuk menutupi alat pada saat sterilisasi.
10	Kertas Label	Sebagai bahan penanda.
11	*Tryptic Soy Agar* (TSA)	Sebagai media agar.
12	*Tryptic Soy Broth* (TSB)	Sebagai media cair.
13	Kertas Koran	Sebagai bahan untuk membungkus peralatan yang akan di sterilisasi.
14	Kertas Cakram	Sebagai bahan untuk mengetahui besar zona bening dari ekstrak kasar yang digunakan.
15	Tali kasur	Sebagai bahan untuk mengikat peralatan yang akan di sterilisasi.
16	DMSO 10%	Sebagai pelarut ekstrak.
17	NaCl	Sebagai bahan pembuat NaFisiologis.
18	Plastik *Wrap*	Sebagi pembungkus botol sampel.
19	Spirtus	Sebagai bahan bakar untuk Bunsen.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan metode eksperimen. Penelitian eksperimental pada dasarnya ingin menguji hubungan suatu sebab (*cause*) dengan akibat (*effect*). Pengujian dilakukan

dalam suatu sistem tertutup, yang kondisinya terkontrol. Terdapat beberapa unsur dalam penelitian eksperimental, yaitu adanya situasi (kelompok) kontrol dan kelompok uji atau kelompok perlakuan, serta adanya intervensi peneliti (perlakuan). Kegunaan dari rancangan eksperimental adalah mendapatkan informasi yang relevan dengan permasalahn penelitian secara maksimal, dengan materi, biaya dan waktu yang minimal. Sehingga penelitian menjadi lebih efektif dan efisien dalam hal waktu, biaya, tenaga dan analisa statistiknya (Hartanto, 2003).

Metode penelitian eksperimen pada umumnya digunakan dalam penelitian yang bersifat laboratoris. Namun, bukan berarti bahwa pendekatan ini tidak dapat digunakan dalam penelitian sosial, termasuk penelitian pendidikan. Jadi, penelitian eksperimen yang mendasarkan pada paradigma positivistik pada awalnya memang banyak diterapkan pada penelitian ilmu-ilmu keras (*hard-science*), seperti biologi dan fisika, yang kemudian diadopsi untuk diterapkan pada bidang - bidang lain, termasuk bidang sosial dan pendidikan (Jaedun, 2011).

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam sehingga kondisi lingkungan tempat penelitian dalam keadaan sama (Sastrosupadi, 2002).

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

Keterangan :

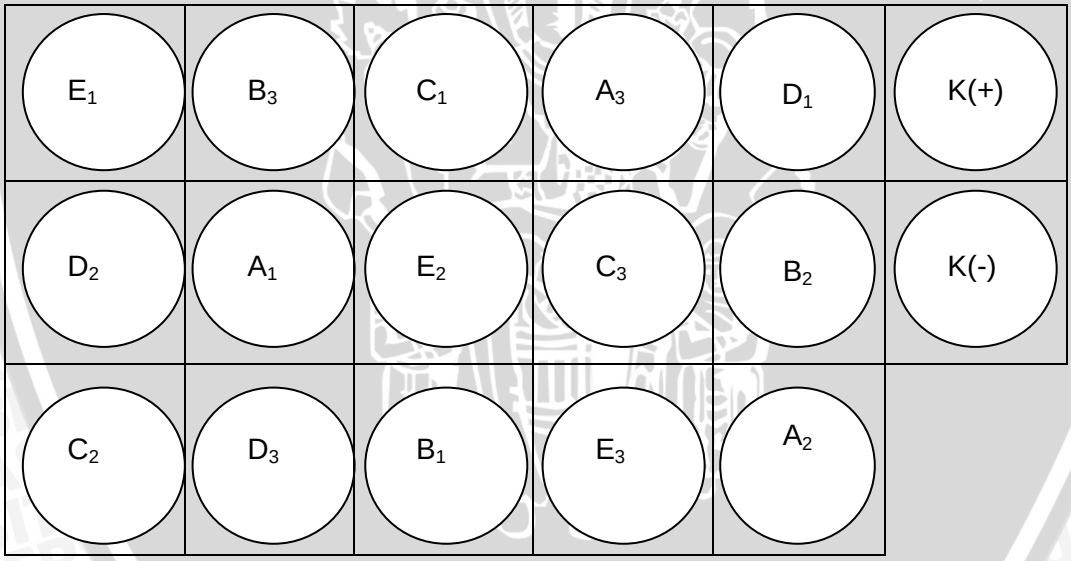
Y_{ij} = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-$_i$ dan ulangan ke-j

μ = nilai rata-rata

T_i = pengaruh perlakuan ke-$_i$

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

Penelitian dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) dengan perlakuan yang diberikan adalah perbedaan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap bakteri *A. hydrophila.* Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat yang tepat dalam penggunaan ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*). Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, sedangkan perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 5 perlakuan beserta kontrol negatif dan kontrol positif. Tiap perlakuan disajikan pada Gambar 3 berikut ini.



Gambar 3. Denah penelitian uji cakram

Keterangan :

K(+) : Perlakuan kontrol (+) dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 200 ppt.

K(-) : Perlakuan kontrol (-) dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 0 ppt.

A : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 10 ppt.

B : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 20 ppt.

C : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 30 ppt.

D : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 40 ppt.

E : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 50 ppt.

1, 2, dan 3: Sebagai ulangan.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi merupakan hal penting yang harus dilakukan sebelum dimulai percobaan yang bertujuan untuk membunuh semua mikroorganisme yang tidak dikehendaki yang menempel pada alat maupun bahan. Adapun langkah-langkah dalam sterilisasi yaitu:

- Pertama mencuci semua alat – alat dengan menggunakan sabun dan ditunggu hingga kering.
- Setelah kering, alat dibungkus dengan menggunakan plastik tahan panas atau dibungkus dengan menggunakan kertas koran. Strerilisasi bahan dilakukan 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.

- Alat dan bahan yang sudah siap disterilisasi, dimasukkan ke dalam keranjang sterilisasi.
- Memasukkan aquades ke dalam ruang sterilisasi sampai menutup sistem pemanas (*heater*), untuk mencegah penimbunan kapur pada elemen pemanas.
- Keranjang yang sudah berisi alat maupun bahan yang akan disterilisasi dimasukkan ke dalam *autoclave*.
- *Autoclave* ditutup dengan cara menutup tuas secara diagonal agar seimbang kekuatannya pada saat penutupan.
- Klep keluarnya uap (*safety falve*) dipastikan pada posisi berdiri atau tegak.
- *Autoclave* dinyalakan pada posisi ON (ke atas), dan temperatur diputar pada posisi maksimal.
- Ditunggu hingga keluar uap air lalu klep ditutup atau arah ke samping.
- Ditunggu sampai jarum menunjukkan suhu sterilisasi (121ºC).
- Temperatur diturunkan sampai lampu pada *sterilizing* berwarna kuning dan timer diatur pada posisi 15 menit.
- Setelah alarm berbunyi maka pertanda sterilisasi berakhir dan temperatur diturunkan minimal.
- *Autoclave* dimatikan pada posisi OFF, lalu klep dibuka secara perlahan sampai jarum menunjukkan angka 0 dan tutup *autoclave* dapat dibuka.

3.4.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan

Selain alat dan bahan, sterilisasi tempat perlakuan juga penting dilakukan karena bertujuan untuk menghindari terjadinya kontaminasi dengan mikroorganisme lain yang tidak diinginkan. Tempat perlakuan seperti meja dan semua barang yang akan digunakan untuk penelitian maupun tangan laboran yang bersinggungan dengan penelitian harus benar – benar dalam kondisi

aseptis. Sterilisasi tempat perlakuan ini dapat dilakukan dengan cara sterilisasi kimia menggunakan alkohol 70% serta dapat dilakukan dengan sterilisasi fisika menggunakan pemijaran dengan api bunsen maupun menggunakan penyinaran dengan sinar UV.

