

**PENGARUH EKSTRAK KASAR PEGAGAN (*Centella asiatica*)
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas fluorescens*
SECARA IN VITRO**

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

**Oleh:
IBTIDA'UL MUNIR
NIM. 125080500111020**



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

**PENGARUH EKSTRAK KASAR PEGAGAN (*Centella asiatica*)
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas fluorescens*
SECARA IN VITRO**

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

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

**Oleh:
IBTIDA'UL MUNIR
NIM. 125080500111020**



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

SKRIPSI
PENGARUH EKSTRAK KASAR PEGAGAN (*Centella asiatica*)
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas fluorescens*
SECARA IN VITRO

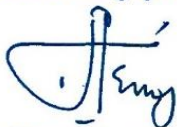
Oleh :

IBTIDA'UL MUNIR
NIM. 125080500111020

Telah dipertahankan di depan penguji
 Pada tanggal 9 Juni 2016
 Dan dinyatakan telah memenuhi syarat
 SK Dekan No. :
 Tanggal :

Menyetujui,

Dosen Penguji I



(Ir. Heny Suprastyani, MS)
NIP. 19620904 198701 2 001
 Tanggal: **15 JUL 2016**

Dosen Pembimbing I



(Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS)
NIP. 19550213 198403 1 001
 Tanggal: **15 JUL 2016**

Dosen Penguji II



(Ir. Ellana Sanoesi, MP)
NIP. 19630924 199803 2 002
 Tanggal: **15 JUL 2016**

Dosen Pembimbing II



(M. Fakhri, S.Pi, MP, M.Sc)
NIP. 19860717 201504 1 001
 Tanggal: **15 JUL 2016**

Mengetahui,
Ketua Jurusan
Manajemen Sumberdaya Perairan



(Dr. Ir. Arni W. Ekawati, MS)
NIP. 19620805 198603 2 001
 Tanggal: **15 JUL 2016**

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dengan 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 dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagialis), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, Juni 2016

Mahasiswa

IBTIDA'UL MUNIR

UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis mengucapkan puja dan puji syukur atas kehadiran Allah SWT atas segala rahmat, hidayah dan karuniaNya sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Penulis banyak mendapat bantuan dan bimbingan dari berbagai pihak, pada kesempatan ini penulis mengucapkan rasa terimakasih yang sebesar-besarnya kepada yang terhormat:

1. Ibu Prof. Dr. Ir. Diana Arfiati, MS selaku Dekan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.
2. Ibu Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS selaku Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan.
3. Bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc selaku ketua program studi Budidaya Perairan.
4. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku dosen pembimbing I dan Bapak M. Fakhri, S.Pi, MP, M.Sc dosen pembimbing II yang senantiasa dalam memberikan bimbingan dan masukan selama penelitian hingga penyusunan laporan skripsi ini selesai.
5. Ibu Ir. Heny Suprastyani, MS dan Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku Dosen Penguji I dan II yang telah memberikan kritik dan sarannya dalam perbaikan Laporan skripsi.
6. Kedua orang tua, serta adik tercinta yang senantiasa memberikan doa dan dukungan moril maupun materil kepada penulis selama penelitian hingga laporan hasil Skripsi ini selesai.
7. Laboran Lab. Penyakit dan kesehatan Ikan (Ibu Titin) FPIK Universitas Brawijaya, yang bersedia membantu dari awal hingga akhir penelitian.
8. Teman - teman Tim PSEUDO (Ion, Niksa, Azizah, Silvi, Rosa, Putri dan Lina), yang selalu membantu dan memberikan solusi pada penulis selama penelitian, serta teman-teman tim Skripsi bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.

Penulis panjatkan doa semoga Allah SWT memberikan imbalan yang setimpal atas bantuan semua pihak dalam menyusun skripsi.

Malang, Juni 2016

Penulis

RINGKASAN

IBTIDA'UL MUNIR. Pengaruh Ekstrak Kasar Pegagan (*Centella asiatica*) terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara *In Vitro*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.** dan **Muhammad Fakhri, S.Pi, MP, M.Sc**

Kegiatan sektor Budidaya bidang perikanan di Indonesia, dewasa ini telah mengalami peningkatan dari tahun 2010 – 2014 dengan rata – rata pertahun mencapai 23, 74 %. Namun terdapat beberapa hal yang menjadi kendala dalam kegiatan budidaya perikanan itu sendiri. Salah satu kendalanya adalah hama dan penyakit. Penyakit dapat menimbulkan kematian pada ikan yang dibudidayakan serta menyebabkan kerugian cukup besar terhadap proses budidaya itu sendiri. *P. fluorescens* merupakan salah satu bakteri yang menimbulkan penyakit Hemoragic dan septicemia pada ikan air tawar, gejala yang timbul yaitu ikan berwarna gelap (kusam), luka pada kulit, sirip dan sisik rusak, pendarahan pada tubuh ikan, perut busung, insang rusak berwarna keputih – putihan hingga kebiru – biruan, ikan lemah dan timbul borok. Pengobatan dengan menggunakan antibiotik serta obat-obat kimia untuk mengatasi adanya penyakit tersebut dapat menimbulkan sifat resisten terhadap bakteri serta dapat membahayakan lingkungan perairan. Oleh karena itu diperlukan suatu bahan alami sebagai pengganti antibiotik yang lebih aman dan ramah lingkungan yaitu salah satunya dengan menggunakan ekstrak pegagan (*Centella asiatica*) yang mengandung zat antibakteri, diantaranya adalah saponin, tannin, alkaloid, dan flavonoid .

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penyakit dan kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari sampai bulan April 2016. Tujuan penelitian ini adalah untuk menjelaskan pengaruh pemberian ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) dalam menghambat bakteri *P. flourescens* secara *in vitro* dan untuk menentukan dosis terbaik ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) yang diperlukan dalam menghambat bakteri *P. flourescens* secara *in vitro*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental penelitian yang dilakukan terhadap variabel yang data-datanya belum ada sehingga perlu dilakukan proses manipulasi melalui pemberian treatment atau perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian yang kemudian diamati atau diukur dampaknya (data yang akan datang) dan teknik pengambilan datanya dengan cara observasi langsung, yaitu pengamat merekam apa yang tengah terjadi pada saat itu juga. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), menggunakan 5 perlakuan dosis ekstrak pegagan yaitu : dosis (A) 5 ppt ; (B) 10 ppt ; (C) 15 ppt ; (D) 20 ppt dan (E) 25 ppt. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali kemudian dilakukan analisis secara statistik dengan menggunakan analisis uji keragaman atau uji f (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan 99% ($\alpha = 0,01$).

Kesimpulan dari hasil penelitian ini bahwa hasil uji daya hambat bakteri dengan menggunakan uji cakram menunjukkan dosis ekstrak pegagan (*C. asiatica*) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari pertumbuhan bakteri *P. Fluorescens*. Pemberian ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) menghasilkan perlakuan terbaik yaitu pada perlakuan E dengan dosis 25 ppt menghasilkan rata - rata daya hambat sebesar $8,98 \pm 0,74$ mm dan hasil rata - rata daya hambat terendah yaitu pada perlakuan A dengan dosis 5 ppt sebesar $6,27 \pm 0,03$ mm. Ekstrak kasar Pegagan (*C. asiatica*) memiliki sifat antibakteri secara bakteriostatik karena hanya menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.

KATA PENGANTAR

Dengan memanjatkan puji syukur ke hadirat ALLAH SWT, atas limpahan rahmat dan hidayah-Mu penulis dapat menyajikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Ekstrak Kasar Pegagan (*Centella asiatica*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara *In Vitro*” untuk melengkapi tugas – tugas dan memenuhi syarat – syarat guna memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih sebesar – besarnya kepada :

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

Penulis menyadari bahwa skripsi ini masih sangat jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan demi perbaikan dan kesempurnaan laporan atau kegiatan selanjutnya, agar tulisan ini dapat bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi semua pihak.

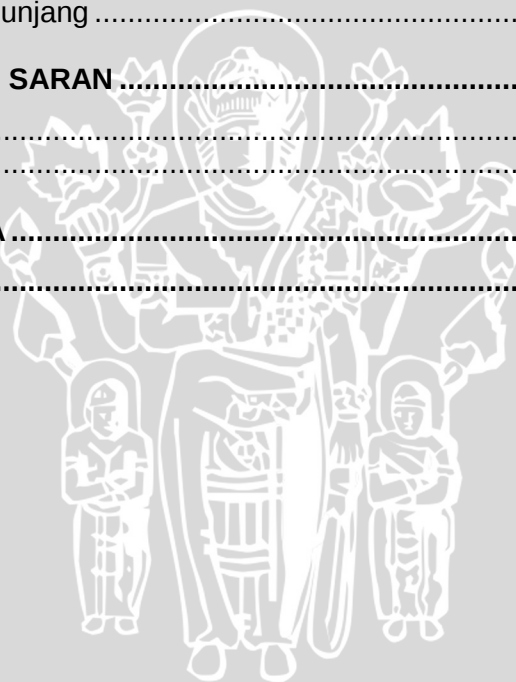
Malang, Juni 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
LEMBAR PENGESAHAN	iii
PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
UCAPAN TERIMAKASIH	v
RINGKASAN	vi
KATA PENGANTAR	vii
DAFTAR ISI	viii
DAFTAR TABEL	x
DAFTAR GAMBAR	xi
DAFTAR LAMPIRAN	xii
 1. PENDAHULUAN	 1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Hipotesis	4
1.6 Tempat dan Waktu	4
 2. TINJAUAN PUSTAKA	 5
2.1 Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i>	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	6
2.1.3 Fase Reproduksi	6
2.1.4 Fase Pertumbuhan	7
2.1.5 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan	8
2.1.6 Infeksi dan Gejalanya	10
2.2 Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	11
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	11
2.2.2 Habitat dan Penyebaran	12
2.2.3 Bahan Aktif	12
2.2.4 Mekanisme Senyawa Pegagan (<i>Centella asiatica</i>) Sebagai Antibakteri	13
2.3 Uji Efektifitas Antibakteri dengan Uji Cakram	14
 3. METODE PENELITIAN	 16
3.1 Materi Penelitian	16
3.1.1 Alat Penelitian	16
3.1.2 Bahan Penelitian	17
3.2 Metode Penelitian	17
3.3 Pengambilan Data	18
3.4 Rancangan Penelitian	19

3.5 Prosedur Penelitian	20
3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	20
3.5.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan.....	21
3.5.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	22
3.5.4 Pembuatan Media	22
3.5.4.1 Media Agar Miring	22
3.5.4.2 Media <i>Tryptitone Soy Agar</i> (TSB)	23
3.5.4.3 Media Agar untuk Uji Cakram	23
3.5.5 Peremajaan Bakteri <i>P. fluorescens</i>	24
3.5.6 Kultur Bakteri <i>P. fluorescens</i>	25
3.6 Pelaksanaan Penelitian dengan Uji Cakram.....	26
3.7 Parameter Uji	27
3.8 Analisa Data	28
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram	29
4.2 Daya Hambat Ekstrak Kasar Pegagan (<i>C. asiatica</i>) terhadap <i>P. fluorescens</i>	30
4.3 Parameter Penunjang	38
5. KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1 Kesimpulan	40
5.2 Saran	40
6. DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN.....	45



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat yang digunakan Penelitian	16
2. Bahan yang digunakan Penelitian	17
3. Hasil rata – rata pengukuran diameter daya hambat (mm) ekstrak kasar pegagan (<i>C. asiatica</i>) terhadap daya hambat bakteri <i>P. fluorescens</i>	31
4. klasifikasi Respon Hambatan.....	33
5. Hasil Perhitungan Sidik Ragam Diameter Daya Hambat Bakteri <i>P. Fluorescens</i>	35
6. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Ekstrak Kasar Pegagan (<i>C. asiatica</i>) Terhadap Diameter Daya Hambat Bakteri <i>P. fluorescens</i>	35



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>P. fluorescens</i> pembesaran 1000 x	5
2. Fase Pertumbuhan Bakteri	8
3. Pegagan	11
4. Denah (<i>Lay Out</i>) Rancangan Penelitian.....	20
5. Hasil Uji Pewarnaan Gram Bakteri <i>P. fluorescens</i> dengan perbesaran 1000x.....	29
6. Hasil Uji Daya Hambat Ekstak Kasar Pegagan (<i>C. asiatica</i>) terhadap Bakteri <i>P. fluorescens</i>	30
7. Grafik Hubungan Zona Hambat antar Perlakuan Ekstrak Pegagan (<i>C. asiatica</i>) terhadap Bakteri <i>P. Fluorescens</i>	36



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>P. fluorescens</i>	45
2. Alat dan Bahan Penelitian.....	46
3. Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Pegagan (<i>C. asiatica</i>) pada Uji Difusi Kertas Cakram	55
4. Pembuatan Ekstrak Pegagan (<i>C. asiatica</i>).....	56
5. Hasil Uji Cakram Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Pegagan (<i>C. asiatica</i>) Terhadap Daya Hambat Bakteri <i>P. fluorescens</i>	57
6. Analisis Data Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Kasar Pegagan (<i>C. asiatica</i>) terhadap Diameter Hambatan (mm) Bakteri <i>P. fluorescens</i> Secara <i>In vitro</i>	60



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Selama kurun waktu 2010 - 2014, produksi perikanan budidaya memperlihatkan trend yang positif yaitu mengalami peningkatan dengan rata-rata per tahun mencapai 23,74%. Angka tersebut juga diikuti oleh kinerja positif peningkatan nilai produksi perikanan budidaya dalam kurun waktu yang sama dengan rata-rata kenaikan per tahun sebesar 16,12%. Produksi perikanan budidaya sampai dengan triwulan IV tahun 2014 yaitu sebesar 14.521.349 ton atau (107,97%) dari target sebesar 13.449.206 ton dengan capaian nilai produksi sebesar Rp109,784 miliar atau capaian (90,17%) dari target sebesar Rp121,758 miliar (Anonymous, 2015).

Upaya dalam meningkatkan produksi ikan salah satu kendalanya yaitu ketersediaan pakan berkualitas, benih yang bermutu atau serangan penyakit (Afrianto, Liviawaty, Jamaris dan Hendi, 2015). Penyakit yang menyerang ikan disebabkan oleh bakteri salah satunya adalah bakteri *Pseudomonas*. Bakteri tersebut telah banyak ditemui menyerang ikan lele dan menimbulkan kematian massal di Indonesia. Penyakit ini menimbulkan kerusakan pada organ dalam (hati dan limpa) dan daging. Selain itu, penyakit ini menimbulkan gejala berupa bisul – bisul yang menyebabkan borok, akibatnya sangat parah dan sukar untuk diobati (Suyanto, 1982).

