

**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR DAUN KIPAHIT (*Tithonia diversifolia*)
TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

Oleh :

**DWI NUR FINDAH
NIM. 155080507111003**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2019**

**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR DAUN KIPAHT (*Tithonia diversifolia*)
TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

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

Oleh :

**DWI NUR FINDAH
NIM. 155080507111003**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
APRIL
2019**

SKRIPSI

UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR DAUN KIPAHIT (*Tithonia diversifolia*)
TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila* SECARA IN VITRO

Oleh :
DWI NUR FINDAH
NIM. 155080507111003

Telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 9 April 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat



Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

(Dr. Ir. M. Firdaus, MP)
NIP. 19680919 200501 1 0019
TANGGAL : 10 MAY 2019

Menyetujui,
Dosen Pembimbing

(Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS)
NIP. 195502131984031001
TANGGAL : 10 MAY 2019



IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : **UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK KASAR DAUN KIPAHIT (*Tithonia diversifolia*) TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro*.**

Nama : Dwi Nur Findah

NIM : 155080507111003

Progam Studi : Budidaya Perairan

PENGUJI PEMBIMBING

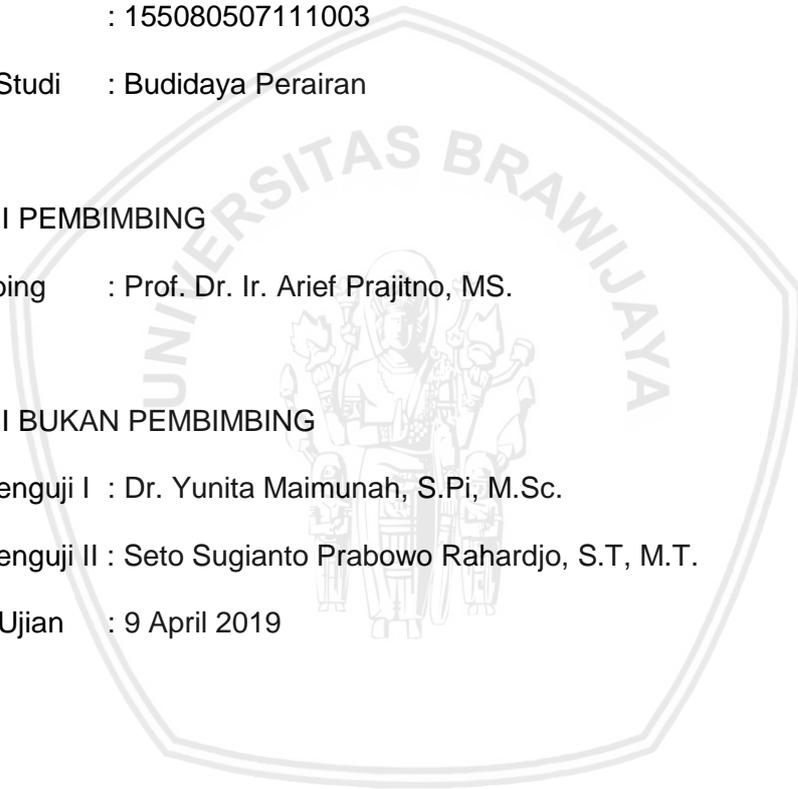
Pembimbing : Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING

Dosen Penguji I : Dr. Yunita Maimunah, S.Pi, M.Sc.

Dosen Penguji II : Seto Sugianto Prabowo Rahardjo, S.T, M.T.

Tanggal Ujian : 9 April 2019



UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis bersyukur kepada Allah SWT atas segala rahmat, hidayah dan karuniaNya sehingga laporan berjalan dengan baik dan lancar, dengan kerendahan hati penulis mengucapkan terimakasih kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS. selaku dosen pembimbing yang telah membimbing dan memberikan pengarahan selama proses penyusunan laporan .
2. Dr. Yunita Maimunah, S.Pi, M.Sc. dan Seto Sugianto Prabowo Rahadrjo, S.T, MT. selaku dosen penguji yang telah membimbing dan memberikan pengarahan selama proses penyusunan laporan .
3. Bapak Samsul dan Ibu Istiati selaku orang tua yang telah memberikan do'a, dukungan dan motivasi.
4. Tim Bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS yang membantu proses penelitian.

Malang, Februari 2019

Penulis

RINGKASAN

Dwi Nur Findah. Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Kipahit (*Tithonia diversifolia*) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.**

Indonesia merupakan salah satu negara yang memiliki luas lautan lebih besar dibandingkan daratan. Luas lautan di Indonesia mencapai 62% dari total wilayah Indonesia sedangkan luas daratan hanya 38% dari total wilayah Indonesia. Dengan kondisi tersebut, di masa yang akan datang kontribusi produksi dari sektor perikanan selayaknya menjadi *prime mover* pertumbuhan ekonomi. Kegiatan perikanan yang banyak dilakukan di Indonesia adalah kegiatan budidaya, kegiatan ini sangat diminati karena banyak memiliki keuntungan, namun kegiatan budidaya memiliki banyak kendala salah satunya yaitu adanya penyakit yang disebabkan oleh bakteri.

Bakteri yang sering menyerang adalah *A. hydrophila*, bakteri ini dapat menimbulkan kerugian yang sangat besar meskipun pada kolam yang terawat dengan baik, sehingga dapat menimbulkan kerugian besar karena menyebabkan kematian ikan secara masal. Oleh karena itu perlu diadakan pengendalian dan pengobatan agar ikan tidak terserang bakteri.

Pengobatan biasanya dilakukan menggunakan bahan kimia, namun bahan kimia tersebut dapat menimbulkan berbagai dampak negatif yaitu menimbulkan resistensi terhadap bakteri *A. hydrophila*, disamping itu dapat berefek samping pada lingkungan. Oleh sebab itu perlu dilakukan cara untuk menggunakan obat alami. Salah satu bahan obat alami yang dapat digunakan yaitu berasal dari daun kipahit (*T. diversifolia*), tanaman ini memiliki senyawa antibakteri. Senyawa aktif yang terdapat pada daun kipahit antara lain alkaloid, saponin dan tanin.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh daya hambat pemberian ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) terhadap bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Parasit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Desember 2018 – Februari 2019.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen. Rancangan penelitian ini dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL), dan terdapat 5 perlakuan, 2 kontrol, 3 ulangan dosis ekstrak kasar daun Kipahit (*T. diversifolia*) yang berbeda yaitu 500 ppm (A), 1000 ppm (B), 1500 ppm (C), 2000 ppm (D), 2500 ppm (E). Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) terhadap bakteri *A. hydrophila* berbeda nyata yaitu pada pengamatan diameter zona bening didapatkan nilai tertinggi pada perlakuan E (2500 ppm) dengan rata-rata 11,933 mm. Sedangkan rata-rata zona bening terendah pada perlakuan A (500 ppm) sebesar 9,280 mm. Hubungan zona bening antar perlakuan ekstrak kasar daun kipahit terhadap bakteri *A. hydrophila* menunjukkan perpotongan garis secara linier dengan persamaan $y = 8,552 + 0,0014x$ dengan koefisien nilai determinasi $R^2 = 0,6089$

Kesimpulan yang didapat dari penelitian ini adalah ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dapat membunuh bakteri *A. hydrophila* (bakterisidal). Semakin tinggi dosis yang digunakan, maka semakin besar zona bening yang dihasilkan.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah Yang Maha Esa atas berkah, karunia serta ridho-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan usulan skripsi dengan judul: "Uji daya hambat ekstrak kasar daun kipahit (*Tithonia diversifolia*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*."

Saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku dosen pembimbing dan semua pihak yang telah membantu penulis untuk menyusun laporan ini.

Saya menyadari bahwa masih banyak kekurangan pada penulisan ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembaca untuk penyempurnaan tulisan selanjutnya, sehingga dapat bermanfaat bagi kita semua. Demikian penulis sampaikan terima kasih.

Malang, Februari 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
UCAPAN TERIMA KASIH	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	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Kegunaan	4
1.6 Tempat dan Waktu	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biologi Tanaman Kipahit	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	5
2.1.2 Habitat	6
2.1.3 Kandungan	6
2.1.4 Manfaat	7
2.1.5 Senyawa Antibakteri Daun Kipahit	8
2.2 Bakteri <i>A. hydrophila</i>	10
2.2.1 Klasifikasi dan morfologi	10
2.2.2 Habitat dan Penyebaran	11
2.2.3 Pertumbuhan Bakteri	12
2.2.4 Infeksi Bakteri	13
2.3 Aktivitas Anti Mikroba	15
2.4 Uji Bakteri secara <i>In Vitro</i>	15
3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Materi Penelitian	17
3.1.1 Alat Penelitian	17
3.1.2 Bahan Penelitian	17
3.2 Metode Penelitian	17
3.3 Rancangan Penelitian	18
3.4 Prosedur Penelitian	19
3.4.1 Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Kipahit (<i>T. diversifolia</i>)	19
3.4.2 Sterilisasi Alat dan Bahan	20
3.4.3 Pembuatan Media Agar Miring	21
3.4.4 Pembuatan Media TSB (<i>Tryptitone Soy Broth</i>)	22



3.4.5	Pembuatan Media TSA (<i>Tryptic Soy Agar</i>)	23
3.4.6	Pembuatan Nafis (Natrium Fisiologis).....	23
3.4.7	Peremajaan Bakteri	24
3.4.8	Kultur Bakteri.....	24
3.4.9	Pengenceran Bakteri	25
3.5	Pelaksanaan Penelitian	26
3.5.1	Uji Cakram.....	26
3.5.2	Parameter Uji.....	27
3.5.3	Analisi Data	27
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	28
4.1	Identifikasi Bakteri <i>A. hydrophilla</i>	28
4.2	Uji Cakram.....	29
4.3	Parameter Penunjang.....	36
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	37
5.1	Kesimpulan.....	37
5.2	Saran.....	37
	DAFTAR PUSTAKA	38
	LAMPIRAN	43