3.4.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*)

Proses pembuatan ekstrak kasar daun kenikir (*C.caudatus*) dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- Menyiapkan daun kenikir yang didapat dari Balai Medika Tanaman Obat Batu, Jawa Timur sebanyak 1 kg.
- Selanjutnya, dikeringkan dengan cara dioven. Suhu yang digunakan pada saat pengovenan yaitu 40 - 50ºC. Pengovenan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air dari daun sehingga mudah untuk mendapatkan senyawa antibakterinya.
- Setelah di oven, dilakukan proses penggilingan dengan menggunakan blender.
- Setelah bahan yang digunakan sudah siap, kemudian dilakukan persiapan perendaman (maserasi) dimana dengan serbuk daun kenikir sebanyak 200 gram dimaserasi dalam larutan etanol 96% dengan perbandingan 1 : 5 sebanyak 1 L selama 3 x 24 jam dilakukan pada suhu kamar. Etanol merupakan pelarut polar yang banyak digunakan untuk mengekstrak komponen polar suatu bahan alam dan dikenal sebagai pelarut universal. Senyawa yang terkandung dalam daun dapat diserap oleh etanol 96%. Pelarut etanol dapat memberikan serapan karena pelarut yang digunakan bukan pelarut murni yaitu etanol 96%. Sehingga, serapan tersebut merupakan serapan komponen senyawa yang terkandung dalam etanol (Sundari, 2010).

- Larutan yang sudah didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring, lalu diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator.*
- Didapatkan ekstrak daun kenikir berupa pasta.

3.4.4 Pembuatan Media

A. *Tryptic Soya Agar* (TSA)

- TSA merk OXOID dengan dosis 40 gram/l.
- Ditimbang 20 gram TSA.
- Dimasukkan dalam Erlenmeyer berisi 500 ml akuades.
- Diaduk pada kondisi hangat diatas *hotplate* sampai tercampur rata.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen atau alumunium foil kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121^{O}c selama 15 menit.
- Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu ± 30^{O}c karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
- Dituang pada cawan petri, kemudian ditunggu hingga dingin dan disimpan pada lemari pendingin dan diberi label.
- Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin.
- Panaskan kembali apabila akan digunakan lagi.

B. *Tryptic Soy Broth* (TSB)

- Ditimbang TSB sebanyak 0,6 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml.
- Ditambahkan aquades sebanyak 20 ml, diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kekuningan.
- Erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas hingga rapat lalu dibungkus dengan menggunakan kertas aluminium foil dan diikat dengan menggunakan benang kasur agar benar – benar tertutup rapat.

- Media disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121ºC selama 15 menit.
- Setelah sterilisasi selesai, media dibiarkan dingin karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.

C. Pembiakan Bakteri *A. hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri negatif yang sering menyerang ikan air tawar. Pada penelitian ini, bakteri *A. hydrophila* yang digunakan adalah bakteri isolat murni yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau Jepara. Pengidentifikasian bakteri dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri *A. hydrophila,* maka dilakukan pengujian biokimia antara lain uji gram, dimana untuk menentukan bakteri tersebut adalah bakteri gram positif atau bakteri gram negatif dapat dilihat pada Lampiran 1.

Pewarnaan gram dilakukan bertujuan sama dengan uji gram yaitu untuk membedakan bakteri apakah gram positif atau bakteri gram negatif, bakteri dicampur dengan tetesan air steril pada gelas objek, kemudian disebarkan ditengah gelas obyek sehingga membentuk lapisan tipis dan difiksasi. Dengan Kristal violet olesan bakteri digenangi selama dua menit lalu dicuci dengan air mengalir, dan dikeringkan anginkan. Diberi yodium selama dua menit, dicuci dengan air mengalir, dan dikeringkan. Selanjutnya diberi larutan pemucat yaitu alkohol 95%, tetes demi tetes sampai zat warna ungu tidak terlihat lagi, lalu dicuci pada air mengalir dan dikeringkankan. Kemudian dogenangi lagi dengan safranin selama 30 detik, lalu dicuci dan dibiarkan kering diudara. Warna merah pada olesan bakteri menunjukan bakteri gram negatif dan jika warna ungu menunjukan bakteri gram positif (Muslimin, 2014).

Untuk mendapatkan bakteri dalam bentuk cair, maka bakteri diremajakan kembali dengan metode gores menggunakan media cair yaitu *Tryptic Soy Broth* (TSB). Langkah yang dilakukan pada pembiakan bakteri *A. hydrophila* yaitu:

- Larutan TSB disiapkan sebanyak 0,6 gram dalam Erlenmeyer sebanyak 20 ml.
- Jarum *osse* dipanaskan diatas Bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum *osse* disentukan kebiakan murni *A. hydrophila* kemudian dicelupkan ke TSB.
- Larutan TSB dibiarkan 24 jam dalam inkubator pada suhu 30^{o}C.
- Setelah 24 jam, media TSB akan berubah menjadi keruh yang menandakan bahwa bakteri telah tumbuh. Kemudian bakteri dilihat kepadatannya dengan Metode Mc. Farland adalah dengan mencocokkan kekeruhannya berdasarkan kepadatan bakteri pada Mc. Farlan yaitu 10^8 CFU/ml. Kepadatan bakteri yang digunakan pada penelitian ini adalah 10^8 CFU/ml.
- Menyiapkan petridisk yang sudah berisi media TSA.
- Bakteri dibiakkan dengan metode cawan sebar (*Spread plate*).
- Ambil suspensi cairan sebanyak 0,1 ml dengan pipet ukur kemudian teteskan diatas permukaan agar yang telah memadat.
- Batang drugal diambil kemudian disemprot dengan alkohol dan dipanaskan diatas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.
- Kemudian disebar dengan menempelkan pada permukaan agar supaya tetesan suspensi merata.
- Media TSA diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 30ºC selama 24 jam.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Prosedur pelaksanaan uji cakram adalah:

Pembuatan kertas cakram dilakukan dengan menyiapkan potongan kertas dibuat kertas cakram berdiameter 6 mm dibuat dari kertas saring Whatman, diletakan dalam cawan petri kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit, kemudian kertas cakram yang telah disterilkan tersebut ditetesi larutan uji masing - masing ekstrak dengan berbagai konsentrasi dan kontrol positif serta kontrol negatif masing - masing sebanyak 15 µL (Miranti, Prasetyorini dan Suwary, 2013). Prosedur pelaksanaan uji cakram adalah sebagai berikut:

- Disiapkan cawan petri yang sudah terdapat media TSA sebanyak 20 ml .
- Disiapkan berbagai dosis ekstrak kasar daun kenikiryang akan diujikan untuk mengetahui daya hambatnya.
- Disiapkan bakteri pada media TSB dengan kepadatan 10^8 CFU/ml.
- Penanaman bakteri pada media TSA dilakukan dengan metode sebar (*Spread plate*) pada bakteri.
- Kemudian ambil suspense cairan sebanyak 0,1 ml dengan pipet ukur, kemudian teteskan diatas permukaan agar yang telah memadat.
- Batang drugal diambil kemudian disemprotkan alkohol dan dibakar diatas Bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.
- Kemudian disebarkan dengan menempelkan pada permukaan agar supaya tetesan suspense merata. Penanaman bakteri ini dilakukan pada *Laminar Air Flow* dengan kondisi yang tetap steril agar tidak terkontaminasi.
- Selanjutnya merendam kertas cakram pada masing-masing dosis yang ditentukan selama 15 menit.

- Kertas cakram ditiriskan dan diletakkan pada lempeng agar yang sebelumnya sudah ditanami bakteri.
- Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu ruang yaitu 30^{o}C.
- Diukur diameter zona bening yang ada disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong untuk menentukan dosis optimum yang dapat menghambat bakteri.

3.5.2 Uji difusi kertas cakram

Metode cakram merupakan cara yang mudah untuk menetapkan kerentanan organisme terhadap antibiotik adalah dengan menginokulasi media agar dengan biakan dan membiarkan antibiotik berdifusi ke media agar. Efektivitas antibiotik ditunjukkan oleh zona hambatan. Zona hambatan tampak sebagai area jernih atau bersih yang mengelilingi cakram tempat zat dengan antivitas antimikroba terdifusi (Harmita dan Radji, 2008).

3.5.3 Parameter Uji

Parameter yang diamati pada penelitian ini terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utamanya yaitu melakukan pengamatan terhadap zona hambat bakteri yang dilakukan dengan cara mengukur diameter zona bening di sekeliling kertas cakram dari masing – masing perlakuan yaitu dosis maksimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Parameter penunjangnya adalah suhu inkubasi yakni sebesar 30ºC, pH media TSA sebesar 7, dan lama perendaman kertas cakram pada ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) selama 15 menit.