Suatu upaya yang banyak dilakukan untuk menangani permasalahan tersebut adalah dengan menggunakan antibiotik, akan tetapi penggunaan antibiotik secara terus menerus akan menyebabkan permasalahan baru, yaitu timbulnya resistensi, penimbunan residu obat-obatan didalam tubuh ikan atau udang, maupun pencemaran lingkungan yang akhirnya dapat mempengaruhi organisme perairan (Prajitno, 2007). Obat antibakteri seperti entrofloksasin cukup

efektif untuk menanggulangi serangan penyakit yang disebabkan bakteri. Namun, penggunaannya sudah dilarang, penggunaan obat alami lebih dianjurkan (Carman dan Sucipto, 2013).

Berdasarkan permasalahan diatas, sehingga perlu adanya bahan alternatif yang lebih aman yang bisa digunakan dalam pengendalian penyakit ikan. Alternatif salah satunya adalah dengan menggunakan bahan alami yang bersifat antijamur, antiparasit, antibakteri, dan antiviral. Adapun keuntungan menggunakan bahan alami antara lain relatif lebih aman, mudah diperoleh, murah, tidak menimbulkan resistensi, serta relatif tidak berbahaya terhadap lingkungan sekitarnya (Sugianti, 2005). Salah satu bahan alami yang bersifat antibakteri adalah pegagan (*C. asiatica*). Pegagan merupakan salah satu tanaman yang digunakan sebagai obat. 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 (Ramadhan, Rasyd dan Sy, 2015).

Pada penelitian Putri, Sulaiman dan Indrayudha (2013) , ekstrak pegagan berpengaruh terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara pada uji cakram dengan konsentrasi ekstrak pegagan yang daya hambatnya pada konsentrasi 6% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 8,62 mm dan konsentrasi 10% rata-rata diameter zona hambat sebesar 10,37 mm.

Penelitian yang menggunakan ekstrak kasar pegagan untuk menghambat bakteri *P. fluorescens* belum pernah dilakukan. Oleh karena itu diadakan penelitian ini untuk menjelaskan pengaruh ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*.

1.2 Rumusan Masalah

P. fluorescens adalah bakteri yang menimbulkan penyakit hemoragic dan septicemia. Gejalanya dapat dilihat dari munculnya bisul di kulit, sirip, rongga perut, dan rongga bagian dalam ikan. Bakteri ini juga menyebabkan anemia atau kekurangan darah merah pada ikan hias yang bisa membawa kematian massal pada ikan (Sitanggang, 2002).

Budidaya ikan menggunakan obat – obatan termasuk peptisida yang digunakan untuk mencegah dan mengobati (menyembuhkan) penyakit ikan yang disebabkan oleh hama dan berbagai penyakit infeksi (parasiter). Pemakaian obat – obatan dianggap sangat praktis, efektif, dan mudah. Tetapi, karena obat – obatan kebanyakan tidak spesifik dan dapat menimbulkan strain bakteri yang resisten dan menimbulkan pencemaran lingkungan (Kordi, 2004). Berdasarkan informasi tersebut maka dibutuhkan penelitian mengenai ekstrak pegagan (*C. asiatica*) dalam menghambat *P. fluorescens*. Berhubungan dengan hal tersebut, maka didapatkan rumusan masalah pada penelitian ini adalah :

- Apakah pemberian ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) dapat menghambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*?
- Berapakah dosis terbaik ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) dalam menghambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah :

- Untuk menjelaskan pengaruh pemberian ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) dalam menghambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*.
- Untuk menentukan dosis terbaik ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) dalam menghambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*.

1.4 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini diharapkan memberikan informasi kepada pembaca ataupun pembudidaya ikan air tawar dapat menggunakan bahan alami pegagan sebagai antibakteri yang digunakan sebagai alternatif untuk menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* yang ramah lingkungan.

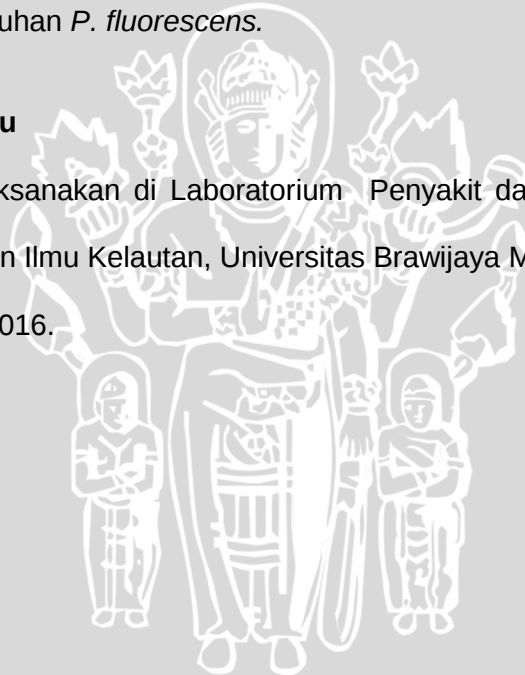
1.5 Hipotesis

H0 : Pemberian ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) tidak berpengaruh terhadap daya hambat pertumbuhan *P. fluorescens*.

H1 : Pemberian ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) berpengaruh terhadap daya hambat pertumbuhan *P. fluorescens*.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari sampai April 2016.



2. TINJAUAN PUSTAKA

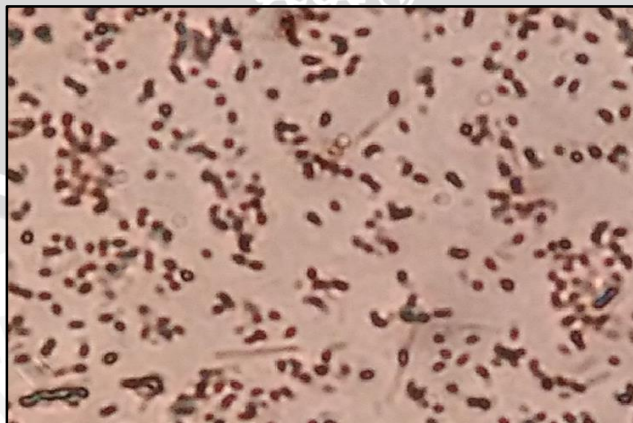
2.1 Bakteri *P. fluorescens*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Adapun klasifikasi bakteri *P. fluorescens* menurut Siegrist (2010), adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Order	: Pseudomonadales
Family	: Pseudomonadaceae
Genus	: Pseudomonas
Spesies	: <i>Pseudomonas fluorescens</i>

Menurut Soenandar dan Tjachjono (2012), menyatakan bahwa Bakteri *Pseudomonas fluorescens* merupakan bakteri berbentuk batang lurus atau tegak agak lengkung dengan ukuran $(0,5 - 1) \times (1,5 - 5) \mu\text{m}$. Bakteri ini bersifat gram negatif dan aerob. *P. fluorescens* mampu bergerak dengan menggunakan flagellum polar. Gambar bakteri *P. fluorescens* dapat dilihat pada Gambar 1 dan uji biokimia disajikan pada Lampiran 1.



Gambar 1. *P. fluorescens* pembesaran 1000 x (Dokumen Pribadi, 2016).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Arwiyanto, Maryudani dan Azizah (2007), *P. fluorescens* merupakan bakteri yang bersifat gram negatif serta memerlukan oksigen untuk tumbuh (aerob). Semua isolat *P. fluorescens* dapat tumbuh pada kisaran suhu 20 – 41 °C dengan pertumbuhan terbaik pada suhu 30 °C serta pH yang baik untuk pertumbuhannya adalah pada kisaran 6 – 7. Pada medium yang mengandung NaCl semua bakteri *P. fluorescens* tumbuh sampai pada konsentrasi NaCl 2 %.

Menurut Lesmana (2003), *Pseudomonas* merupakan bakteri yang banyak terdapat di perairan. Bakteri *Pseudomonas* ini tahan terhadap suhu ekstrim yaitu pada suhu panas hingga dingin sekalipun, serta tahan terhadap desinfektan. Infeksi bakteri *Pseudomonas* ini sangat berbahaya bagi ikan kecuali pada ikan dalam keadaan sehat. Bakteri *Pseudomonas* menyerang ikan ketika sistem imun tubuh ikan menurun serta kondisi lingkungan yang tidak baik. Dalam jumlah banyak bakteri *P. fluorescens* dapat mengeluarkan zat racun yang terakumulasi dalam air sehingga dapat meracuni ikan.

2.1.3 Fase Reproduksi

Menurut Stansfield, Colome dan Cano (2003), sel bereproduksi secara aseksual, yaitu tanpa terjadinya pertukaran atau pemerolehan informasi dari hereditas baru. Bakteri bereproduksi secara aseksual melalui proses yang disebut pembelahan biner (*binary fission*). Selama berlangsungnya pembelahan tersebut, bakteri tumbuh menduplikasi (menggandakan) informasi hereditasnya, mensegregasikan kromosom – kromosom yang telah diduplikasi dan membelah sitoplasmanya.

Proses pembelahan sel bakteri menurut Pelczar dan Chan (2008), adalah :

- 1) Terdapat kenaikan jumlah bahan inti yang terpisah menjadi dua unit, satu untuk masing – masing sel anak baru.

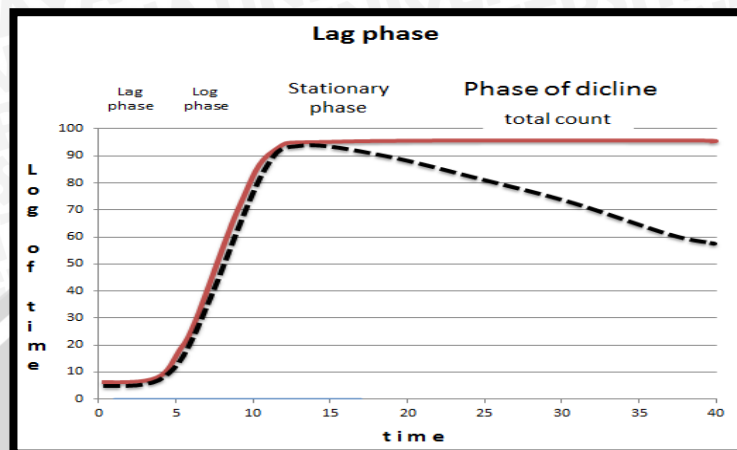
- 2) Dinding sel dan membran sel tumbuh ke arah luar dan membran sel tumbuh (meluas) ke dalam sitoplasma pada suatu titik di tengah – tengah sumbu panjang sel. Pada perbatasan tersebut disintesis dua lapisan bahan dinding sel.
- 3) Pembentukan mesosom menjadi lebih jelas. Mesosom mempunyai kaitan dengan pembentukan septum (dinding sel yang membagi) dan juga berpautan dengan daerah inti.

2.1.4 Fase Pertumbuhan

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

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

- d) Fase kematian, pada fase ini terjadi penurunan laju pertumbuhan dan juga penurunan jumlah sel bakteri. Hal tersebut disebabkan karena nutrisi yang dibutuhkan sel bakteri sudah habis dan kondisi lingkungan yang tidak sesuai.



Gambar 2. Fase Pertumbuhan Bakteri (Duguid, Marmion dan Swain,1978).

Sebagian besar bakteri tumbuh melalui proses yang disebut pembelahan biner. Hal ini berarti bahwa sel terbagi menjadi dua sel identik yang tumbuh dan kemudian membelah lagi menjadi empat sel, delapan, enam belas, tiga puluh dua, dan seterusnya. Perbedaan kecepatan pertumbuhan direfleksikan pada masa inkubasi suatu penyakit, yaitu waktu yang diperlukan oleh bakteri untuk mencapai jumlah yang cukup untuk menimbulkan gejala suatu infeksi penyakit. Jika zat gizi habis atau kondisi berubah, maka bakteri akan berhenti tumbuh (James, Baker dan Swain, 2008).

2.1.5 Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan

a. Lingkungan

Faktor yang mempengaruhi laju pertumbuhan dan aktifitas bakteri adalah pH, suhu, nutrisi, tekanan osmosis, pengeringan dan lain – lain. pH dan suhu merupakan faktor yang paling penting dalam pertumbuhan bakteri, tetapi setiap spesies bakteri memiliki suhu dan pH optimum yang berbeda – beda (Waluyo, 2007). Kebanyakan bakteri mempunyai pH optimum, yaitu pH dimana

pertumbuhan maksimum, sekitar pH 6,5-7,5. Pada pH dibawah 5,0 dan diatas 8,5 bakteri tidak dapat tumbuh dengan baik, kecuali bakteri asam asetat dan bakteri oksidasi sulfur (Kadir, 2010).

Suhu, lingkungan, gas (oksigen dan karbon dioksida) dan pH adalah faktor – faktor fisik utama yang harus dipertimbangkan dalam penyediaan kondisi optimum bagi pertumbuhan bakteri (Pelczar dan Chan, 2008). *P. fluorescens* merupakan bakteri yang bersifat gram negatif serta memerlukan oksigen untuk tumbuh (aerob). Semua isolat *P. fluorescens* dapat tumbuh pada kisaran suhu 20 – 41 °C dengan pertumbuhan terbaik pada suhu 30 °C serta pH yang baik untuk pertumbuhannya adalah pada kisaran 6 – 7 (Arwiyanto, Maryudani dan Azizah ,2007).

b. Nutrien

Persyaratan nutrisi untuk pertumbuhan bakteri dalam bentuk zat – zat kimiawi seperti membutuhkan energi pancaran sinar matahari atau tergantung pada oksidasi. Membutuhkan karbon, nitrogen, belerang (sulfur) dan fosfor. Beberapa unsur logam (natrium, kalium, magnesium, mangan, besi, seng, tembaga dan kobalt. Membutuhkan vitamin karena berfungsi membentuk substansi yang mengaktivasi enzim – substansi yang menyebabkan perubahan kimiawi. Membutuhkan air karena berfungsi sebagai metabolik dan pertumbuhannya (Pelczar dan Chan, 2008).

Menurut Kurniawan, Damajanti dan Hamad (2014), unsur mineral sangat diperlukan sebagai nutrisi untuk metabolisme zat organik oleh mikroorganisme, kecuali nitrogen dan fosfor mineral tersebut biasanya telah ada dalam jumlah yang cukup dalam air. Kuantitas nitrogen dan fosfor yang diperlukan untuk penghilangan BOD yang efektif. Tetapi tidak semua senyawa nitrogen organik dapat untuk sintesis mikroba. Nitrogen biasanya ditambahkan dalam bentuk

urea, senyawa nitrogen sebelum digunakan harus dikonversi lebih dahulu ke bentuk amonia, nitrit, nitrat dan sekitar 75% senyawa nitrogen organik juga dapat digunakan untuk sintesis mikroba, fosfor dapat diberikan sebagai asam fosfat, tri super phosphate (TSP) biasanya digunakan sebagai sumber nutrisi fosfor.

