

**PENGARUH EKSTRAK KASAR DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*)
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Vibrio alginolyticus* SECARA IN
VITRO**

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

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh:
ROCHMAD SASONO AJI
125080500111027



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

**PENGARUH EKSTRAK KASAR DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*)
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Vibrio alginolyticus* SECARA IN
VITRO**

**LAPORAN 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:
ROCHMAD SASONO AJI
125080500111027**



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

LAPORAN SKRIPSI

PENGARUH EKSTRAK KASAR DAUN PEGAGAN (*Centella asiatica*) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Vibrio alginolyticus* SECARA IN VITRO

Oleh:
ROCHMAD SASONO AJI
NIM. 125080500111027

Telah dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal 1 Juni 2016
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat
Tanggal : _____

Dosen Penguji I

Dr. Ir. Maftuch, M.Si
NIP. 19660825 199203 1 001
TANGGAL : 15 JUN 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS
NIP. 19550213 198403 1 001
TANGGAL : 15 JUN 2016

Dosen Penguji II

Ir. Heny Suprastyani, MS
NIP. 19620904 198701 2 001
TANGGAL : 15 JUN 2016

Dosen Pembimbing II

Ir. Ellana Sanoesi, MP
NIP. 19630924 199803 2 002
TANGGAL : 15 JUN 2016

Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP



Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS
NIP : 19620805 198603 2 001
TANGGAL : 15 JUN 2016



PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI

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

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 1 Juni 2016

Mahasiswa

Rochmad Sasono Aji



RINGKASAN

Rochmad Sasono Aji. Pengaruh Ekstrak Kasar Daun Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Vibrio alginolyticus* Secara *In Vitro*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.** dan **Ir. Ellana Sanoesi, MP**

Pembangunan nasional adalah upaya meningkatkan seluruh aspek kehidupan masyarakat, bangsa dan negara. Salah satu sektor yang dapat menunjang pembangunan perekonomian adalah subsektor perikanan budidaya. Kendala utama dalam kegiatan budidaya adalah munculnya serangan penyakit yang menginfeksi organisme budidaya. Akibat dari serangan penyakit yaitu menyebabkan kerugian biaya produksi hingga mengalami kebangkrutan usaha. Salah satu penyakit yang menyerang budidaya adalah septicemic vibriosis yaitu penyakit yang disebabkan oleh bakteri *V. alginolyticus*. Penyakit ini dapat mengakibatkan mortalitas hingga 50%, pada umumnya tanda – tanda vibriosis mirip dengan penyakit infeksi lainnya, yaitu kehilangan nafsu makan, kulit mengalami pemucatan atau perubahan warna. Selama ini pencegahan terhadap serangan bakteri pada umumnya dilakukan dengan pemberian antibiotik dan bahan kimia. Salah satu alternatif yang digunakan untuk mengatasi permasalahan serangan penyakit adalah mengganti penggunaan antibiotik dengan bahan alami seperti tumbuhan obat, yaitu dengan menggunakan daun pegagan (*C. asiatica*). Tanaman ini mengandung senyawa antibakteri yaitu flavonoid. Flavonoid merupakan senyawa turunan dari fenol yang berfungsi merusak membran sitoplasma, mendenaturasi protein sel dan menghambat kinerja protein sel.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang pada tanggal 18 januari hingga 23 maret 2016. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat bakteri *V. alginolyticus* secara *in vitro*.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen yaitu metode penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap obyek penelitian serta adanya kontrol. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Percobaan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 5 perlakuan dosis ekstrak kasar daun pegagan yaitu dosis perlakuan (A) 15ppt ; (B) 30 ppt ; (C) 45 ppt ; (D) 60 ppt dan (E) 75 ppt. Masing – masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun pegagan terhadap bakteri *V. alginolyticus* berbeda sangat nyata yaitu pada pengamatan diameter zona bening didapatkan nilai tertinggi pada perlakuan A sebesar 11,243 mm. Sedangkan diameter rata – rata zona bening terendah pada perlakuan E sebesar 4,747 mm. Hubungan zona bening antar perlakuan ekstrak kasar bunga rosella terhadap bakteri *V. alginolyticus* menunjukkan perpotongan garis secara linear dengan persamaan $y = -0,1028x + 11,934$, dengan koefisien nilai determinasi (R^2) sebesar 0,7396.

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) berpengaruh terhadap daya hambat (zona bening) bakteri *V. alginolyticus* dengan nilai rata – rata zona bening tertinggi pada perlakuan dosis 15 ppt sebesar 11,243 mm.

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala berkah, karunia serta ridho-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul: "Pengaruh Ekstrak Kasar Daun Pegagan (*C. asiatica*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. alginolyticus* Secara *In Vitro*". Penulis mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS dan ibu Ir. Ellana Sanoesi, M.P. selaku dosen pembimbing dan semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan karya tulis ilmiah laporan skripsi ini.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan yang mendasar pada karya tulis ilmiah laporan skripsi ini. Oleh karena itu penulis mengharapkan kritik serta saran yang dapat membangun untuk penyempurnaan karya tulis ilmiah laporan skripsi selanjutnya. Demikian penulis sampaikan terimakasih.

Malang, 1 Juni 2016

Penulis

UCAPAN TERIMAKASIH

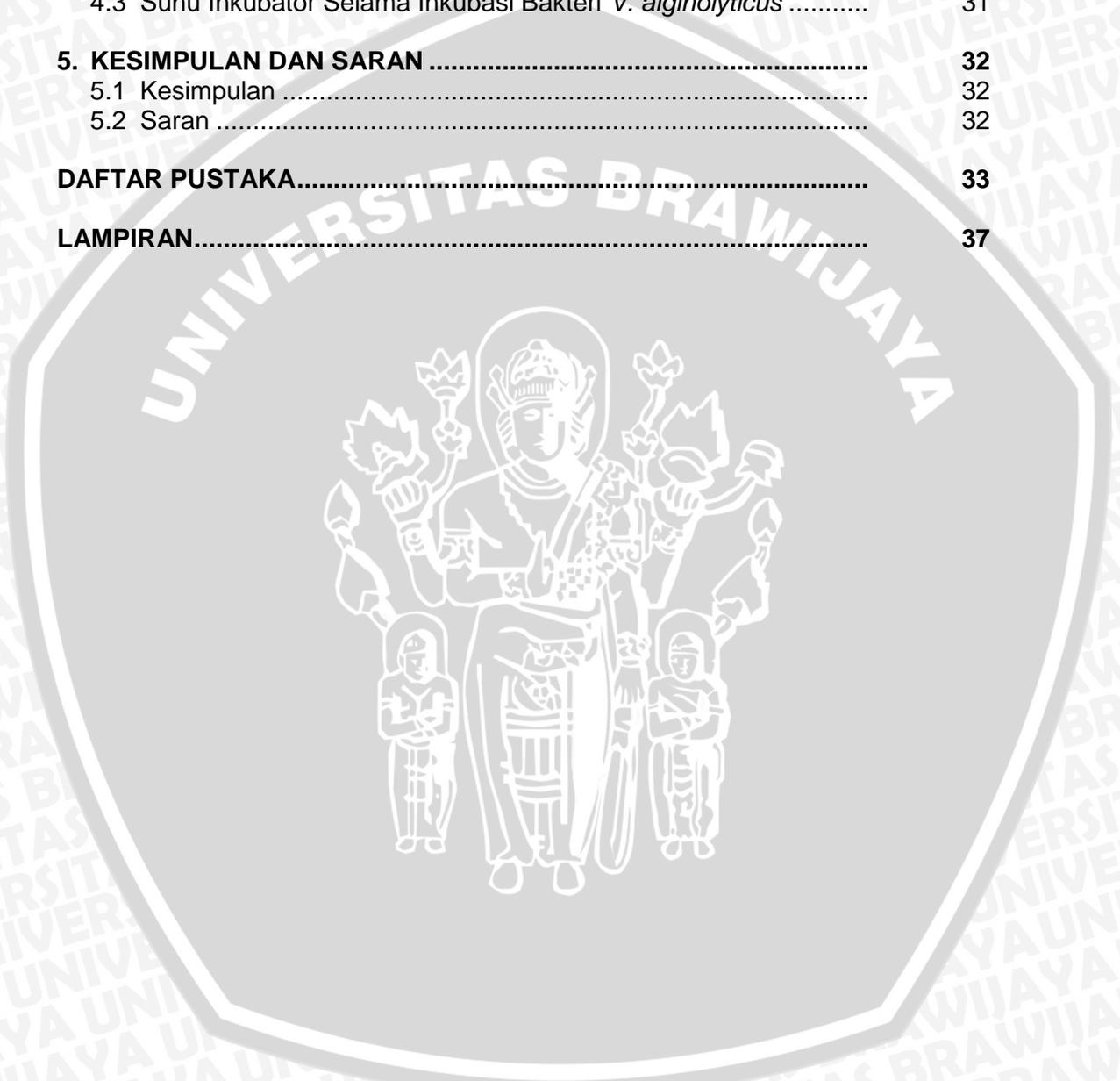
Puji syukur penulis ucapkan atas terselesainya laporan skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih sebesar besarnya kepada :

1. Allah SWT yang senantiasa mengiringi dan memberi petunjuk-Nya dalam setiap langkah, serta Nabi besar Muhammad SAW yang menjadi suri tauladan bagi umatnya.
2. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno MS selaku Dosen Pembimbing Akademik, pembimbing Praktek Kerja Magang (PKM) dan pembimbing skripsi yang telah banyak memberikan motivasi, saran, bimbingan, arahan dan nasihat bagi penulis selama masa studi.
3. Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku dosen pembimbing II yang telah memberikan bimbingan, saran dan arahan kepada penulis selama penelitian.
4. Dr. Ir. Maftuch, M.Si selaku penguji I dan Ir. Heny Suprastyani, MS selaku penguji II yang telah memberikan bimbingan, arahan dan saran bagi penulis.
5. Ayah Istadji dan ibu Sulistyo Meini yang selalu memberikan doa yang terbaik yang selalu menjadi penuntun dan memberi ilmu yang bermanfaat bagi penulis. Serta saudaraku Sri Sukeksi Andayaningrum.
6. Seluruh rekan - rekan tim aljino: Heprita Nur, Ellyda Hasan , Rusmawanto, Intan Permatasari, Nikzha Anis, Ibtida'ul Munir dan seluruh rekan-rekan Budidaya Perairan Angkatan 2012 yang telah banyak membantu penulis dan selalu memberikan dukungan dan motivasi untuk terselesainya laporan skripsi ini.
7. Serta pihak-pihak yang membantu selama penelitian.

DAFTAR ISI

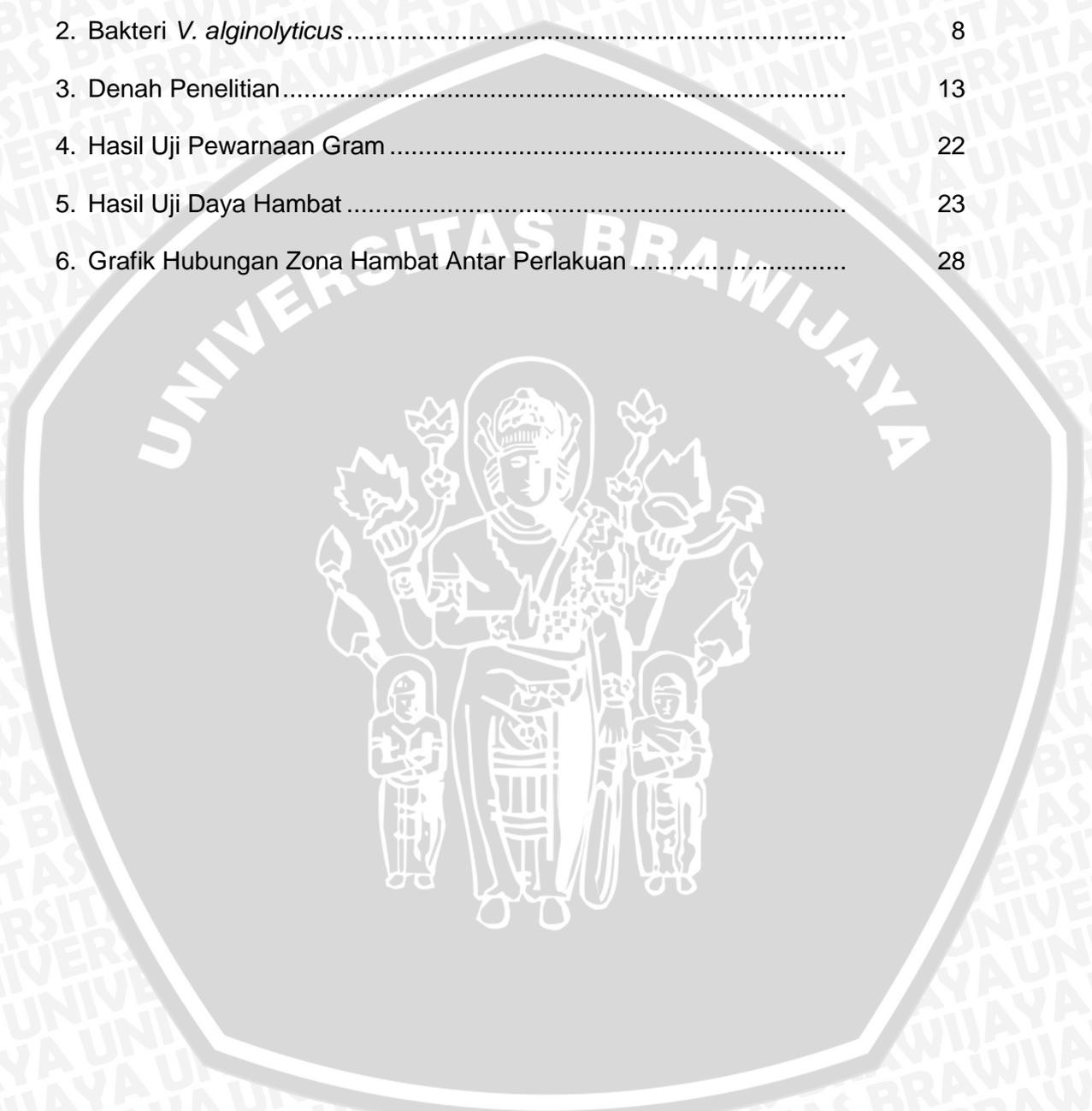
	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI.....	iii
RINGKASAN.....	iv
KATA PENGANTAR.....	v
UCAPAN TERIMAKASIH.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	5
1.4 Hipotesis.....	5
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Biologi Tanaman Pegagan (<i>C.asiatica</i>).....	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman Pegagan.....	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran.....	7
2.1.3 Bahan Aktif Dalam Daun Pegagan.....	7
2.2 Biologi Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	8
2.2.2 Infeksi Oleh Bakteri <i>V. alginolyticus</i> dan gejalanya.....	9
2.3 Uji Daya Hambat Bakteri <i>V. alginolyticus</i> secara <i>In Vitro</i> Dengan Uji Cakram.....	9
3. METODE PENELITIAN.....	11
3.1 Materi Penelitian.....	11
3.1.1 Peralatan Penelitian.....	11
3.1.2 Bahan Penelitian.....	11
3.2 Metode Penelitian.....	11
3.3 Rancangan Penelitian.....	12
3.4 Prosedur Penelitian.....	13
3.4.1 Persiapan Penelitian.....	13