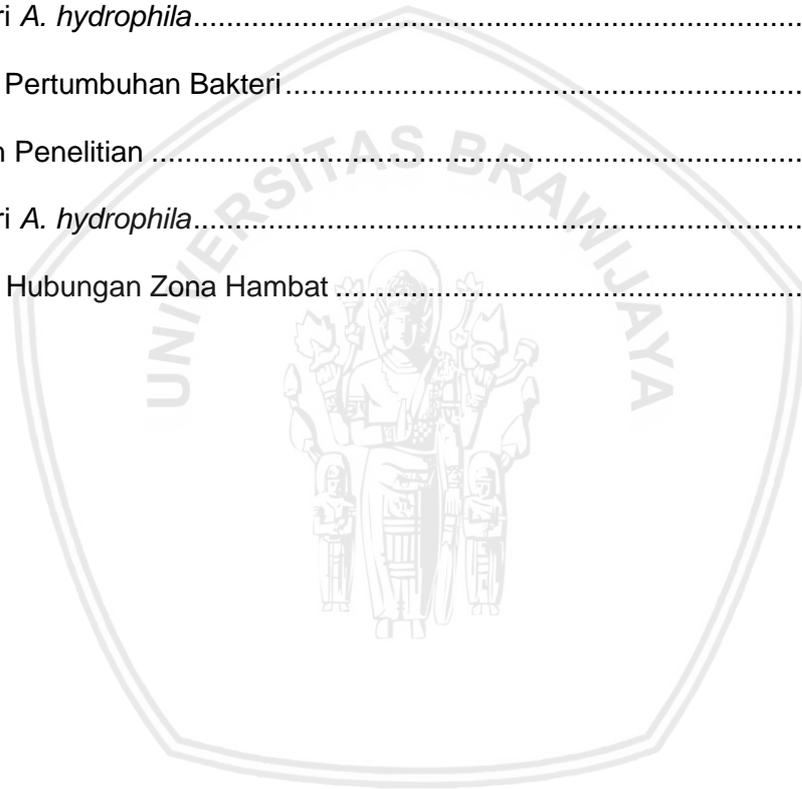
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Klasifikasi Respon Hambatan	16
2. Klasifikasi Respon Hambatan	31
3. Data Hasil Pengukuran Rerata Zona Bening (mm).	31
4. Analisa Sidik Ragam.....	32
5. Uji Beda Nyata Terkecil	33



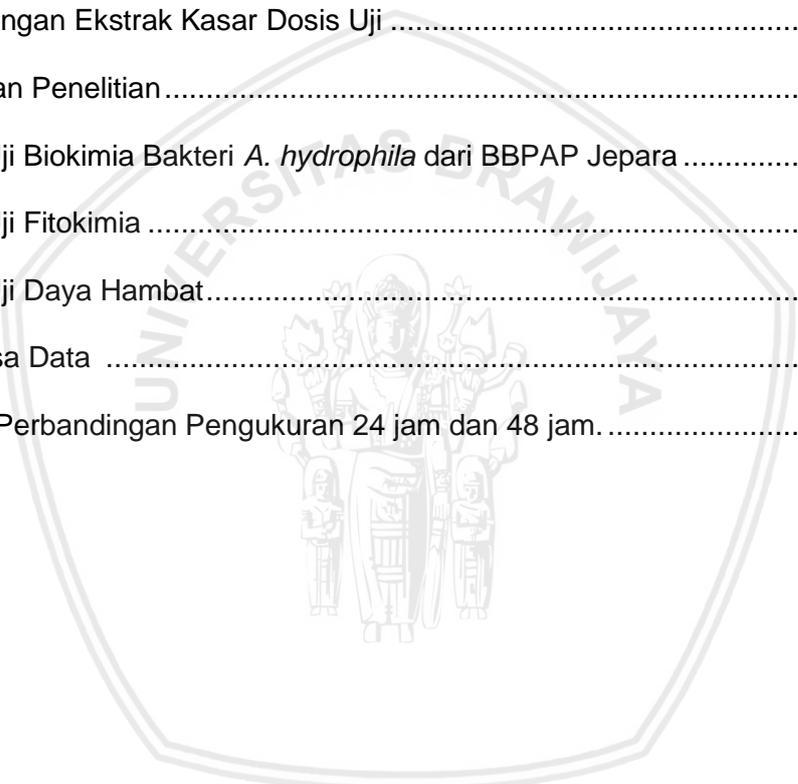
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman Kipahit.....	5
2. Struktur Kimia Senyawa Alkaloid	8
3. Struktur Kimia Senyawa Tanin.....	9
4. Struktur Kimia Senyawa Saponin.....	10
5. Bakteri <i>A. hydrophila</i>	11
6. Kurva Pertumbuhan Bakteri	13
7. Denah Penelitian	19
8. Bakteri <i>A. hydrophila</i>	29
9. Grafik Hubungan Zona Hambat	34



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan Fungsi.....	43
2. Bahan dan Fungsi.....	44
3 Alat- alat Penelitian.....	45
4. Bahan- bahan Penelitian.....	51
5. Perhitungan Ekstrak Kasar Dosis Uji	54
6. Kegiatan Penelitian.....	56
7. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>A. hydrophila</i> dari BBPAP Jepara	59
8. Hasil Uji Fitokimia	60
9. Hasil Uji Daya Hambat.....	61
10. Analisa Data	62
11. Data Perbandingan Pengukuran 24 jam dan 48 jam.....	70



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut Afrianto, Liviawaty, Jamaris dan Hendi (2015), penyakit adalah segala bentuk penyimpangan yang dapat menyebabkan ikan merasa terganggu kehidupannya. Atau penyakit sebagai suatu keadaan fisik, kimia, biologis, morfologis, dan atau fungsi yang mengalami perubahan dari kondisi normal karena penyebab dari dalam (*internal*) dan luar (*eksternal*). Adapun pengertian lain, yaitu kondisi tidak normal karena terjadi penurunan kemampuan ikan secara bertahap untuk mempertahankan fungsi fisiologisnya. Ikan menjadi tidak normal disebabkan oleh dirinya sendiri.

Menurut Prajitno (2007), penyakit pada ikan dalam kondisi alami dapat timbul akibat adanya interaksi inang, jasad pathogen dan kondisi lingkungan. Apabila interaksi anatar ketiga komponen tersebut tidak seimbang, dapat mengakibatkan penyakit ikan. Ikan mudah terserang penyakit terutama disebabkan oleh kondisi ikan yang lemah (semakin turunnya daya tahan tubuh ikan) akibat dari beberapa faktor, seperti, kepadatan yang tinggi, makanan yang kurang baik, kualitas air yang kurang baik, fluktuasi suhu yang besar, penanganan yang buruk serta adanya pembendungan atau polusi yang dapat menyebabkan perubahan ekosistem perairan. Selain itu lemahnya kondisi ikan juga disebabkan oleh perkembangan alat produksi atau pemijahan.

Menurut Khairuman dan Amri (2012), penyakit dapat diakibatkan oleh berbagai hal. Pertama penyakit akibat gangguan jasad hidup atau sering disebut juga penyakit parasiter. Kedua, penyakit yang disebabkan bukan oleh jasad hidup melainkan oleh faktor fisik dan kimia perairan atau sering disebut sebagai penyakit non-parasiter.

Organisme patogen (penyakit) yang menyerang ikan dapat digolongkan sebagai parasit. Contoh organisme tersebut adalah jamur, bakteri, protozoa. Berdasarkan sifat seranganya, organisme patogen dapat dibedakan menjadi dua jenis, yakni organisme patogen asli dan organisme patogen potensial. Organisme patogen asli bersifat lebih berbahaya dibandingkan dengan organisme patogen potensial karena mampu menimbulkan penyakit hanya lewat kontak tubuh. Pada organisme patogen potensial, serangan terjadi tatkala kondisi tubuh ikan sedang menurun sehingga pertahanan tubuhnya menjadi lemah (Sitanggang, 2008).

Menurut Sutrisno (2007), penyakit bakteri ini adalah penyakit yang sering menyebabkan ikan mati, karena bakteri merupakan parasit yang paling kecil dan sulit untuk diidentifikasi. Bakteri yang sering menyerang ikan adalah *A. hydrophila*. Sifat penyerangan terhadap ikan adalah terdapat diseluruh bagian tubuh, baik melalui *external parasiter* maupun *internal parasiter*.

Menurut Samsundari (2007), bahwa bakteri *A. hydrophila* dapat menimbulkan kerugian yang sangat besar meskipun pada kolam yang terawat dengan baik, sehingga dapat menimbulkan kerugian besar karena menyebabkan kematian ikan secara masal. Hal ini terjadi karena kondisi padat tebar yang tinggi, suhu yang tinggi dan kandungan bahan organik yang tinggi dapat menimbulkan stress ikan sehingga mudah terserang penyakit, dengan adanya hal ini perlu dilakukan pengendalian.

Pengendalian dapat dilakukan dengan menggunakan bahan antibiotic yang dapat menyembuhkan penyakit akibat infeksi bakteri, dan penggunaan antibiotik yang tidak rasional dapat meningkatkan resistensi bakteri terhadap antibiotik. Resistensi antibiotik terjadi ketika bakteri penyebab infeksi tidak mati saat diberikan terapi antibiotik, yang diakibatkan karena penggunaan antibiotik yang tidak tepat. Ketika antibiotik digunakan secara berlebihan bakteri dapat mengembangkan cara-cara baru untuk melawan antibakteri, sehingga bakteri

yang bertahan menjadi lebih kuat dan terus bertambah banyak dan semakin berbahaya. Resistensi terhadap antibiotik menjadi masalah, sehingga diperlukan usaha untuk mengembangkan obat-obatan jenis baru yang dapat mencegah terjadinya resistensi. Penelitian zat yang berkhasiat sebagai antibiotik baru yang berpotensi menghambat atau membunuh bakteri yang resisten terhadap antibiotik perlu dilakukan. Salah satu caranya dengan mengembangkan pengobatan tradisional yang memanfaatkan tanaman yang dapat membunuh bakteri untuk menghindari terjadinya resistensi (Kurniawan dan Aryana, 2015).

Salah satu tumbuhan yang dapat digunakan yaitu tanaman Kipahit (*T. diversifolia*) hal ini sesuai pernyataan Verawati, Aria dan Novicaresa (2011), bahwa Tumbuhan yang merupakan bahan baku obat tradisional tersebut tersebar hampir di seluruh wilayah Indonesia, baik itu tumbuhan asli Indonesia, maupun tumbuhan dari luar negeri yang tumbuh dan dikembangkan di Indonesia. Salah satu tumbuhan tersebut adalah tanaman kipahit (*T. diversifolia*) atau secara tradisional dikenal sebagai bunga Kembang Bulan Bunga Busuk, Bunga Kipait, dari Family Asteraceae. Selain itu dari penelitian sebelumnya diketahui bahwa tumbuhan *T. diversifolia* aktif sebagai anti bakteri. Berdasarkan pernyataan tersebut maka sifat antibakteri pada daun kipahit *T. diversifolia* diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dan juga dapat membunuh bakteri *A. hydrophila*.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas dapat diperoleh rumusan masalah yaitu Bagaimana pengaruh daya hambat ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) terhadap bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh daya hambat ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) terhadap bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis

H0 : Diduga pemberian ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dengan dosis berbeda tidak berpengaruh terhadap bakteri *A. hydrophila*.