3.6 Analisa data

Data hasil zona hambat dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan diameter zona hambat antar perlakuan. Semua analisa akan diulang sebanyak tiga kali dari masing – masing perlakuan dan diuji secara

statistik dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) sesuai rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 95% (α = 0,05) dan 99% (α = 0,01). Analisis digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variable bebas) terhadap parameter yang diukur. Apabila nilai uji F memiliki hasil berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka akan dilanjutkan dengan Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antar dua perlakuan.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*) Terhadap Bakteri *A. hydrophila*

Daya hambat ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap bakteri *A. hydrophila* dapat diketahui dari diameter zona hambat berupa zona bening yang muncul pada kertas cakram. Hasil pengamatan selama penelitian mengenai uji daya hambat ekstrak daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila,* dapat dilihat pada tabel 3 dan gambar yang disajikan pada Lampiran 6.

Pada penelitian ini menggunakan dosis antara lain 10 ppt, 20 ppt, 30 ppt, 40 ppt dan 50 ppt. Kemampuan daya antibakterial ekstrak terhadap bakteri ditentukan dengan mengukur diameter daya hambat atau zona bening yang muncul di sekitar kertas cakram. Hasil data pengukuran daya hambat disajikan pada Tabel 3 berikut ini:

Tabel 3. Hasil rata - rata pengukuran diameter daya hambat (mm) ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan (ppt)	Ulangan			Total (mm)	Rerata (mm)
	1	2	3		
A (10)	4,48	4,91	4,95	14,34	4,78 ± 0,26
B (20)	5,79	6,31	5,84	17,94	5,98 ± 0,29
C (30)	6,78	6,3	8,21	21,29	7,09 ± 0,99
D (40)	8,15	10,03	9,4	27,58	9,19 ± 0,96
E (50)	9,8	10,37	10,35	30,52	10,17 ± 0,32
Total				111.67	

Semua dosis yang diujikan menunjukkan adanya zona bening disekitar kertas cakram yang telah direndam dengan ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*). Berdasarkan Tabel pengamatan zona bening didapatkan zona hambat tertinggi pada perlakuan E dengan dosis 50 ppt didapatkan nilai diameter rata – rata zona bening yaitu sebesar 10,17 mm. Zona hambat terendah yaitu

terdapat pada perlakuan A dengan dosis 10 ppt didapatkan nilai diameter rata – rata zona bening sebesar 4,78 mm. Hal ini dikarena adanya perbedaan jumlah kandungan bahan aktif yang terdapat pada setiap dosis ekstrak kasar daun kenikir. Menurut Putri (2014), Kandungan bahan aktif yang terdapat pada daun kenikir yaitu fenol, flavonoid, saponin dan tannin.

Penelitian yang dilakukan Dwiyanti, Muslimin dan Guntur (2014), menunjukan bahwa ekstrak daun kenikir yang menghambat bakteri *Bacillus cereus* memiliki zona hambat tertinggi pada konsentrasi 90% dengan nilai rata – rata diameter zona hambat yaitu 11,5 mm dan zona hambat terendah pada konsentrasi 30% dengan nilai rata – rata diameter zona hambat sebesar 6,7 mm. Berdasarkan penelitian tersebut zona hambat yang dihasilkan memiliki respon hambatan yang kuat pada konsentrasi 90% dan untuk konsentrasi 30% memiliki respon hambatan yang sedang. Jika dibandingkan dengan penelitian uji efektivitas ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap bakteri *A. hydrophila,* zona hambat atau zona bening yang dihasilkan pada konsentrasi tertinggi 25% memiliki nilai rata – rata 10,17 mm sedangkan konsentrasi terendah 5% sebesar 4,78 mm. Hal ini dikarenakan perbedaan bakteri yang digunakan yaitu *A. hydrophila* merupakan bakteri gram negatif sedangkan *Bacillus cereus* merupakan bakteri gram positif. Menurut Istiqomah, Damayanti, Julendra, Istika dan Winarsih (2014), bakteri gram positif pada umumnya mempunyai kepekaan terhadap senyawa antibakteri dibandingkan dengan bakteri gram negatif karena dinding sel bakteri gram positif mengandung lapisan peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan dengan bakteri gram negatif. Bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel relatif lebih kompleks, berlapis tiga yaitu lapisan luar yang berupa lipoprotein, lapisan tengah yang berupa lipopolisakarida dan lapisan dalam berupa peptidoglikan yang tipis sehingga menyebabkan bakteri gram negatif lebih resistensi terhadap senyawa antibakteri diluar sel

dibandingkan dengan bakteri gram positif. Pada bakteri gram positif 90% dinding selnya terdiri dari lapisan peptidoglikan, pada bakteri gram negatif lapisan peptidoglikan 5 – 20%. Oleh karena itu daya hambat ekstrak kasar daun kenikir terhadap bakteri *A. hydrophila* lebih besar zona beningnya atau zona hambatnya dibandingkan dengan bakteri *B. cereus.*

Berdasarkan uji daya hambat ekstrak kasar daun kenikir dapat dilihat bahwa semakin tinggi perlakuan yang diberikan, maka zona hambat atau zona bening yang terbentuk semakin melebar. Pernyataan tersebut sesuai dengan pernyataan Arum, Supartono dan Sudarmin (2012), semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka daya hambat terhadap bakteri semakin besar dan semakin lama proses inkubasi diameter zona beningnya semakin luas. Hal ini disebabkan karena semakin tinggi kadar senyawa bioaktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut Purwanto (2015), selain konsentrasi ekstrak, jenis bahan antimikroba juga menentukan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Perbedaan besarnya hambatan untuk masing – masing konsentrasi dapat disebabkan oleh perbedaan besar kecilnya konsentrasi, banyak sedikitnya kandungan zat aktif antimikroba yang terkandung dalam eksrak, kecepatan difusi bahan antimikroba ke dalam medium, pH lingkungan dan waktu inkubasi.

Adanya daya hambat, dikarenakan pada ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) memiliki zat antibakteri yang dapat mengahambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* antara lain fenol, flavonoid dan saponin. Menurut Sulastrianah, Imran dan Fitria (2011), mekanisme saponin sebagai antibakteri adalah dengan cara merusak membrane sel bakteri akibat terjadinya peningkatan permeabilitas membrane oleh karena saponin yang bereaksi dengan dinding sel bakteri. Rusaknya membrane sel bakteri menyebabkan bocornya membrane sel bakteri dan akhirnya komponen penting dari dalam sel bakteri akan keluar. Flavonoid dapat berperan sebagai antibakteri dan

antioksidan. Protein yang mengalami koagulan akan non fungsi. Selain itu dapat mengganggu sistesis membran sel melalui pengahambatan yang mengakibatkan penggabungan rantai glikan tidak terhubung silang ke dalam peptidoglikan membran sel sehingga menuju suatu struktur yang lemah dan menyebabkan kerusakan dinding sel bakteri.

Menurut Susanti (2008), fenol berikatan dengan protein melalui ikatan hydrogen sehingga mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Dimana sebagian besar struktur dinding sel dan membran sitoplasma bakteri mengandung protein dan lemak. begitu pula menurut Rahayu (2013), senyawa fenol bekerja dengan cara denaturasi protein sehingga meningkatkan permeabilitas membran sel sehingga merubah komposisi komponen protein.

Menurut Roslizawati, Ramadani, Fakhrurrazi, dan Herrialfian (2013), flavonoid berperan langsung sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme seperti bakteri atau virus. Mekanisme penghambatan flavonoid terhadap pertumbuhan bakteri diduga karena kemampuan senyawa tersebut membentuk komplek dengan protein ekstraseluler, mengaktivasi enzim, dan merusak membran sel. Pada umumnya senyawa flavonoid dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif. Flavonoid dapat berfungsi sebagai bahan antimikroba dengan membentuk ikatan komplek dengan dinding sel dan merusak membran. Senyawa ini merupakan antimikrob karena kemampuannya membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler terlarut serta dinding sel mikroba. Flavonoid yang bersifat lipofilik akan merusak membran mikroba.

Berikut Klasifikasi respon hambatan ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri, disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Klasifikasi respon hambatan ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri menurut Inneke, Rumampuk, Rimper dan Losung (2005)

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan
< 5 mm	Lemah
5 - 10 mm	Sedang
11 – 20 mm	Kuat
21 – 30 mm	Sangat kuat

Berdasarkan tabel klasifikasi zona hambatan diatas, maka pada perlakuan setiap dosis ekstrak kasar daun kenikir respon hambatanya berbeda, yaitu pada perlakuan A (10 ppt) didapatkan hasil rata – rata diameter zona hambatan 4, 78 mm, sehingga termasuk dalam klasifikasi respon hambat lemah, perlakuan B (20 ppt), C (30 ppt), D (40 ppt) dan E (50 ppt) didapatkan hasil rata – rata diameter zona hambatan 5 – 10 mm, sehingga termasuk dalam klasifikasi respon hambat sedang.