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian	17
3.5 Parameter Uji Penelitian	19
3.6 Analisa Data Penelitian	19
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	21
4.1 Identifikasi Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	21
4.2 Daya Hambat (Zona Bening) Ekstrak Kasar Daun Pegagan (<i>C. asiatica</i>) terhadap Bakteri <i>V. alginolyticus</i> secara <i>In Vitro</i>	23
4.3 Suhu Inkubator Selama Inkubasi Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	31
5. KESIMPULAN DAN SARAN	32
5.1 Kesimpulan	32
5.2 Saran	32
DAFTAR PUSTAKA	33
LAMPIRAN	37



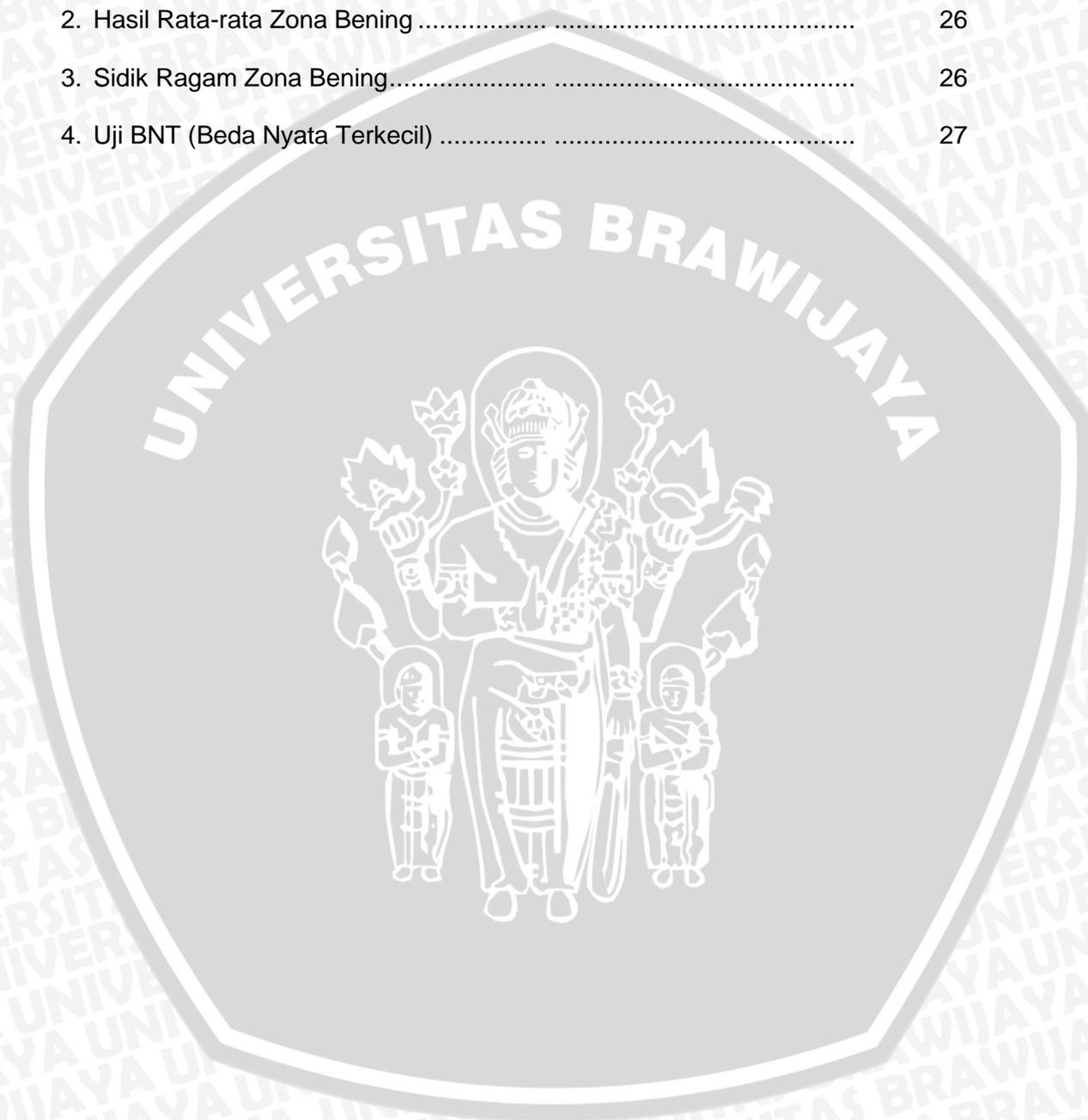
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tumbuhan Pegagan (<i>C. asiatica</i>).....	6
2. Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	8
3. Denah Penelitian.....	13
4. Hasil Uji Pewarnaan Gram.....	22
5. Hasil Uji Daya Hambat.....	23
6. Grafik Hubungan Zona Hambat Antar Perlakuan.....	28



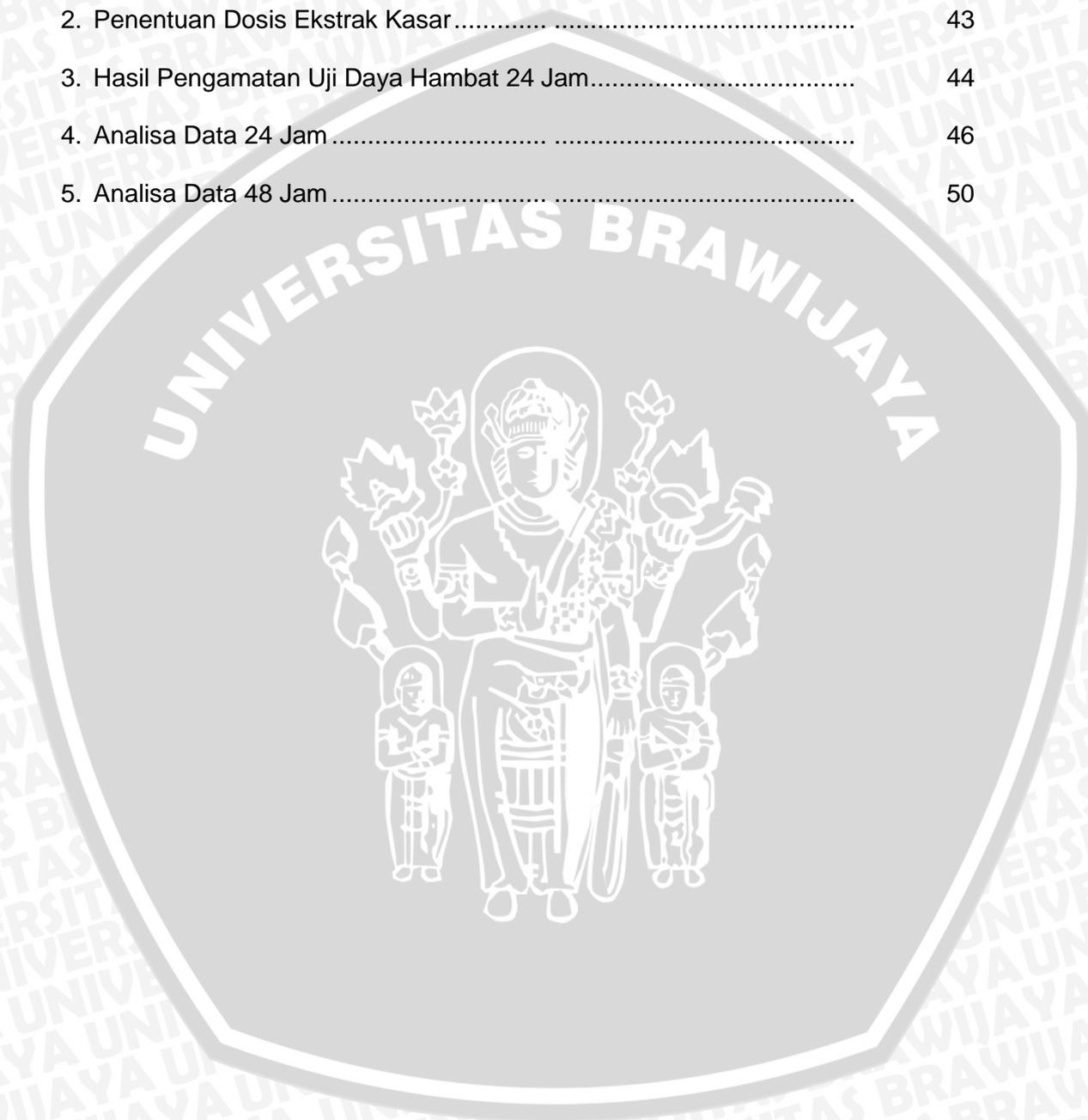
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan	24
2. Hasil Rata-rata Zona Bening	26
3. Sidik Ragam Zona Bening.....	26
4. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)	27



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Foto Alat dan Bahan Penelitian	37
2. Penentuan Dosis Ekstrak Kasar	43
3. Hasil Pengamatan Uji Daya Hambat 24 Jam.....	44
4. Analisa Data 24 Jam	46
5. Analisa Data 48 Jam	50



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pembangunan nasional adalah upaya untuk meningkatkan seluruh aspek kehidupan masyarakat, bangsa dan negara yang merupakan proses pengembangan keseluruhan sistem penyelenggaraan negara untuk mewujudkan tujuan nasional. Sub sektor perikanan memegang peranan sangat penting dalam pembangunan perekonomian nasional. Sumber daya perikanan Indonesia merupakan aset pembangunan yang memiliki peluang besar untuk dijadikan salah satu sumber pertumbuhan ekonomi. Sumber daya perikanan yang dimiliki oleh Indonesia beragam dan berpotensi diantaranya budidaya laut dan tambak atau payau yang mengarah untuk kemajuan perekonomian Indonesia (Juanti, Jumiati, Santoso, 2014).

Menurut Sa'adah (2014), perikanan adalah suatu kegiatan perekonomian yang memanfaatkan sumber daya alam perikanan dengan menggunakan ilmu pengetahuan dan teknologi untuk kesejahteraan manusia dengan mengoptimalkan dan memelihara produktivitas sumber daya perikanan dan kelestarian lingkungan.

Menurut Soewito, Subono, Malangjoedo, Soesanto, Soeseno, Soehardi, Budiono, Martono, Asikin, Rachmatun (2000), wilayah daratan Indonesia berupa puluhan ribu pulau besar dan kecil, dengan panjang garis pantai \pm 81.000 km. Perairan pantai yang demikian panjang selain mempunyai potensi usaha peangkapan ikan berskala kecil juga potensi usaha budidaya laut. Berkat kemajuan ilmu dan teknologi kemudian berkembang perikanan budidaya, yang potensinya di Indonesia cukup besar. Bila dikelola dengan baik, potensi itu dapat mendatangkan kesejahteraan yang besar bagi bangsa Indonesia.

Menurut Murtidjo (2003), produksi perikanan dari tahun ke tahun meningkat dengan pesat. Peningkatan produksi tersebut disamping meningkatkan konsumsi ikan dalam negeri, juga meningkatkan ekspor hasil perikanan, memperluas kesempatan kerja atau berusaha, meningkatkan pendapatan petani ikan dan nelayan, serta mendorong pembangunan secara menyeluruh. Ekspor udang Indonesia yang senantiasa meningkat, serta dukungan kebijaksanaan pemerintah bahwa udang diandalkan sebagai primadona ekspor subsektor perikanan menyebabkan kebutuhan benur tetap meningkat sesuai peningkatan volume ekspor udang.

Menurut Purnomowati, Garbono, Nugroho (2011), perkembangan perikanan budidaya cukup pesat akhir-akhir ini, tidak terlepas dari serentetan kendala, dan salah satu kendala teknis yang dirasakan makin serius sejalan dengan intensifikasi budidaya adalah gangguan penyakit yang disebabkan oleh jasad patogen. Jasad pathogen tersebut dapat berupa eksotik patogen dan endemik patogen, selain itu kendala utama produksi perikanan disebabkan oleh penurunan kualitas lingkungan. Kualitas lingkungan budidaya makin lama semakin menurun, hal ini berkaitan dengan makin intensifnya budidaya yang banyak menggunakan pakan buatan dan tidak disertai dengan penerapan manajemen budidaya yang baik.