H1 : Diduga pemberian ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dengan dosis berbeda berpengaruh terhadap bakteri *A. hydrophila*.

1.5 Kegunaan

Penelitian ini berguna untuk mengetahui manfaat ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dengan pemberian dosis yang berbeda sebagai antibakteri terhadap bakteri *A. hydrophila* secara *in vitro*.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada Desember- Februari 2019.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Tanaman Kipahit

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi daun kipahit menurut Amanatie dan Sulostyowati (2015) adalah sebagai berikut :

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Dicotyledoneae
Bangsa	: Asterales
Suku	: Asteraceae
Marga	: Thitonia
Jenis	: <i>Thitonia diversifolia</i>



Gambar 1. Tanaman Kipahit (Dokumentasi pribadi, 2019)

Menurut Yuliah (2006), semak yang bercabang-kayu berasal dari Mexico dan sudah lama didatangkan dari tempat asalnya ke Indonesia. Tingginya 3 meter. Bunganya besar, kuat dan bagus. Bentuknya mirip bunga matahari. Warnanya kuning emas. Bunga-bunganya jarang menghasilkan biji yang dapat digunakan untuk bibit. Untuk memperbanyak tanaman yang paling mudah yaitu dengan cara menanam steknya. Panjang setek kira-kira 20 cm diambil dari

cabang yang belum berkayu keras. Tanaman ini tumbuhnya cepat, pemeliharaanya mudah. Tanaman ini seringkali terdapat sebagai tanaman liar.

2.1.2 Habitat

Menurut Hidayat dan Napitupulu (2015), nama daerah tanaman ini yaitu kipahit, beung-beureuman tangkal, daun kukuran (sunda), nilam bukit, toma (madura), amperu lemah, jarongan lampesan (Jakarta), daun kukur, hutan alosu, majana kusu (Maluku). Herba liar ini termasuk kelompok tumbuhan mint yang banyak dikenal sebagai bahan obat-obatan. Sonketan termasuk tumbuhan endemik tropis yang oleh beberapa negara Asia tenggara digunakan sebagai tanaman hias sekaligus bahan obat alami, tetapi saat ini mulai sulit ditemukan di alam. Diantara suku Kalangayu dari Tinoc, Ifugao, daun yang telah dihancurkan digunakan untuk mengobati luka bakar dan kudis. Benihnya dapat dimakan untuk mengusir cacing diperut.

Menurut Wahyuni, Saleh dan Kartika (2015), kipahit (*Tithonia diversifolia*) merupakan spesies tumbuhan yang termasuk dalam family Asteraceae. Tumbuhan ini secara empirik telah lama digunakan oleh masyarakat di Asia Selatan, Amerika Tengah dan Afrika digunakan untuk mengobati beberapa macam penyakit.

2.1.3 Kandungan

Berdasarkan penelitian Ningsih, Firmansyah dan Anggraini (2016), hasil pemeriksaan fitokimia, diperoleh hasil yaitu ekstrak kasar etanol daun kipahit mengandung metabolit sekunder fenol, dan saponin. Kandungan senyawa dalam ekstrak kasar mempengaruhi aktivitas antibakteri yang dihasilkan. Hasil pemeriksaan susut pengeringan adalah 10,02%, kadar abu 3,11%, dan pH 5,35. Nilai susut pengeringan menunjukkan kadar air yang terkandung dalam ekstrak. Kandungan air dalam ekstrak kasar akan menyebabkan terjadinya pertumbuhan mikroorganisme, sehingga kadar air dalam ekstrak kasar dibatasi hingga 12,5%.

Menurut Nurjannah, Isbiyantoro dan Fadilah (2018), aktivitas antibakteri ekstrak kasar daun kipahit terhadap bakteri tersebut dapat disebabkan oleh kandungan kimianya yaitu senyawa alkaloid dan tanin. Senyawa alkaloid bekerja pada bakteri dengan cara merusak membran sitoplasma. Membran sitoplasma bakteri yang berfungsi mengatur masuknya bahan makanan dan nutrisi, apabila membran sitoplasma rusak maka metabolit penting dalam bakteri akan keluar dan bahan makanan untuk menghasilkan energi tidak dapat masuk sehingga sel bakteri tidak mampu tumbuh dan akhirnya terjadi kematian.

2.1.4 Manfaat

Menurut Ningsih, *et al.* (2016), berdasarkan sifat fisik ekstrak etanol daun kipahit dapat diformulasikan dalam bentuk gel pembersih tangan, pada uji aktivitas antibakteri formula gel pembersih tangan ekstrak etanol daun kipahit dapat memberikan daya hambat, sehingga dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun kipahit mengandung senyawa antibakteri.

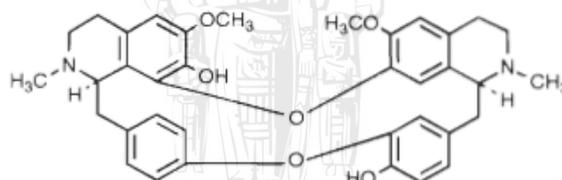
Menurut Dalimartha (2000), bahwa bagian yang dimanfaatkan dari tumbuhan *T. diversifolia* sebagai senyawa aktif yang digunakan untuk pengobatan tradisional biasanya adalah bagian daun, tapi dapat juga menggunakan kulit akar dan batang. Daun dari tumbuhan *T. diversifolia* ini mengandung senyawa alkaloid saponin, tanin, serta polifenol. Manfaat dari daun *T. diversifolia* secara tradisional biasanya digunakan sebagai obat sakit perut, kembung, diare dan digunakan sebagai obat luka dan anti radang (*antiinflamasi*).

Taofik, Yuianti, Barizi dan Hayati (2010) menyatakan bahwa ekstrak kipait positif mengandung saponin, alkaloid dan tanin. Tanaman kipait berpotensi sebagai insektisida nabati dan fungisida nabati karena mengandung senyawa aktif seperti *sesquiterpen lakton*, *tagitinin A*, *tagitinin C*, *hispidulin*, dan (*z*) *beta-ocimene*. Senyawa-senyawa ini dapat mempengaruhi reproduksi, menghambat perkembangan serangga, dan bersifat anti makan.

2.1.5 Senyawa Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Kipahit (*T. diversifolia*)

a. Alkaloid

Mekanisme kerja alkaloid sebagai antibakteri secara umum dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Selain itu senyawa alkaloid terdapat gugus basa yang mengandung nitrogen akan bereaksi dengan senyawa asam amino yang menyusun dinding sel bakteri dan DNA bakteri. Reaksi ini mengakibatkan terjadinya perubahan struktur dan susunan asam amino sehingga akan menimbulkan perubahan keseimbangan genetik pada rantai DNA. Hal ini akan menyebabkan terjadinya lisis sel bakteri yang akan menyebabkan kematian sel pada bakteri (Wahdiningsih, Untari dan Fauzia, 2014). Adapun Gambar Struktur Kimia Senyawa Alkaloid disajikan pada gambar 2.



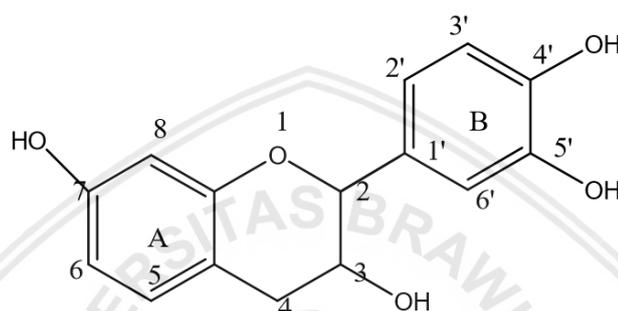
Gambar 2. Struktur Kimia Senyawa Alkaloid (Simanjuntak, 1995)

b. Tanin

Menurut Akiyama, Yamasaki, Oono dan Iwatsuki (2011), 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.

Menurut Fieser (1961), Senyawa tanin merupakan senyawa yang termasuk golongan senyawa , karena dilihat dari strukturnya yang memiliki 2 cincin aromatik yang diikat oleh tiga atom karbon. Kedudukan gugus hidroksil fenol bebas pada inti dapat ditentukan dengan menambahkan pereaksi geser ke

dalam larutan cuplikan dan mengamati pergeseran puncak serapan yang terjadi. Dengan demikian, secara tidak langsung cara ini berguna untuk menentukan kedudukan gula atau metil yang terikat pada salah satu gugus hidroksil fenol. Pada struktur inti tanin di atas terdapat gugus hidroksil pada posisi 7 pada cincin A dan 4', 5' pada cincin B. adapun gambar struktur kimia senyawa tanin disajikan pada gambar 4.



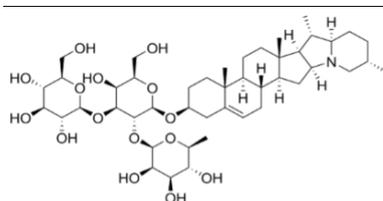
Gambar 4. Struktur Kimia Senyawa Tanin (Fieser, 1961)

c. Saponin

Menurut Zahro dan Agustini (2013), saponin adalah glikosida triterpena dan sterol yang telah terdeteksi dalam lebih dari 90 suku tumbuhan. Saponin merupakan senyawa aktif permukaan dan bersifat seperti sabun, serta dapat dideteksi berdasarkan kemampuannya membentuk busa jika dikocok dalam air dan menghemolisis sel darah. Dalam larutan yang sangat encer saponin sangat beracun untuk ikan dan tumbuhan yang mengandung saponin telah digunakan sebagai racun ikan selama berates-ratus tahun. Beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba. Saponin bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakterilisis.

Menurut Wahjuningrum, Hasanah dan Rahman (2016), Saponin merupakan salah satu senyawa yang memiliki sifat antibakteri. Saponin merupakan senyawa aktif yang memiliki kemampuan untuk merusak permeabilitas membran. Permeabilitas membran merupakan kemampuan

membran sel untuk meloloskan masuknya laurtan sehingga menyebabkan dinding sel bakteri menjadi hancur. Adapun gambar senyawa struktur kimia senyawa saponin disajikan pada gambar 5.