2.1.6 Infeksi dan Gejalanya

P. fluorescens adalah patogen ikan air tawar. Bakteri ini menyebabkan penyakit pada ikan *silver carp* (*Hypophthalmichthys molitrix*), *bighead* (*Aristichthys nobilis*), ikan mas (*Carassius auratus*), *tench* (*Tinca tinca*), *grass carp* (*Ctenopharyngodon idella*), dan *black carp* (*Mylopharyngodon piceus*). Ciri khas bakteri ini adalah penyebab infeksi sekunder pada ikan, tetapi patogenitasnya lebih rendah. Bagian yang diserang umumnya sirip dan ekor sehingga terjadi erosi. Serangannya dapat menyebabkan kematian masal, dimana terjadi lesi hemoragik pada kulit dan dasar sirip dan hemoragi petechial terlihat jelas pada insang, ginjal, hati, dan pada lumen dan submukosa usus (Afrianto, Liviawaty, Jamaris dan Hendi, 2015).

Menurut Cahyono (2001), bakteri *P. fluorescens* menyerang ikan yang masih muda maupun yang sudah dewasa. Hampir semua bagian tubuh ikan dapat terserang oleh bakteri ini. Serangannya sangat ganas hingga dapat menimbulkan kematian. Kerugian yang dapat ditimbulkan oleh serangan bakteri ini sangat besar. Penularanya dapat melalui air, alat – alat, bagian ikan yang telah terinfeksi, melalui hewan air, dan melalui tumbuhan lain. Gejala yang tampak pada ikan yang terserang *P. fluorescens* adalah ikan berwarna gelap (kusam), nafsu akan berkurang atau sama sekali tidak ada nafsu makan, ikan bergerombol di dekat pintu pengeluaran air, luka pada kulit, sirip dan sisik rusak, pendarahan pada tubuh ikan, perut busung, insang rusak berwarna keputih – putihan hingga kebiru – biruan, ikan lemah dan timbul borok.

2.2 Pegagan (*C. asiatica*)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Rasy (2013), klasifikasi dari pegagan adalah sebagai berikut :

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

Pegagan tumbuh merayap menutupi tanah, tidak berbatang, tinggi tanaman antara 10 – 50 cm, memiliki daun satu helaian yang tersusun dalam roset akar dan terdiri dari 2 – 10 helai daun. Daun berwarna hijau; berbentuk seperti kipas, buah pinggang atau ginjal, permukaan dan punggungnya licin, tetapi agak melengkung ke atas, bergerigi dan kadang – kadang berambut, tulangnya berpusat di pangkal dan tersebar ke ujung, serta berdiameter 1 – 7 cm. Tangkai daun berbentuk seperti pelepah, agak panjang, berukuran 5 – 15 cm tergantung dari kesuburan tempat tumbuhnya. Sepanjang tangkai daun teralur dan di pangkalnya terdapat daun sisik yang sangat pendek, licin, tidak berbulu, berpadu dengan pangkal tangkai daun (Winarto dan Surbakti, 2003). Morfologi pegagan disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Pegagan (Winarto dan Surbakti, 2003).

2.2.2 Habitat dan Penyebaran

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

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

2.2.3 Bahan Aktif

Menurut Rismana, Kusumaningrum, Rosidah, Nizar dan Yulianti (2013), Ekstrak pegagan mengandung bahan aktif *triterpenoid* seperti *asiaticoside*, *asiatic acid*, *madecassoside* dan *madecassic acid* mempunyai efek sebagai antinospasmodik dan antiinflamasi. Menurut Winarto dan Surbakti (2003), kandungan zat kimia pada pegagan antara lain *asiaticoside*, *thankunside*, *isothankunside*, *madecassoside*, *brahmaside*, *brahmic acid*, *modasiatic acid*, *meso-inositol*, *centellose*, *carotenoid*, garam K, Na, Ca, Fe, *vellarine*, *tannin*,

mucilago, resin, pektin, gula, protein, fosfor, dan vitamin B serta mengandung sedikit vitamin C dan sedikit minyak atsiri.

Kandungan pegagan seperti triterfenoid safonin dan flavopnoid mampu berperan sebagai imunostimulan, sehingga meningkatkan aktivitas metabolisme di dalam sel makrofag. Meningkatnya metabolisme di dalam sel akan meningkatkan enzim-enzim dan bahan lain yang berperan dalam fagositosis, sehingga kemampuan fagositosis makin meningkat (Besung, 2011). Pegagan (*C. asiatica*) mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, triterpenoid, dan saponin. Kandungan alkaloid dan terpenoid yang bersifat imunostimulator (Kumala, Dewi dan Nugroho. 2012).

2.2.4 Mekanisme Senyawa Pegagan (*C. asiatica*) Sebagai Antibakteri

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

Pegagan mengandung zat antibakteri diantaranya mengandung zat saponin tannin, alkaloid, dan flavonoid (Ramadhan, Rasyd dan Sy, 2015). Senyawa saponin merupakan zat yang dapat berinteraksi dengan sel bakteri maka dinding sel bakteri akan menjadi lisis atau pecah, demikian pula dengan senyawa tannin yang merupakan senyawa metabolit sekunder yang dalam konsentrasi rendah mampu menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara mengkoagulasi protoplasma bakteri (Munfaati, Ratnasari dan Trimulyono, 2015). Alkaloid dapat merusak komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh (Warbung, Wowor dan Posangi, 2013).

2.3 Uji Efektifitas Antibakteri dengan Uji Cakram

Kertas cakram dengan diameter 6 mm dimasukkan dalam cairan ekstrak dan didiamkan selama 30 menit. Selanjutnya kertas cakram dikeluarkan dari cairan ekstrak dan dikeringkan pada suhu sekitar 50 °C hingga cairan tidak menetes. Masing-masing suspensi isolat kemudian dimasukkan pada cawan Petri steril masing-masing sebanyak 0.5 ml dan dituangkan agar nutrisi setebal 4 mm. Selanjutnya agar dan suspensi bakteri digoyang secara merata dan dibiarkan hingga agar membeku. Kertas cakram yang mengandung ekstrak ditempelkan pada permukaan agar dan cawan Petri diinkubasi pada suhu 37 °C selama 24 jam. Diameter hambat yang terjadi diukur dengan penggaris hanya pada zona bening saja (Lingga dan Rustama, 2005).

Menurut Darsana, Besung dan Mahatmi (2012), variabel yang diamati adalah besarnya diameter daya hambat ekstrak (satuan mm) terhadap bakteri. Tingkat potensi hanya bisa dibandingkan berdasarkan besarnya diameter daya hambat yang terbentuk pada tiap-tiap konsentrasi, dengan hambatan yang tampak sebagai daerah yang tidak memperlihatkan pertumbuhan kuman disekitar kertas cakram. Yang menjadi acuan ialah jika semakin besar diameter terbentuk maka semakin baik daya hambat terhadap bakteri. Ditambahkan oleh Noor, Poeloengan dan Yulianti (2006), hasil uji daya antibakteri didasarkan pada pengukuran diameter daerah hambat (DDH) pertumbuhan bakteri yang terbentuk di sekeliling kertas cakram.

Uji cakram digunakan untuk mengetahui pada konsentrasi tertentu yang dapat menghambat bakteri yang bersifat bakteriostatik (menghambat bakteri) setelah diinkubasi selama 24 jam, maupun bakterisidal (membunuh bakteri) setelah diinkubasi selama 48 jam. Kertas cakram yang telah direndam dengan zat antibakteri diletakkan di atas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme yang diuji. di atas lempengan agar yang telah disemai dengan

mikroorganisme yang diuji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antibakteri terlihat sebagai wilayah yang jernih di sekitar pertumbuhan mikroorganisme.



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1 dan Lampiran 2:

Tabel 1. Alat yang digunakan Penelitian

No	Alat	Fungsi
1	Autoclave	digunakan untuk mensterilisasi peralatan yang akan digunakan
2	Gunting	digunakan untuk memotong sampel
3	Blender	digunakan untuk menghaluskan sampel
4	Timbangan digital	digunakan untuk menimbang sampel
5	Corong	digunakan untuk memasukan pelarut
6	Toples kaca	digunakan untuk wadah maserasi
7	Gelas ukur	digunakan untuk mengukur larutan
8	<i>Rotary evaporator</i>	digunakan untuk alat untuk ekstraksi
9	Spatula	digunakan untuk menghomogenkan larutan
10	Botol film	digunakan untuk menyimpan hasil ekstrak
11	Lemari pendingin	digunakan untuk menyimpan sampel
12	<i>Vortex mixer</i>	digunakan untuk menghomogenkan larutan
13	Cawan petri	digunakan untuk tempat media tumbuh bakteri
14	Tabung reaksi	digunakan untuk tempat larutan suspensi dan kultur bakteri
15	Gelas ukur	digunakan untuk mengukur larutan
16	Elemeyer	digunakan untuk tempat larutan
17	Mikropipet	digunakan untuk mengambil larutan dalam skala kecil
18	Jarum ose	digunakan untuk menginokulasi bakteri
19	Gunting	digunakan untuk memotong bahan
20	Sendok bahan	digunakan untuk mengambil bahan
21	Jangka sorong	digunakan untuk mengukur diameter zona hambat
22	Bunsen	digunakan untuk pengkondisian aseptis
23	Washing bootle	digunakan untuk menyimpan aquades
24	Rak tabung reaksi	digunakan untuk tempat tabung reaksi
25	Inkubator	digunakan untuk menyimpan bakteri dan media
26	Sprayer	digunakan untuk tepat alkohol
27	tree angel	digunakan untuk meratakan bakteri
28	<i>Laminari Air Flow</i> (LAF)	digunakan untuk tempat dilakukanya perlakuan
29	Pipet volume	digunakan untuk mengambil larutan

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini dapat disajikan pada

Tabel 2 dan Lampiran 2:

Tabel 2. Bahan yang digunakan Penelitian

No	Bahan	Fungsi
1	Pegagan (<i>Centella asiatica</i>)	sebagai sampel yang akan diekstraksi
2	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	sebagai bakteri yang akan diuji
3	Etanol 90 %	sebagai pelarut saat maserasi
4	Kertas saring (whatman)	sebagai penyaring filtrat dan residu
5	Alumunium foil	sebagai penutup larutan
6	Kertas label	sebagai penanda
7	Kapas	sebagai menutup tabung, elemeyer dan pipet saat sterilisasi
8	Kertas bekas	sebagai menutup alat saat sterilisasi
9	Tali	sebagai mengikat alat saat sterilisasi
10	Alumunium foil	sebagai menutup alat
11	Alkohol 70%	pengkondisian aseptis
12	Kertas cakram	sebagai uji daya hambat
13	Tisue	sebagai pembersih
14	Plastik 2 kg	sebagai wadah penyimpanan petri saat di inkubator
15	<i>Pseudomonas Selective Agar</i> (PSA)	sebagai media agar
16	<i>Tryptitone Soy Agar</i> (TSB)	sebagai media cair
17	DMSO	sebagai pelarut
18	NaCl	sebagai bahan larutan na-fisiologis
19	Spirtus	sebagai bahan bakar bunsen
20	Plastik wrap	sebagai pembungkus botol sampel
21	Aquades	Sebagai pelarut media

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Menurut Umar (2005), metode eksperimen merupakan langkah-langkah lengkap yang diambil sebelum eksperimen dilakukan agar data yang diperlukan dapat diperoleh sehingga analisis menjadi obyektif. Eksperimen biasanya dilakukan di laboratorium. Variabel bebas dijadikan sebagai variabel

eksperimen, variabel penyebab atau variabel perlakuan yang karakteristiknya diyakini dapat menghasilkan perbedaan sedangkan variabel terikat atau variabel akibat merupakan hasil dari suatu penelitian. Dikatakan terikat karena tergantung variabel bebas.

Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan terhadap variabel yang data-datanya belum ada sehingga perlu dilakukan proses manipulasi melalui pemberian treatment atau perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian yang kemudian diamati atau diukur dampaknya (data yang akan datang). Penelitian eksperimen juga merupakan penelitian yang dilakukan secara sengaja oleh peneliti dengan cara memberikan treatment atau perlakuan tertentu terhadap subjek penelitian guna membangkitkan sesuatu kejadian atau keadaan yang akan diteliti bagaimana akibatnya (Jaedun, 2011).

3.3 Pengambilan Data

Penelitian ini menggunakan pengambilan data observasi. Menurut Mania (2008), observasi merupakan cara atau metode menghimpun keterangan atau data yang dilakukan dengan mengadakan pengamatan dan pencatatan secara sistematis terhadap fenomena yang sedang dijadikan sasaran pengamatan. Dengan demikian, melalui kegiatan observasi dapat memperoleh gambaran yang lebih jelas.

Mengumpulkan data dari sampel penelitian salah satunya dilakukan dengan pengamatan atau observasi. Pengamatan (observasi) adalah metode pengumpulan data dimana peneliti atau kolaboratornya mencatat informasi sebagaimana yang mereka saksikan selama penelitian. Penyaksian terhadap peristiwa-peristiwa itu bisa dengan melihat, mendengarkan, merasakan, yang kemudian dicatat seobyektif mungkin (Gulo, 2000).

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Menurut Sastrosupadi (2000), Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca dan peternakan. Karena media homogen maka media atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati dan model RAL adalah sebagai berikut :

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

$$i = 1, 2, \dots, t$$

$$j = 1, 2, \dots, t$$

keterangan :

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

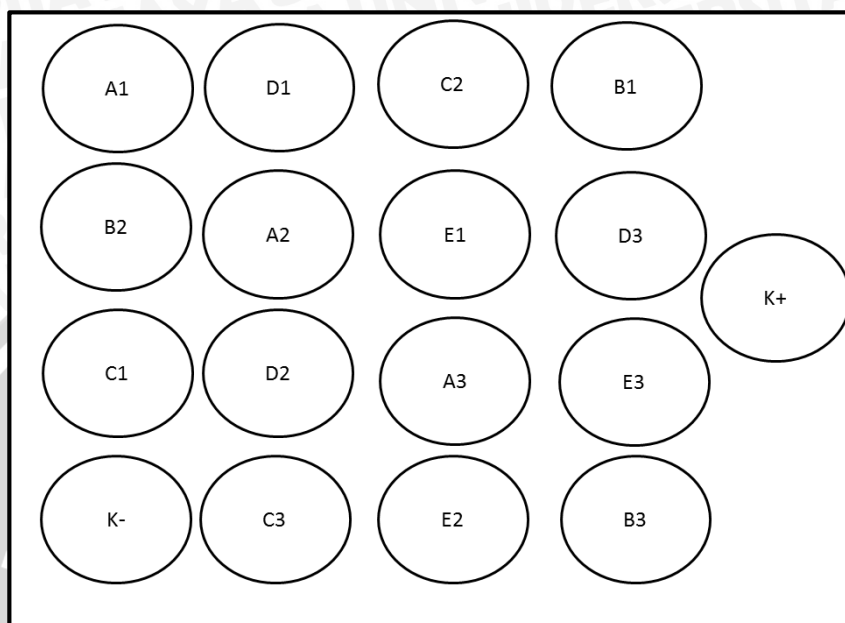
μ = nilai tengah umum

τ_i = pengaruh perlakuan ke- i

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

Variabel bebas dalam penelitian ini berupa pemberian ekstrak Pegagan (*C. asiatica*) dengan memberikan perlakuan pengaruh perbedaan dosis ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *P. fluorescens*. Dasar penelitian ini berupa penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat penggunaan ekstrak pegagan (*C. asiatica*). Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, sedangkan perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 5 perlakuan dan 2 kontrol, kontrol positif dan kontrol negatif. Denah percobaan yang digunakan pada penelitian, huruf A, B, C, D dan E menunjukkan perlakuan perbedaan dosis yang digunakan dimana huruf A merupakan perlakuan dengan dosis 5 ppt, perlakuan B merupakan perlakuan dengan dosis 10 ppt, perlakuan C merupakan perlakuan dengan dosis 15 ppt dan perlakuan D merupakan perlakuan dengan dosis 20 ppt serta perlakuan E dengan perlakuan

dosis 25 ppt. K+ merupakan kontrol positif dan K- merupakan kontrol negatif. Sementara angka 1, 2, dan 3 menunjukkan banyaknya ulangan yang digunakan. Perhitungan penentuan dosis disajikan pada lampiran 3.