Menurut Sumino, Supriyadi, Wardiyanto (2013), suatu kegiatan budidaya ikan tidak terlepas dari adanya kekhawatiran mengenai penyakit yang menginfeksi pada organisme budidaya. Penyakit menjadi salah satu faktor kegagalan dalam kegiatan budidaya jika tidak diatasi secara tepat. Penyakit pada ikan dan udang yang dibudidayakan secara massal banyak disebabkan oleh jamur, parasit, virus dan bakteri.

Menurut Prajitno (2005), penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak

langsung. Dengan demikian timbulnya penyakit ikan di kolam merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, kondisi lingkungan dan organisme penyakit. Interaksi yang tidak sesuai ini dapat menyebabkan ikan stress, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah terinfeksi penyakit. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan kendala utama dalam kegiatan budidaya. Salah satu penyakit yang ditakuti oleh pembudidaya air payau adalah *Septichemic vibriosis* yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio alginolyticus*.

Menurut Ashari, Tumbol, Kolopita (2014), penyakit yang disebabkan oleh bakteri memperlihatkan gejala-gejala seperti kehilangan nafsu makan, luka-luka pada permukaan tubuh, pendarahan pada insang, perut membesar berisi cairan, sisik lepas, sirip ekor lepas, jika dilakukan pembedahan akan terlihat pembengkakan dan kerusakan pada hati, ginjal dan limpa. Penyakit bakteri ini dapat menyebabkan kematian diatas 80% dalam waktu relatif singkat.

Menurut Aniputri, Hutabarat dan Subandiyono (2014), pengobatan ikan yang terinfeksi bakteri selama ini dilakukan adalah dengan pemberian antibiotik. Penggunaan antibiotik pada skala besar kurang efisien karena selain kurang ekonomis, dampak yang ditimbulkan adalah bertambahnya jenis bakteri yang resisten terhadap antibiotik dan dapat menyebabkan pencemaran lingkungan. Salah satu cara pengobatan alternatif yang efektif adalah dengan menggunakan bahan-bahan alami. Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai alternatif adalah daun pegagan (*C. asiatica*).

Menurut Ramadhan, Rasyid dan Elmatris (2015), daun pegagan (*C. asiatica*) atau yang dikenal di beberapa daerah dengan nama daun kaki kuda merupakan salah satu tanaman asli Indonesia yang sering digunakan sebagai obat tradisional. Salah satu manfaat yang bisa didapatkan dari pegagan (*C. asiatica*) adalah antibakterinya. Manfaat antibakterinya didapatkan karena

pegagan (*C. asiatica*) mengandung zat antibakteri, diantaranya adalah saponin, tannin, alkaloid, dan flavonoid.

Menurut Supriyatna, Moelyono, Iskandar dan Febriyanti (2014), Flavonoid merupakan senyawa yang berwarna kuning sangat umum di alam. Secara kimia, flavonoid merupakan derivat flavon (*2-fenil-benzo- γ -piron*) dan beberapa (disebut isoflavonoid) dari isoflavon (*3-fenil-benzo- γ -piron*). Flavonoid biasanya larut di air dan alkohol mendidih. Banyak flavonoid mengandung aglikon dari glikosida alam yang dibentuk oleh jembatan dari satu atau lebih gula di posisi tujuh atau tiga. Flavonoid juga memiliki sifat antikoagulan dan antihepatotoksik. Banyak flavonoid juga mempunyai aktivitas anti inflamasi, anti oksidan, anti bakteri dan bersifat spasmolitik.

1.2 Rumusan Masalah

Menurut Prajitno (2007), bakteri vibrio bersifat patogen oportunistik (tidak menyebabkan penyakit pada organisme yang memiliki sistem imun normal, tetapi menginfeksi organisme yang memiliki sistem imun lemah) pada budidaya air payau dan laut, karena bertindak sebagai patogen primer dan sekunder. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri vibrio disebut vibriosis. Gejala yang ditimbulkan oleh bakteri vibrio tergantung tingkat serangan, yaitu kronis dan akut. Beberapa gejala yang terlihat adalah punggung kehitam-hitaman, bercak merah pada pangkal sirip, sisik tegak, bergerak lamban, keseimbangan terganggu, dan nafsu makan berkurang. Tanda-tanda klinis ini disebabkan oleh serangan bakteri *V. alginolyticus*.

Menurut Hatmanti, Nuchsin, dan Dewi (2009), Cara yang sering dilakukan untuk membasmi bakteri patogen ialah dengan menggunakan antibiotik, namun penggunaan antibiotik ternyata dapat menimbulkan efek samping yaitu dapat

menjadikan bakteri patogen menjadi resisten. Oleh karena itu perlu dilakukan pencarian metode lain yang aman bagi biota dan lingkungannya.

Berdasarkan uraian diatas dapat diperoleh rumusan masalah sebagai berikut :

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

1.3 Tujuan

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

1.4 Hipotesis

H₀ : Di duga pemberian ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) dengan dosis yang berbeda tidak berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *V. alginolyticus*.

H₁ : Di duga pemberian ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) dengan dosis yang berbeda berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *V. alginolyticus*.

1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada tanggal 18 Januari hingga 23 Maret 2016.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Tanaman Pegagan (*C. asiatica*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman Pegagan

Menurut Rasy (2013), Tanaman pegagan (*C. asiatica*) diklasifikasikan sebagai berikut:

Kerajaan : Plantae
Ordo : Apiales
Famili : Mackinlayaceae
Genus : *Centella*
Spesies : *Centella asiatica*

Menurut Aspan, Sherley, Napitulu, Wisaksono, Efizal, Mooduto, Herawaty, Novianti, Wahyu dan Tumino (2008), pegagan (*C. asiatica*) memiliki karakteristik seperti tanpa batang tetapi dengan rimpang pendek dan stolon-stolon yang melata, panjang 10-80 cm. Pegagan memiliki daun tunggal, tersusun dalam roset yang terdiri dari dua sampai sepuluh daun, kadang-kadang agak berambut; tangkai daun panjang sampai 50 mm, helai daun berbentuk ginjal, lebar dan bundar dengan garis tengah 1-7 cm, pinggir daun beringgit sampai beringgit-bergerigi, terutama ke arah pangkal daun. Bentuk tanaman pegagan (*C. asiatica*) disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. Tanaman Pegagan (*C. asiatica*) (Direktorat Obat Asli Indonesia, 2010)

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Rasy (2013), pegagan (*C. asiatica*) merupakan tumbuhan dengan batang lunak tidak berkayu yang menyukai tanah agak lembab dan cukup sinar matahari. Biasanya tanaman pegagan (*C. asiatica*) tumbuh subur di padang rumput, tepi selokan, sawah dan sebagainya. Selain itu, pegagan (*C. asiatica*) juga sering sengaja ditanam oleh masyarakat untuk menutupi tanah di daerah perkebunan.

Menurut Direktorat Obat Asli Indonesia (2010), pegagan tumbuh liar diseluruh indonesia serta daerah-daerah beriklim tropis pada umumnya. Pegagan dapat tumbuh mulai di dataran rendah hingga ketinggian 2500 mdpl baik daerah terbuka. Pegagan juga tumbuh di tempat lembab dan subur seperti tegalan, padang rumput, tepi parit, diantara batu-batu, dan ditepi jalan. Pegagan juga sering ditemukan hidup secara berkelompok didaerah yang memiliki daerah yang lembab.

2.1.3 Bahan Aktif Dalam Daun Pegagan

Menurut Direktorat Obat Asli Indonesia (2010), pegagan mengandung triterpenoid: asiatikosida, madekasosida, asam asiatat, asam indosentoat, bayogenin, asam 2α , 3β , 20, 23-tetrahidorksiurs-28-oat, asam euskapat, asam terminolat, asam 3β - 6β -23-tri-hidroksiolean-12en-28-oat, asam 3β - 6β -23-trihidroksiurs-12-en-28-oat; flavonoid: kaempferol, kuersetin; saponin: sentelasapogenol A, sentelasaponin A, B dan D; poliasetilen: kadiyenol, sentelin, asiatisin dan sentelisin.

Menurut Rasy (2013), tumbuhan pegagan (*C. asiatica*) atau kaki kuda mengandung beberapa senyawa kimia seperti : *asiaticoside*, *thankuniside*, *madecassoside*, *bhahmoside*, *brahmic acid*, *madasiatic acid*, *meso-inositol*, *centelloside*, *hydrocotylin*, *vellarine*, *tannin*, serta garam mineral. Menurut Tiwari, Gehlot dan Gambhir (2011), tanaman dan ekstrak mengandung *asiaticoside* yang

merupakan senyawa aktif *C. asitica* , dimana bagian trisakarida memiliki hubungan dengan *aglycone asiatic acid*. Triterpen saponin dan saponin bertanggung jawab untuk penyembuhan luka dan pembuluh darah.

2.2 Biologi Bakteri *V. alginolyticus*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi bakteri *V. alginolyticus*

Menurut Garity, Bell dan Lilburn (2004), bakteri *V. alginolyticus* diklasifikasikan sebagai berikut:

Filum : Proteobacteria

Kelas : Gammaproteobacteria

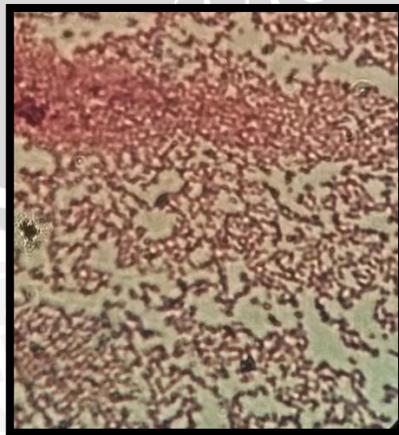
Ordo : Vibrionales

Famili : Vibrionaceae

Genus : Vibrio

Spesies : *Vibrio alginolyticus*

Menurut Felix, Nugroho, Silalahi dan Octavia (2011), *V. alginolyticus* dicirikan dengan pertumbuhannya yang bersifat koloni pada media padat non selektif. Ciri lain adalah membentuk kolom berukuran 0,8-1,2 cm yang berwarna kuning pada media TCBS. Bakteri *V. alginolyticus* bersifat gram negatif, katalase positif, oksidase positif dan termasuk kedalam bakteri motil. Morfologi bakteri *V. alginolyticus* disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Bakteri *V. alginolyticus* (Dokumentasi Pribadi).

2.2.2 Infeksi Oleh Bakteri *V. alginolyticus* dan Gejalanya

Menurut Ilmiah, Sukenda, Widanarni dan Harris (2012), Vibriosis merupakan penyakit bakterial yang disebabkan oleh infeksi patogen golongan *Vibrio* dan mengakibatkan kematian ikan mencapai lebih dari 80 % pada budidaya ikan di jaring apung. Proses infeksi bakteri *Vibrio* pada ikan diawali oleh proses interaksi dengan pelekatan datau adesi pada permukaan sel inang, yang diikuti dengan masuknya bakteri kedalam sel, kemudian dilanjutkan dengan tahap invasi dan penyebaran lokal atau sistemik dalam tubuh inang. Tahap terakhir adalah pengeluaran dari tubuh inang, mulai dari tahap pelekatan hingga tahap perusakan inang, mikroorganismenya menggunakan faktor virulensi antara lain pili yang mengakibatkan mikroorganismenya dapat bertahan dalam tubuh inang dan meninggalkan kerusakan.

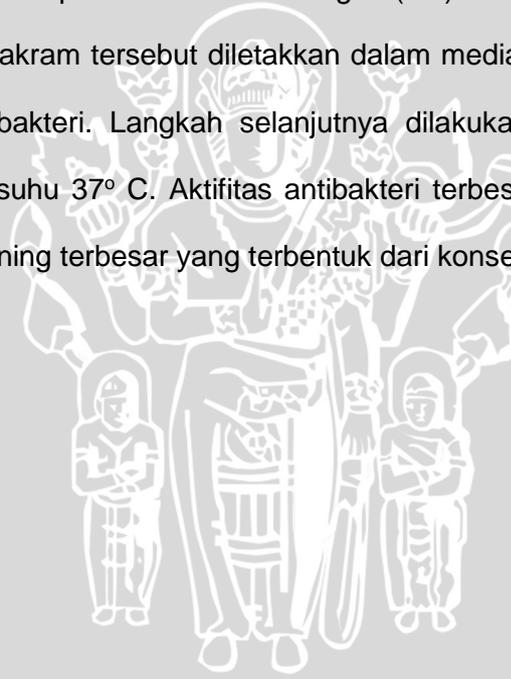
Septicemic vibriosis adalah penyakit yang menginfeksi larva ikan atau udang di wilayah Asia seperti China, Indonesia dan Thailand. Warna udang yang sakit karena diinfeksi bakteri menjadi keruh, tidak bisa bergerak, udang cenderung mengurangi kontak dengan cahaya, lambung kosong, meningkatnya permukaan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

2.3 Uji Daya Hambat Bakteri *V. alginolyticus* secara *in vitro* dengan Uji Cakram

Menurut Roihanah, Sukoso dan Andayani (2011), Uji cakram yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi disekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba dan dibandingkan dengan antibiotik kanamycin. Menurut Kusmiati dan Agustini (2007), metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah

direndam larutan uji diatas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram.

Menurut Mulyadi, Wuryanti dan Ria S. (2013), langkah-langkah dalam melakukan uji cakram adalah dimulai dengan cakram dicelupkan ke dalam larutan sampel sampai merata di seluruh permukaan cakram dengan berbagai macam konsentrasi yang telah disiapkan. Penuangan media *nutrient agar* (NA) yang telah disterilkan ke dalam petridish. Media *nutrient agar* (NA) yang telah dingin dan memadat selanjutnya di tanami bakteri. Bakteri yang di tanam diratakan hingga seluruh permukaan *nutrient agar* (NA) dengan menggunakan *spreader*. Kemudian cakram tersebut diletakkan dalam media *nutrient agar* (NA) yang telah ditanami bakteri. Langkah selanjutnya dilakukan dengan inkubasi selama 24 jam pada suhu 37° C. Aktifitas antibakteri terbesar ditunjukkan oleh luas diameter zona bening terbesar yang terbentuk dari konsentrasi tersebut.