Gambar 5. Struktur Kimia Senyawa Saponin (Minarno, 2016)

2.2 Bakteri *A. hydrophila*

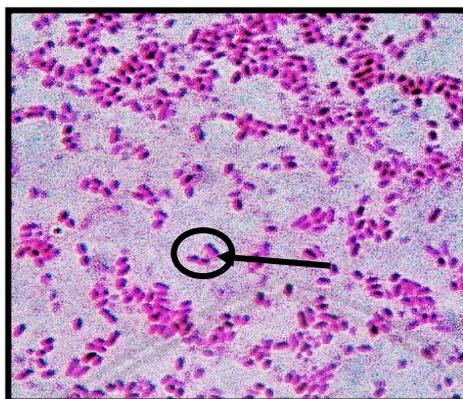
2.2.1 Klasifikasi dan morfologi

Menurut Austin dan Austin (1987), klasifikasi bakteri *A. hydrophila* adalah sebagai berikut:

- Domain : Bacteria
- Kingdom : Eubacteria
- Phylum : Proteobacteria
- Class : Gammaproteobacteria
- Order : Aeromonadales
- Family : Aeromonadaceae
- Genus : *Aeromonas*
- Species : *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila merupakan bakteri heterotrofik uniseluler, tergolong protista prokariot yang dicirikan dengan tidak adanya membran yang memisahkan inti dengan sitoplasma. Bakteri ini biasanya berukuran 0,7-1,8 x 1,0-1,5 μm dan bergerak menggunakan sebuah polar flagel. *A. hydrophila* bersifat motil hal ini dikarenakan bakteri *A. hydrophila* memiliki flagela tunggal di salah satu ujungnya. Bakteri ini berbentuk batang sampai dengan kokus dengan ujung membulat, fakultatif anaerob (dapat hidup dalam perairan yang terdapat oksigen maupun

tidak terdapat oksigen), bersifat mesofilik (organisme yang dapat hidup pada kisaran suhu 25°C – 45°C). (Haryani, *et al.*, 2012). Morfologi bakteri *A. hydrophila* dilihat dengan mikroskop elektron disajikan dalam Gambar 6.



Gambar 6. Bakteri *A. hydrophila* perbesaran 1000x (Dokumentasi pribadi, 2019)

2.2.2 Habitat dan Penyebaran

A. hydrophila adalah bakteri yang memiliki sifat oksidatif dan anaerobik fakultatif, sehingga dapat hidup di lingkungan perairan dengan atau tanpa oksigen. Bakteri ini tidak memiliki kemampuan untuk membentuk spora. Bakteri ini dapat dijumpai di lingkungan air payau, air tawar, atau lautan dan termasuk bakteri yang memiliki kemampuan untuk bergerak (motil). Bakteri ini berbentuk batang dan memiliki diameter sel berkisar 0,3-1 µm dan panjang 1-3,5 µm. Bakteri ini memiliki alat gerak berupa flagel dan memiliki suhu optimum pertumbuhan 28 °C, tetapi masih mampu bertahan hidup pada suhu (4 °C sampai 37 °C). Bakteri ini menyukai lingkungan kolam yang tercemar bahan organik, terutama di musim kemarau atau menjelang musim hujan. Bakteri ini dapat bertahan hidup dalam air atau sedimen selama beberapa hari hingga beberapa minggu, tetapi tidak dapat berkembang biak dan bersifat obligat (Afrianto, Liviawaty, Jamaris dan Hendi, 2015).

Bakteri *A. hydrophila* dapat hidup di air tawar, air laut maupun air payau. Pada umumnya bakteri ini hidup pada air tawar yang mengandung bahan organik

tinggi. Bakteri ini juga diakui sebagai patogen dari hewan akuatik yang berdarah dingin. Di daerah tropik dan sub tropik, pendarahan pada organ dalam pada ikan yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila* pada umumnya muncul pada musim panas (kemarau) karena pada saat itu dosis bahan organik tinggi dalam kolam air. Pada ikan, bakteri ini banyak ditemukan di bagian insang, kulit, hati, dan ginjal. Ada pula yang berpendapat bakteri ini dapat hidup pada saluran pencernaan (Irianto, 2005).

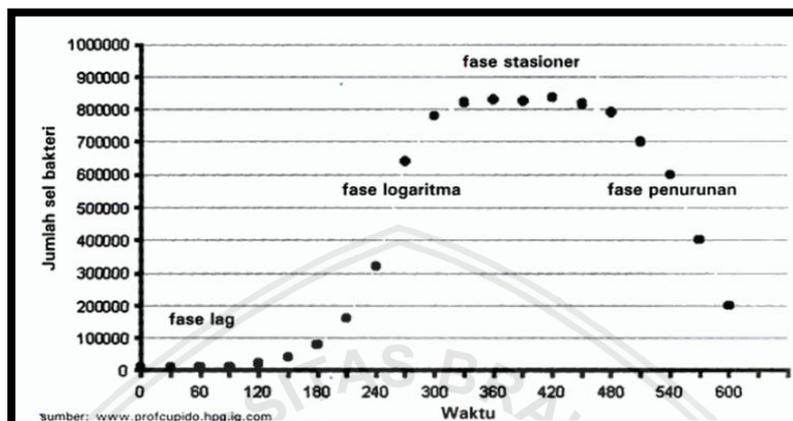
2.2.3 Pertumbuhan Bakteri

Bakteri memiliki permukaan yang luas sesuai dengan perbandingan volume tubuhnya. Oleh karena itu, bakteri akan cepat memperoleh makanan dari lingkungannya baik secara difusi maupun melalui mekanisme transpor aktif. Itulah sebabnya, pada kondisi yang cocok bakteri akan tumbuh dengan cepat. Ada beberapa faktor mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Faktor-faktor tersebut adalah suhu, ketersediaan makanan, pH, dosis ionik, serta oksigen, khususnya untuk bakteri obligat (Sudjadi dan Laila, 2006)

Pertumbuhan sel-sel bakteri dapat dihitung berdasarkan pertumbuhan koloni bakteri. Hubungan antara jumlah sel bakteri dengan waktu pertumbuhan bakteri dapat dinyatakan dalam kurva pertumbuhan bakteri. Kurva pertumbuhan tersebut terbagi dalam beberapa fase, yaitu

1. Fase permulaan cepat (fase lag) merupakan masa adaptasi bakteri terhadap lingkungannya yang baru sehingga pertumbuhannya belum maksimal.
2. Fase pembiakan cepat (fase logaritma) merupakan masa pertumbuhan bakteri mencapai maksimum.
3. Fase diperlambat (fase stasioner) merupakan masa pertumbuhan bakteri yang mulai menurun

4. Fase kematian (penurunan) yang ditandai dengan meningkatnya kematian-kematian sel-sel bakteri berhenti memperbanyak diri (Setiowati dan Furqonita, 2007). Untuk lebih jelasnya kurva pertumbuhan bakteri di sajikan pada gambar 7.



Gambar 7. Kurva pertumbuhan bakteri (Setiowati dan Furqonita, 2007)

Menurut Fifendy (2017), faktor-faktor yang mempengaruhi pertumbuhan mikroba yaitu :

- 1) Tingkat keasaman (pH), kebanyakan mikroba tumbuh baik pada pH sekitar netral dan pH 4,6-7,0 merupakan kondisi optimum untuk pertumbuhan bakteri.
- 2) Suhu, setiap mikroba mempunyai kisaran suhu dan suhu optimum tertentu untuk pertumbuhannya. Bakteri patogen umumnya mempunyai suhu optimum pertumbuhan sekitar 37°C.
- 3) Nutrien, mikroba sama dengan makhluk hidup lainnya, memerlukan suplai nutrisi sebagai sumber energi dan pertumbuhan.
- 4) Oksigen, mikroba mempunyai kebutuhan oksigen yang berbeda-beda untuk pertumbuhannya.

2.2.4 Infeksi Bakteri

Bakteri *A. hydrophila* tidak selalu menimbulkan wabah, tetapi sifatnya laten, tetapi bila suatu saat kondisi lingkungan memburuk dan keadaan ikan juga buruk, penyakit baru akan menyerang. Bakteri ini dapat mengakibatkan kematian

massal dan merupakan agen penyebab hemoragik septikemia (*bacterial hemorrhagic septicemia*) atau MAS (*motile aeromonas septicemia*) (Saparinto, 2013).

Menurut Mahyuddin (2010), gejala-gejala ikan yang terserang penyakit akibat bakteri ini antara lain:

1. Permukaan tubuhnya terdapat warna darah (pendarahan), terutama pada bagian dada, pangkal sirip dan perut.
2. Selaput lendir berkurang sehingga tidak licin.
3. Beberapa bagian tubuh ikan terdapat kulit yang terlihat melepuh
4. Sirip rusak dan pecah-pecah
5. Insang mengalami kerusakan dan berwarna keputih-putihan, dan berwarna kebiru-biruan
6. Ikan akan lemah, hilang keseimbangan dan mudah ditangkap.

Menurut Prajitno (2007), ikan yang terserang *A. hydrophila*, biasanya akan memperlihatkan tanda-tanda :

- a. Warna tubuhnya berubah menjadi agak gelap
- b. Kulitnya akan kesat dan timbul pendarahan yang selanjutnya akan menjadi borok (*haemorrhagic*).
- c. Kemampuan berenang akan menurun dan sering mengambang di permukaan air karena insangnya rusak sehingga sulit bernafas.
- d. Sering terjadi pendarahan pada organ dalam, seperti hati, ginjal, maupun limpa.
- e. Sering juga terlihat perutnya agak kembung (*dropsy*).
- f. Seluruh siripnya rusak dan insangnya menjadi berwarna keputih-putihan, mata rusak dan agak menonjol (*exophthalmia*).

2.3 Aktivitas Anti Mikroba

Zat anti mikroba adalah senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Zat anti mikroba yang bersifat membunuh mikroorganisme disebut *microbicidal*. Sementara itu, zat antimikroba yang banyak beredar luas saat ini cenderung bersifat sintetis. Jika digunakan secara terus-menerus dapat menimbulkan gangguan bagi kesehatan (Hermanto, 2012).

Menurut Manuaba (2003), menjelaskan bahwa mekanisme kerja dari anti mikroba dapat bersifat bakterisidal bila membunuh bakteri. Cara kerja antimikroba adalah sebagai berikut : menghambat metabolisme sel mikroba, menghambat sintesis dinding sel mikroba, merusak keutuhan membran sel mikroba, menghambat sintesis protein mikroba, menghambat dan merusak sintesis asam nukleat mikroba. Seiring dengan makin luasnya penggunaan antimikroba maka dapat terjadi suatu keadaan "resistensi mikroba" terhadap antimikroba sehingga efektivitas antibiotika semakin menurun.