Gambar 4. Denah (*Lay Out*) Rancangan Penelitian

Keterangan gambar:

- A : Perlakuan dosis 5 ppt
- B : Perlakuan dosis 10 ppt
- C : Perlakuan dosis 15 ppt
- D : Perlakuan dosis 20 ppt
- E : Perlakuan dosis 25 ppt
- K+ : Perlakuan dosis 100 ppt (kontrol positif)
- K- : Perlakuan tanpa diberi ekstrak 0 ppt (kontrol negatif)
- A – D : Perlakuan
- 1 – 3 : Ulangan
- K : Kontrol positif (+) dan kontrol negatif (-)

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan cara :

- Alat – alat yang akan digunakan dicuci menggunakan sabun cuci, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas bekas dan diikat menggunakan benang sedangkan untuk tabung reaksi dan erlenmayer bagian atas ditutup dengan kapas.

- Air secukupnya dituang ke dalam *autoclave*, kemudian alat yang telah dibungkus dengan kertas bekas dimasukkan ke dalam keranjang *autoclave* dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris. Klep uap (*safety falve*) dipastikan pada posisi tegak.
- Tombol ON dinyalakan dan temperatur diputar pada posisi maksimal. Ditunggu hingga keluar uap air kemudian klep uap ditutup, kemudian ditunggu hingga mencapai suhu 121°C dan tekanan menunjukkan 1 atm. Selanjutnya suhu diturunkan sampai lampu pada *autoclave* berwarna kuning keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit. Setelah alarm berbunyi maka tanda sterilisasi selesai dan suhu pada *autoclave* diturunkan pada suhu minimal.
- Tombol OFF ditekan, ditunggu sampai suhu menunjukkan angka 0 (nol), 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.

3.5.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan

Selain alat dan bahan, tempat dan laboran juga harus steril yang bertujuan untuk menghindari kontaminasi dengan bakteri yang berada diluar tempat penelitian. Tangan laboran yang bersinggungan, meja dan sekitar tempat perlakuan harus dalam kondisi steril. Sterilisasi tempat dapat dilakukan dengan cara kimia menggunakan alkohol 70% maupun cara fisika yaitu dengan pembakaran langsung maupun dengan penyinaran dengan sinar UV. Pada kegiatan penelitian ini sterilisasi tempat dilakukan dengan menggunakan sinar UV yang terdapat pada *laminar air flow* (LAF).

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Pegagan (*C. asiatica*)

Proses pembuatan ekstrak kasar pegagan (*Centella asiatica*) adalah :

- Menyiapkan pegagan (semuanya kecuali akar) sebanyak 700 gr yang di dapatkan di Balai Medika Tanaman Obat Batu, Jawa Timur, selanjutnya pegagan dipotong kecil - kecil dan dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci dengan air sampai bersih kemudian ditiriskan.
- Selanjutnya, dikering anginkan pada suhu ruangan sekitar 3 – 7 hari. Pengeringan bertujuan untuk mengurangi kadar air, sehingga mudah untuk mendapatkan senyawa antibakterinya.
- Setelah pegagan kering kemudian diblender sampai halus, selanjutnya serbuk pegagan didapat 100 gr dengan cara ditimbang menggunakan timbangan analitik.
- Proses selanjutnya maserasi dimana serbuk pegagan sebanyak 100 gr di maserasi dengan etanol 90% sebanyak 1 L (Vasavi, Arun dan Rekha, 2014).
- Bejana maserasi ditutup dengan rapat dan dibiarkan selama 3 hari dengan sesekali diaduk.
- Setelah 3 hari, filtrat disaring dan dipisahkan dengan residu. Didapatkan filtrat sebanyak ± 750 ml.
- Setelah terpisah dari residu, filtrat diuapkan dengan *vacuum rotary evaporator* hingga didapatkan ekstrak kental berbentuk pasta sebanyak ± 14 gr. Proses pembuatan ekstrak kasar pegagan disajikan pada Lampiran 4.

3.5.4 Pembuatan Media

3.5.4.1 Media Agar Miring

Proses pembuatan media Agar miring menggunakan *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) adalah sebagai berikut :

- Media PSA ditimbang 2 gr dengan menggunakan timbangan digital.

- Media dimasukkan ke dalam beaker glass 100 ml.
- Media dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 ml dan dihomogenkan.
- Media dipanaskan dengan hot plate sampai mendidih.
- Media yang sudah homogen dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi sebanyak 10 ml disetiap tabung reaksinya.
- Tabung reaksi ditutup kapas dan dilapisi alumunium foil serta diikat oleh tali.
- Media distrerilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
- Tabung reaksi yang berisi media steril dimiringkan dengan kemiringan 30 °
- Media ditunggu sampai padat

3.5.4.2 Media *Tryptitone Soy Agar* (TSB)

Media TSB adalah media cair yang digunakan untuk kultur bakteri. Proses pembuatan media TSB adalah sebagai berikut :

- Media ditimbang 1,5 gr dengan menggunakan timbangan digital.
- Media dimasukkan ke dalam beaker glass 100 ml.
- Media dilarutkan dengan aquades sebanyak 50 ml lalu dihomogenkan.
- Media dipanaskan dengan hot plate sampai mendidih.
- Media yang sudah homogen ditutup dengan kapas dan dilapisi alumunium foil serta diikat dengan tali.
- Media distrerilisasi dengan autoclave pada suhu 121 °C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Setelah sterilisasi selesai, media dibiarkan dingin karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.

3.5.4.3 Media Agar untuk Uji Cakram

Penelitian ini menggunakan bakteri *P. fluorescens*, sehingga media yang digunakan yaitu *Pseudomonas Selective Agar* (PSA). Dosis yang digunakan

dalam pembuatan PSA sebesar 40 gram/L. Langkah-langkah dalam pembuatan PSA sebagai berikut:

- Ditimbang PSA sebanyak 7 gram,
- PSA dilarutkan ke dalam erlenmeyer yang berisi aquades sebanyak 280 ml.
- PSA diaduk dengan menggunakan spatula hingga benar-benar larut secara homogen.
- Setelah larut sempurna, erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas sampai rapat, lalu ditutup lagi dengan kertas alumunium foil dan dirapatkan dengan tali.
- Media yang sudah tertutup rapat, disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Media ditunggu hingga hangat kuku atau hingga suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ lalu dituang ke dalam cawan petri dalam kondisi steril.
- Media ditunggu hingga mengeras dan siap untuk digunakan. Apabila media tidak langsung digunakan, maka media diberi label dan disimpan dalam lemari pendingin agar tidak terkontaminasi.

3.5.5 Peremajaan Bakteri *P. fluorescens*

Peremajaan bakteri *P. Fluorescens* dilakukan agar bakteri yang digunakan dapat bertahan lebih lama dibandingkan dengan bakteri biakan murninya. Bakteri yang sudah diremajakan dapat bertahan 3 bulan, hali ini dikarenakan bertambahnya nutrisi dari media yang diberikan sehingga bertahan lebih lama. Prosedur peremajaan bakteri *P. fluorescens* adalah sebagai berikut :

- Media Agar miring yang sudah dibuat disiapkan terlebih dahulu.
- Bakteri diambil dengan menggunakan jarum ose dari stok bakteri.

- Bakteri yang terdapat pada jarum ose digoreskan ke dalam media agar miring dengan metode gores.
- Media agar miring diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 33 °C selama 24 jam.

3.5.6 Kultur Bakteri *P. fluorescens*

Adapun prosedur kultur bakteri *P. fluorescens* adalah sebagai berikut :

- Dibiakkan bakteri yang sudah diremajakan pada media Agar Miring dimabil dengan menggunakan jamur ose sebanyak 1 gores.
- Ose yang sudah terdapat bakteri dicelupkan pada media TSB yang sudah dipersiapkan
- Media disimpan pada inkubator dengan suhu 33 °C selama 24 jam.
- Semua kegiatan pengkukturan dilakukan secara steril.
- Setelah 24 jam media TSB akan berubah menjadi keruh yang menandakan bakwa bakteri telah tumbuh. Bakteri ini kemudian dilihat kepadatannya dengan metode Mc. Farland edngn cara mencocokkan kekruhan beradasrkan kepadatan bakteri pada Mc. Farland.
- Kepadatan bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu 10^7 CFU/ml. Kepadatan bakteri 10^7 CFU/ml didapatkan dengan cara mencocokkan kepadatan bakteri pada media cair TSB dengan Mc. Farland berdasarkan kekeruhannya. Menurut Ariyanti, Darmayasa, Sudirga (2012), menyatakan bahwa suspensi bakteri tersebut kekeruhannya disertakan dengan standar McFarland 0,5 yang setara dengan 10^8 CFU/ml. Sehingga untuk mendapatkan bakteri dengan kepadatan 10^7 CFU/ml, maka diambil 1 ml bakteri dari media cair TSB dan diencerkan dengan menggunakan Nafis sebanyak 9 ml lalu didapatkan bakteri dengan kepadatan 10^7 CFU/ml.

- Disiapkan petridisk yang sudah berisi media PSA.
- Sebelum bakteri dibiakkan pada media PSA, disiapkan terlebih dahulu larutan Na fisiologis untuk menggunakan bakteri agar didapatkan kepadatan sesuai yang diinginkan yaitu 10^7
- 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.
- *Triangel* diambil kemudian disemprot alkohol dan dibakar di atas Bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.
- Kemudian dsebarkan dengan menempelkan pada permukaan agar supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cairan ikut diputar dan diratakan menggunakan *triangel*.
- Media PSA diinkubasi di dalam inkubator selama 24 jam dengan suhu $33\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6 Pelaksanaan Penelitian dengan Uji Cakram

Metode difusi kertas cakram adalah metode dimana meletakkan kertas cakram yang telah direndam dengan larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, maka pertumbuhan bakteri diamati untuk memastikan ada atau tidaknya daerah hambatan disekeliling kertas cakram (Kusmiyati dan Wayan, 2007). Adapun prosedur pelaksanaan uji cakram adalah sebagai berikut :

- Disiapkan cawan petri yang telah terdapat media PSA sebanyak 20 ml.
- Disiapkan berbagai dosis ekstrak kasar pegagan yang akan diujikan untuk mengetahui daya hambatnya.
- Disiapkan bakteri pada media TSB dengan kepadatan 10^8 dan diencerkan dengan menggunakan Nafis agar mendapatkan bakteri *P. fluorescens* dengan kepadatan 10^7 .

- Penanaman bakteri pada media PSA dilakukan dengan menggunakan metode cawan sebar (*spread plate*) pada bakteri yang sudah diencerkan dengan Nafis.
- Setelah itu, diambil suspensi cairan sebanyak 0,1 ml dengan menggunakan pipet ukur kemudian teteskan dalam permukaan agar yang telah memadat.
- *Triangel* diambil kemudian disemprot alkohol dan dibakar diatas Bunsen beberapa saat, kemudian dinginkan dan ditunggu beberapa detik.
- Kemudian disebar dengan menempelkan pada permukaan agar supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar dan diratakan menggunakan *triangel*. Penanaman dilakukan pada *Laminar Air Flow* dengan kondisi yang tetap steril agar tidak terkontaminasi.
- Kertas cakram steril ukuran 6 mm direndam ke dalam ekstrak pegagan selama 15 menit berdasarkan dosis perlakuan yang telah ditentukan.
- Kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak kasar pegagan ditiriskan dan diletakkan pada permukaan lempeng agar.
- Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh bergeser, karena mengurangi validasi pengukuran.
- Dibaca hasil setelah diinkubasi pada suhu ruang 33 °C selama 24 jam dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong *digital*.
- Untuk mengetahui sifat bakteriosidal (membunuh bakteri) maka dilakukan pengamatan setelah 48 jam.

3.7 Parameter Uji

Parameter uji dari penelitian ini terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama dari penelitian ini adalah 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 lama perendaman kertas cakram pada ekstrak kasar Pegagan (*C. asiatica*) selama 15 menit, pH 7 pada media bakteri dan suhu inkubasi sebesar 33 °C.

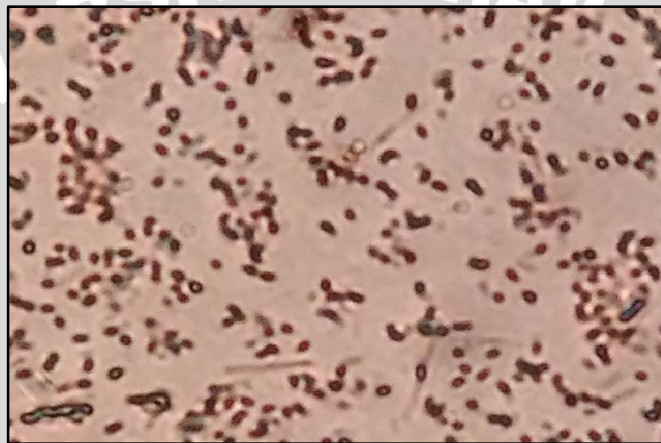
3.8 Analisa Data

Penelitian yang menggunakan metode rancangan acak lengkap (RAL) memperoleh data kemudian dilakukan analisis secara statistik dengan menggunakan analisis uji keragaman atau uji f (ANOVA) dengan tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan 99% ($\alpha = 0,01$). Hal ini digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter ukur (uji f). Data sidik ragam jika memperlihatkan pengaruh berbeda nyata maka dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk membandingkan nilai antar perlakuan. Untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antara perlakuan dengan parameter yang diuji yaitu daya hambat bakteri *P. fluorescens*, maka dilakukan uji polinomial orthogonal.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi Bakteri dengan Pewarnaan Gram

Sebelum melakukan kultur ataupun peremajaan bakteri, hendaknya mengetahui terlebih dahulu bakteri yang dikultur dengan cara pewarnaan gram. Melakukan identifikasi bakteri agar kultur bakteri sesuai dengan bakteri yang kita kultur. Gambar pewarnaan gram disajikan pada Gambar 5 dan uji biokimia pada Lampiran 1.