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian meliputi : *autoclave*, *blender*, botol film, cawan petri, erlenmeyer 250 ml dan 500 ml, *hot plate*, *lamina air flow*, lemari pendingin, inkubator, toples kaca, tabung reaksi, gelas ukur 10 ml dan 100 ml, jarum osse, spatula, timbangan sartorius, mikropipet, bunsen, *rotary vacum evaporator*, rak tabung reaksi, gunting, corong dan *vortex*.

3.1.2 Bahan penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian meliputi : daun pegagan kering (*C. asiatica*), bakteri *V. alginolyticus*, alkohol 70%, etanol 90%, TCBS (*Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar*), TSB (*Tryptitone Soy Broth*), benang kasur, *tissue*, kapas, DMNS0 10%, kertas saring, aquades, *alumonium foil*, spiritus, kertas cakram, kertas koran, kertas label.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian ini adalah metode eksperimen yaitu metode yang memungkinkan untuk memanipulasi variabel dengan menghubungkan sebab dan akibat dari obyek yang diteliti. Menurut Nursalam (2008), penelitian eksperimen adalah suatu rancangan penelitian yang digunakan untuk mencari hubungan sebab-akibat dengan adanya keterlibatan penelitian dalam melakukan manipulasi terhadap variabel bebas. Tujuan penelitian eksperimen menurut Hermawan (2005), adalah mengukur pengaruh dari variabel-variabel "*Explanatory*" atau variabel independen terhadap variabel dependen, dengan cara mengontrol variabel-variabel lain, untuk melakukan inferensi kausal secara lebih jelas dan agar dapat dipahami.

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 atau homogen. Menurut Pratisto (2004), Rancangan acak lengkap merupakan rancangan percobaan yang paling sederhana diantara rancangan percobaan standar lainnya. Beberapa keuntungan menggunakan rancangan acak lengkap antara lain : Denah perancangan percobaannya lebih mudah, Analisis statistik terhadap objek percobaan sederhana dan fleksibel dalam jumlah penggunaan, perlakuan dan ulangan.

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

Keterangan :

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

μ : Nilai tengah umum

τ_i : Pengaruh perlakuan ke - i

ε_{ij} : Pengaruh ghalat percobaan dari perlakuan ke - i dan ulangan ke - j

Dalam penelitian *in vitro* perlakuan yang diamati adalah pengaruh perbedaan dosis ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. alginolitycus* pada cawan petri selama 24 jam. Pengamatan dilakukan berdasarkan pengukuran besarnya zona hambat bakteri *V. alginolitycus* yang muncul pada medium agar padat TCBSA (*Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar*) dengan satuan milimeter (mm). Tingkat dosis ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) yang dipakai dalam pengukuran ini adalah 5 perlakuan dengan 3 ulangan beserta kontrol positif dan kontrol negatif yaitu :

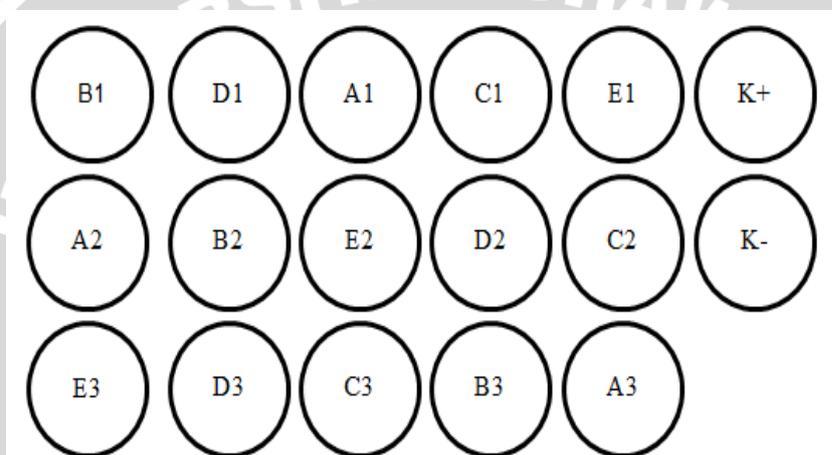
K+ : Perlakuan kontrol dengan dosis ekstrak kasar daun pegagan 100 ppt

K- : Perlakuan kontrol dengan dosis ekstrak kasar daun pegagan 0 ppt

A : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun pegagan 15 ppt

- B : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun pegagan 30 ppt
 C : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun pegagan 45 ppt
 D : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun pegagan 60 ppt
 E : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun pegagan 75 ppt

Untuk perhitungan ekstrak kasar daun pegagan yang dibutuhkan untuk mendapatkan dosis dari setiap perlakuan disajikan pada lampiran 2. Untuk denah penelitian pengaruh perbedaan dosis ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Denah Penelitian

Keterangan gambar :

- K + : Kontrol positif (+)
 K - : Kontrol positif (-)
 A - E : Perlakuan
 1 - 3 : Ulangan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

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

- Alat-alat yang akan digunakan dicuci menggunakan sabun cuci, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan plastik tahan panas dan diikat menggunakan benang.
- Air 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 dan bahan yang sudah disterilkan diambil.
- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

b. Sterilisasi Tempat Perlakuan

Sterilisasi tempat dilakukan guna menghindari kontaminan dengan bakteri yang berada diluar tempat penelitian. Sterilisasi tempat dapat dilakukan dengan cara kimia menggunakan alkohol 70% maupun cara fisika dengan pembakaran langsung maupun dengan penyinaran dengan sinar UV. Pada penelitian ini sterilisasi tempat dilakukan dengan menggunakan sinar UV yang terdapat pada *laminar air flow*.

c. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Pegagan

Proses pembuatan ekstrak dimulai dengan menyiapkan daun pegagan basah sejumlah 5 kg yang didapatkan dari daerah Batu, Jawa Timur. Kemudian

dijemur dibawah sinar matahari dan didapatkan berat kering sebanyak 1 kg. Selanjutnya daun pegagan kering tersebut dihaluskan dengan menggunakan *blender* sampai halus. Kemudian daun tersebut diambil sebanyak 100 gr dengan cara ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik.

Persiapan perendaman (*maserasi*) dimana serbuk daun pegagan (*C. asiatica*) sebanyak 100 gr di dimaserasi dalam etanol 90% sebanyak 1000 mililiter atau 1 Liter selama 3 x 24 jam dalam suhu kamar. Untuk menjaga kondisi larutan, toples dibungkus menggunakan *aluminium foil*. Kemudian larutan yang didapat kemudian disaring dengan kertas saring lalu diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak daun pegagan sebanyak 25,97 gram.

d. Pembuatan media

Bakteri *V. alginolyticus* diperoleh dari BBPBAP Jepara dengan kepadatan 10^8 sel/ml sebanyak 10 ml. Bakteri yang digunakan untuk uji daya hambat ekstrak kasar daun pegagan adalah bakteri dengan kepadatan 10^7 sel/ml. Pemiakan bakteri meliputi pembuatan media diantaranya sebagai berikut :

(1) TCBS (*Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar*)

Media TCBS berguna sebagai media hidup bakteri dalam bentuk padat atau agar. Media TCBS digunakan sebagai media hidup bakteri yang akan diberi kertas cakram sesuai perlakuan. Langkah dalam pembuatan media TCBS sebagai berikut:

- TCBSA dengan dosis 80 gram/l.
- Ditimbang 22,4 gram TCBSA
- Dimasukkan dalam erlenmeyer berisi 280 ml akuades.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen / *aluminium foil*.
- Diaduk pada kondisi hangat diatas *hotplate* sampai tercampur rata. 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 *steril* dan di tunggu hingga dingin
- Simpan media yang akan digunakan ke dalam lemari pendingin
- Media TCBS yang tidak digunakan secara langsung sebaiknya disimpan dalam lemari pendingin untuk menghindari kontaminasi.
- Panaskan lagi media TCBS dengan menggunakan *hotplate* apabila akan digunakan kembali.

(2) TSB (*Tryptitone Soy Broth*)

Media TSB (*Tryptitone Soy Broth*) berguna sebagai media hidup bakteri dalam bentuk cair. Media TSB digunakan sebagai media hidup bakteri sementara yang akan dikultur pada media TCBS. Langkah dalam pembuatan media TSB 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 dengan benang kasar.
- Kemudian disterilkan dalam *autoclave* 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.

e. **Pembiakan bakteri *V. alginolyticus***

- Larutan TSB disiapkan sebanyak 6 gram dalam *erlenmeyer* sebanyak 200 ml.
- Jarum osse dipanaskan diatas bunsen sampai berpijar, setelah dingin

jarum osse disentuhkan kebiakan murni *V. alginolyticus* kemudian dicelupkan ke TSB.

- Larutan TSB dibiarkan 12 - 24 jam dalam inkubator pada suhu 29^o C.
- Disiapkan cawan petri yang berisi media TCBSA.
- Setelah TSB menjadi keruh, jarum osse dicelupkan ke TSB dan digoreskan ke permukaan TCBSA.
- Digoreskan ke dalam media TCBSA secara zig - zag dengan metode goresan Sinambung, T atau Kuadran.
- Media TCBSA Inkubasi di dalam inkubator dengan suhu 33°C selama 48 Jam.

f. Uji Pendahuluan Penentuan Dosis Daya Hambat Daun Pegagan

Uji pendahuluan pada kegiatan awal penelitian dilakukan dengan melakukan uji kertas cakram difusi pada media TCBSA yang sudah ditanam bakteri *V. alginolyticus* dengan menggunakan ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) sebagai antibakteri. Dalam uji pendahuluan ini konsentrasi ekstrak kasar daun pegagan adalah 1000 ppm. Adapun dosis uji difusi kertas cakram pada uji pendahuluan adalah 0 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 250 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 750 ppm dan 1000 ppm. Sedangkan kepadatan bakteri yang digunakan adalah 15×10^8 sel/ml. Hasil dari uji pendahuluan didapatkan bahwa dosis 125 ppm sudah menghambat bakteri *V. alginolyticus*.

3.4.2 Pelaksanaan penelitian

a. Prosedur pelaksanaan Uji cakram adalah :

- Disiapkan cawan petri yang telah terdapat media TCBSA.
- Disiapkan konsentrasi ekstrak kasar daun pegagan untuk uji cakram.
- Penanaman bakteri pada media TCBSA dilakukan dengan cara

mengambil biakan bakteri dari media TSB dengan menggunakan pipet tetes, kemudian diteteskan pada media, setelah itu media diputar secara teratur agar biakan dapat tersebar merata pada permukaan media.

- Kertas cakram steril ukuran 6 mm direndam ke dalam ekstrak daun pegagan selama 15 menit berdasarkan dosis perlakuan yang telah ditentukan.
- Kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak kasar daun pegagan 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.

b. Uji difusi kertas cakram

Menurut Mulyadi, Wuryanti dan Ria (2013), Metode yang digunakan dalam uji antibakteri ini yaitu metode difusi cakram kertas. Metode ini dilakukan dengan meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Pencelupan cakram pada larutan uji hingga seluruh permukaan cakram basah. Pengamatan dilakukan setelah bakteri diinokulasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat zona bening disekitar cakram. Pemilihan metode ini karena mudah dan sederhana untuk menentukan aktivitas antibakteri sampel yang di uji.

Uji cakram digunakan untuk mengetahui pada konsentrasi tertentu yang dapat menghambat bakteri yang bersifat bakteristatik (menghambat bakteri) setelah diinkubasi selama 24 jam, maupun bakteriosidal (membunuh bakteri) setelah diinkubasi selama 48 jam. Kertas cakram yang telah direndam dengan zat antibakteri diletakkan di atas lempengan agar yang telah ditanam dengan mikroorganisme yang diuji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antibakteri terlihat sebagai wilayah yang jernih di sekitar pertumbuhan mikroorganisme.

3.5 Parameter Uji Penelitian

Adapun dalam pelaksanaan penelitian pengaruh perbedaan dosis ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* memiliki parameter uji yang terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang.

- Parameter utama

Parameter utama dalam penelitian pengaruh perbedaan dosis ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* yaitu daerah hambatan yang diukur dengan menggunakan kertas cakram yang dinyatakan dalam mm (milimeter).

- Parameter penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian pengaruh perbedaan dosis ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* yaitu suhu inkubasi yakni sebesar 37⁰ C.

3.6 Analisa Data

Berdasarkan hasil uji daya hambat (zona bening) ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* maka dilakukan analisa data secara statistik dengan menggunakan analisa keragaman atau uji F

(ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Uji ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon zona hambat (zona bening) yang diukur atau uji F.

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



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi Bakteri *V. alginolyticus*

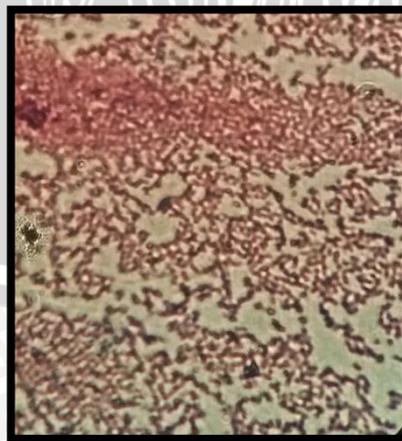
Proses pengidentifikasian bakteri dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah bakteri *V. alginolyticus*. Menurut Kismiyati, Subekti, Yusuf dan Kusdarwati (2009), Identifikasi bakteri yang meliputi pemeriksaan morfologi, pewarnaan gram, dan uji biokimia antara lain: uji O/F, uji oksidase, uji katalase, uji motilitas, produksi indol, uji TSIA, uji gula. Identifikasi bakteri dilakukan dalam beberapa uji seperti pengamatan morfologi koloni bakteri. Pengamatan morfologi koloni bakteri dilakukan setelah mendapatkan biakan murni. Pengamatan ini meliputi warna, bentuk, tepian koloni, elevasi atau permukaan koloni dan struktur dalam koloni.