2.4 Uji Bakteri secara *In Vitro*

Uji bakteri secara *in vitro* dapat dilakukan menggunakan cakram kertas, hal ini sesuai dengan pernyataan Katrin, Idiawati dan Sitorus (2015), bahwa metode yang digunakan untuk uji aktivitas antibakteri adalah metode difusi agar dengan menggunakan cakram kertas, dimana dalam teknik ini media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri kemudian dimasukan kertas cakram dalam media dan diisi dengan senyawa uji.

Menurut Soleha (2015), Cakram kertas, yang telah dibubuhkan sejumlah antimikroba tertentu, ditempatkan pada media yang telah ditanami organisme yang akan diuji secara merata. Tingginya dosis dari antimikroba ditentukan oleh difusi dari cakram dan pertumbuhan organisme uji hambat

penyebarannya sepanjang difusi antimikroba (terbentuk zona jernih disekitar cakram), sehingga bakteri tersebut merupakan bakteri yang sensitif terhadap antimikroba. Ukuran zona jernih yang sudah terbentuk pada kertas cakram dapat dipengaruhi oleh berbagai hal misalnya yaitu kecepatan difusi antimikroba, derajat, sensitifitas mikroorganisme, dan kecepatan pertumbuhan bakteri. Untuk derajat kategori bakteri dibandingkan terhadap diameter zona hambat yang berbeda-beda setiap antimikroba, sehingga dapat ditentukan kategori resisten, intermediate atau sensitif terhadap antimikroba uji.

Menurut Kusmawarti dan Indriati (2008), aktivitas daya hambat bakteri dinyatakan berdasarkan zona bening yang dihasilkan di sekitar paper disk. Diameter zona hambat pertumbuhan bakteri diukur dalam satuan mm dan dijadikan ukuran kuantitatif untuk ukuran zona hambat. Aktivitas tersebut dikelompokkan menjadi 4 kategori yang disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Klasifikasi Respon Hambatan

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
(< 5 mm)	Aktivitas lemah
(5 - 10 mm)	Sedang
(>10-20 mm)	Kuat
(>20 - 30 mm)	Sangat Kuat

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian “Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Kipahit (*T. diversifolia*) Terhadap Bakteri *A. hydrophila* Secara *In Vitro*” antara lain yaitu autoklaf, kulkas, cawan petri, erlenmeyer, toples, gelas ukur, Bunsen, tabung reaksi, *hot plate*, timbangan digital, timbangan analitik, *vortex mixer*, jerigen 5 liter, mikropipet 10-100 μ l, nampan, *washing bottle*, *sprayer*, *rotary evaporator*, botol sampel \pm 50 ml, LAF (*Laminary Air Flow*), incubator, spatula. Alat beserta fungsinya dapat dilihat pada lampiran 1 dan untuk gambar alat yang digunakan dapat dilihat pada lampiran 3.

3.1.2 Bahan Penelitian

Adapun bahan yang digunakan dalam penelitian “Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Kipahit (*T. diversifolia*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara *In Vitro*” antara lain yaitu daun kipahit (*T. diversifolia*), etanol 95%, TSA (*Triptic Soy Agar*), TSB (*Tryptone Soy Borth*), bakteri *A. hydrophila*, aquades, kertas cakram, DMSO (*Dimetil Sulfoksida*), kapas, kertas saring *Whatman* No. 41, alumunium foil, plastic wrap, spirtus, plastik, alkohol 70%, larutan Kristal violet, larutan iodin, larutan safranin. Bahan beserta fungsinya dapat dilihat pada lampiran 2 dan untuk gambar bahan yang digunakan dapat dilihat pada lampiran 4.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan metode kuantitatif dengan cara eksperimen. Menurut Ifianika (2018), bahwa dalam penelitian eksperimen ada perlakuan (*treatment*), sedangkan dalam

penelitian naturalistik tidak ada perlakuan. Dengan demikian metode penelitian eksperimen dapat diartikan sebagai metode penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi yang terkendali.

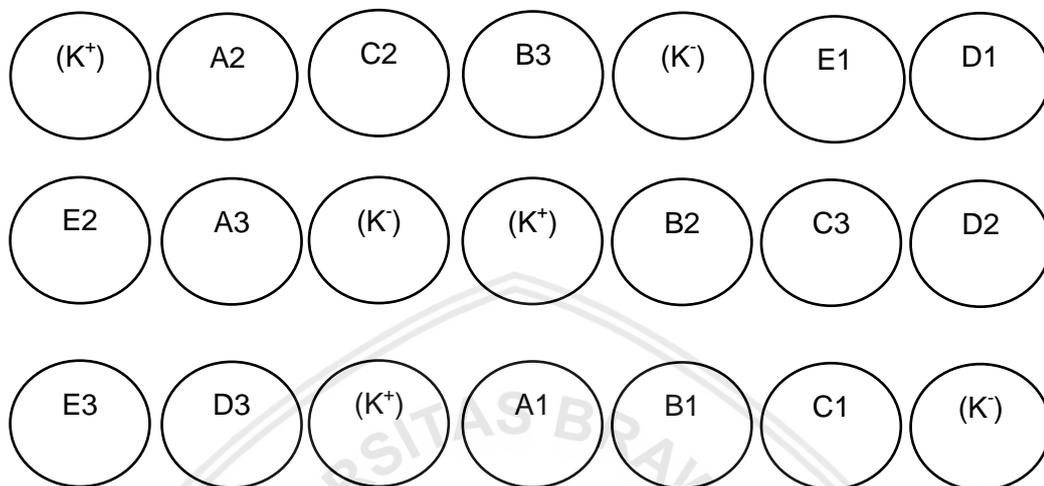
Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian suatu treatment atau perlakuan terhadap subjek penelitian. Metode eksperimen merupakan metode yang paling produktif karena jika dilakukan dengan baik akan menjawab hipotesis yang utamanya berkaitan dengan hubungan sebab akibat. Oleh karena itu, penelitian yang sering dilakukan peneliti dalam dunia pendidikan adalah penelitian eksperimen (Carsel, 2018).

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap, hal ini dikarenakan perlakuan yang digunakan pada penelitian ini relatif seragam sehingga tidak diperlukan pengelompokan. 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, peternakan. Karena media homogen maka media atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati.

Penelitian ini menggunakan variabel bebas berupa ekstrak kasar Daun Kipahit (*T. diversifolia*) dengan dosis yang berbeda. Dasar penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh dosis Daun Kipahit (*T. diversifolia*) yang diberikan terhadap daya hambat bakteri yang optimal. Adapun penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dengan 3 kali ulangan dan 2 kontrol terdiri dari kontrol positif dan kontrol negatif. Pada penelitian ini perlakuan relatif seragam sehingga tidak perlu dilakukan pengelompokan, dengan adanya hal ini maka dilakukan pengacakan

pada semua perlakuan. Pengacakan pada tiap perlakuan dilakukan dengan menggunakan pengocokan sehingga pengacakan dilakukan dengan benar-benar di acak. Berikut disajikan denah penelitian pada Gambar 8.



Gambar 8. Denah Penelitian

Keterangan :

- K+ : Bakteri *A. hydrophila* ditanam dengan pemberian ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dengan dosis 5000 ppm.
- K - : Bakteri *A. hydrophila* ditanam dengan pemberian DMSO 10%
- A : Bakteri *A. hydrophila* ditanam dengan pemberian ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dengan dosis 500 ppm.
- B : Bakteri *A. hydrophila* ditanam dengan pemberian ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dengan dosis 1000 ppm.
- C : Bakteri *A. hydrophila* ditanam dengan pemberian ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dengan dosis 1500 ppm.
- D : Bakteri *A. hydrophila* ditanam dengan pemberian ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dengan dosis 2000 ppm.
- E : Bakteri *A. hydrophila* ditanam dengan pemberian ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dengan dosis 2500 ppm.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Kipahit (*T. diversifolia*)

Daun kipahit (*T. diversifolia*) didapatkan dari sepanjang sejalan di kecamatan sukun, kemudian daun ini dilakukan pengeringan selama 7 hari. Setelah itu, daun kipahit (*T. diversifolia*) yang sudah kering dilakukan penghalusan dengan cara di blender hingga menjadi serbuk. Setelah itu dilakukan maserasi dengan perbandingan 1 : 10 (weight / volume) dan selama 3



hari, metode yang digunakan ini mengacu pada penelitian Trina, Fitmawati dan Sofiyanti (2014), bahwa ekstraksi dilakukan dengan cara serbuk tanaman kipahit dilakukan perendaman selama 3 x 24 jam dengan perbandingan serbuk kering-etanol 1 : 10 (weight / volume). Proses ekstrak dipekatkan dengan penguap putar.

Proses ini dilakukan dengan cara serbuk daun kipahit (*T. diversifolia*) ditimbang sebanyak 200 gram untuk dilakukan proses maserasi yaitu dengan cara dicampurkan dengan pelarut etanol 95% sebanyak 2000 ml, proses maserasi dilakukan di toples. Setelah dicampur etanol dan serbuk daun kipahit (*T. diversifolia*) diaduk sampai rata dan kemudian ditutup, toples dibungkus dengan aluminium foil dan dilapisi plastik wrap agar etanol tidak menguap. Proses maserasi dilakukan selama 3 hari, setiap 24 jam di goyang-goyangkan agar etanol dan serbuk daun kipahit (*T. diversifolia*) tercampur.

Hasil dari maserasi kemudian dipisahkan dengan endapan yang ada pada toples dengan cara disaring menggunakan kertas saring kedalam erlenmeyer. Hasil dari saringan tersebut dilakukan penguapan menggunakan *Rotary Evaporator* selama 2 jam 30 menit dan didapatkan hasil ekstrak kasar berbentuk pasta berwarna hijau pekat. Setelah itu hasil ekstrak tersebut dimasukkan ke dalam botol film dan dilakukan penimbangan menggunakan timbangan digital. Setelah dilakukan penimbangan botol film yang berisi ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dibungkus dengan *aluminium foil* dan dilapisi oleh plastik wrap, serta disimpan didalam kulkas. Metode pembuatan ekstrak daun kipahit (*T. diversifolia*) untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada lampiran 6.

3.4.2 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum alat dan bahan yang akan digunakan saat penelitian maka perlu dilakukan proses sterilisasi. Hal ini bertujuan untuk membunuh semua

mikroorganisme yang tidak dikehendaki yang menempel pada alat dan bahan.