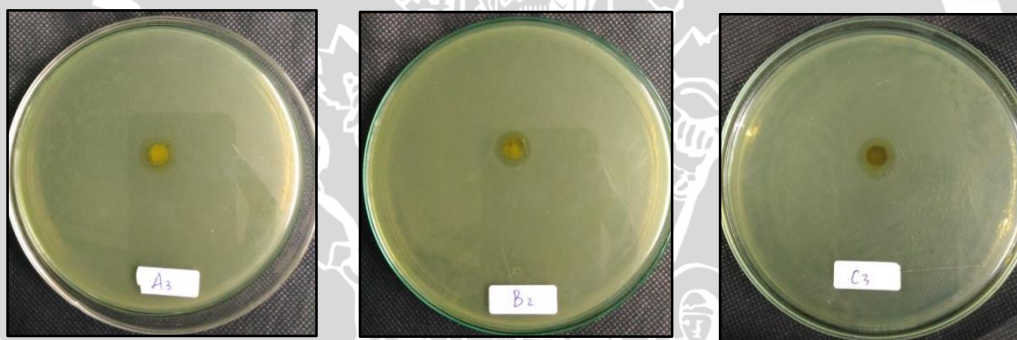
Gambar 5. Hasil Uji Pewarnaan Gram Bakteri *P. fluorescens* dengan perbesaran 1000x (Dokumen Pribadi, 2016).

Hasil dari pewarnaan gram tersebut diketahui bakteri berwarna merah muda yang menandakan bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif dan bakteri tersebut berbentuk batang. Menurut Puspitasari, Hendriani dan Kusuma (2009), bakteri gram positif akan mempertahankan warna ungu dari kristal violet sedangkan bakteri Gram negatif tidak mempertahankan warna ungu dari kristal violet tetapi zat warna safranin dapat terserap pada dinding sel sehingga pada saat dilihat dengan menggunakan mikroskop akan memperlihatkan warna merah. Ditambahkan oleh Soenandar dan Tjachjono (2012), menyatakan bahwa Bakteri *Pseudomonas fluorescens* merupakan bakteri berbentuk batang lurus atau tegak agak lengkung dengan ukuran $(0,5 - 1) \times (1,5 - 5) \mu\text{m}$. Bakteri ini bersifat gram

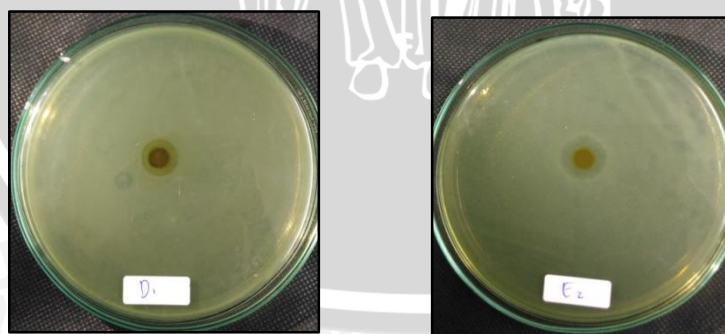
negatif dan aerob. *P. fluorescens* mampu bergerak dengan menggunakan flagellum polar.

4.2 Daya Hambat Ekstrak Kasar Pegagan (*C. asiatica*) terhadap *P. fluorescens*

Paremeter utama dalam penelitian ini adalah daya hambat berupa daya bening yang berada di sekitar kertas cakram. Pada penelitian ini dosis yang digunakan antara lain 5 ppt, 10 ppt, 15 ppt, 20 ppt dan 25 ppt dengan 3 kali ulangan. Hasil pengamatan penelitian mengenai uji daya hambat ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*, maka didapat gambar hasil penelitian zona bening yang disajikan pada Gambar 6.



Perlakuan A dosis 5 ppt Perlakuan B dosis 10 ppt Perlakuan C dosis 15 ppt



Perlakuan D dosis 20 ppt

Perlakuan E dosis 25 ppt

Gambar 6. Hasil Uji Daya Hambat Ekstak Kasar Pegagan (*C. asiatica*) terhadap Bakteri *P. fluorescens*

Berdasarkan Gambar 5. zona bening terkecil terdapat diperlakuan dosis terendah yaitu 5 ppt pada perlakuan A, sedangkan zona bening terbesar terdapat perlakuan dosis tertinggi pada perlakuan E dosis 25 ppt. Kemampuan daya antibakterial ekstrak terhadap bakteri ditentukan dengan cara mengukur diameter daya hambat atau zona bening yang muncul di sekitar kertas cakram. Hasil uji daya hambat pada penelitian yang dilakukan diperoleh tidak adanya pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* disekitar kertas cakram yang telah direndam ekstrak kasar pegagan dengan menggunakan perlakuan dosis yang berbeda. Tidak adanya pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* ditandai dengan adanya zona bening sekitar cakram. Semakin rendah dosis yang digunakan maka semakin kecil zona bening yang dihasilkan. Semakin besar dosis yang digunakan maka zona beningnya juga semakin besar. Hal tersebut dipengaruhi oleh banyaknya bahan aktif dari ekstrak pegagan yang diserap oleh kertas cakram. Hasil rata – rata data pengukuran daya hambat ditunjukkan pada Tabel 3 dan gambar lengkapnya disajikan pada Lampiran 5.

Tabel 3. Hasil rata – rata pengukuran diameter daya hambat (mm) ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

Perlakuan (ppt)	Ulangan			Total (mm)	Rata – rata (mm)
	1	2	3		
A (5)	6,25	6,26	6,3	18,81	6,27 ± 0,03
B (10)	6,35	6,38	6,4	19,13	6,38 ± 0,03
C (15)	7,69	7,95	7,46	23,1	7,70 ± 0,25
D (20)	7,44	8,17	8,09	23,7	7,90 ± 0,40
E (25)	8,13	9,28	9,52	26,93	8,98 ± 0,74

Semua perlakuan yang diujikan menunjukkan adanya zona bening disekitar kertas cakram yang telah direndam dengan ekstrak kasar pegagan. Berdasarkan pengamatan menunjukkan hasil pengukuran diameter daya hambat ekstrak

kasar pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *P. fluorescens*. Hasil rata-rata diameter daya hambat perlakuan A (5 ppt) sebesar $6,27 \pm 0,03$ mm, perlakuan B (10 ppt) sebesar $6,38 \pm 0,03$ mm, perlakuan C (15 ppt) sebesar $7,70 \pm 0,25$ mm, perlakuan D (20 ppt) sebesar $7,90 \pm 0,40$ mm dan perlakuan E (25 ppt) sebesar $8,98 \pm 0,78$. Hasil rata - rata diameter daya hambat tertinggi pada perlakuan E (25 ppt) sebesar $8,98 \pm 0,78$ mm, dan hasil rata - rata diameter daya hambat terendah pada perlakuan A (5 ppt) yaitu sebesar $6,72 \pm 0,03$ mm. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan jumlah kandungan bahan aktif yang terdapat pada setiap dosis ekstrak kasar pegagan. Menurut Ramadhan, Rasyd dan Sy (2015), pegagan (*C. asiatica*) mengandung zat antibakteri, diantaranya adalah saponin, tannin, alkaloid, dan flavonoid. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Putri, Sulaiman dan Indrayudha (2013), ekstrak Pegagan berpengaruh terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* secara pada uji cakram dengan konsentrasi ekstrak pegagan yang daya hambatnya pada konsentrasi 6% dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 8,62 mm dan konsentrasi 10% rata-rata diameter zona hambat sebesar 10,37 mm.

Adanya daya hambat tersebut, dikarenakan pada ekstrak pegagan (*C. asiatica*) memiliki beberapa zat antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri *P. fluorescens*, diantaranya yaitu flavonoid. Menurut Darsana, Besung dan Mahatmi (2012), senyawa-senyawa flavanoid umumnya bersifat antioksidan dan banyak yang telah digunakan sebagai salah satu komponen bahan baku obat-obatan. Senyawa flavonoid dan turunannya memiliki dua fungsi fisiologi tertentu, yaitu sebagai bahan kimia untuk mengatasi serangan penyakit (sebagai antibakteri) dan anti virus bagi tanaman. Mekanisme kerja dari flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri, antara lain bahwa flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri. Menurut Siregar, Sabdono dan Pringgenies (2012), senyawa flavonoid memiliki

kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri dengan beberapa mekanisme yang berbeda, antara lain flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding bakteri, mikrosom dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri.

Saponin adalah salah satu zat yang terdapat pada pegagan yang memiliki sifat antibakteri. Pernyataan tersebut sesuai dengan pendapat Ainurrochmah, Ratnasari dan Lisdiana (2013), senyawa saponin dapat merusak membran sel bakteri dengan cara berinteraksi dengan membran sel. Hal tersebut dapat terjadi karena saponin mempunyai sisi aktif pada permukaan sel yang memungkinkan untuk berikatan dengan senyawa penyusun membran sel bakteri, yaitu lipid. Menurut Nur Jumriah, Dwyana dan Abdullah (2013), senyawa saponin akan membentuk senyawa kompleks dengan membran sel melalui ikatan hidrogen, sehingga dapat menghancurkan sifat permeabilitas dinding sel dan akhirnya dapat menimbulkan kematian sel. Menurut Ardananurdin, Winarsih dan Widayat (2004), saponin bekerja sebagai antimikroba dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteri lisis.

Senyawa tanin dapat menghambat aktivitas enzim protease, menghambat enzim pada protein transpor selubung sel bakteri, dan destruksi atau inaktivasi fungsi materi genetik. Selain itu, tanin diduga mampu mengkerutkan dinding sel bakteri sehingga dapat mengganggu permeabilitas sel. Terganggunya permeabilitas sel bakteri menyebabkan sel tersebut tidak dapat melakukan aktivitas hidup sehingga pertumbuhannya terhambat atau mati (Maliana, Khotimah dan Diba, 2013), tanin juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Hal ini menyebabkan sel bakteri menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga sel bakteri akan mati (Ngajow, Abidjulu dan Kamu, 2013).

Alkaloid mengandung racun yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri atau dapat menyebabkan sel bakteri menjadi lisis bila terpapar oleh zat tersebut (Lingga dan Rustama, 2005). Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri. Mekanisme yang diduga adalah dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut (Besung dan Mahatmi, 2012).

Respon hambat dari suatu bahan aktif dapat diklasifikasikan pada respon hambatan. Disajikan pada tabel 4, diketahui bahwa pada perlakuan A (5 ppt), B (10 ppt), C (15 ppt), D (20 ppt), E (25 ppt), termasuk ke dalam klasifikasi respon hambatan sedang karena hasil rata - rata zona bening yang dihasilkan 5 – 10 mm. Menurut Davis dan Stout (1971), respon hambatan dari suatu bahan aktif terhadap pertumbuhan bakteri dapat diklasifikasikan seperti pada Tabel 4.

Tabel 4. Klasifikasi Respon Hambatan (Davis dan Stout, 1971).

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
<5 mm	Lemah
5 – 10 mm	Sedang
>10 – 20 mm	Kuat
>20 – 30 mm	Sangat Kuat

Untuk mengetahui nilai dari kenormalan data, maka dilakukan uji kenormalan data (Lampiran 6). Kemudian dilanjutkan dengan perhitungan sidik ragam untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan. Hasil sidik ragam pengaruh pemberian ekstrak kasar pegagan dengan dosis yang berbeda terhadap bakteri *P. fluorescens* seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5, untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 6.

Tabel 5. Hasil Perhitungan Sidik Ragam Diameter Daya Hambat Bakteri *P. fluorescens*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	15,42	3,85	24,91 **	3,48	5,99
Acak	10	1,55	0,15			
Total	14					

Keterangan : ** = Berbeda Sangat Nyata

Pada tabel sidik ragam didapatkan hasil bahwa uji daya hambat ekstrak pegagan (*C. asiatica*) terhadap bakteri *P. asiatica* berbeda sangat nyata. Hal ini dikarenakan nilai F hitung lebih besar dari pada nilai F 5 % dan F 1 % atau nilai dari 24,91 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 6, untuk perhitungan lengkapnya pada Lampiran 6.

Tabel 6. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Ekstrak Kasar Pegagan (*C. asiatica*) Terhadap Diameter Daya Hambat Bakteri *P. fluorescens*.

Rata – rata Perlakuan	A (6,27)	B (6,38)	C (7,70)	D (7,90)	E (8,98)	Notasi
A (6,27)	-	-	-	-	-	a
B (6,38)	0,11 ^{ns}	-	-	-	-	a
C (7,70)	1,43**	1,32**	-	-	-	b
D (7,90)	1,63**	1,52**	0,20 ^{ns}	-	-	b
E (8,98)	2,71**	2,60**	2,28**	1,08**	-	c

Keterangan :

ns : tidak berbeda nyata

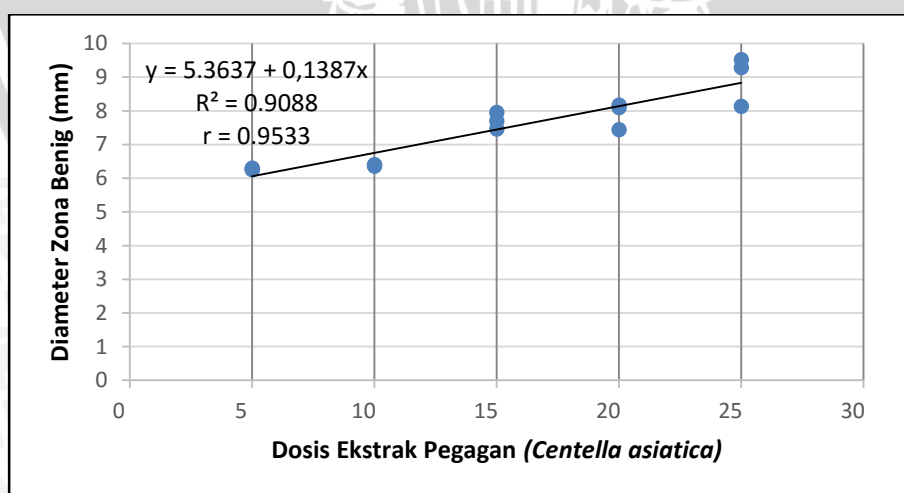
* : berbeda nyata

** : berbeda sangat nyata

Pada hasil uji BNT (Tabel 6) didapatkan hasil bahwa pada perlakuan E dengan dosis 25 ppt memberikan pengaruh berbeda sangat nyata dengan perlakuan A (5 ppt), B (10 ppt), C (15 ppt) dan D (20 ppt). Hasil perlakuan

tersebut menunjukkan bahwa perlakuan A dengan dosis 5 ppt tidak memberi pengaruh yang signifikan terhadap seluruh perlakuan, sehingga diberi notasi a. Perlakuan B (10 ppt) terhadap perlakuan A (5 ppt) tidak berbeda nyata sehingga diberi notasi a. Perlakuan C (15 ppt) terhadap perlakuan B (10 ppt) berpengaruh berbeda sangat nyata, maka diberi notasi b. Perlakuan D (20 ppt) terhadap perlakuan C (15 ppt), tidak berbeda nyata, sehingga bernotasi b. Sedangkan perlakuan E (25 ppt) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A (5 ppt), perlakuan B (10 ppt), perlakuan C (15 ppt) dan perlakuan D (20 ppt), maka dapat diberi notasi c. Adanya daya hambat tersebut, dikarenakan pada ekstrak pegagan (*C. asiatica*) memiliki beberapa zat antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri *P. fluorescens*, diantaranya yaitu flavonoid, tannin, alkaloid dan saponin.

Untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antara perlakuan dengan parameter yang diuji yaitu daya hambat bakteri *P. fluorescens*, maka dilakukan uji polinomial orthogonal. Hasil perhitungan uji polinomial orthogonal yang berupa grafik disajikan pada Gambar 6, untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 6.



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

Berdasarkan Gambar 6, grafik hubungan daya hambat antar perlakuan ekstrak kasar pegagan terhadap bakteri *P. fluorescens* menunjukkan perpotongan garis secara linier dengan persamaan $y = 5.3637 + 0,1387x$ dengan koefisien nilai determinasi (R^2) sebesar 0,9088. Sehingga dapat disimpulkan dengan semakin meningkatnya dosis ekstrak pegagan berbanding lurus dengan besarnya diameter zona hambat (mm). Pada dosis 5 ppt hingga 25 ppt grafik mengalami peningkatan atau bertambah besarnya daya hambat, hasil perhitungan lengkapnya pada Lampiran 6. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kasar pegagan mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri *P. fluorescens*.

Hasil dari penelitian ini menunjukkan diameter zona bening berbanding lurus dengan jumlah dosis ekstrak yang digunakan, semakin besar dosis ekstrak yang digunakan semakin besar diameter zona beningnya dikarenakan zat aktif yang diserap semakin banyak. Pernyataan tersebut sesuai dengan pendapat Katno, Sari dan Agus (2009), diameter zona bening atau zona hambat yang dihasilkan oleh suatu ekstrak berbanding lurus dengan jumlah dosis ekstrak yang digunakan, sehingga perbedaan besar kecilnya zona bening atau zona hambat yang dihasilkan masing - masing dosis berbanding dengan jumlah bahan aktif yang digunakan.

Sifat antibakteri dari ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) dapat diketahui dengan pengamatan setelah diinkubasi selama 48 jam. Pada pengamatan 24 jam, zona hambat atau zona bening disekitar kertas cakram yang terbentuk diamati dan diukur. Setelah selama 48 jam diinkubasi, kembali dilakukan pengamatan dan pengukuran zona hambat. Hasil yang didapatkan pada pengamatan dan pengukuran setelah 48 jam terjadi penurunan diameter zona hambat yang terbentuk, sehingga dapat disimpulkan bahwa daya hambat ekstrak kasar pegagan masih bersifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan mikroba)

bukan bakteriosidal (membunuh mikroba). Hal ini sesuai dengan pendapat Rostinawati (2009), efek antibakteri dibagi menjadi dua kelompok yaitu bakteristatik, merupakan efek yang menghambat pertumbuhan bakteri, tetapi tidak menyebabkan kematian seluruh bakteri. Mekanisme bakteristatik biasanya terjadi pada ribosom yang menyebabkan penghambatan sintesis protein. Sedangkan bakteriosidal adalah antibakteri yang dapat membunuh sel bakteri, tetapi tidak menyebabkan lisis atau pecahnya sel bakteri.

4.3 Parameter Penunjang

a. Lama Perendaman Kertas Cakram Ke dalam Ekstrak Kasar Pegagan (*C. asiatica*)

Parameter penunjang pertama yaitu lama perendaman kertas cakram. Ukuran kertas cakram yang digunakan dalam penelitian ini yaitu 6 mm. Lama perendaman kertas cakram ini bertujuan agar ekstrak kasar daun pegagan (*C. asiatica*) benar-benar menyerap sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* dengan baik. Lama perendaman kertas cakram pada penelitian ini adalah 15 menit. Hal ini didukung oleh pernyataan Mutschler (1991), 15 menit merupakan waktu yang optimal karena ekstrak sudah menyerap dengan sempurna dalam kertas cakram, sehingga dapat disimpulkan bahwa pada waktu 15 menit adalah lama perendaman terbaik untuk mengetahui daya hambat bakteri *P. fluorescens* selama inkubasi.

b. pH

Parameter penunjang yang kedua yaitu pH, merupakan parameter lingkungan yang harus diperhatikan untuk menunjang pertumbuhan bakteri *P. fluoprescens*. Hasil pengukuran pH pada media *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) menggunakan pH paper menunjukkan pH media sebesar 7. Menurut Kadir (2010), kebanyakan bakteri mempunyai pH optimum, yaitu pH dimana pertumbuhan maksimum, sekitar pH 6,5-7,5. Pada pH dibawah 5,0 dan diatas

8,5 bakteri tidak dapat tumbuh dengan baik, kecuali bakteri asam asetat dan bakteri oksidasi sulfur.

c. Suhu Inkubasi

Paremeter penunjang selanjutnya dalam penelitian ini adalah suhu pada saat proses inkubasi. Proses pertumbuhan bakteri setelah ditanam dan diberi perlakuan dalam penelitian ini adalah di inkubasi selama 24 jam. Selama masa inkubasi tersebut, suhu yang digunakan adalah 33 °C. Menurut Arwiyanto, Maryudani dan Azizah (2007), semua isolat *P. fluorescens* dapat tumbuh pada kisaran suhu 20 – 41 °C serta pH yang baik untuk pertumbuhannya adalah pada kisaran 6 – 7.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil dari penelitian tentang pemberian ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* secara *In vitro* dapat diberikan kesimpulan sebagai berikut :

- Ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) memberikan pengaruh terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* dan ekstrak kasar Pegagan (*C. asiatica*) memiliki sifat antibakteri secara bakteriostatik karena hanya menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.
- Pemberian ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) menghasilkan perlakuan terbaik yaitu pada perlakuan E dengan dosis 25 ppt menghasilkan rata - rata daya hambat sebesar $8,98 \pm 0,74$ mm dan hasil rata - rata daya hambat terendah yaitu pada perlakuan A dengan dosis 5 ppt sebesar $6,27 \pm 0,03$ mm.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan untuk menggunakan ekstrak kasar pegagan (*C. asiatica*) untuk menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* dengan dosis tertinggi yaitu 25 ppt, dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk penelitian secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E., E. Liviawaty., Z. Jamaris dan Hendy. 2015. Penyakit Ikan. Penebar Swadaya : Jakarta. 220 hlm.
- Ainurrochmah, A., E. Ratnasari dan L. Lisdiana. 2013. Efektivitas Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia*) terhadap Penghambatan Pertumbuhan Bakteri *Shigella flexneri* dengan Metode Sumuran. 2 (3) : 233 – 237.
- Anonymous. 2015. Laporan Kinerja Kementerian Kelautan dan Perikanan tahun 2014. LKJ KKP : Jakarta. 176 hlm.
- Ardananuridin, A., S. Winarsih dan M. Widayat. 2004. Uji Efektifitas Dekok Bunga Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi*) sebagai Antimikroba terhadap Bakteri *Salmonella typhi* secara In Vitro. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. 20 (1) : 30 – 35.
- Ariyanti, N.K., I.B.G. Darmayasa dan S.K. Sudirga. 2012. Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis* Miller) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. *Jurnal Biologi*. 16 (1) : 1 - 4.
- Arwiyanto, T., Y.M.S Maryudani dan N. Azizah. 2007. Sifat –Sifat Fenotipik *Pseudomonas fluorescens*, Agensi Pengendalian Hayati Penyakit Lincah pada Tembakau Temanggung. *Biodiversitas*. 8 (2) : 147 – 151.
- Besung, I.N.K. 2011. Pengaruh Ekstrak Pegagan (*Centella asiatica*) dalam Meningkatkan Kapasitas Fagosit Makrofag Peritoneum Mencit terhadap *Salmonella typhi*. *Buletin Veteriner Udayana*. 3 (2) : 73 – 78.
- Cahyono, B. 2001. Budidaya Ikan di Perairan Umum. Kanisius : Yogyakarta. 98 hlm.
- Carman, O. dan A. Sucipto. 2013. Pembesaran Nila 2,5 Bulan. Penebar Swadaya: Jakarta. 100 hlm.
- Darsana, I.G.O.,I.N.K. Besung dan H. Mahatmi. 2012. Potensi Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Tenore) Steenis) dalam Menghambat Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* secara In Vitro. *Indonesia Medicus Veterinus*. 1 (3) : 337 – 351.
- Davis, W.W. dan T.R. Stout. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Assay. *America Society for Microbiology*. 22 (4): 659 - 665.
- Duguid, J.P., B.P. Marmoni dan R.H.A. Swain. 1978. Medikal Microbiology. Churchill Livingstone. Edinburgh. 666 hlm.
- Gulo, W. 2000. Metodologi Penelitian. PT. Gramedia Widiasarana Indonesia : Jakarta. 268 hlm.
- Jaedun, A. 2011. Metodologi Penelitian Eksperimen. UNY: Yogyakarta. 13 hlm.

- James, J., C. Baker dan H. Swain. 2008. Prinsip – Prinsip Sains untuk Keperawatan. Penerbit Erlangga : Jakarta. 251 hlm.
- Kadir, I. 2010. Pemanfaatan Iradiasi untuk Memperpanjang Daya Simpan Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*) Kering. *Jurnal Ilmiah Aplikasi Isotop dan Radiasi*. 6 (1) : 86 – 103.
- Katno., S. Haryanti dan A. Triyono. 2009. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Sembung (*Blumea balsamifera* (L.) DC.) terhadap Pertumbuhan Mikroba *E. coli*, *S. aureus* dan *C. albicans*. *Jurnal Tanaman Obat Tradisional*. 2 (1) : 33 – 36.
- Kordi, M.G.H. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. Rineka Cipta : Jakarta. 190 hlm.
- Kumala, S., A.T. Dewi dan Y.A. Nugroho. 2012. Efek Imunostimulan Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban.) Terhadap IG g Mencit Jantan yang Diinduksi Sel Darah Merah Domba. *Badan Lit Bang Farmasi*. 1 (3) : 1 – 6.
- Kurniawan, G., N. Damajanti dan A. Hamad. 2014. Pengaruh Nutrisi Bakteri *Pseudomonas* sp dalam *Rotaring Biological Contractor* (RBC) terhadap Kandungan BOD dan COD Air Limbah Kilang *Paraxylene*. *Jurnal Sainteks*. 9 (1) : 66 – 75.
- Lesmana, D.S. 2003. Mencegah dan Menanggulangi Penyakit Ikan Hias. Penebar Swadaya : Jakarta. 80 hlm.
- Lingga, M.E. dan M.M. Rustama. 2005. Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Air dan Etanol Bawang Putih (*Allium sativum* L.) terhadap Bakteri Gram Negatif dan Gram Positif yang diisolasi dari Udang Dogol (*Metapenaeus monoceros*), Udang Lobster (*Panulirus* sp), dan Udang Rebon (*Mysis* dan *Acetes*). *Jurnal biotika*. 5 (2) : 1 – 13.
- Maliana, Y., S. Khotimah dan F. Diba. 2013. Aktivitas Antibakteri Kulit *Garcinia mangostana* Linn. Terhadap Pertumbuhan *Flavobacterium* dan *Enterobacter* dari *Coptotermes curviganathus* Holmgren. *Jurnal Protobion*. 2 (1) : 7 – 11.
- Mania, S. 2008. Observasi Sebagai Alat Evaluasi dalam Dunia Pendidikan dan Pengajaran. *Lentera Pendidikan*. 11 (2) : 220 – 233.
- Munfaati, P.N., E. Ratnasari dan G. Trimulyono. 2015. Aktivitas Senyawa Antibakteri Ekstrak Herba Meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae* Secara *in Vitro* . *Lentera Bio*. 4 (1) : 64 – 71.
- Musyarofah, N., S. Susanto, S.A. Azis dan S. Kartosoewarno. 2007. Respon Tanaman Pegagan (*Centella asiatica* L. Urban) Terhadap Pemberian Pupuk Alami di Bawah Naungan. *Bul. Agron*. 35 (2) : 217 – 224.
- Mutschler, E. 1991. Dinamika Obat. Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi. ITB : Bandung. 205 hlm.

- Ngajow, M., J. Abidjulu dan V. S. Kamu. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pornetia pinnata*) terhadap Bakteri *Staphylococcus auratus* secara *In vitro*. *Jurnal Mipa Unsrat Online*. 2 (2) : 128 – 132.
- Noor, S.M., M. Poeloengan dan T. Yulianti. 2006. Analisis Senyawa Kimia Sekunder dan Uji Daya Antibakteri Ekstrak Daun Tanjung (*Mimusops elengi* L) terhadap *Salmonella typhi* dan *Shigella boydii*. *Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner*. 1 (1) : 986 – 992.
- Nur, Jumriah., Z. Dwyana dan A. Abdullah. 2013. Bioaktivitas Getah Pelepah Pisang Ambon *Musa paradisiaca* var *sapientum* terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeuroginosa* dan *Escherichia coli*. *Repotoy Unhas*. 2 (1) : 1 – 10.
- Pelczar, M.J. dan E.C.S. Chan. 2008. Dasar – Dasar Mikrobiologi. Penerbit Universtas Indonesia : Jakarta. 442 hlm.
- Prajitno, A. 2005. Diktat Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan. Universitas Brawijaya Fakultas Perikanan : Malang. 105 hlm.
- . 2007. Penyakit Ikan - Udag : Bakteri. UM Press : Malang.113 hlm.
- Puspitasari, I.M., R. Hendriani dan S.A.F. Kusuma. 2009. Pencarian Bakteri Tanah Penghasil Enzim Protease dari Gunung Gede Cianjur. *Pustaka Unpad*. 1(1) : 1 – 14.
- Putri, V.S., T.N.S. sulaiman dan P. Indrayudha. 2013. Formulasi Krim Ekstrak Etanol Herba Pegagan (*Centella asiatica* (L.) Urban) Konsentrasi 6% Dan 10% dengan Basis Cold Cream dan Vanishing Cream serta Uji Aktivitas Antibakteri terhadap Staphylococcus Aureus. *Naskah Publikasi*. 2 (1) : 1-13.
- Ramadhan, N.S., R. Rasyid dan E. Sy. 2015. Daya Hambat Ekstrak Daun Pegagan (*Centella asiatica*) yang diambil di Batusangkar terhadap Pertumbuhan Kuman *Vibrio cholerae* secara *In Vitro*. *Jurnal Kesehatan Andalas*. 4 (1) : 202 – 206.
- Rasy, V. 2013. 30 Tanaman Herbal untuk Pengobatan Tradisional. Penerbit Sakti : Yogyakarta. 160 hlm.
- Rismana, E., S. Kusumaningrum,.I. Rosidah,. Nizar dan E. Yulianti. 2013. Pengujian Stabilitas Sediaan Antiacne Berbahan Baku Aktif Nanopartikel Kitosan/ Ekstrak Manggis – Pegagan. *Buletin Penelitian Kesehatan*. 41 (4) : 207 – 216.
- Rostinawati, T. 2009. Aktivitas Antibakteri Madu Amber dan Madu Putih Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Multiresisten DNA *Staphylococcus aureus* Resisten Mesilin. Universitas Padjadjaran : Jatinangor. 23 hlm.
- Sa'adah, S. 2007. Mengenal Tanaman yang Berkhasiat Obat. Azka Pres : Jakarta. 91 hlm.