Kemudian dilanjutkan dengan perhitungan menggunakan sidik ragam yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh perlakuan. Hasil sidik ragam tentang pengaruh pemberian ekstrak kasar daun kenikir dengan berbagai dosis terhadap bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Perhitungan Sidik Ragam Diameter Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	59,61077	14,90	34,53375**	3,48	5,99
Acak	10	4,315	0,43154			
Total	14					

Keterangan : ** = Berbeda Sangat Nyata

Pada tabel sidik ragam di atas menunjukkan pengaruh pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* adalah berbeda sangat nyata. Hal ini ditunjukkan dengan hasil perhitungan F Hitung yang lebih besar dari F Tabel 1% atau nilai 34,53375 lebih besar dari 5,99. Maka H0 ditolak yang berarti perlakuan tersebut berbeda sangat nyata.

Selanjutnya untuk mengetahui antar perlakuan maka dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) yang disajikan pada Tabel 6, untuk perhitungan lengkap terdapat pada Lampiran 5.

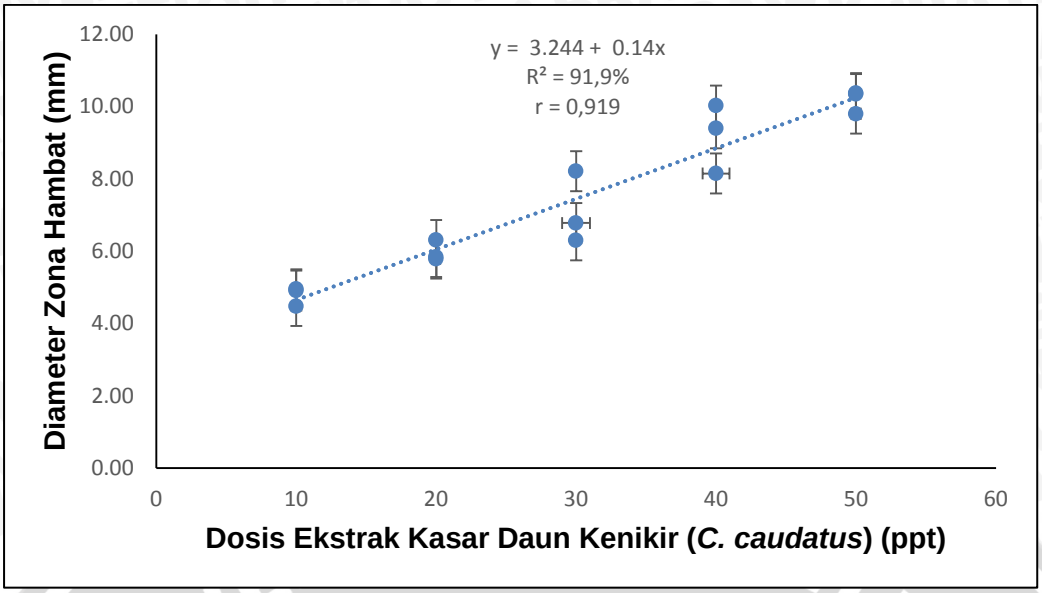
Tabel 6. Uji Perbandingan Beda Nyata Terkecil (BNT) Ekstrak Kenikir (*C. caudatus*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		4.78	5.98	7.09	9.19	10.17	
A	4,78	_					a
B	5,98	1,20*	_				b
C	7,09	2,31**	1,11^{ns}	_			b
D	9,19	4,41**	3,21**	2,10**	_		c
E	10,17	5,39**	4,19**	3,08**	0,98^{ns}	_	c

Keterangan :*) berbeda nyata
**) berbeda sangat nyata
^{ns})Tidak berbeda nyata

Pada hasil tabel uji BNT diketahui bahwa nilai yang paling efektif yakni pada perlakuan D (40 ppt), hal ini dikarenakan pada perlakuan D terlihat berbeda sangat nyata dengan perlakuan A (10 ppt), B (20 ppt) dan C (30 ppt) namun terlihat tidak berbeda nyata dengan perlakuan E (50 ppt). Sehingga dapat disimpulkan bahwa dosis yang efektif ekstrak kasar daun kenikir yakni pada perlakuan D dengan dosis sebesar 40 ppt, karena pada dosis tersebut pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* sudah terhambat dengan baik. Menurut Retnowati, Bialangi dan Posangi (2011), terjadinya penghambat bakteri tersebut karena adanya reaksi suatu senyawa kimia sebagai antibakteri.senyawa flavonoid merupakan senyawa kimia, mekanisme kerjanya mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sitoplasma.

Untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antara perlakuan dengan parameter yang diuji yaitu daya hambat bakteri *A. hydrophila*, maka dilakukan uji polinomial orthogonal. Hasil uji polynomial orthogonal yang berupa grafik disajikan pada Gambar 4 berikut ini:



Gambar 4. Grafik hubungan antara dosis ekstrak daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap diameter zona hambat bakteri *A. hydrophila*

Berdasarkan hasil uji polynomial orthogonal yang ditunjukkan pada Gambar 4 di atas menunjukkan bahwa hubungan antara perbedaan dosis ekstrak daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap diameter daya hambat bakteri *A. hydrophila* menghasilkan hubungan atau grafik secara linear. Dari gambar tersebut nampak bahwa perlakuan ini menghasilkan garis perpotongan yang membentuk grafik linear dengan persamaan y = 3,244 + 0,14x dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 91,9% dengan nilai korelasi (r) sebesar 0,919. Grafik tersebut menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak daun kenikir yang digunakan maka semakin besar zona hambatnya. Kemampuan ekstrak daun kenikir untuk dapat memberikan diameter daya hambat terbaik ini diduga disebabkan karena adanya senyawa flavonoid, Saponin dan fenol yang lebih besar dari dosis perlakuan lain yang telah diberikan.

Menurut Ariyanti, Darmayasa dan Sudirga (2012) aktivitas antibakteri dari senyawa aktif juga dapat dihambat oleh mekanisme resistensi bakteri terhadap bahan antibakteri. Adanya struktur membran luar yang kompleks pada bakteri

gram negatif membatasi akses senyawa aktif ekstrak ke dalam membran sel, dan menjadikan bakteri lebih resisten terhadap antibakteri.

4.2 Hasil Parameter Penunjang

Pada penelitian ini parameter penunjang yang digunakan yaitu suhu inkubasi dengan menggunakan suhu sebesar 30ºC. Dengan menggunakan suhu inkubasi sebesar 30ºC pada penelitian, maka hasil pembiakan bakteri *A. hydrophila* sudah dapat tumbuh dengan baik setelah diinkubasi selama 24 jam. Tanda – tanda bahwa bakteri *A. hydrophila* sudah tumbuh yaitu pada media agar berwarna kuning keruh. Penggunaan suhu 30ºC ini karena suhu optimal pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* yaitu sebesar 28ºC. Hal ini sesuai dengan pernyataan Prajitno (2005), pertumbuhan maksimal bakteri pada kisaran suhu 28^{o}C - 41^{o}C, sedang pertumbuhan minimum bakteri pada suhu 0^{o}C - 5^{o}C. Bakteri akan tumbuh dengan baik pada pH 5,5 - 9,0.

Parameter penunjang lainnya adalah pH media pertumbuhan bakteri. Pada penelitian ini menggunakan media *Tryptic Soya Agar* (TSA). TSA merupakan media agar sehingga pengukuran pH dilakukan sebelum proses menuangan media TSA ke dalam cawan petri menggunakan pH paper. Media TSA merupakan faktor penting dalam pertumbuhan bakteri *A. hydrophila.* Penelitian ini menggunakan media TSA dengan nilai pH sebesar 7,0. Sehingga jika pH media pada kisaran optimum, maka bakteri *A. hydrophila* akan tumbuh secara optimal. Hal ini sesuai dengan pernyataan Pelczar dan Chan (1986), salah satu faktor penting dalam pertumbuhan bakteri adalah nilai pH, bakteri memerlukan suatu pH optimum (6,5 – 7,5) untuk tumbuh optimal. Pengaruh pH terhadap pertumbuhan bakteri ini berkaitan dengan aktivitas enzim. Enzim dibutuhkan oleh beberapa bakteri untuk mengkatalis reaksi – reaksi yang berhubungan dengan pertumbuhan bakteri. Apabila pH dalam suatu medium

atau lingkungan tidak optimum maka akan mengganggu kerja enzim – enzim tersebut dan akhirnya mengganggu pertumbuhan bakteri itu sendiri.