Proses sterilisasi tersebut adalah sebagai berikut ini:

- Alat-alat yang akan digunakan dicuci menggunakan sabun cuci, kemudian dikeringkan lalu dibungkus dengan menggunakan kertas putih bekas atau koran.
- Aquades dituang ke dalam autoklaf secukupnya, dimasukan keranjang yang berisi alat dan bahan yang akan di sterilisasi ke dalam autoclave.
- Autoclave ditutup rapat, setelah itu saklar dihidupkan dan kemudian diputar tombol sirine berwarna merah pada autoklaf dan diputar hingga batas lampu berwarna merah.
- Ditunggu 15 menit sampai autoklaf mencapai suhu 121°C dan ditunggu beberapa saat sampai suhu menunjukkan angka 0 (nol),
- Saklar dimatikan , kemudian dibuka kran uap dan penutup autoklaf dengan cara simetris.
- Keranjang dikeluarkan yang berisi alat dan bahan yang sudah dsterilisasi.
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

3.4.3 Pembuatan Media Agar Miring

Media agar miring berfungsi sebagai media peremajaan bakteri.

Adapun cara proses pembuatan media agar miring adalah sebagai berikut:

- Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) ditimbang sebanyak 0,4 gr dengan timbangan digital.
- Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) dimasukkan ke dalam erlenmayer ukuran 50 ml.
- Media dilarutkan dengan akuades 10 ml dan dihomogenkan.

- Media yang dilarutkan dengan akuades dipanaskan diatas *hot plate* dan di aduk-aduk hingga mendidih.
- Dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 10 ml.
- Tabung reaksi ditutup dengan kapas pada bagian atas serta ditutup lagi dengan *aluminium foil*.
- Tabung reaksi yang berisi media dimasukkan kedalam beaker glass yang pada bagian bawah sudah diberi kapas dan pada bagian atas dibungkus dengan *aluminium foil*.
- Media di sterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
- Tabung reaksi yang berisi media steril di miringkan dengan kemiringan 30°.
- Ditunggu media hingga menjadi padat.

3.4.4 Pembuatan Media TSB (*Tryptitone Soy Broth*)

Media TSB (*Tryptitone Soy Broth*) merupakan media cair yang digunakan untuk kultur bakteri. Adapun cara pembuatan media TSB adalah sebagai berikut:

- Media TSB (*Tryptitone Soy Broth*) ditimbang sebanyak 0,3 gram menggunakan timbangan digital.
- Media TSB (*Tryptitone Soy Broth*) dimasukkan kedalam erlenmayer.
- Media dilarutkan dengan akuades sebanyak 10 ml, kemudian dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml.
- Tabung reaksi yang berisi media TSB ditutup dengan menggunakan kapas pada bagian atas dan dibungkus dengan *aluminium foil*.
- Tabung reaksi dimasukkan kedalam beaker glass yang pada bagian bawah sudah diberi kapas dan pada bagian atas dibungkus dengan *aluminium foil*.
- Disterilisasi media menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

- Media yang akan digunakan untuk pembiakan bakteri dibiarkan dingin karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.

3.4.5 Pembuatan Media TSA (*Tryptic Soy Agar*)

Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) merupakan media yang digunakan sebagai media agar dalam melakukan uji cakram. Adapun pembuatan media ini adalah sebagai berikut:

- Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) ditimbang sebanyak 5,6 gram dengan timbangan digital dan dimasukkan dalam erlenmayer
- Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) dilarutkan dengan akuades sebanyak 140 ml dan dihomogenkan.
- Erlenmeyer yang berisi media dan akuades ditutup kapas pada bagian atas dan dibungkus *aluminium foil*.
- Media disterilisasikan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
- Media yang akan dipakai dibiarkan sedikit lebih dingin karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
- Media dituang pada cawan petri, kemudian ditunggu hingga dingin apabila hendak digunakan dan dapat disimpan pada lemari pendingin dengan diberi label agar tidak tertukar.

3.4.6 Pembuatan Nafis (Natrium Fisiologis)

- Garam NaCl ditimbang sebanyak 0,27 gr dengan timbangan digital dan dimasukkan dalam erlenmayer.
- Garam NaCl dilarutkan dengan akuades sebanyak 30 ml dan dihomogenkan.
- Garam NaCl dan akuades yang sudah tercampur dimasukkan kedalam 3 tabung reaksi sebanyak 10 ml tiap tabungnya.

- Tabung reaksi yang sudah berisi garam NaCl dan akuades ditutup dengan kapas pada bagian atas serta ditutup dengan *aluminium foil*.
- Setelah itu dimasukkan kedalam beaker glass yang pada bagian bawah sudah diberi kapas dan pada bagian atas dibungkus dengan *aluminium foil*.
- Tabung reaksi disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

3.4.7 Peremajaan Bakteri

Bakteri *A. hydrophila* didapatkan dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara dengan kepadatan 10^{10} sel/ml. Adapun pembiakan bakteri *A. hydrophila* adalah sebagai berikut :

- Media agar miring yang akan digunakan untuk peremajaan dan media agar miring yang berisi bakteri murni disiapkan.
- Jarum ose dipanaskan diatas bunsen hingga berpijar dan digoreskan pada media agar yang tidak ditumbuhi bakteri. Hal tersebut bertujuan untuk menurunkan suhu pada jarum ose agar bakteri tidak mati.
- Membuka penutup kapas pada tabung reaksi yang telah berisi bakteri kemudian panaskan ujung tabung terlebih dahulu di atas bunsen.
- Mengambil satu inokulan bakteri dari biakan bakteri murni kemudian goreskan pada media agar yang masih steril di dekat bunsen yang menyala.
- Setelah itu, media hasil goresan diinkubasi di inkubator selama 24 jam dengan suhu 32°C untuk melihat pertumbuhan bakteri. Metode peremajaan bakteri dapat dilihat pada lampiran 6.

3.4.8 Kultur Bakteri

Untuk mendapatkan bakteri dalam bentuk cair, maka bakteri diremajakan kembali menggunakan media cair yaitu TSB. Adapun langkah-langkahnya sebagai berikut:

- Media TSB yang akan digunakan untuk kultur bakteri dipersiapkan.
- Jarum ose dipanaskan diatas bunsen hingga berpijar dan digoreskan pada media agar yang tidak ditumbuhi bakteri. Hal tersebut bertujuan untuk menurunkan suhu pada jarum ose agar bakteri tidak mati.
- Bakteri *A. hydrophila* diambil dari media agar miring yang telah diremajakan dengan jarum ose steril sebanyak 1 ose.
- Jarum ose dicelupkan pada media TSB yang sudah distrerilkan dan di *vortex mixer*.
- Tabung reaksi ditutup dengan kapas dan alumunium foil.
- Dibiarkan larutan TSB selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 32°C.
- Setelah 24 jam dan media telah tampak keruh, kemudian media disimpan dalam kulkas.
- Disajikan hasil biakan bakteri yang ditandai dengan warna keruh pada media biakan.

3.4.9 Pengenceran Bakteri

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPAP) Jepara, Jawa Tengah dengan kepadatan 10^{10} sel/ml. Kepadatan bakteri yang akan digunakan untuk uji daya hambat daun kipahit (*T. diversifolia*) adalah kepadatan 10^7 sel/ml. Adapun prosedur yang akan digunakan untuk memperoleh bakteri *A. hydrophila* dengan kepadatan 10^7 sel/ml adalah sebagai berikut :

- Media Natrium Fisiologis yang sudah disterilisasi sebanyak 3 tabung reaksi dipersiapkan.
- Bakteri yang telah dikultur dalam media TSB disiapkan.

- Tabung reaksi pertama ditambahkan sebanyak 1000 μl bakteri dari media TSB dengan kepadatan 10^{10} sel/ml, sehingga didapatkan bakteri dengan kepadatan 10^9 sel/ml.
- Bakteri dengan kepadatan 10^9 sel/ml selanjutnya diambil sebanyak 1000 μl dan dimasukkan pada Natrium Fisiologis tabung kedua dan didapatkan bakteri dengan kepadatan 10^8 sel/ml.
- Cara diatas dilakukan hingga mendapatkan kepadatan 10^7 sel/ml.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Uji Cakram

Adapun prosedur uji kertas cakram adalah sebagai berikut :

- Cawan petri yang sudah terdapat media TSA disiapkan
- Bakteri diambil dari hasil pengenceran sebanyak 100 μl dan dimasukkan kedalam cawan petri kemudian diratakan menggunakan triangel lalu ditunggu selama 15 menit.
- Kertas cakram steril ukuran 6 mm direndam ke dalam ekstrak kasar daun tanaman daun kipahit (*T. diversifolia*) selama 15 menit sesuai dosis perlakuan dengan dosis 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm, 2000 ppm dan 2500 ppm.
- Kertas cakram yang telah direndam ekstrak kasar daun diletakan di permukaan media agar yang sudah ditanami dengan bakteri.
- Jarak kertas cakram dengan tepi cawan petri tidak boleh kurang dari 15 mm dan kertas cakram tidak boleh bergeser, karena mengurangi validasi pengukuran.
- Diinkubasi pada suhu ruang 32°C selama 24-48 jam dan dibaca hasil dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram

menggunakan jangka sorong digital. Metode uji cakram untuk lebih jelasnya dapat dilihat pada lampiran 6.

3.5.2 Parameter Uji

Parameter utama dalam penelitian ini adalah parameter uji yang berupa ukuran zona hambat yang dihasilkan setelah uji difusi kertas cakram dengan menggunakan ekstrak kasar daun tanaman daun kipahit (*T. diversifolia*) dalam satuan millimeter (mm). Parameter penunjang pada penelitian ini yaitu suhu inkubasi yang digunakan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* selama penelitian.