Pada penelitian ini proses identifikasi bakteri dilakukan dengan menggunakan uji pewarnaan gram. Berdasarkan hasil pengamatan pewarnaan bakteri *V. alginolyticus* dibawah mikroskop, bakteri *V. alginolyticus* termasuk gram negatif karena dinding sel bakteri *V. alginolyticus* menahan warna merah dari larutan safranin. Menurut James, Baker dan Swain (2008), salah satu pewarnaan yang sering digunakan untuk mengidentifikasi bakteri adalah pewarnaan gram. Berdasarkan pewarnaan gram, bakteri dibagi menjadi dua golongan, tergantung dari reaksi dinding sel terhadap pewarna safranin atau kristal violet. Bakteri yang tetap berwarna ungu dengan pewarnaan oleh kristal violet disebut bakteri gram positif, sedangkan bakteri yang warna ungunya hilang jika dibilas dengan alkohol, tetapi tetap berwarna merah muda karena menahan warna merah safranin disebut bakteri gram negatif.

Menurut Kismiyati *et al.* (2009), pewarnaan gram bertujuan untuk menentukan apakah bakteri tersebut termasuk di dalam kelompok bakteri gram positif atau kelompok bakteri gram negatif. Cara kerja dari pewarnaan grama

yaitu disuspensikan 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 C yang mengandung alkohol, dan yang terakhir tetesi dengan larutan gram D yang mengandung safranin. Langkah selanjutnya yaitu dikeringkan dengan menggunakan kertas serap dan di tambahkan larutan emersi dan setelah itu diamati di bawah mikroskop. Bila hasil pewarnaan gram diperoleh bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut adalah bakteri gram positif, sedangkan bila diperoleh bakteri berwarna merah maka termasuk dalam bakteri gram negatif.

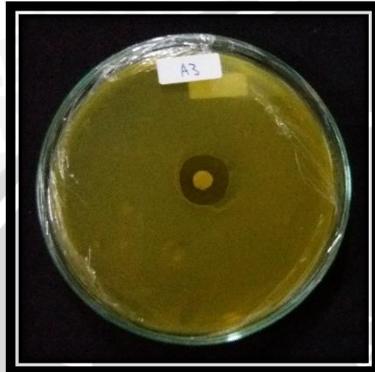
Menurut Pelczar dan Chan (2008), Pewarnaan gram merupakan salah satu teknik pewarnaan terpenting didalam mikrobiologi. Mekanisme pewarnaan gram didasarkan pada struktur dan komposisi dinding sel bakteri. Bakteri gram negatif mengandung lipid, lemak atau substansi seperti lemak dalam presentase lebih tinggi daripada yang dikandung bakteri gram positif. Dinding sel bakteri gram negatif juga lebih tipis daripada dinding sel bakteri gram positif. Bukti percobaan prosedur pewarnaan, perlakuan dengan etanol terhadap bakteri gram negatif menyebabkan terekstraksinya lipid sehingga memperbesar daya permeabilitas dinding sel gram negatif. Gambar hasil uji pewarnaan disajikan pada Gambar 4.



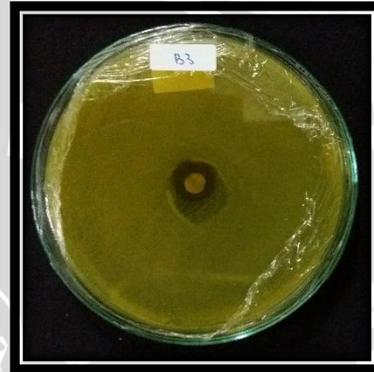
Gambar 4. Hasil Uji Pewarnaan Gram Bakteri *V. alginolyticus* dengan perbesaran 100x.

4.2 Daya Hambat (Zona Bening) Ekstrak Kasar Daun Pegagan (*C. asiatica*) terhadap Bakteri *V. alginolyticus* secara *In Vitro*

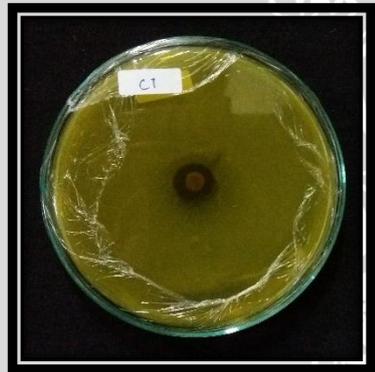
Berdasarkan hasil pengamatan selama penelitian mengenai uji daya hambat ekstrak kasar daun pegagan terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* maka didapat gambar hasil penelitian zona bening yang disajikan pada Gambar 5.



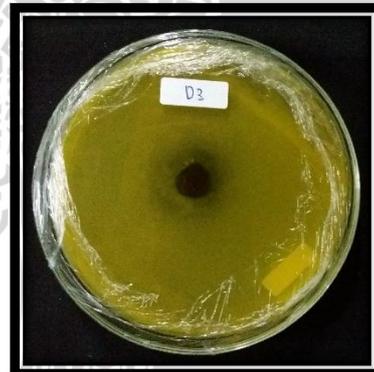
Perlakuan A dengan dosis 15 ppt



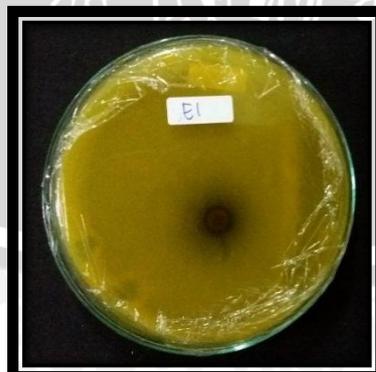
Perlakuan B dengan dosis 30 ppt



Perlakuan C dengan dosis 45 ppt



Perlakuan D dengan dosis 60 ppt



Perlakuan E dengan dosis 75 ppt

Gambar 5. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Pegagan (*C. asiatica*) terhadap Bakteri *V. alginolyticus* Pada Tiap Perlakuan.

Hasil dari pengamatan uji daya hambat ekstrak kasar daun pegagan terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* untuk lebih lengkapnya disajikan pada lampiran 3. Berdasarkan hasil pengamatan selama penelitian (Gambar 5), diameter zona bening semakin mengecil dengan naiknya konsentrasi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*). Hal ini sesuai dengan pendapat Darwis, Romauli dan Kasrina (2013), yang berpendapat bahwa penurunan daya hambat bakteri dimungkinkan karena adanya perbedaan kecepatan difusi ekstrak. Pada konsentrasi tinggi kemampuan difusi zat antibakteri rendah karena konsentrasi ekstrak terlalu pekat. Hal ini menyebabkan ekstrak sulit untuk berdifusi secara maksimal kedalam media yang mengandung bakteri. Hal ini diperkuat dengan pernyataan Handajani dan Purwoko (2008), penurunan diameter zona hambat bakteri disebabkan oleh daya difusi ekstrak ke dalam media berkurang. Penurunan daya difusi mungkin disebabkan semakin tingginya konsentrasi ekstrak maka semakin rendah kelarutan (mengental seperti gel). Julendra dan Sofyan (2007), menambahkan bahwa menurunnya efektifitas daya hambat ekstrak alami diduga mempunyai kesamaan dengan mekanisme penurunan efektifitas antibiotik apabila dipakai melebihi dosis tertentu dapat menyebabkan resistensi bakteri patogen.

Pernyataan diatas dapat dilihat bahwa ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) mengalami penurunan daya difusi dengan naiknya konsentrasi ekstrak. Menurut Ariyanti, Darmayasa dan Sudirga (2012), faktor yang berpengaruh terhadap besar zona hambatan yang dihasilkan pada metode difusi antara lain kecepatan difusi, sifat media agar yang digunakan, jumlah organisme yang diinokulasi, kecepatan tumbuh bakteri, konsentrasi bahan kimia, serta kondisi pada saat inkubasi. Faktor lain yang mempengaruhi besar zona hambatan antara lain lama penyimpanan ekstrak di lemari pendingin dan rapat tidaknya wadah yang digunakan untuk menyimpan ekstrak.

Pada hasil pengamatan selama penelitian uji daya hambat bakteri *V. alginolyticus* yang diberi ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) diperoleh hasil tidak adanya pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* disekitar kertas cakram yang telah direndam ekstrak pegagan (*C. asiatica*) menggunakan perlakuan konsentrasi yang berbeda. Diameter zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dipengaruhi oleh konsentrasi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) yang berbeda pada setiap perlakuan. Berdasarkan Gambar 5 konsentrasi perlakuan terendah pada perlakuan 15 ppt sedangkan konsentrasi tertinggi pada perlakuan E sebesar 75 ppt. Klasifikasi respon daya hambat pertumbuhan bakteri disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Menurut Pan, Chen, Wu, Tang dan Zhao (2009);

Diameter zona bening	Respon hambat pertumbuhan
0 - 3 mm	Lemah
3 - 6 mm	Sedang
>6 mm	Kuat

Berdasarkan tabel klasifikasi respon daya hambat pertumbuhan bakteri diatas, maka dapat ditentukan bahwa respon hambat ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* pada masing-masing perlakuan berbeda, yaitu pada perlakuan A dengan dosis 15 ppt didapatkan hasil rata-rata pengukuran diameter zona bening sebesar 11,243 mm. Hasil tersebut termasuk klasifikasi respon daya hambat kuat. Pada perlakuan B dengan dosis 30 ppt didapatkan hasil rata-rata pengukuran diameter zona bening sebesar 8,297 mm yaitu termasuk dalam klasifikasi respon daya hambat kuat. Pada perlakuan C dengan dosis 45 ppt didapatkan hasil rata-rata pengukuran diameter zona bening sebesar 6,577 mm yaitu termasuk dalam klasifikasi respon daya hambat kuat. Pada perlakuan D dengan dosis 60 ppt didapatkan hasil rata-rata pengukuran diameter zona bening sebesar 5,766 mm yaitu termasuk dalam klasifikasi respon daya hambat sedang. Pada perlakuan E dengan dosis 75 ppt

didapatkan hasil rata-rata pengukuran diameter zona bening sebesar 4,747 mm yaitu termasuk dalam klasifikasi respon daya hambat sedang.

Kemudian dilanjutkan dengan perhitungan rata-rata zona bening bakteri *V. alginolyticus* yang diberi ekstrak daun pegagan (*C. asiatica*) menggunakan lima perlakuan dosis yang berbeda dengan tiga kali ulangan disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Hasil Rata – Rata Zona Bening Bakteri *V. alginolyticus*

PERLAKUAN	ULANGAN			TOTAL	RATA – RATA
	1	2	3		
A (15 ppt)	12,61	8,38	12,74	33,73	11,243 ± 2,48
B (30 ppt)	7,63	8,65	8,34	24,62	8,207 ± 0,52
C (45 ppt)	7,67	4,91	7,15	19,73	6,577 ± 1,47
D (60 ppt)	4,83	6,21	6,26	17,30	5,766 ± 0,81
E (75 ppt)	5,35	4,79	4,13	14,24	4,747 ± 0,61
TOTAL				109,62	

Pada tabel pengamatan zona bening didapatkan nilai diameter rata-rata zona bening tertinggi pada perlakuan A yaitu sebesar 11,234 mm. Sedangkan nilai rata – rata zona bening terendah pada perlakuan E yaitu sebesar 4,747 mm. kemudian untuk mengetahui pengaruh perlakuan ekstrak kasar daun pegagan terhadap zona bening, maka dilakukan uji sidik ragam. Berikut adalah tabel uji sidik ragam yang disajikan pada Tabel 3, Untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 2.

Tabel 3. Sidik Ragam Zona Bening Bakteri *V. alginolyticus*

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	77,296	19,324	9,907**	3,48	5,99
Acak	10	19,506	1,9506			
Total	14					

Keterangan : ** Berbeda Sangat Nyata

Pada tabel sidik ragam didapatkan hasil bahwa uji daya hambat ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* berbeda sangat nyata. Hal ini dikarenakan nilai F. Hitung lebih besar daripada nilai F 5% dan F 1% atau nilai dari 9,907 lebih besar dari nilai 3,48 dan 5,99. Maka H_0 ditolak yang berarti perlakuan tersebut berbeda sangat nyata. Selanjutnya untuk

mengetahui pengaruh antar perlakuan dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang disajikan pada Tabel 4, untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 2.