Lama perendaman kertas cakram pada dosis ekstrak kasar daun kenikir juga dapat mempengaruhi diameter daya hambat yang dihasilkan. Oleh karena itu, parameter penunjang kedua yang digunakan pada penelitian ini yaitu lama perendaman kertas cakram pada ekstrak yaitu selama 15 menit. Dengan perendaman kertas cakram selama 15 menit pada dosis ekstrak daun kenikir, maka kertas cakram dapat menyerap ekstrak dengan sempurna sehingga hasil diameter daya hambat juga maksimal yang ditunjukkan pada Lampiran 6. Hal ini sesuai dengan pernyataan Noverita, Fitria dan Sinaga (2009), pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode Kirby - Bauer yang dikenal dengan sebutan metode cakram kertas. Tiap–tiap cakram kertas kosong sebelumnya dipanaskan dalam oven pada suhu 70ºC selama 15 menit, kemudian kertas cakram dicelupkan ke dalam larutan uji. Cakram yang telah berisi supernatan, kemudian didiamkan selama 15 menit sebelum diletakkan pada media uji. Kemudian secara aseptik, setelah kertas cakram menyerap supernatan tersebut, masing–masing diletakkan pada permukaan medium yang telah berisi mikroba yang akan diuji.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro* diperoleh kesimpulan sebagai berikut:

1. Uji efektifitas antibakterial dengan menggunakan uji cakram menunjukkan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari pertumbuhan bakteri *A. hydrophila.*
2. Zona bening atau zona hambat yang tertinggi ialah pada perlakuan E dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) sebesar 50 ppt memiliki nilai zona hambat sebesar 10,17 mm, sedangkan zona bening atau zona hambat yang terendah ialah pada perlakuan A dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) sebesar 10 ppt memiliki nilai zona hambat sebesar 4,78 mm.
3. Dosis ekstrak kasar daun kenikir yang paling efektif ialah pada perlakuan D dengan sebesar dosis 50 ppt.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak kasar daun kenikir untuk mendapatkan dosis yang optimal untuk menghambat bakteri *A. hydrophila.*

DAFTAR PUSTAKA

Afrianto, E., E. Liviawati., Z. Jamaris dan Hendi. 2015. Penyakit Ikan. Penebar Swadaya. 220 hlm.

Amri, K. dan Khairuman. 2003. Budidaya Ikan Nila Secara Intensif. Agromedia Pustaka. 145 hlm.

Aniputri, F.D., J. Hutabara dan Subandiyono. 2014. Pengaruh Ekstrak Bawang Putih (*Allium sativum*) Terhadap Tingkat Pencegahan Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan Kelulushidupan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (2) : 1-10 hlm.

Ariyanti, N. K., I. B. G. Darmayasa, S. dan K. Sudirga. 2012. Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis* Miller) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli*. *Jurnal Biologi*. **16** (1) : 1-4 hlm.

Arum, Y.P., Supartono dan Sudarmin. 2012. Isolasi dan Uji Daya Antimikroba Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal MIPA*. **35** (2) : 165-174 hlm.

Dewi, I. K., L. Joharman dan Y. Budiarti. 2013. Perbandingan Daya Hambat Ekstrak Etanol Dengan Sediaan Sirup Herbal Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Pertumbuhan *Shigella dysenteriaeIn Vitro*. *Berkala Kedokteran*. **9** (2) : 191-198 hlm.

Garrity, G., J. A. Bell dan T. Lilburn. 2004. Taxonomic Outline Of The Prokaryotes Bergey's Manual Of System Bacteriology. Michigan State University. 399 hlm.

Harmita dan M. Radji. 2008. Buku Ajar Analisis Hayati. Penerbit Buku Kedokteran EGC. 167 hlm.

Hartanto, R. 2003. Modul Metodologi Penelitian. Universitas Diponegoro. Semarang. 24 hlm.

Haryani, A., R. Grandiosa., I. D. Buwono dan A. Santika. 2012. Uji Efektivitas Daun Pepaya (*Carica papaya*) Untuk Pengobatan Infeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Mas Koki (*Carassius auratus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **3** (3) : 204-220 hlm.

Herupradoto, B. A. dan G. A. Yuliani. 2010. Karakterisasi Protein Spesifik *Aeromonas hydrophila* Penyebab Penyakit Ulser Pada Ikan Mas. *Jurnal Veteriner*. **11** (3) : 158-162 hlm.

Hidayat S., Romade dan Naputitupulu. 2015. Kitab Tumbuhan Obat. Penebar Swadaya. 416 hlm.

Hidayat, S., S. Wahyuni dan S. Andalusia. 2008. Seri Tumbuhan Obat Berpotensi Hias. Gramedia. 114 hlm.

Inneke, F. M. R., N. D. Rumampuk., J. Rimper dan F. Losung. Produksi Dan Uji Aktivitas Antimikroba Yang Diekstrak Dari Rotifer (*Brachionus rotundiformis*) Strain Lokal. *Jurnal LPPM Bidang Sains dan Teknologi.* **1** (1) : 56-70 hlm.

Istiqomah, L., E. Damayanti., H. Julendra., D. Istika dan S. Winarsih. 2014. Daya Hambat Granul Ekstrak Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus)* Terhadap Bakteri Patogenik *In Vitro*. *Jurnal Sais Veteriner.* **32** (1) : 93-104 hlm.

Jaedun A.2011.Metodologi Penelitian Eksperimen. Universitas Negeri Yogyakarta.Yogyakarta. 13 hlm.

Karimy, M.F., H. Julendra., S. N. Hayati., A. Sofyan., E. Damayanti, dan D. Priyowidodo. 2013. Efektifitas ekstrak daun kenikir (*cosmos caudatus*), daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) dan tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dalam sediaan granul larut air sebagai koksidiostat alami. *JITV*. 18 (2) : 88-98 hlm.

KKP. 2013. Laporan Tahunan Diretorat Produksi Tahun 2013. 45 hlm.

Mangunwardoyo, W., R. Ismayasari, Dan E. Riani. 2010. Uji patogenitas dan vierulensi *Aeromonas hydrophila* stanier pada ikan nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) Melalui Postulat Koch. *Jurnal Ristek Akuakultur*. **5** (2): 245-255 hlm.

Maulidia, S. O. 2010. Uji Efektivitas dan Fotostabilitas Krim Ekstrak Etanol 70% The Hitam (*Camellia sinensis* L.) Sebagai Tabir Surya Secara *in vitro. Skripsi*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta. 319 hlm.

Michael. 2008. *Microbiology and Edition USA.* WMC Brown Publisher.103 hlm.

Miranti, M., Prasetyorini, dan C. Suwary. 2013. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 30% dan 96% Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa)* Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus. Ekologia*. **13** (1): 9-18 hlm.

Noverita, D. Fitria dan E. Sinaga. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit dari Daun dan Rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia*. **4** (4):171-176 hlm.

Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan, 1986. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 522 hlm.

Purwanto, Sigit. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Aktif Ekstrak Daun Senggani (*Melastoma malabathricum* L) Terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Keperawatan Sriwijaya*. **2** (2) : 1-9 hlm.

Putri, D. N. 2014. Uji Aktivitas Ekstrak Metanol Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) Terhadap Bakteri *Salmonella typhi*. *Tesis.* Universitas Islam Negeri Malik Ibrahim. Malang. 145 hlm.

Prajitno, A. 2005. Diktat Parasit dan Penyakit Ikan. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 105 hlm.

_____, A. 2007. Penyakit Ikan dan Udang. UM Press. Malang.113 hlm.

Rahayu, P. 2013. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. *Skripsi.* Universitas Hasanuddin. Makassar. 45 hlm.

Retnowati, Y., N. Bialangi dan N. W. Posangi. 2011. Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* Pada Media yang Diekspos Dengan Infus Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*). *Saintek*. **6** (2) : 1-9 hlm.

Roihanah, S., Sukoso dan S. Andayani. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria* sp. Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *in vitro*.*J. Explife Sci*. **2** (1) : 1-5 hlm.