3.5.3 Analisa Data

Data hasil penelitian yang diperoleh dianalisa secara statistik dengan menggunakan analisis uji keragaman atau uji F (ANOVA) dengan metode yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada 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 atau sidik ragam). Jika data sidik ragam memperlihatkan pengaruh berbeda nyata maka untuk membandingkan nilai antar perlakuan dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT). Selanjutnya untuk mengetahui hubungan atau regresi antara perlakuan dengan diameter zona hambat (zona bening) dilakukan uji *polynomial orthogonal* yang memberikan keterangan mengenai pengaruh keterangan terbaik.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi Bakteri *A. hydrophilla*

Proses identifikasi bakteri dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah bakteri *A. hydrophilla*. Pada penelitian ini proses identifikasi dilakukan uji biokimia di Laboratorium Mikrobiologi BBAPAP Jepara dengan menggunakan metode *Cowan and stell's, Manual for Identification of medical bacteria*, hasil uji bakteri *A. hydrophilla* yang didapatkan adalah bakteri gram negatif (-), berbentuk batang, uji katalase positif (+), uji oksidase positif (+), uji H₂S negatif (-), uji indol positif (+), Uji motil positif (+), OF medium fermentatif, uji VP positif (+), uji MR negatif (-), uji gelatin positif (+), uji urea negatif (-), uji glukosa positif (+), uji sukrosa positif (+) dapat dilihat pada lampiran 7. Hal ini sesuai pernyataan Lukistiyowati dan Kurniasih (2012), setelah dilakukan isolasi kembali ke media agar selektif (GSP), menunjukkan bakteri tersebut positif *A. hydrophilla* dengan hasil uji biokimia menunjukkan karakteristik adanya kesamaan reaksi. Tes biokimia tersebut menunjukkan uji gram (-); uji oksidase (+) ; uji katalase (+); uji motilitas (+); uji indol (+) ; uji H₂S pada media TSIA (+); uji Voges-proskaver (+); uji gas dari glukosa (+) dan uji Ornithin dekarbosisase (-). Berdasarkan identifikasi bakteri *A. hydrophilla* pada pewarnaan gram didapatkan hasil bahwa bakteri *A. hydrophilla* termasuk dalam bakteri gram negatif dikarenakan pada saat pewarnaan bakteri *A. hydrophilla* berwarna merah. Hal ini sesuai pernyataan Menurut Bijanti, Yuliani dan Tyasningsih (2011), ciri utama bakteri *A. hydrophilla* adalah termasuk dalam bakteri gram negatif hal ini dikarenakan dengan metode pewarnaan bakteri *A. hydrophilla* menghasilkan warna merah, motil karena memiliki satu flagela (*monotrichous flagella*) yang keluar dari salah satu kutubnya, berbentuk batang, fakultatif aerobik, tidak berspora. Bakteri *A. hydrophilla* berwarna merah diakibatkan tidak dapat mengikat

warna utama yaitu kristal violet hal ini sesuai pernyataan Fitri dan Yasmin (2011), bahwa pewarnaan gram digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri serta untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif pada pewarnaan gram berwarna ungu disebabkan kompleks zat warna kristal violet-yodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat aseton alkohol, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah sebab kompleks tersebut larut pada saat pemberian larutan pemucat aseton alkohol sehingga mengambil warna merah safranin. Adapun gambar hasil pewarnaan bakteri *A. hydrophila* disajikan pada gambar 9.



Gambar 9. Bakteri *A. hydrophila*. perbesaran 1000x (Dokumentasi pribadi, 2019)

4.2 Uji Cakram

Penelitian ini menggunakan bakteri *A. hydrophila* yang diperoleh dari isolat murni BBPBAP Jepara. Uji cakram dilakukan untuk mengetahui daya hambat antibakteri yang terdapat pada ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) yang ditandai dengan adanya zona bening yang terdapat pada sekitar kertas cakram. Hasil uji fiokimia ekstrak kasar daun kipahit terdapat pada lampiran 8. Uji ini dilakukan dengan memasukkan kertas cakram kedalam ekstrak kasar dengan waktu 15 menit. Uji cakram dilakukan dengan perendaman ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) yang menggunakan dosis berbeda-beda yaitu sebesar 500

ppm, 1.000 ppm, 1.500 ppm, 2.000 ppm, 2.500 ppm, dan kontrol (kontrol positif dan kontrol negatif). Dosis yang digunakan mulai dari 500 ppm, hal ini penentuan berdasarkan penelitian pendahuluan yang mana kertas cakram yang di rendam dengan dalam ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dengan dosis 500 ppm dapat memiliki daya hambat yang jelas sehingga dosis yang digunakan dimulai dari dosis 500 ppm. Kertas cakram yang telah direndam dengan ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) diletakan di cawan yang telah ditanamai bakteri *A. hydrophila*, apabila menghasilkan zona bening maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak kasar tersebut memiliki sifat anti bakteri yang mana dapat menghambat pertumbuhan bakteri maupun dapat membunuh bakteri yang di lakukan uji.

Berdasarkan hasil pengamatan zona bening pada uji cakram selama penelitian setiap perlakuan menghasilkan zona bening. Zona bening yang terbentuk mulai dari dosis terendah (500 ppm) sampai dosis tertinggi (2500 ppm) menghasilkan ukuran yang semakin membesar. Semakin tinggi dosis maka zona bening yang dihasilkan juga semakin tinggi, serta semakin rendah dosis maka zona bening yang dihasilkan semakin rendah. Tingginya dosis yang diberikan menunjukkan semakin banyaknya bahan aktif yang terkandung dalam ekstrak kasar tersebut. Hal ini sesuai pernyataan Ajizah (2004), bahwa semakin tinggi dosis semakin kecil kerapatan optik, yang berarti semakin sedikit jumlah bakteri yang mampu bertahan hidup. Ini menunjukkan bahwa dengan meningkatnya dosis semakin besar kadar bahan aktif yang berfungsi sebagai antibakteri, sehingga kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri juga semakin besar. Gambar hasil uji daya hambat ekstrak daun kipahit (*T. diversifolia*) lebih jelasnya disajikan pada lampiran 9.

Menurut Mahmuda dan Atun (2017), menyatakan bahwa klasifikasi respon hambatan yang berupa zona bening dapat dibagi menjadi 4 ukuran yang disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Klasifikasi Respon Hambatan

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
(< 5 mm)	Aktivitas lemah
(5 - 10 mm)	Sedang
(>10-20 mm)	Kuat
(>20 - 30 mm)	Sangat Kuat

Berdasarkan tabel klasifikasi respon daya hambat pertumbuhan bakteri

diatas, maka dapat ditentukan bahwa respon hambat ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada masing-masing perlakuan berbeda, yaitu pada perlakuan A (500 ppm) didapatkan hasil rata-rata pengukuran diameter zona bening sebesar 9,28 mm, pada perlakuan B (1.000 ppm) didapatkan hasil rata-rata pengukuran diameter zona bening sebesar 9,93 mm. Kedua perlakuan tersebut termasuk klasifikasi respon daya hambat sedang. Sedangkan pada perlakuan C (1.500 ppm) didapatkan hasil rata-rata pengukuran diameter zona bening sebesar 10,47 mm, perlakuan D (2.000 ppm) didapatkan hasil rata-rata pengukuran diameter zona bening sebesar 11,32 mm, pada perlakuan E (2.500 ppm) didapatkan hasil rata-rata pengukuran diameter zona bening sebesar 11,93 mm, dari ketiga perlakuan termasuk klasifikasi respon daya hambat kuat. Analisa data pengaruh daya hambat terhadap bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada lampiran 9. Data hasil pengukuran rerata zona bening pada penelitian disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Data Hasil Pengukuran Rerata Zona Bening (mm).

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata±SD
	1	2	3		
A (500 ppm)	9,1	9,46	9,28	27,840	9,280 ± 0,180
B (1.000 ppm)	11,27	9,38	9,14	29,790	9,930 ± 1,167
C (1.500 ppm)	9,67	11,16	10,59	31,420	10,473 ± 0,752
D (2.000 ppm)	11,01	11,96	10,98	33,950	11,317 ± 0,557
E (2.500 ppm)	11,69	13,47	10,64	35,800	11,933 ± 1,431
K (-)	6,08	6,25	6,03	18,360	6,120 ± 0,115
K (+)	12,68	13,76	11,16	37,600	12,533 ± 1,306
	Total			214,760	

Pada Tabel 3. dapat dilihat perbandingan antara perlakuan A dengan dosis 500 ppm sampai perlakuan E dengan dosis 2.500 ppm didapatkan hasil bahwa perlakuan E dengan dosis 2.500 ppm memiliki rerata zona bening tertinggi sebesar 11,933 mm, dan rerata zona bening terendah terdapat pada perlakuan A dengan dosis 500 ppm sebesar 9,280 mm. Kontrol digunakan sebagai pembanding bukan sebagai perlakuan sehingga tidak dibandingkan dengan perlakuan. Pada kontrol negatif terdapat zona bening hal ini dapat diakibatkan oleh berbagai hal. Menurut Alfiah, Khotimah dan Turnip (2015), bahwa faktor lain yang dapat mempengaruhi perbedaan terbentuknya zona bening (zona hambat) selain adanya bahan antimikroba yang terkandung dalam ekstrak yaitu dapat dikarenakan temperatur inkubasi, waktu pemasangan cakram dan jarak cakram antimikroba. Kemudian untuk mengetahui pengaruh perlakuan daya hambat ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) terhadap bakteri *A. hydrophila* maka dilakukan perhitungan sidik ragam. Berikut adalah tabel hasil perhitungan sidik ragam yang disajikan pada tabel 4.

Tabel 4. Analisa Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	6	81,994	13,666	15,850**	2,85	4,46
Acak	14	12,071	0,862			
Total	20	94,065				

Keterangan :

** : Berbeda Sangat Nyata

Pada tabel sidik ragam didapatkan hasil bahwa uji daya hambat ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila*. Hal ini dikarenakan nilai F hitung (4,503) lebih besar dari pada nilai F tabel 5% (2,85) dan nilai F tabel 1% (4,46). Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan masing-masing antar perlakuan terhadap zona bening daya hambat bakteri didukung dengan perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf $p > 5\%$ (kepercayaan 95%). Hasil Uji

Beda Nyata Terkecil (BNT) didapatkan untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan yang disajikan pada tabel 5.