Tabel 4. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) Ekstrak Kasar Daun Pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. alginolyticus*

Rata-Rata Perlakuan	E 4,747	D 5,766	C 6,577	B 8,207	A 11,243	Notasi
E 4,747	-	-	-	-	-	a
D 5,766	1,019 ^{ns}	-	-	-	-	a
C 6,577	1,83 ^{ns}	0,811 ^{ns}	-	-	-	a
B 8,207	3,46 ^{**}	2,441 [*]	1,63 ^{ns}	-	-	ab
A 11,243	6,496 ^{**}	5,477 ^{**}	4,666 ^{**}	3,036 [*]	-	bc

Keterangan :

ns : Tidak Berbeda Nyata

* : Berbeda Nyata

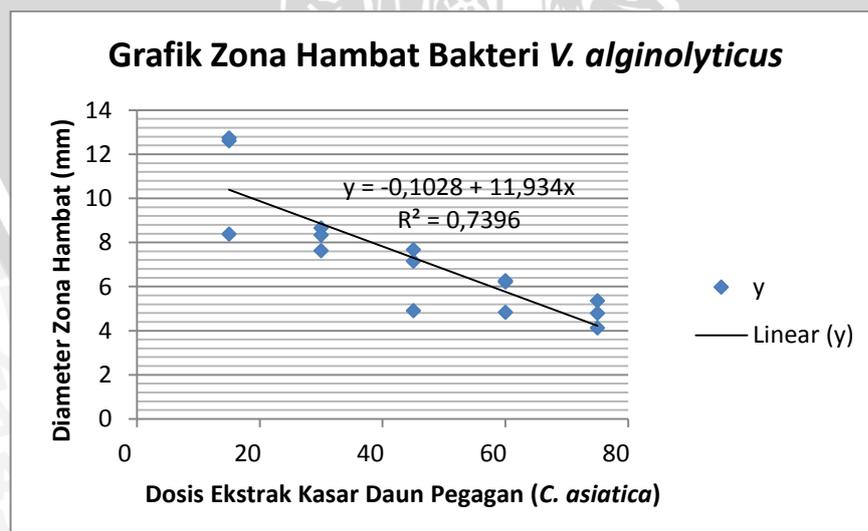
** : Berbeda Sangat Nyata

Pada hasil tabel uji BNT (Tabel 5.) didapatkan nilai hasil dari perlakuan A (15 ppt) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata dengan perlakuan E (75 ppt), D (60 ppt), C (45 ppt) dan B (30 ppt). Perlakuan tersebut didasari bahwa perlakuan A tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap semua perlakuan sehingga diberi notasi a. Perlakuan B terhadap perlakuan A tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perlakuan A sehingga diberi notasi a. Perlakuan C terhadap perlakuan A dan B tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perlakuan A dan B sehingga diberi notasi a. Perlakuan D memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A, B, dan C sehingga diberi notasi b. Sedangkan perlakuan E memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A, B, C, dan D maka diberi notasi c. Penghambatan pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* dikarenakan ekstrak kasar daun pegagan mengandung senyawa antioksidan yang sangat tinggi yaitu flavonoid dan saponin. Menurut Pelczar dan Chan (1986), flavonoid merupakan senyawa antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara merusak dinding sel, merusak membran sitoplasma, mendenaturasi protein

sel dan menghambat kinerja protein sel. Menurut Wirakusumah (2010), Flavonoid merupakan komponen fenol, yaitu bioaktif yang akan mengubah reaksi tubuh terhadap senyawa lain seperti alergen, virus dan zat karsinogen.

Menurut Tjay dan Rahardja (2007), Fenol merupakan salah satu antiseptikum tertua dengan khasiat bakterisid dan fungisid. Mekanisme kerjanya berdasarkan denaturasi protein sel bakteri, yakni perubahan rumus bangunnya hingga sifat khasnyahilang. Menurut Pawarta dan Dewi (2008), turunan fenol berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses adsorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen. Pada kadar rendah terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian, diikuti penetrasi fenol kedalam sel dan menyebabkan presipitasi serta denaturasi protein. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein dan sel membran mengalami lisis.

Mengetahui bentuk hubungan regresi antar perlakuan dengan zona bening maka perlu dilakukan uji polinomial ortogonal. Hasil perhitungan uji polinomial orthogonal yang berupa grafik disajikan pada Gambar 6, untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 2.



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

Berdasarkan Gambar 6, grafik hubungan zona hambat antar perlakuan ekstrak kasar daun pegagan terhadap bakteri *V. alginolyticus* menunjukkan perpotongan garis secara linear dengan persamaan $y = - 0,1028 + 11,934x$ dengan koefisien nilai determinasi (R^2) sebesar 0,7396 dan nilai korelasi sebesar 0,86. Pada dosis 15 ppt hingga 75 ppt grafik mengalami penurunan atau mengecilnya zona hambat, hasil perhitungan lengkapnya pada Lampiran 4. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar daun pegagan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*.

Untuk mengetahui sifat antibakteri dari ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) maka dilakukan pengamatan setelah inkubasi selama 48 jam. Untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 5. Dari hasil pengamatan selama 48 jam, dapat disimpulkan bahwa daya hambat dari masing – masing perlakuan mengalami penurunan. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) 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

Ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) memiliki senyawa antioksidan yang berfungsi untuk membunuh bakteri, senyawa yang terkandung didalam daun pegagan diantaranya adalah flavonoid. Menurut Arum, Supartono dan Sudarmin (2012), Flavonoid merupakan golongan terbesar senyawa fenol alam dan merupakan senyawa polar karena mempunyai sejumlah gugus hidroksil, sehingga akan larut dalam pelarut polar seperti etanol dan metanol. Flavonoid

merupakan senyawa aktif yang dapat digunakan sebagai antioksidan, antibakteri, dan antiinflamasi karena mampu menghambat aktivitas bakteri penyebab penyakit. Fenol merupakan senyawa antioksidan yang dapat merusak lapisan dinding sel bakteri.

Menurut Ide (2008), Sekian banyak senyawa fenolik yang ada di alam, flavonoid merupakan golongan terbesar. Di alam senyawa fenolik kerap dijumpai terikat pada protein, alkonoid dan terpenoid. Aktivitas flavonoid sebagai antioksidan sudah tidak diragukan lagi. Flavonoid berperan sebagai antioksidan karena dapat menangkap radikal bebas dengan melepaskan atom hidrogen dari gugus hidroksilnya. Pemberian atom hidrogen ini akan menyebabkan radikal bebas menjadi stabil dan berhenti melakukan gerakan ekstrim sehingga tidak merusak lipida, protein dan DNA. Flavonoid dapat menghentikan tahap awal reaksi dengan melepaskan satu atom hidrogen kemudian berikatan dengan satu radikal bebas. Selanjutnya dengan mekanisme seperti itu, radikal peroksi dapat dihancurkan atau distabilkan oleh resonansi dari gugus hidroksil yang membuat energi aktivasinya berkurang.

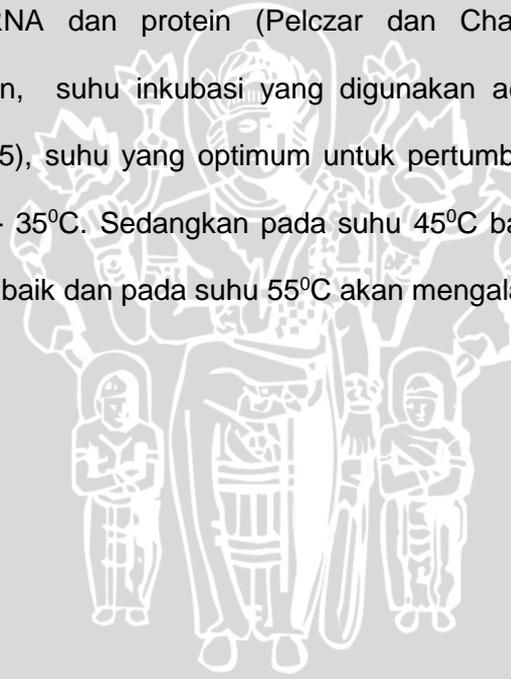
Menurut Prajitno (2007), Pada kerusakan membran sitoplasma, ion H^+ dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipida akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma akibatnya membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan mengalami kematian.

Secara umum antibakteri yang mempengaruhi aktivitas pembentukan dinding sel atau permeabilitas membran sel bekerja secara bakteriosida sedangkan yang mempengaruhi sintesis protein adalah bakteriostatik. Istilah penggunaan bakteriosida dan bakteriostatik berdasarkan cara kerjanya yaitu

bakteriosida bersifat membunuh bakteri dan bakteriostatik bersifat menghambat pertumbuhan bakteri sehingga jumlah bakteri tetap (Pelczar dan Chan, 2008).

4.2 Suhu Inkubator Selama Inkubasi Bakteri *V. alginolyticus*

Parameter penunjang merupakan parameter yang digunakan selama penelitian. Pada penelitian ini parameter penunjang yang digunakan adalah suhu inkubasi. Suhu merupakan faktor utama yang mempengaruhi laju pertumbuhan bakteri. Umumnya pertumbuhan bakteri ditandai dengan bertambahnya jumlah massa melebihi massa yang ada didalam inokulan asalnya, yaitu bertambahnya massa bakteri berbanding lurus dengan penambahan komponen selular yang lain seperti DNA, RNA dan protein (Pelczar dan Chan, 2008). Selama pelaksanaan penelitian, suhu inkubasi yang digunakan adalah 33^o - 34^o C. Menurut Prajitno (2005), suhu yang optimum untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio* berkisar antara 30^oC - 35^oC. Sedangkan pada suhu 45^oC bakteri tersebut tidak dapat tumbuh dengan baik dan pada suhu 55^oC akan mengalami kematian.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh daya hambat ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* secara *In Vitro* maka diperoleh kesimpulan ekstrak kasar daun pegagan berpengaruh terhadap zona hambat (zona bening) bakteri *V. alginolyticus* dengan nilai rata – rata zona hambat tertinggi sebesar 11,243 mm pada perlakuan A dengan konsentrasi 15 ppt sedangkan terendah sebesar 4,747 mm pada perlakuan E dengan konsentrasi 75 ppt dan bersifat bakteriostatik.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian pengaruh daya hambat ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* secara *In Vitro* dapat disarankan menggunakan ekstrak kasar daun pegagan untuk menghambat bakteri *V. alginolyticus* dengan dosis optimum 15 ppt, dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut secara *In Vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Aniputri, F. D., J. Hutabarat, 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
- Ariyanti, N. D., I. B.G. Darmayasa, S. D. 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
- Arum, Y.P., Supartono, Sudarmin. 2012. Isolasi dan Uji Daya Anti Mikroba Ekstrak Daun Kersen (*Muntingia calabura*). *Jurnal MIPA*. **35** (2):165-174
- Ashari, C., R. A. Tumbol, M. E. F. Kolopita. 2014. Diagnosa Penyakit Bakterial Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Di Budidaya Pada Jaring Tancap Di Danau Tondano. *Jurnal Budidaya Perairan*. **2** (3):24-30.
- Aspan, R., Sherley, R. Napitupulu, L. S. Wisaksono, Efizal, L. Mooduto, T. Herawaty, A. Novianti, S. Wahyu, Tumino. 2008. Taksonomi Koleksi Tanaman Obat Kebun Tanaman Obat Citeurup. Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Jakarta. 105hlm.
- Darwis, W., M. Romauli, Kasrina. 2013. Uji Efektivitas Ekstrak Daun Iler-Iler (*Coleus scutellarioides* (Linn.) Benth) Sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Konservasi Hayati*. **9** (2):55-59
- Direktorat Obat Asli Indonesia. 2010. Serial Data Ilmiah Terkini Tumbuhan Obat: Pegagan (*Centella asiatica*). Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. Jakarta. 20hlm.
- Felix, F., T.T. Nugroho, S. Silalahi, Y. Octavia. 2011. Skrining Bakteri *Vibrio* sp Asli Indonesia Sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Tehnik 16s Ribosomal DNA. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. **3** (2):85-99
- Garrity, G.M., J. A. Bell, T. G. Lilburn. 2004. Taxonomic Outline of The Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. Springer. United States of America. 399hlm.
- Handajani, N.S., T. Purwoko. 2008. Aktivitas Ekstrak Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga*) Terhadap Pertumbuhan Jamur *Aspergillus* spp. Penghasil Aflatoksin dan *Fusarium moniliforme*. *Jurnal Biodiversitas*. **9** (3):161-164
- Hatmanti, A., R. Nuchsin, J. Dewi. 2009. Screening Bakteri Penghambat Untuk Bakteri Penyebab Penyakit Pada Budidaya Ikan Kerapu Dari Perairan Banten Dan Lampung. *Jurnal Makara*. **13** (1):81-86
- Ide, P. 2008. Dark Chocolate Healing : Mengungkap Khasiat Cokelat Terhadap Sirkulasi Darah dan Imunitas Tubuh. PT. Elex Media Komputindo. Jakarta. 391hlm.