Roslizawaty, N. Y. Ramadani, Fakhrurrazi dan Herrialfian. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Rebusan Sarang Semut (*Myrmecodia* sp.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli. Jurnal Medika veterinaria*.**7** (2): 91-94 hlm.

Safita, G., E. R. E. Sakti, dan Syafnir. 2015. Uji aktivitas antibakteri daun kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth) dan daun sintrong (*Crassocephalum crepidioides* (Benth) S*. moore*) terhadap bakteri*Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Prosiding Penelitian Spesia Unisba*. 421-427 hlm.

Sastrosupadi, A. 2002. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.

Sharifuldin, M. 2014. Profiling and quantification of *cosmos caudatus* kunth and *centella asiatica* linn. and in vitro anti cancer activity of *cosmos caudatus*. *Thesis*. 53 hlm.

Sudjadi, B dan S. Laila. 2006. Biologi Sains dalam Kehidupan. Yudhistira. 139 hlm.

Sundari, Ida. 2010. Identifikasi Senyawa Dalam Ekstrak Etanol Biji Buah Merah (*Pandanus conoideus* Lamk.). *Skripsi.* Universitas Sebelas Maret. Surakarta. 67 hlm.

Sulastrianah., Imran Dan Fitria E. S. 2011. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak (*Annona Muricata* L.) Dan Daun Sirih (*Piper Betle* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia Coli*. *Skripsi*. FMIPA. 84 hlm.

Waluyo, L. 2009. Mikrobiologi Lingkungan. UMM Press. Malang. 113 hlm.

Wullur, F. F., F.V. Longdong, dan M. P. Wasak. 2013. Eksistensi usaha petani budidaya ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di desa warukapas kabupaten minahasa utara provinsi sulawesi utara. *Akulturasi*.**1** (1) : 26-32 hlm.

Yusoff, N.A.H.,N. F. Noor, dan Y. Rukayadi. 2015. Effects of *cosmos caudatus* kunth. (*ulam raja*) extract on microflora in raw chicken meat.*International Journal Of Current Microbiology And Applied Sciences*. **4** (2) : 426-435 hlm.

.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Biokimia Bakteri *A. Hydrophila*

KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA
BALAI BESAR PERIKANAN BUDIDAYA AIR PAYAU
LABORATORIUM UJI BBPBAP JEPARA
Alamat surat: PO Box 1 Jepara , Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418
Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724
Emai : bbbapjpr@rad.net.id Website : udang-bbbap.com

HASIL UJI BIOKIMIA

Uji Bio Kimia	*Aeromonas hydrophilla*
Gram	–
Bentuk	Batang
Katalase	+
Oksidase	+
H2S	–
Indol	+
Motil	+
OF medium	Fermentatif
VP	+
MR	–
Gelatin	+
Urea	–
Glukosa	+
Sukrosa	+

Lab. Mikrobiologi BBPBAP Jepara
Penyelia

Sri Murti Astuti, SP.

Lampiran 2. Alat-alat yang digunakan dalam Penelitian

Cawan petri

Oven

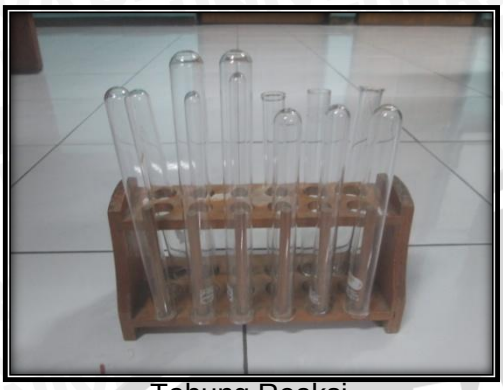
Inkubator

Lemari Pendingin ekstrak

Autoclave

Gelas Ukur

Lampiran 2. (Lanjutan)



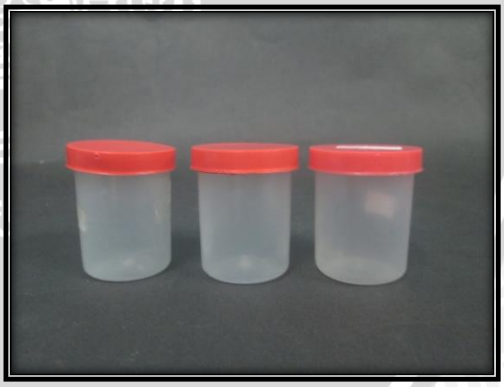
Tabung Reaksi

Nampan

Beaker Glass

Corong Kaca

Jarum osse, Spatula dan pinset



Botol film

Lampiran 2. (Lanjutan)

Bunsen dan Korek Api

Mikropipet dan Blue tip

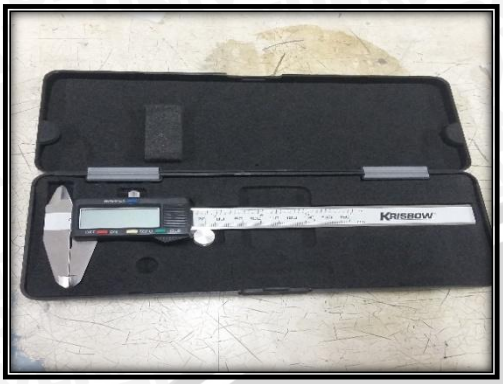
Erlenmeyer

Gunting

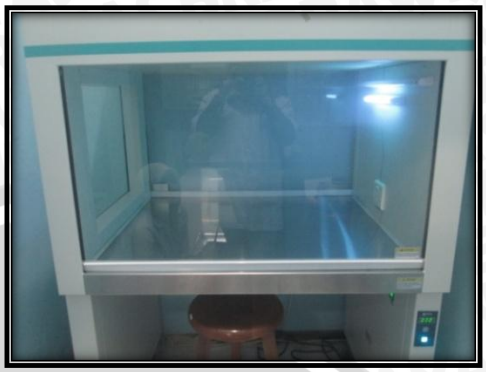
Rak Tabung Reaksi

Timbangan Digital

Lampiran 2. (Lanjutan)



Jangka Sorong



Laminar Air Flow

Triangel

Pipet Tetes

Toples Kaca

Hotplate

Evaporator

Destruksi

Vortex Mixer

Timbangan Analitik

Botol Sprayer

Lemari Pendingin Bah

Lampiran 3. Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian

Larutan violet

iodine 5%

Kapas

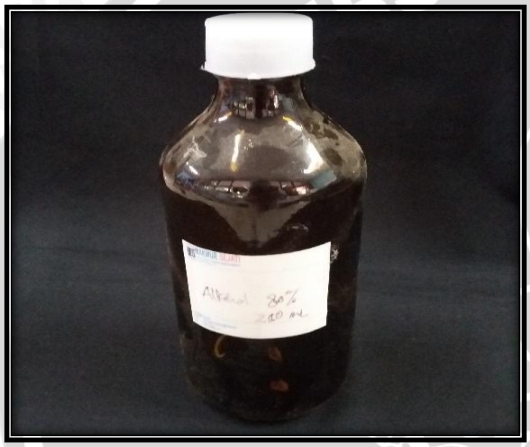
DMSO 100%

Kertas Cakram

Akuades

TSB

TSA

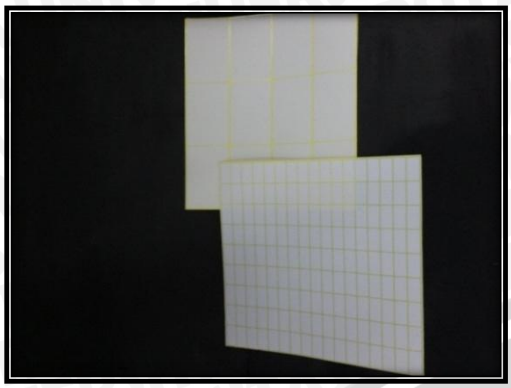


Alkohol 80%

Benang Kasur

Safranin

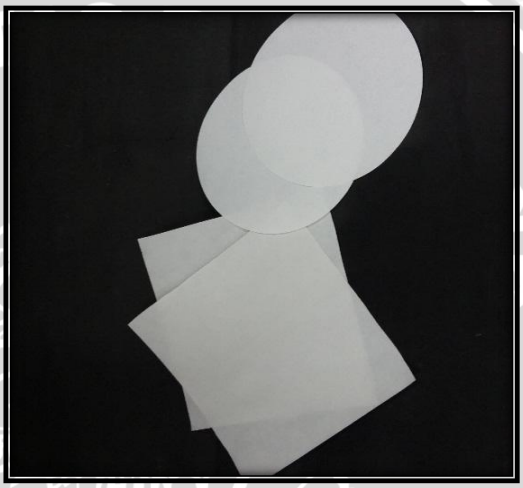
Ethanol 96% dan Alkohol 70%



Kertas Label

Tissue

Aluminum Foil dan Kertas Warp



Kertas Saring

pH paper

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 4. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*)