- Salle, A.J. 1961. Fundamental Principles of Bacteriology. McGraw – Hill Book Company : New York. 812 hlm.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius : Yogyakarta. 276 hlm.
- Siegrist, J. 2010. *Pseudomonas* a Communicative Bacteria. *Microbiology Focus*. 2 (4) : 1-8.
- Siregar, A.F., A. Sabdono dan D. Pringgenies. 2012. Potensi Antibakteri Ekstrak Rumput Laut terhadap Bakteri Penyakit Kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *Journal of Marine Research*. 1 (2) : 152 – 160.
- Sitangang, M. 2002. Mengatasi Penyakit dan Hama Ikan Hias. Agromedia Pustaka : Jakarta. 52 hlm.
- Soenandar M. dan R.H. Tjachjono. 2012. Membuat Peptisida Organik. PT Agromedia Pustaka : Jakarta. 126 hm.
- Standfield, W.D., J.S. Colome dan R.J. Cano. 2003. Biologi Molekuler dan Sel. Penerbit Erlangga : Jakarta. 117 hlm.
- Sugianti, B. 2005. Pemanfaatan Tumbuhan Obat Tradisional dalam Pengendalian Penyakit Ikan. Makalah Pribadi Falsafah Sains. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor : Bogor. 37 hlm.
- Suyanto, N.S. 1982. Budidaya Ikan Lele. Penebar Swadaya : Jakarta. 93 hlm.
- Umar, H. 2005. Riset Sumberdaya Manusia dalam Organisasi. PT Gramedia Pustaka Utama : Jakarta. 320 hlm.
- Vasavi, H.S., Arun dan P.D. Rekha. 2014. Anti-quorum Sensing activity of Flavonoid-rich Fraction from *Centella asiatica* L. Against *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Journal of Microbiology and Infection*. 1 (20) : 1-8.
- Waluyo, L. 2009. Mikrobiologi lingkungan. UMM Press : Malang. 355 hlm.
- Warbung, Y.Y., V.N.S. Wowor dan J. Posangi. 2013. Daya Hambat Ekstrak Spons Laut *Callyspongia* sp terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Jurnal e-Gigi*. 2 (1) : 1 – 12.
- Winarto W.P. dan M. Surbakti. 2003. Khasiat dan Manfaat Pegagan Tanaman Penambah Daya Ingat. Agromedia Pustaka : Jakarta. 72 hlm.
- Wong, M.F. 2011. Pijat untuk Mencerdaskan Otak dan Mencerdaskan Daya Ingat. Penebar Swadaya : Jakarta. 116 hlm.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Biokimia Bakteri *P. fluorescens*.



**KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA
BALAI BESAR PERIKANAN BUDIDAYA AIR PAYAU**

LABORATORIUM UJI BBPAP JEPARA

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

HASIL UJI BIOKIMIA

Uji Bio Kimia	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Gram	—
Bentuk	Batang
Katalase	+
Oksidase	+
H ₂ S	—
Indol	—
Citrate	+
OF medium	Oksidatif
VP	—
MR	—
Urea	—
Glukosa	+
Sukrosa	—
37 ⁰ C	+

Lab. Mikrobiologi BBPAP Jepara

Pervelia
Sri Murti Astuti, SP.

Lampiran 2. Alat dan Bahan Penelitian



Inkubator



Autoclave



Oven



Cawan Petri



Autoclave Destruksi



Rak Tabung

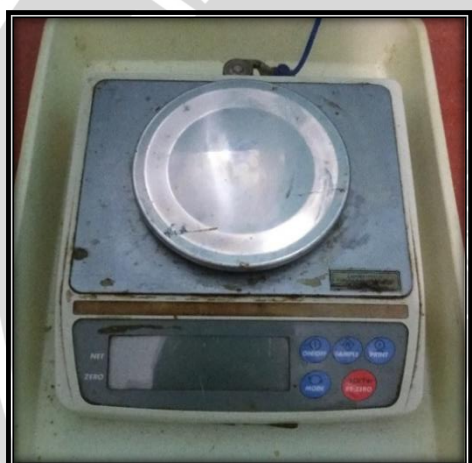
Lampiran 2. (Lanjutan)



Lemari Pendingin Penyimpanan Bakteri



Lemari Pendingin Penyimpanan



Timbangan Digital



Timbangan Analitik



Laminary Air Flow



Hot Plate

Lampiran 2. (Lanjutan)



Vortex Mixer



Micropipet dan Blue



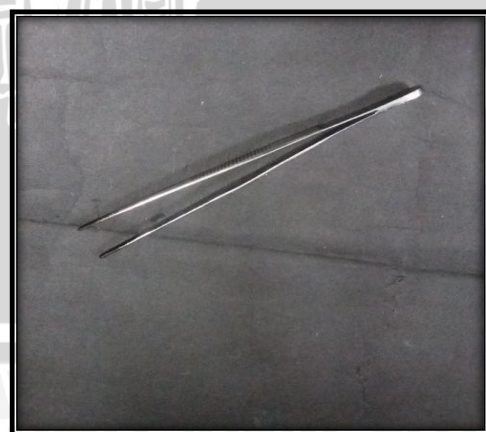
Bunsen dan Korek Api



Aluminium Foil dan Plastik Wrap



Erlenmeyer



Pinset

Lampiran 2. (Lanjutan)



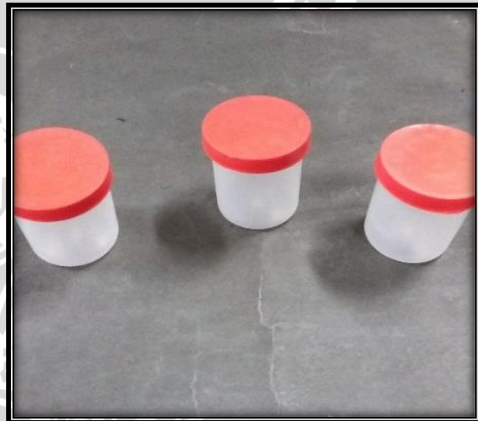
Corong Kaca



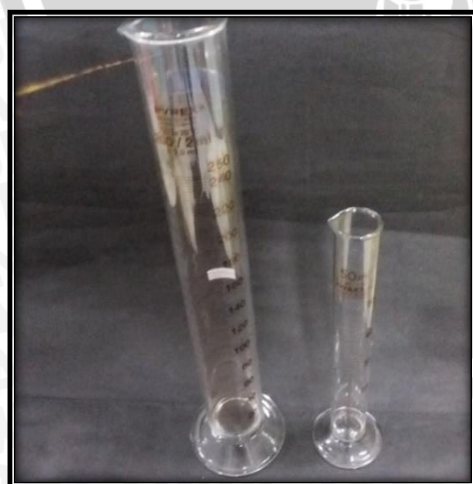
Pipet Volume dan Bola



Rotary Evaporator



Botol film



Gelas Ukur



Toples Kaca

Lampiran 2. (Lanjutan)



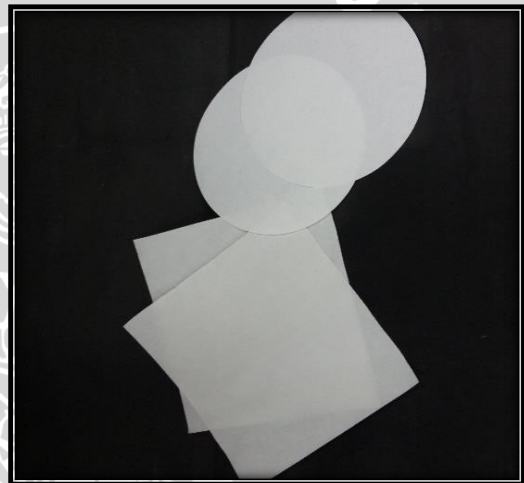
Nampan



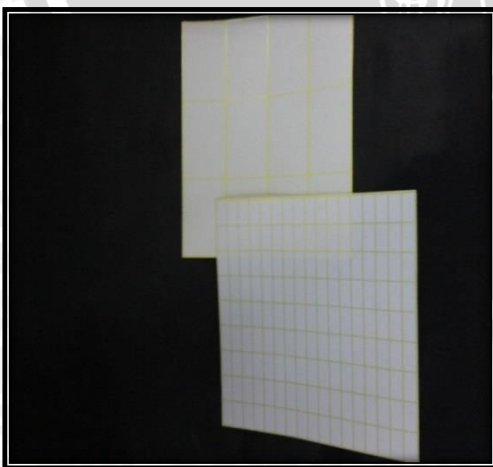
Botol Sprayer



Gunting dan Cutter



Kertas Saring



Kertas Label



Benang Kasur

Lampiran 2. (Lanjutan)



Beaker Glass



Sendok Media



Spatula



Triangle



Tabung Reaksi



Jangka Sorong Digital

Lampiran 2. (Lanjutan)



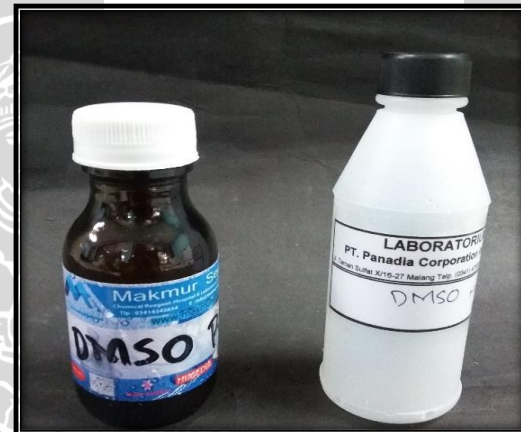
Kapas



Tissue



Alkohol 70% dan Ethanol



DMSO 10%



Kertas Cakram Diameter 6



Aquades Hydrobatt

Lampiran 2. (Lanjutan)



Isolat Murni *P. fluorescens*



PSA



TSB

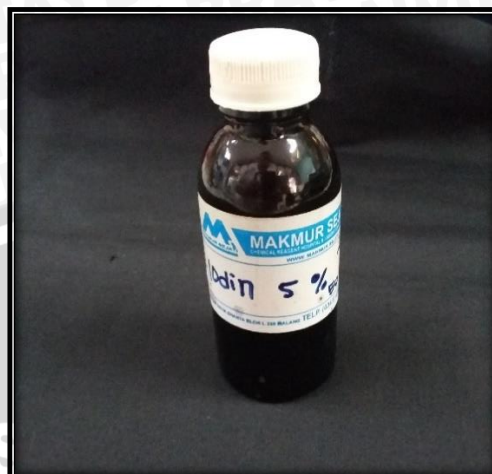


Eksrak Pegagan (*C. asiatica*)

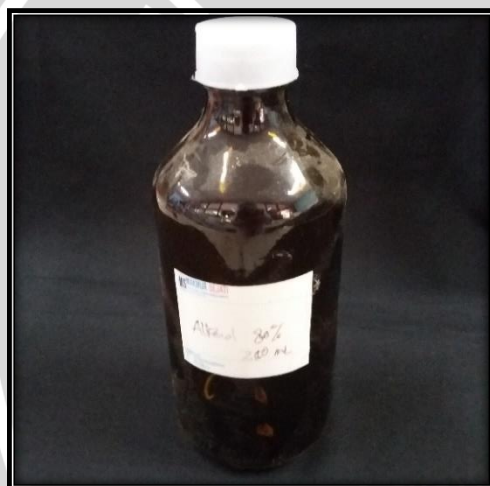
Lampiran 2. (Lanjutan)



Kristal violet



Iodin 5%



Alkohol 80%



Safranin



Pipet tetes

Lampiran 3. Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Pegagan (*C. asiatica*) pada Uji Difusi Kertas Cakram

Persiapan perendaman (maserasi) dimana serbuk 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 *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak kasar pegagan sebanyak 14 gram, selanjutnya dilakukan pengukuran dosis (ppt) untuk menentukan dosis ekstrak kasar Pegagan (*Centella asiatica*) dan ditambahkan larutan pengencer DMSO 10%.

a) 5 ppt

$$\begin{aligned} N1 \times V1 &= N2 \times V2 \\ 100 \times V \text{ ml} &= 5 \times 3 \text{ ml} \\ V &= 0,15 \text{ gr} \\ \text{DMSO} &= 3 - 0,15 = 2,85 \text{ ml} \end{aligned}$$

b) 10 ppt

$$\begin{aligned} N1 \times V1 &= N2 \times V2 \\ 100 \times V \text{ ml} &= 10 \times 3 \text{ ml} \\ V &= 0,3 \text{ gr} \\ \text{DMSO} &= 3 - 0,3 = 2,7 \text{ ml} \end{aligned}$$

c) 15 ppt

$$\begin{aligned} N1 \times V1 &= N2 \times V2 \\ 100 \times V \text{ ml} &= 15 \times 3 \\ V &= 0,45 \text{ gr} \\ \text{DMSO} &= 3 - 0,45 = 2,55 \text{ ml} \end{aligned}$$

d) 20 ppt

$$\begin{aligned} N1 \times V1 &= N2 \times V2 \\ 100 \times V \text{ ml} &= 20 \times 3 \\ V &= 0,6 \text{ gr} \\ \text{DMSO} &= 3 - 0,6 = 2,4 \text{ ml} \end{aligned}$$

e) 25 ppt

$$\begin{aligned} N1 \times V1 &= N2 \times V2 \\ 100 \times V1 &= 25 \times 3 \\ V &= 0,75 \text{ gr} \\ \text{DMSO} &= 3 - 0,75 = 2,25 \text{ ml} \end{aligned}$$

f) Kontrol + (100 ppt)

$$\begin{aligned} N1 \times V1 &= N2 \times V2 \\ 100 \times V1 &= 100 \times 3 \\ V &= 3 \text{ gr} \\ \text{DMSO} &= 3 - 3 = 0 \text{ ml} \end{aligned}$$

Lampiran 4. Pembuatan Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*).