- Ilmiah, Sukenda, Widanarni, E. Harris. 2012. Isolasi dan Karakterisasi *Vibrio* Patogen Pada Ikan Kerapu Macan *Epinephelus fuscoguttatus*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **11** (1):28-37
- James, J., C. Baker, H. Swain. 2002. Prinsip-prinsip Sains Untuk Keperawatan. Penerbit Erlangga. Jakarta. 245hlm.
- Juanti, F., A. Jumiati, E. Santoso. 2014. Economic Landscape Sub Sektor Perikanan Pada Perekonomian Kabupaten Sidoarjo: Model Input Output dan Analytical Hierarchy Process. *Jurnal Ekonomi Bisnis dan Akutansi*. **1** (1): 42-52.
- Julendra, H., A. Sofyan. 2007. Uji In Vitro Penghambatan Aktivitas *Escherichia coli* Dengan Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*). *Jurnal Media Peternakan*. **30** (1):41-47
- Kismiyati, S. Subekti, R. W. N. Yusuf, R. Kusdarwati. 2009. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Gram Negatif Pada Luka Ikan Mas Koki (*Carassius auratus*) Akibat Infeksi Ektoparasit *Argulus* sp. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **1** (2):129-134.
- Kusmiati, N. W. S. Agustini. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Jurnal Biodivesitas*. **8** (1):48-53
- 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.
- Luturmas, A., A. Y. Pattinasarany. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri *Vibrio alginolyticus* Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Sebagai Faktor Virulensi Bakteri Patogen. Prosiding Seminar Nasional Basic Science 2 tanggal 2 Juli 2010. Universitas Pattimura : hlm. 36-42.
- Mulyadi, M., Wuryanti, P. Ria. 2013. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-alang (*Imperata Cylindrica*) Dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram. *Jurnal Chem Info*. **1** (1):35-42
- Murtidjo, B.A.2003. Benih Udang Windu Skala Kecil. Kanisius.Yogyakarta.75hlm.
- Nursalam. 2008. Konsep dan Penerapan Metodologi Penelitian Ilmu Keperawatan, Pedoman Skripsi, Tesis, dan Instrumen Penelitian Keperawatan. Penerbit Salemba Medika. Jakarta. 276hlm.
- Pan, X., F. Chen, T. Wu, H. Tang, Z. Zhao. 2009. The Acid, Bile Tolerance and Antimicrobial Property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Jurnal Food Control* .**1** (20):598-602
- Pawarta, I. M. O. A., P. F. S. Dewi. 2008. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri Dari Rimpang Lengkuas(*Alpinia galanga*).*Jurnal Kimia*.**2** (2): 100-104

- Pelczar, M.J., E.C.S. Chan. 2008. Dasar-dasar Mikrobiologi 1. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 443hlm.
- _____. 2008. Dasar-dasar Mikrobiologi 2. Universitas Indonesia Press. Jakarta. 554hlm.
- Prajitno, A. 2005. Diktat Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan. Universitas Brawijaya. Malang. 104hlm.
- _____. 2007a. Penyakit Ikan - Udang : Bakteri. UM Press. Malang. 113 hlm.
- _____. 2007b. Uji Sensitivitas Flavonoid Rumput Laut (*Euचेuma cottoni*) Sebagai Bioaktif Alami Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi*. *Jurnal Protein*. **15** (2):66-71
- Pratisto, A. 2004. Cara Mudah Mengatasi Masalah Statistik dan Rancangan Percobaan dengan SPSS 12. Penerbit PT Elex Media Komputindo. Jakarta. 281hlm.
- Purnomowati, R., A. Garbono, F. Nugroho. 2011. Monitoring Sebaran Jasad Patogen Sebagai Upaya Pengendalian Penyakit Pada Budidaya Ikan Laut. *Buletin Budidaya Laut*. No. 30:9-17. Balai Besar Pengembangan Budidaya Laut Lampung
- Ramadhan, N. S., R. Rasyid, Elmatris. 2015. Daya Hambat Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) yang Diambil di Batusangkar terhadap Pertumbuhan Kuman *Vibrio cholerae* secara In Vitro. *Jurnal Kesehatan Andalas*. **4** (1):202-206
- Rasy, V. 2013. 30 Tanaman Herbal Untuk Pengobatan Tradisional. Penerbit Sakti. Yogyakarta. 160hlm.
- Roihanah, S., Sukoso, S. Andayani. 2011. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria* sp. Terhadap Bakteri *Vibrio Harveyi* Secara In Vitro. *Jurnal Experiment Life Science*. **1** (2):1-5
- Sa'adah, W. 2014. Strategi Pengembangan Usaha Pengemasan Udang Windu di UD Sinar Fajar di Kabupaten Lamongan. *Jurnal Eksakta*. **2** (1):70-80.
- Supriyatna, Moelyono, Y. Iskandar, R. M. Febriyanti. 2014. Prinsip Obat Herbal: Sebuah Pengantar Untuk Fitoterapi. Penerbit Deepublish. Yogyakarta. 107hlm.
- Soewito, Subono, M. S. Malangoedo, V. Soesanto, S. Soeseno, Soehardi, R. Budiono, Martono, H. T. Asikin, S. Rachmatun. 2000. Sejarah Perikanan Indonesia. Penerbit Yasamina. Jakarta. 213 hlm.
- Sumino, A. Supriyadi, Wardiyanto. 2013. Efektivitas Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia cattapa* L.) Untuk Pengobatan Infeksi *Aeromonas salmonicida* Pada Ikan Patin (*Pangasioniodon hypophthalmus*). *Jurnal Sains Veteriner*. **31** (1):79-88. Universitas Lampung

Tiwari, S., S. Gehlot, Gambhir. 2011. *Centella asiatica*: A Concise Drug Review With Probable Clinical Uses. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*. 7 (1):38-44

Tjay, T.H., K. Rahardja. 2007. *Obat – Obat Penting: Kasiat, Penggunaan dan Efek-efek Sampingnya*. PT. Elex Media Komputindo. Jakarta. 915hlm.

Wirakusumah, E.P. 2010. *Sehat Cara Al-Quran dan Hadis*. Penerbit Hikmah. Jakarta. 171hlm.



LAMPIRAN

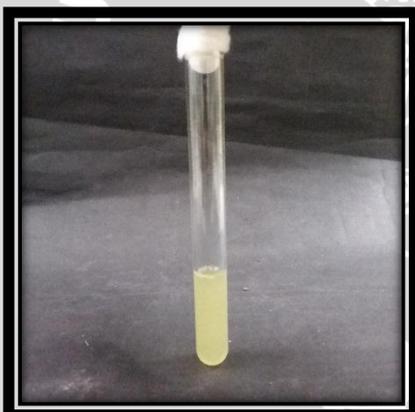
Lampiran 1. Foto Alat dan Bahan Penelitian



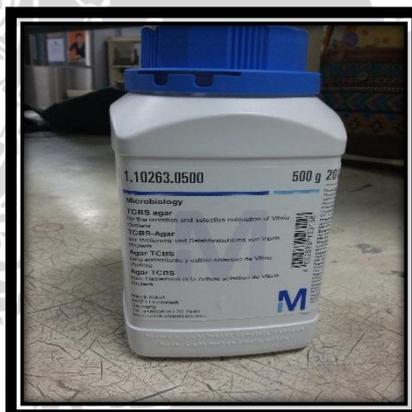
Rotary Vacuum Evaporator



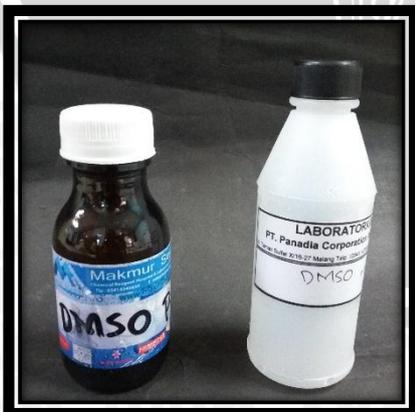
Ektstrak Kasar Daun Pegagan (*C. asiatica*)



TSB *V. alginolyticus*



Media Agar TCBSA



DMSO 10%



Inkubator

Lampiran 1. (Lanjutan)



Laminar Air Flow



Timbangan Digital



Oven



Autoklaf Destruksi



Timbangan Sartorius



Lemari Pendingin Bahan

Lampiran 1. (Lanjutan)



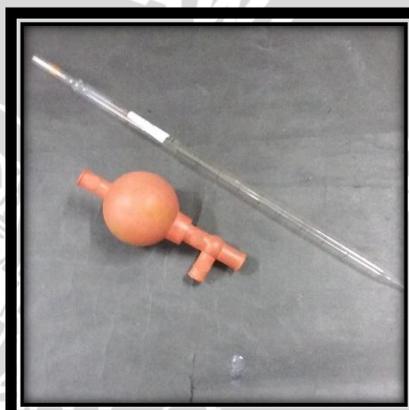
Autoklaf Sterilisasi



Hotplate



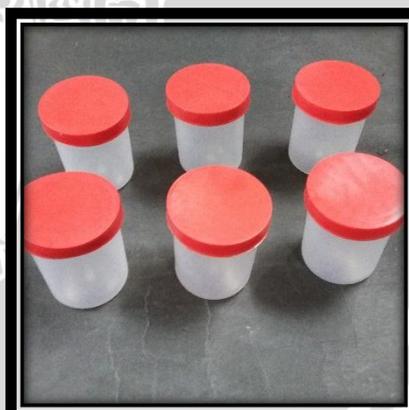
Lemari Pendingin Biakan Bakteri



Bola Hisap dan Pipet Volume



Rak Tabung Reaksi



Botol Film

Lampiran 1. (Lanjutan)



Bunsen



Spatula



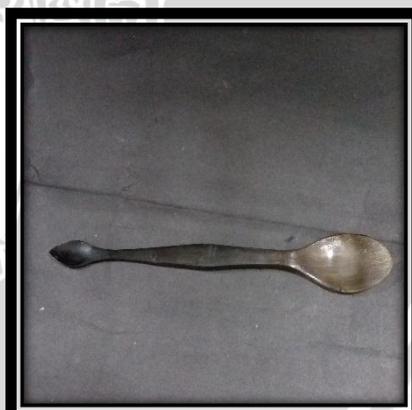
Triangle



Tabung Reaksi

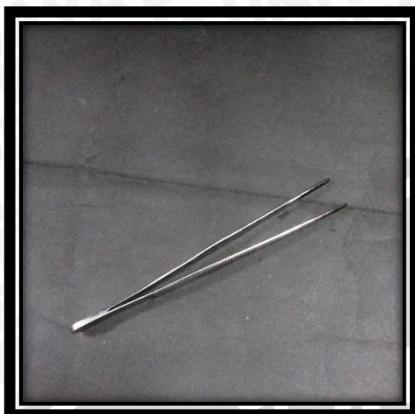


Erlenmeyer



Sendok Bahan

Lampiran 1. (Lanjutan)



Pinset



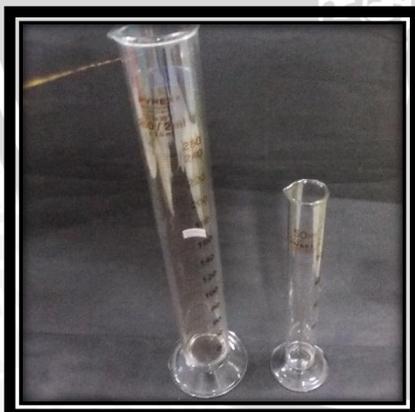
Corong



Toples



Ethanol 96% dan Alkohol 70%



Gelas Ukur



Kapas

Lampiran 1. (Lanjutan)



Tissue



Kertas Cakram



Garam NaCl, KCl, dan MgSO4



Akuades



Daun Pegagan (*C. asiatica*)

Lampiran 2. Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Daun Pegagan (*C. asiatica*) pada Uji Difusi Kertas Cakram

Persiapan perrendaman (maserasi) dimana serbuk daun pegagan sebanyak 100 gram dimaserasi dalam etanol 90% sebanyak 1 liter selama 3 x 24 jam dalam suhu kamar. Larutan yang didapat kemudian disaring dengan kertas saring lalu diuapkan dengan menggunakan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak kasar daun pegagan sebesar 25,97 gram, selanjutnya dilakukan pengukuran dosis (ppt) untuk menentukan dosis ekstrak kasar daun pegagan dan ditambahkan larutan pengencer DMSO 10%.

a) 15 ppt

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

$$100 \times V \text{ ml} = 15 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 0,45 \text{ gr}$$

$$\text{DMSO} = 3 - 0,45 = 2,55 \text{ ml}$$

d) 60 ppt

$$N_1 \times V = N_2 \times V_2$$

$$100 \times V \text{ ml} = 60 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 1,8 \text{ gr}$$

$$\text{DMSO} = 3 - 1,8 = 1,2 \text{ ml}$$

b) 30 ppt

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

$$100 \times V \text{ ml} = 30 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 0,9 \text{ gr}$$

$$\text{DMSO} = 3 - 0,9 = 2,1 \text{ ml}$$

e) 75 ppt

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

$$100 \times V \text{ ml} = 75 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 2,25 \text{ gr}$$

$$\text{DMSO} = 3 - 2,25 = 0,75 \text{ ml}$$

c) 45 ppt

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

$$100 \times V \text{ ml} = 45 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 1,35 \text{ gr}$$

$$\text{DMSO} = 3 - 1,35 = 1,65 \text{ ml}$$

f) 100 ppt

$$N_1 \times V = N_2 \times V_2$$

$$100 \times V \text{ ml} = 100 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 3 \text{ gr}$$

$$\text{DMSO} = 3 - 3 = 0 \text{ ml}$$

Lampiran 3. Hasil Pengamatan Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Pegagan terhadap Pertumbuhan Bakteri *V. alginolyticus* selama 24 Jam



A1 15 ppt



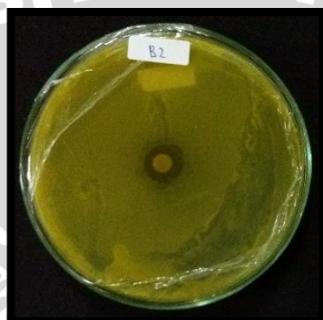
A2 15 ppt



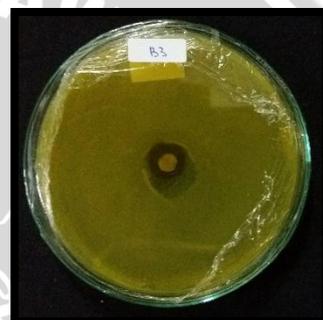
A3 15 ppt



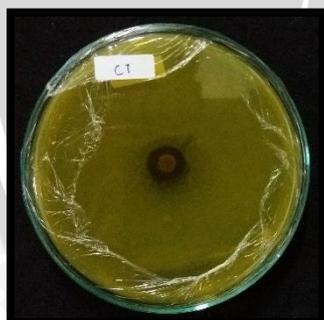
B1 30 ppt



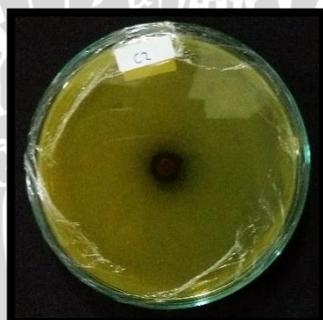
B2 30 ppt



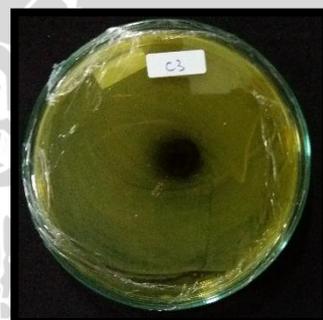
B3 30 ppt



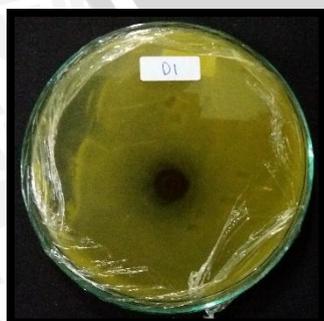
C1 45 ppt



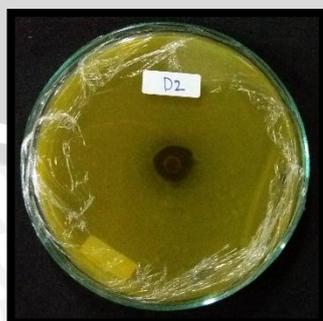
C2 45 ppt



C3 45 ppt



D1 60 ppt



D2 60 ppt

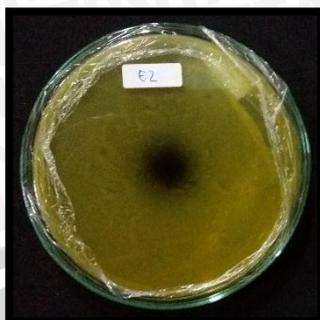


D3 60 ppt

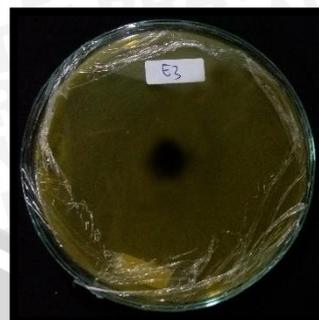
Lampiran 3. (Lanjutan)