Disiapkan tanaman Kenikir

Dikeringkan dengan cara dioven

Dihaluskan daun kenikir hingga menjadi bubuk

Diberi Ethanol 96%

Dilakukan maserasi selama 3 X 24 jam

Disaring

Lampiran 4. (Lanjutan)

Dilakukan evaporasi

Dihasilkan ekstrak daun kenikir

Lampiran 5. Analisis Data Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*) Terhadap Diameter Hambatan (mm) Bakteri *A. hydrophila* secara *In Vitro*

Perlakuan (ppt)	Ulangan			Total (mm)	Rata-rata (mm)
	1	2	3		
A (10)	4,48	4,91	4,95	14,34	4,78±0,26
B (20)	5,79	6,31	5,84	17,94	5,98±0,29
C (30)	6,78	6,3	8,21	21,29	7,09±0,99
D (40)	8,15	10,03	9,4	27,58	9,19±0,96
E (50)	9,8	10,37	10,35	30,52	10,17±0,32
				111,67	

a) Perhitungan:

1. Faktor Koreksi (FK) $= \frac{G^2}{N}$

$= \frac{111.67^2}{15}$

$= 831,3459$

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

$= (A1^2 + A2^2 + A3^2 + \ldots + D3^2) - FK$

$= 895,27 - 831,3459$

$= 63,9262$

3. JK Perlakuan $= \frac{(\ xi)^2}{r} - FK$

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

$= \frac{2672.87}{3} - 831,3459$

$= 59,61077$

4. JK galat = JK Total - JK Perlakuan

=63,9262 – 59,61077

= 4,3154

5. db Total = (n x r) - 1

   = (5 x 3) - 1

   = 14

6. db Perlakuan = n -1

   = 5 – 1

   = 4

7. db Galat = db Total - db Perlakuan

   = 14 - 4

   = 10

b) Tabel Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	Db	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	59,61077	14,90269	34,53375**	3,48	5,99
Acak	8	4,3154	0,43154			
Total	11					

****) berbeda sangat nyata**

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

c) Uji BNT Uji Efektivitas Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudtus*) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *In vitro*

$$SED = \sqrt{\frac{2 \; x \; KT \; acak}{ulangan \; (r)}} = \sqrt{\frac{2 \; x \; 0{,}43154}{3}} = 0{,}536371$$

BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED= 1,20
BNT 1% = T tabel 1% (db acak) x SED= 1,71

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		4.78	5.98	7.09	9.19	10.17	
A	4,78	_					a
B	5,98	1,20*	_				b
C	7,09	2,31**	1,11^{ns}	_			b
D	9,19	4,41**	3,21**	2,10**	_		c
E	10,17	5,39**	4,19**	3,08**	0,98^{ns}	_	c

***) berbeda nyata**
****) berbeda sangat nyata**
^{ns}) Tidak berbeda nyata

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

d) Tabel Uji Polinomial Orthogonal

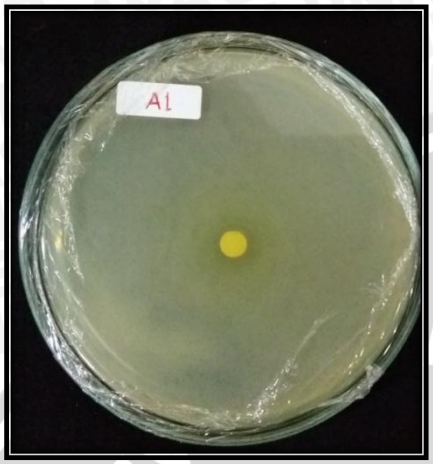
Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan (Ci) Linear	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	14,34	-2	2	-1	1
B	17,94	-1	-1	2	-4
C	21,29	0	-2	0	6
D	27,58	1	-1	-2	-4
E	30,52	2	2	1	1
Q=∑Ci*Ti		42	1,62	-3,1	-9,48
Kr=(∑Ci^2)*r		30	42	30	210
JK=Q^2/Kr		58.8	0,062486	0,320333	

e) Tabel sidik Ragam Regresi

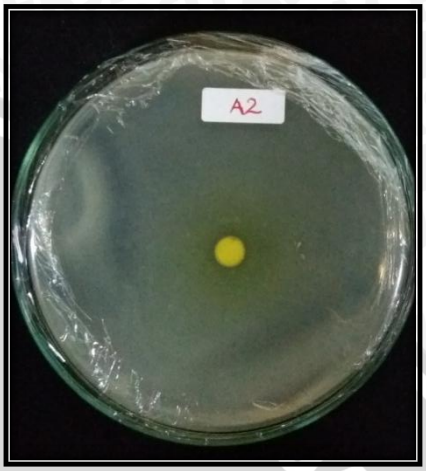
Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	59,61077			3,48	5,99
Linier	1	58,8	58,8	136,252**		
Kuadratik	1	0,062486	0,062486	$0,144797^{ns}$		
Kubik	1	0,320333	0,320333	$0,742303^{ns}$		
Kuartik	1	0,427954	0,427954	$0,991691^{ns}$		
Acak	10	4,3154	0,43154			
Total	14					

** = berbeda sangat nyata ns = tidak berbeda nyata

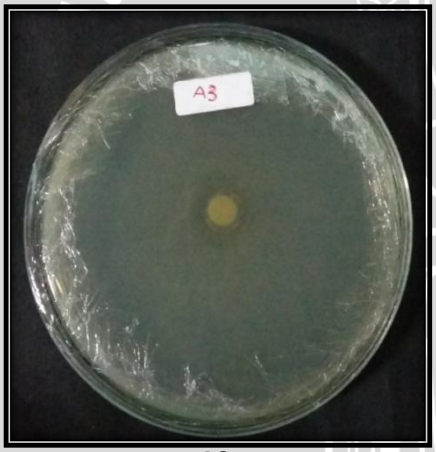
Lampiran 6. Hasil Uji Cakram Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila*