Pegagan (*C. asiatica*)



Diambil Pegagan (kecuali akar) untuk dikeringkan



Pegagan (*C. asiatica*) di maserasi dengan Etanol 90 % selama 3 hari



Pegagan di blender di jadikan serbuk

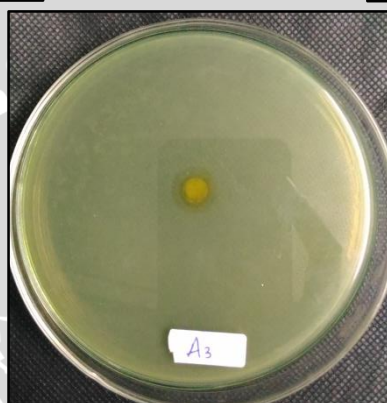


Hasil maserasi akan dilakukan Evaporasi

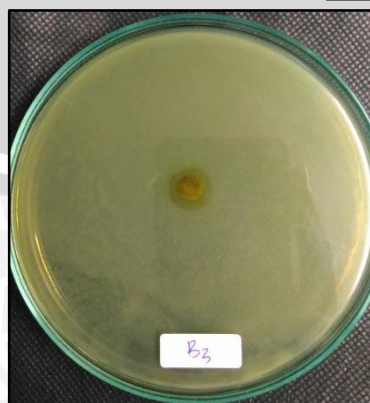
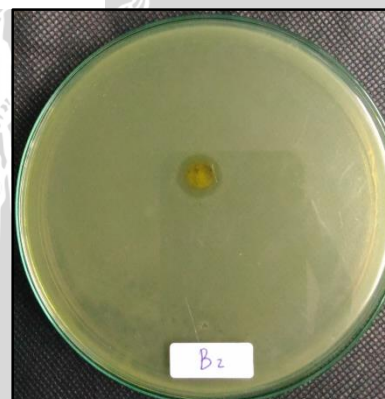
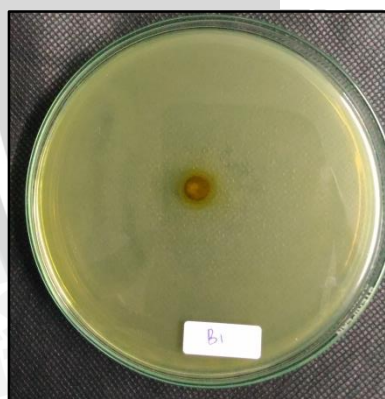


Ekstrak Pegagan (*C. asiatica*)

Lampiran 5. Hasil Uji Cakram Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Pegagan (*C. asiatica*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *P. fluorescens*.

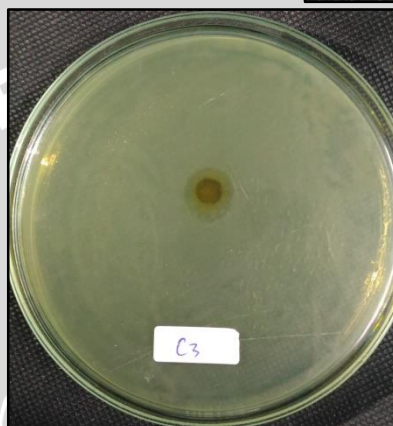
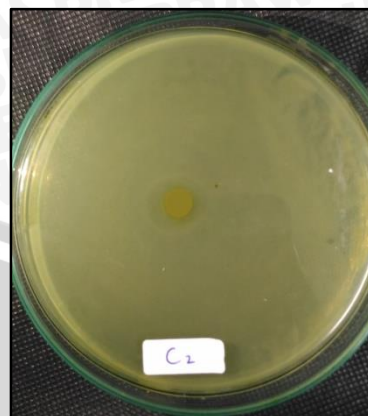
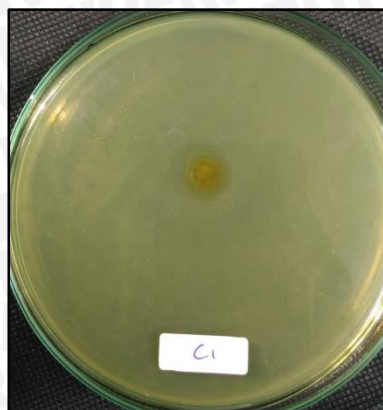


Perlakuan A1, A2, dan A3 (5%)

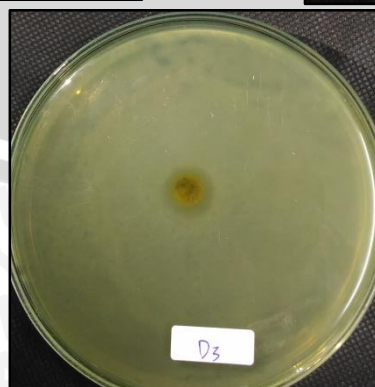
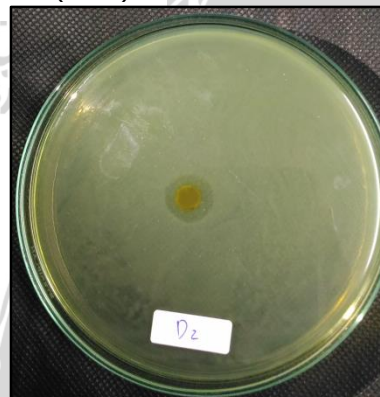
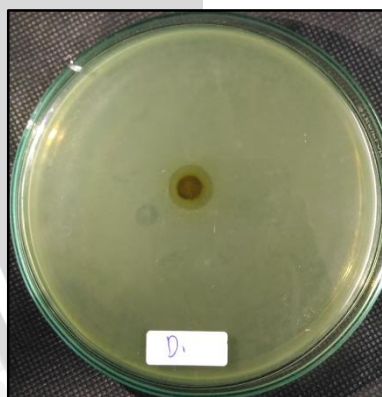


Perlakuan B1, B2, dan B3 (10%)

Lampiran 5. (Lanjutan).

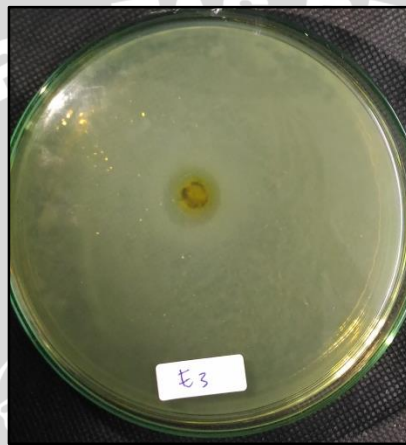
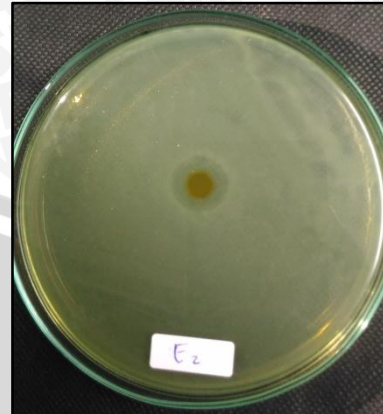
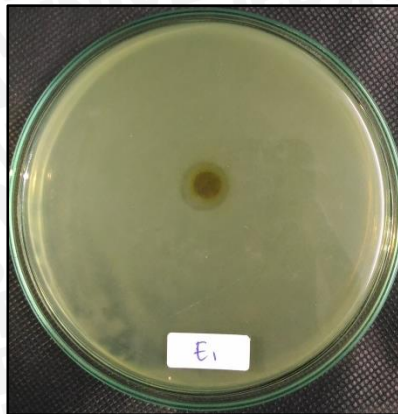


Perlakuan C1, C2, dan C3 (15%)

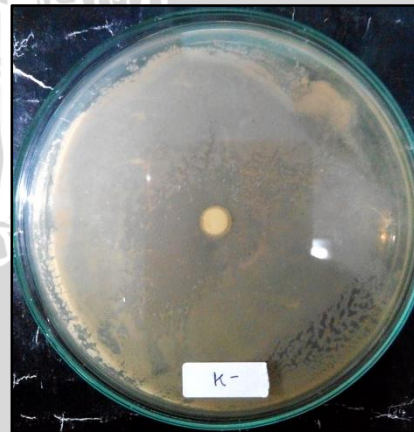
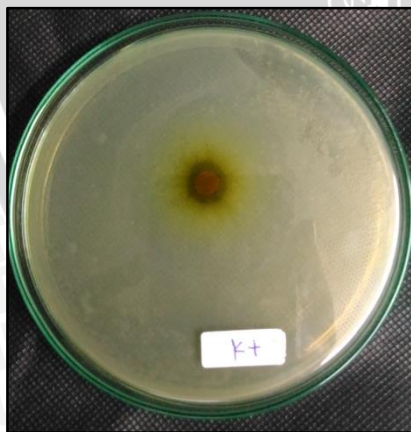


Perlakuan D1, D2 dan D3 (10 %)

Lampiran 5. (Lanjutan).



Perlakuan E1, E2 dan E3 (25 %)



Kontrol (K+) dan Kontrol (K-)

Lampiran 6. Analisis Data Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Kasar Pegagan (*C. asiatica*) terhadap Diameter Hambatan (mm) Bakteri *P. fluorescens* Secara *In vitro*

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

Perlakuan	Ulangan			Total (mm)	Rata - rata (mm)	Stadar deviasai
	1	2	3			
A (5 ppt)	6,25	6,26	6,3	18,81	6,27	± 0,03
B (10 ppt)	6,35	6,38	6,4	19,13	6,38	± 0,03
C (15 ppt)	7,69	7,95	7,46	23,1	7,70	± 0,25
D (20 ppt)	7,44	8,17	8,09	23,7	7,90	± 0,40
E (25 ppt)	8,13	9,28	9,52	26,93	8,98	± 0,74
Total				111,67		

Perhitungan:

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

$$= \frac{111,67^2}{15}$$

$$= 831,35$$
- Jumlah Kuadrat (Total) = $\sum x_{ij}^2 - FK$

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

$$= (6,25^2 + 6,26^2 + 6,3^2 + \dots + 9,52^2) - FK$$

$$= 16,968$$
- Jumlah Kuadrat (Perlakuan)

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

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

$$= \frac{18,81^2 + 19,13^2 + 23,1^2 + 23,7^2 + 26,93^2}{3} - 831,35$$

$$= \frac{353,82 + 365,96 + 533,61 + 561,69 + 725,22}{3} - 831,35$$

$$= 15,42$$
- JK galat = JK Total – JK Perlakuan

$$= 16,968 - 15,42$$

$$= 1,548$$
- db Total = $(n \times r) - 1$

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

$$= 14$$

Lampiran 6. (Lanjutan)

6. db Perlakuan = $n - 1$
 = $5 - 1$
 = 4
7. db Galat = db Total – db Perlakuan
 = $14 - 4$
 = 10

➤ Tabel Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	15,42004	3,85501	24,91 **	3,48	5,99
Acak	10	1,5475	0,154753			
Total	14					

Keterangan : ** Berbeda Sangat Nyata

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

Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

$$SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{\pi (\text{Ulangan})}} = \sqrt{\frac{2 \times (0,154753)}{3}} = 0,32$$

$$\text{BNT 5\%} = T \text{ tabel 5\% (db acak)} \times SED = 0,72$$

$$\text{BNT 1\%} = T \text{ tabel 1\% (db acak)} \times SED = 1,02$$

➤ Tabel Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Rata – rata Perlakuan	A (6,27)	B (6,38)	C (7,70)	D (7,90)	E (8,98)	Notasi
A (6,27)	-	-	-	-	-	a
B (6,38)	0,11 ^{ns}	-	-	-	-	a
C (7,70)	1,43**	1,32**	-	-	-	b
D (7,90)	1,63**	1,52**	0,20 ^{ns}	-	-	b
E (8,98)	2,71**	2,60**	2,28**	1,08**	-	c

Keterangan :

(ns) non signifikan

(*) Berbeda nyata

(**) Berbeda sangat nyata

Lampiran 6. (Lanjutan)

➤ Tabel Uji Polinomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	18.81	-2	2	-1	1
B	19.13	-1	-1	2	-4
C	23.1	0	-2	0	6
D	23.7	1	-1	-2	-4
E	26.93	2	2	1	1
Q= $\sum C_i \cdot T_i$		20.81	2.45	-1.02	13.02
Hasil Kuadrat		10	14	10	70
Kr= $(\sum C_i^2) \cdot r$		30	42	30	210
JK= Q^2 / Kr		14.4352	0.142917	0.03468	0.80724

➤ Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F _{hitung}	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	4	15.42004			3.48	5.99
Linier	1	14.4352	14.4352	93.27879	**	
Kuadratik	1	0.142917	0.142917	0.923513	Ns	
Kubik	1	0.03468	0.03468	0.224099	Ns	
Kuartik	1	0.80724	0.80724	5.216301	*	
2. Acak	10	1.5475	0.154753			
Total	14					

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

Lampiran 6. (Lanjutan)

Mencari persamaan linier $y = b_0 + b_1x$

X	Y	X.Y	X ²
5	6.25	31.25	25
5	6.26	31.3	25
5	6.30	31.5	25
10	6.35	63.5	100
10	6.38	63.8	100
10	6.4	64	100
15	7.69	115.35	225
15	7.95	119.25	225
15	7.46	111.9	225
20	7.44	148.8	400
20	8.17	163.4	400
20	8.09	161.8	400
25	8.13	203.25	625
25	9.28	232	625
25	9.52	238	625
Σ = 225	111,67	1779,1	4125
$\bar{X} = 15$	7,445		

$$\begin{aligned}
 B_1 &= \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y)/n}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \\
 &= \frac{1779,1 - (225 \cdot 111,67)/15}{4125 - \frac{(225)^2}{15}} \\
 &= \frac{1779,1 - 1675,05}{4125 - 3375} \\
 &= \frac{104,05}{750} \\
 &= 0,1387
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 B_0 &= \bar{y} - b_1 \bar{x} \\
 &= 7,445 - (0,1387 \times 15) \\
 &= 7,445 - 2,0805 \\
 &= 5,36
 \end{aligned}$$

Persamaan linier : $y = b_0 + b_1x \rightarrow y = 5,36 + 0,1387x$

Lampiran 6. (Lanjutan)

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

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

$$= \frac{15,42}{15,42 + 1,55}$$

$$= \frac{15,42}{16,97}$$

$$= 0,908$$

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

$$= \sqrt{0,908}$$

$$= 0,95$$