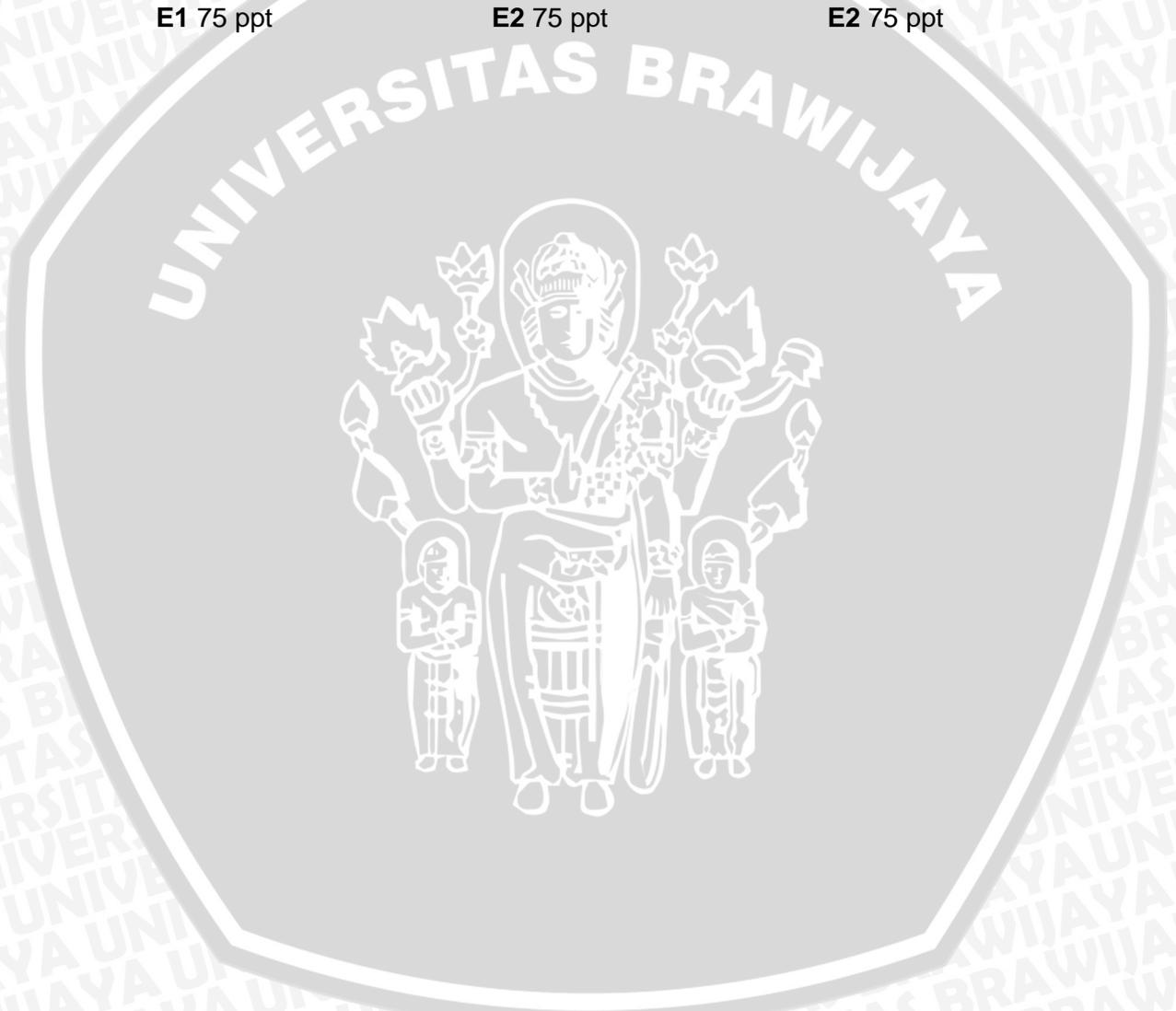
E1 75 ppt



E2 75 ppt



E2 75 ppt



Lampiran 4. Analisis Data Pengaruh Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Pegagan (*C. asiatica*) terhadap Bakteri *V. alginolyticus* Secara *In Vitro*

- Data Rata – Rata Diameter hambatan (mm) Bakteri *V. alginolyticus*

PERLAKUAN	ULANGAN			TOTAL	RATA - RATA
	1	2	3		
A (15 ppt)	12,61	8,38	12,74	33,73	11,243 ± 2,48
B (30 ppt)	7,63	8,65	8,34	24,62	8,207 ± 0,52
C (45 ppt)	7,67	4,91	7,15	19,73	6,577 ± 1,47
D (60 ppt)	4,83	6,21	6,26	17,30	5,766 ± 0,81
E (75 ppt)	5,35	4,79	4,13	14,24	4,747 ± 0,61
TOTAL				109,62	

Perhitungan :

- Perhitungan JK

FK	801,103
JK Total	96,802
JK Perlakuan	77,296
JK Acak	19,506

Perhitungan :

- Faktor Koreksi (FK)

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

$$= \frac{109,62^2}{15}$$

$$= 801,103$$

- Jumlah Kuadrat Total (JK Total)

$$= \sum x_{ij}^2 - FK$$

$$= (A_1^2 + A_2^2 + A_3^2 + \dots + E_3^2) - FK$$

$$= (12,61^2 + 8,38^2 + \dots + 4,13^2) - 801,103$$

$$= 897,905 - 801,103$$

$$= 96,802$$

- JK Perlakuan

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

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

$$= \frac{(33,73^2 + 24,62^2 + 19,73^2 + 17,30^2 + 14,24^2)}{3} - 801,103$$

Lampiran 4. (Lanjutan)

$$= 77,296$$

d. JK Galat = JK Total – JK Perlakuan

$$= 96,802 – 77,296$$

$$= 19,506$$

e. db Total = $(n \times r) - 1$

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

$$= 14$$

f. db Perlakuan = $n - 1$

$$= 5 - 1$$

$$= 4$$

g. db Galat = db Total – db Perlakuan

$$= 14 - 4$$

$$= 10$$

2. Tabel Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	77,296	19,324	9,907**	3,48	5,99
Acak	10	19,506	1,9506			
Total	14					

Keterangan : ** Berbeda Sangat Nyata

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

- Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

$$SED = \frac{\sqrt{2 \times KT \text{ Acak}}}{Ulangan (r)} = \frac{\sqrt{2 \times 1,9506}}{3} = 1,13$$

$$BNT 5\% = T \text{ Tabel } 5\% (\text{db acak}) \times SED = 2,051$$

$$BNT 1\% = T \text{ Tabel } 1\% (\text{db acak}) \times SED = 3,128$$



Lampiran 4. (Lanjutan)

• Tabel Uji BNT(Beda Nyata Terkecil)

Rata-Rata Perlakuan	E	D	C	B	A	Notasi
	4,747	5,766	6,577	8,207	11,243	
E	4,747	-	-	-	-	a
D	5,766	1,019 ^{ns}	-	-	-	a
C	6,577	1,83 ^{ns}	0,811 ^{ns}	-	-	a
B	8,207	3,46 ^{**}	2,441 [*]	1,63 ^{ns}	-	ab
A	11,243	6,496 ^{**}	5,477 ^{**}	4,666 ^{**}	3,036 [*]	bc

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 (15 ppt)	33,73	-2	2	-1	1
B (30 ppt)	24,62	-1	-1	2	-4
C (45 ppt)	19,73	0	-2	0	6
D (60 ppt)	17,30	1	-1	-2	-4
E (75 ppt)	14,24	2	2	1	1
Q= Σci*Ti		-46,3	14,56	-4,85	-1,33
Hasil Kuadrat		30	42	20	210
Kr= (Σci^2)*r		71,454	5,047	0,784	0,008

• Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	4	77,296			3,48	5,99
Linear	1	71,457	71,457	36,633	**	
Kuadratik	1	5,047	5,047	2,587	-	
Kubik	1	0,784	0,784	0,402	-	
Kuartik	1	0,008	0,008	0,004	-	
2. Acak	10	19,506	1,9506			
Total	14	96,802				

$$R^2 = 0,7396$$

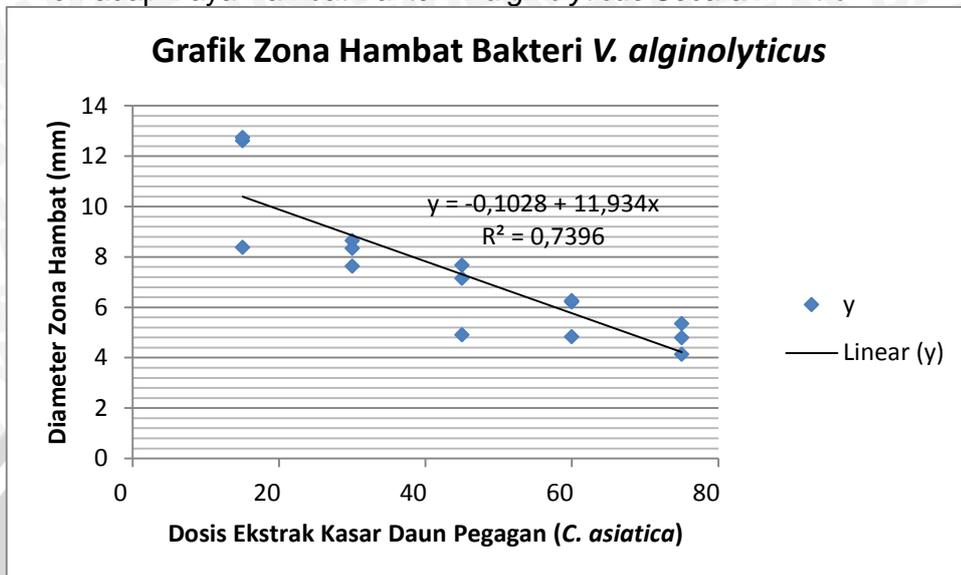
$$r = \sqrt{R^2}$$

$$= \sqrt{0,7396}$$

$$= 0,86$$

Lampiran 4. (Lanjutan)

- Grafik Pengaruh Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Pegagan (*C. asiatica*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V alginolyticus* Secara *In Vitro*



Lampiran 5. Pengolahan Data Pengaruh Ekstrak Kasar Daun Pegagan (*C. asiatica*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. alginolyticus* Secara *In Vitro* (48 jam)

- Data Rata – Rata Diameter hambatan (mm) Bakteri *V. alginolyticus*

PERLAKUAN	ULANGAN			TOTAL	RATA - RATA
	1	2	3		
A (15 ppt)	6,09	3,32	6,13	15,54	5,18±1,59
B (30 ppt)	3,21	3,36	3,14	9,71	3,24±0,72
C (45 ppt)	2,89	2,13	2,25	7,27	2,42±1,00
D (60 ppt)	1,93	2,19	2,14	6,26	2,09±0,24
E (75 ppt)	1,25	1,29	1,11	3,65	1,22±0,82
TOTAL				42,43	

Perhitungan :

1. Perhitungan JK

FK	120,02
JK Total	50,51
JK Perlakuan	27,026
JK Acak	23,48

Perhitungan :

a. Faktor Koreksi (FK)

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

$$= \frac{42,43^2}{15}$$

$$= 120,02$$

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

$$= (A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + E3^2) - FK$$

$$= (6,09^2 + 3,32^2 + \dots + 1,11^2) - 120,02$$

$$= 50,51$$

c. JK Perlakuan

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

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

$$= \frac{(15,54^2 + 9,71^2 + 7,27^2 + 6,26^2 + 3,65^2)}{3} - 120,02$$

$$= 27,026$$

Lampiran 5. (Lanjutan)

$$d. \text{ JK Galat} = \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan}$$

$$= 50,51 - 27,026$$

$$= 23,48$$

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

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

$$= 14$$

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

$$= 5 - 1$$

$$= 4$$

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

$$= 14 - 4$$

$$= 10$$

2. Tabel Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	27,026	6,756	2,877 ^{ns}	3,48	5,99
Acak	10	23,48	2,348			
Total	14					

Keterangan : ns = Tidak Berbeda Nyata

Berdasarkan hasil analisa sidik ragam di atas menunjukkan bahwa nilai F hitung (2,877) 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 pegagan bersifat bakteriostatik.