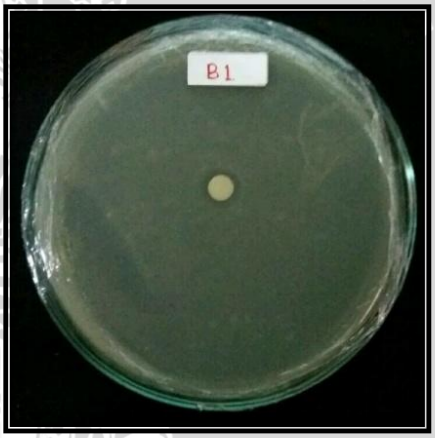
10 ppt



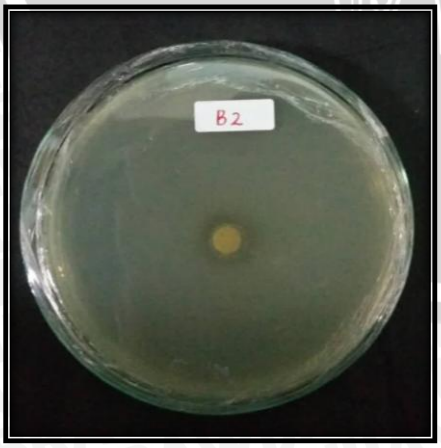
10 ppt



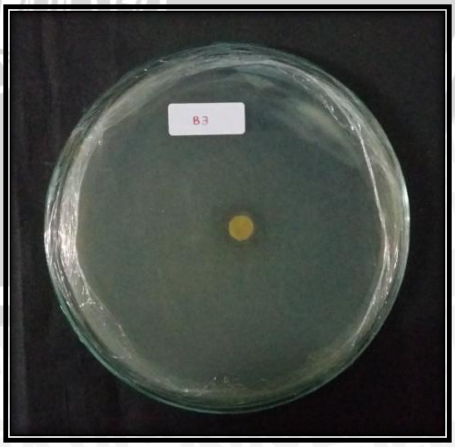
10 ppt



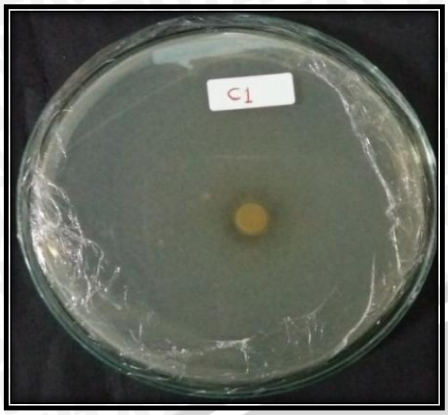
20 ppt



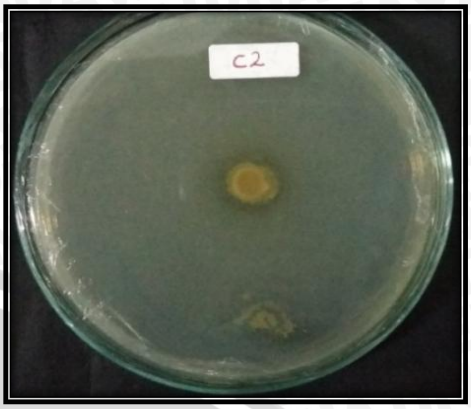
20 ppt



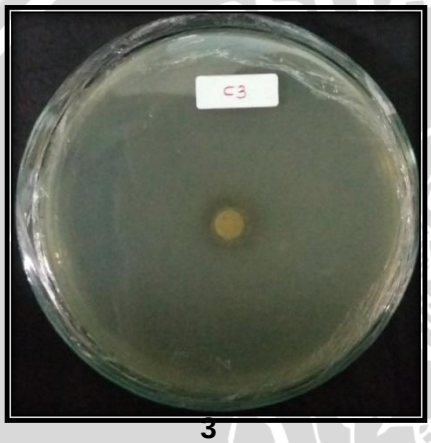
20 ppt



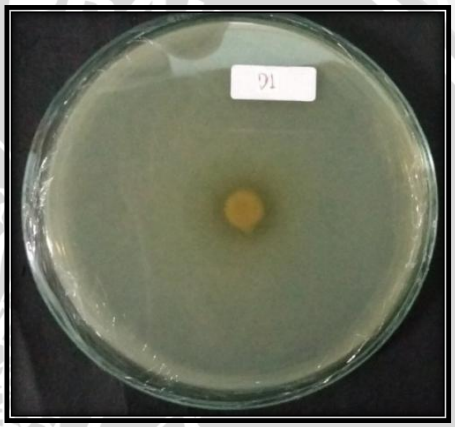
30 ppt



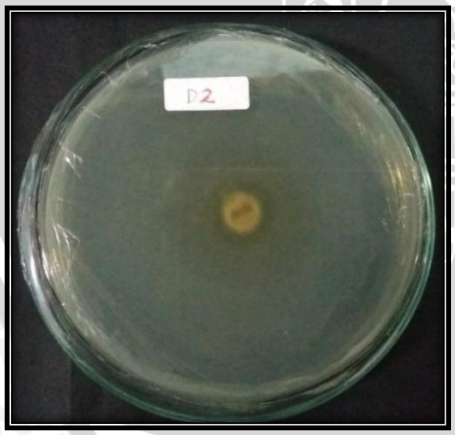
30 ppt



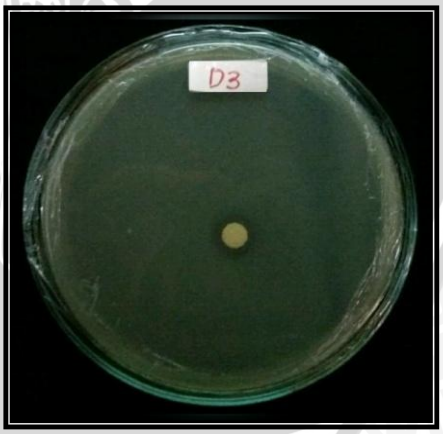
3
30 ppt



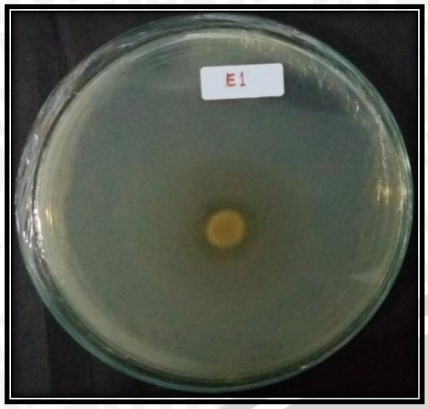
40 ppt



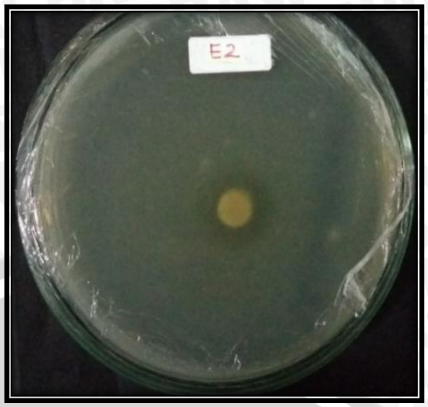
40 ppt



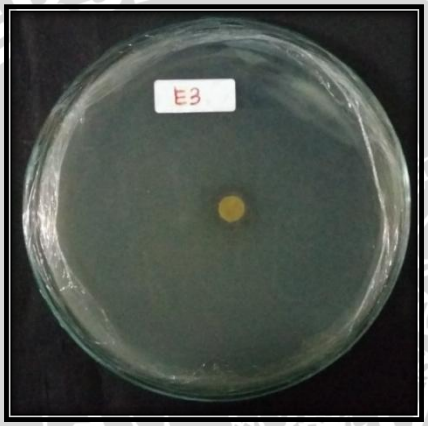
40 ppt



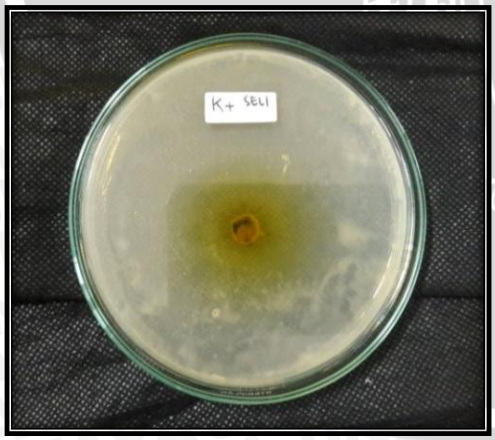
50 ppt



50 ppt



50 ppt



200 ppt

0 ppt

repository.ub.ac.id
UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Lampiran 4. Penentuan Dosis Ekstrak Daun Kenikir (*C. caudatus*)

Pembuatan ekstrak dimulai dengan menimbang daun kenikir segar sebanyak 1 kg. Selanjutnya daun kenikir dicuci sampai bersih dan dilakukan pemotongan untuk mempercepat proses pengeringan dengan menggunakan oven. Pengovenan dilakukan selama 24 jam dengan menggunakan suhu 50ºC. Berat daun kenikir setelah dilakukan pengovenan yaitu sebanyak 200 gram. Selanjutnya persiapan perendaman (maserasi) dimana daun kenikir kering direndam dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 1 liter selama 3 x 24 jam. Larutan yang didapat kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* untuk menguapkan etanol sehingga didapatkan ekstrak daun kenikir sebanyak 9,75 gram. Selanjutnya dilakukan pengukuran untuk menentukan dosis yang diinginkan dengan menambahkan larutan pengencer DMSO 10%. Berikut dosis ekstrak daun kenikir dan laruran pengencer DMSO 10%:

a) 10 ppt

N1 x V1 = N2 x V2

200 x V ml = 10 x 3 ml

V = 0,15

DMSO = 3 – 0,15 = 2,85

b) 20 ppt

N1 x V1 = N2 x V2

200 x V ml = 20 x 3ml

V 1 = 0,3

DMSO = 3 – 0,3 = 2,70

c) 30 ppt

N1 x V1 = N2 x V2

200 x V ml = 30 x 3ml

V 1 = 0,45

DMSO = 3 – 0,45 = 2,55

d) 40 ppt

N1 x V1 = N2 x V2

200 x V ml = 40 x 3ml

V1 = 0,6

DMSO = 3 – 0,6 = 2,40

e) 50 ppt

N1 x V1 = N2 x V2

200 x V ml = 30 x 3ml

V1 = 0,75

DMSO = 3 – 0,75 = 2,25