Tabel 5. Uji Beda Nyata Terkecil

Perlakuan	Rerata	K-	A	B	C	D	E	K+	Notasi
		6,12	9,28	9,93	10,47	11,32	11,93	12,53	
K-	6,12								a
A	9,28	3,16*							b
B	9,93	3,81*	0,65 ^{ns}						bc
C	10,47	4,35*	1,19 ^{ns}	0,54 ^{ns}					bc
D	11,32	5,20*	2,04*	1,39 ^{ns}	0,84 ^{ns}				c
E	11,93	5,81*	2,65*	2,00*	1,46 ^{ns}	0,62 ^{ns}			C
K+	12,53	6,41*	3,25*	2,60*	2,06*	1,22 ^{ns}	0,60 ^{ns}		C

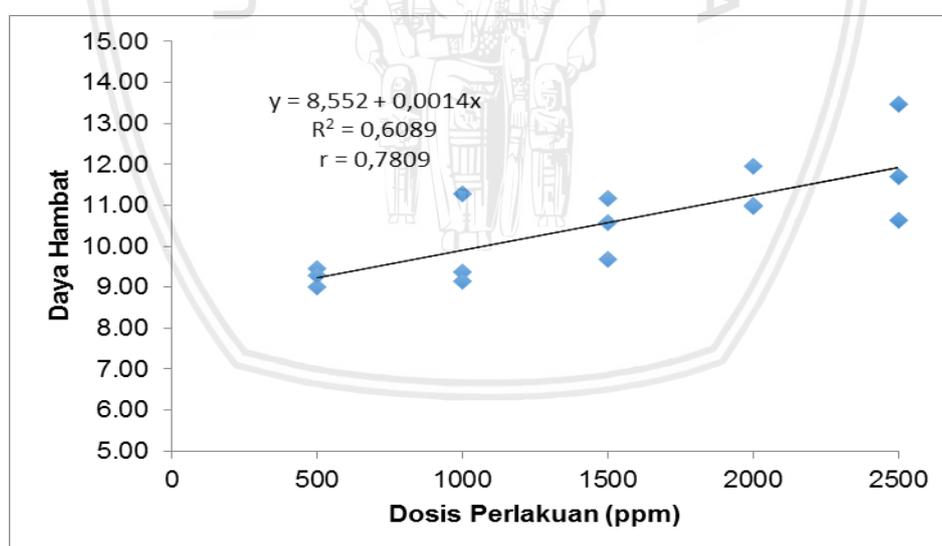
Keterangan :

ns : Tidak berbeda nyata

* : Berbeda sangat nyata

Hasil uji BNT yang terdapat pada tabel 7, didapatkan apabila kontrol dibandingkan dengan perlakuan didapatkan hasil bahwa pada kontrol negatif tidak memberikan pengaruh sehingga diberi notasi a, perlakuan A (500 ppm) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap kontrol (-) sehingga diberi notasi b, perlakuan B (1.000 ppm) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap kontrol (-) dan tidak berpengaruh terhadap perlakuan A (500 ppm) sehingga diberi notasi bc, hal ini dikarenakan pada perlakuan B (1.000 ppm) memiliki kemiripan terhadap perlakuan C dan perlakuan A (500 ppm). Perlakuan C (1.500 ppm) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap kontrol (-), dan tidak berpengaruh terhadap perlakuan A (500 ppm) dan pada perlakuan B (1.000 ppm) sehingga diberi notasi bc, hal ini dikarenakan pada perlakuan C (1.500 ppm) memiliki kemiripan terhadap perlakuan D (2.000 ppm). Perlakuan D (2.000 ppm) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap kontrol (-) dan perlakuan A (1.000 ppm), namun tidak berpengaruh terhadap perlakuan perlakuan B (1.000 ppm) dan C (1.500 ppm) sehingga diberi notasi c. Perlakuan E

(2.500) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap kontrol (-), perlakuan A, perlakuan B, namun tidak berpengaruh terhadap perlakuan C (1.500) dan D (2.000 ppm) sehingga diberi notasi c. Kontrol (+) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap kontrol (-), perlakuan A (1000 ppm), perlakuan B (1.500 ppm) dan perlakuan C (1.500 ppm), namun tidak berpengaruh terhadap perlakuan D (2.000 ppm) dan E (2.500 ppm) sehingga di beri notasi c. Berdasarkan data tersebut maka dapat disimpulkan bahwa perlakuan D (2.000 ppm) merupakan perlakuan terbaik dan efektif untuk membunuh bakteri *A. hydrophila*. hal ini dikarenakan dengan dosis 2.000 ppm memberikan pengaruh yang sama dengan perlakuan E (2.500 ppm) dan kontrol (+). Selanjutnya berdasarkan hasil penelitian didapatkan grafik regresi polynominal orthogonal zona bening yang dihasilkan dengan perlakuan yang berbeda disajikan pada gambar 10.



Gambar 10. Grafik Hubungan Zona Hambat antar Perlakuan Ekstrak kasar Daun Kipahit (*T. diversifolia*) terhadap bakteri *A. hydrophila*

Berdasarkan gambar 7. Grafik hubungan zona hambat antar perlakuan ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) terhadap bakteri *A. hydrophila* menunjukkan perpotongan garis secara linier dengan persamaan $y = 8,552 + 0,0014x$ dengan koefisien nilai determinasi (R^2) sebesar 0,6089. Dosis mulai

500 ppm sampai 2500 ppm grafik mengalami peningkatan pada hasil zona bening. Peningkatan hasil zona bening dapat dipengaruhi oleh bertambahnya dosis yang diberikan kepada setiap perlakuan. Hal ini sesuai pernyataan Rahman (2013), bahwa zona hambat yang terbentuk dipengaruhi oleh dosis bahan aktif yang digunakan, semakin tinggi dosis yang digunakan maka semakin tinggi zona daya hambat yang terbentuk. Dimana besarnya diameter zona hambat berbanding lurus dengan kenaikan dosis bahan aktif.

Penelitian ini apabila dilihat berdasarkan hasilnya menunjukkan bahwa ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) yang baik digunakan sebagai bahan antibakteri berdasarkan kekuatan daya hambatnya yaitu pada perlakuan D dengan dosis 2.000 ppm yang bersifat bakterisidal. Ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) mampu membunuh bakteri hal ini karena diameter zona bening yang dihasilkan setelah dilakukan pengamatan 48 jam diameternya bertambah. Hal ini sesuai pernyataan Pelczar dan Chan (1988), dalam Roihanah, Sukoso dan Andayani (2012), bahwa antibakteri bersifat bakteristatik atau bakterisidal bergantung dari dosisnya. Ekstrak kasar bersifat bakterisidal karena ekstrak kasar mampu membunuh bakteri dan bakteristatis karena ekstrak kasar hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Data perbandingan hasil zona bening antara pengukuran 24 jam dan 48 jam dapat dilihat pada lampiran 11.

Ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) memiliki bahan aktif yang diduga berperan penting dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Bahan aktif ini terdapat berbagai macam misalnya yaitu , tanin dan alkonoid. Hal ini sesuai pernyataan Menurut Wahyuni, *et al* . (2015), berdasarkan penelitian hasil uji fitokimia kandungan yang terdapat pada daun kipahit (*T. diversifolia*) yang di larutkan dengan etanol adalah alkaloid, tannin dan saponin. Pada hasil fitokimia ini tidak terdapat salah satu dari senyawa metabolit sekunder yaitu terpenoid.

Senyawa tanin dapat berguna sebagai pestisida, sedangkan senyawa lainnya seperti alkaloid beberapa diantaranya berfungsi sebagai antibakteri dan pestisida. Bahkan, senyawa saponin dan alkaloid dapat bersifat sebagai antibakteri dan antikanker (Yuliani dan Satuhu, 2012). Sistem kerja tannin sebagai bahan antibakteri adalah dengan menyebabkan adanya denaturasi pada bakteri hal ini sesuai pernyataan Arlofa (2015), alkaloid merupakan senyawa pereduksi yang baik, menghambat banyak reaksi oksidasi baik secara enzim maupun non enzim. Mekanisme kerja alkaloid sebagai anti bakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks terhadap protein ekstra seluler yang menyebabkan terdenaturasinya protein sel bakteri sehingga membran sel mengalami kerusakan.

Menurut Kurniawan dan Aryana (2015), Alkaloid merupakan golongan zat tumbuhan sekunder yang terbesar. 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

4.3 Parameter Penunjang

Parameter penunjang merupakan parameter yang digunakan untuk menunjang penelitian. Penelitian ini menggunakan parameter penunjang suhu inkubasi. Hal ini dikarenakan suhu merupakan faktor utama yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri. Hal ini sesuai pernyataan Prajitno (2007), bahwa pertumbuhan maksimal bakteri pada kisaran suhu 28^oC - 41^oC sedang pertumbuhan minimum bakteri pada suhu 0^oC – 5^oC. bakteri akan tumbuh dengan baik pada pH 5,5-9,0.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) terhadap bakteri *A. hydrophila* dapat ditarik kesimpulan yaitu :

1. Ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) mengandung senyawa aktif alkaloid, tannin dan saponin.
2. Ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) dapat membunuh bakteri *A. hydrophila* dan memiliki sifat bakterisidal.
3. Bakteri *A. Hydrophila* termasuk dalam bakteri gram negatif karena berwarna merah.
4. Zona bening terendah didapatkan pada perlakuan A (500 ppm) dengan hasil rata-rata sebesar 9,28 mm, sedangkan zona bening tertinggi didapatkan pada perlakuan E (2.500 ppm) dengan hasil rata-rata sebesar 11,93 mm.
5. Semakin tinggi dosis perlakuan maka zona hambat yang terbentuk semakin lebar.

5.2 Saran

Adapun saran dari hasil penelitian ini sebaiknya dilakukan penelitian lebih lanjut dengan dosis yang berbeda untuk mengetahui dosis optimum daya hambat ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*). Selain itu perlu dilakukan penelitian secara *in vivo* untuk mengetahui pengaruh ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) terhadap hewan uji yang terinfeksi *A. hydrophila*, namun sebelum melakuakn uji *in vivo* dilakukan terlebih dahulu uji LD₅₀ dan LC₅₀ untuk mengetahui konsentrasi yang dapat menghasilkan 50% respon kematian hewan uji

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 2015. Penyakit Ikan. Jakarta : Penebar Swadaya. 220 hlm
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas Salmonella typhinurium terhadap ekstrak kasar daun *Psidium guajava* L. *BIOSCIENTIAE*. **1** (1) : 31-38.
- Akiyama, H. K. Fujii. O. Yamasaki., T. Oono. K. Iwatsuki. 2001. Antibacterial Action of Several Tannin against Staphylococcus aureus. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **48** : 487 – 491.
- Alfiah, R. R., S. Khotimah, dan M. Turnip. 2015. Efektivitas ekstrak metanol daun Sembung Rambat (*Mikania micrantha* Kunth) terhadap pertumbuhan Jamur *Candida albicans*. *Protobiont*. **4** (1) : 52-57.
- Alfianika, N. 2018. Buku Ajar Metode Penelitian Pengajaran Bahasa Indonesia. Yogyakarta : Deepublish. 192 hlm.
- Amanah, S. 2006. Penyuluhan perikanan. *Jurnal Penyuluhan*. **2** (4) :62-69.
- Ammanatie dan E. Sulistyowati. 2015. Structure education of teh Leaf of *Tithonia diversifolia* (Helms) Gray. *Jurnal Sains dan Matematika*. **23** (4) : 101-106.
- Arlofa, N. 2015. Uji kandung senyawa fitokimia kulit durian sebagai bahan aktif pembuatan sabun. *Junal Chemtech*. **1** (1) : 18-22.
- Austin, B., and D. A. Austin, 1987. Bacterial fish pathogens: Disease in Farmed and Wild Fish. Ellis Horwood Limited, Chichester, England. p 25.
- Bijanti, R., M. G. A. Yuliani, dan W. Tyasningsih. 2011. Antigenesity protein of *Aeromonas hydrophila* caused ulcer disease on Goldfish (*Cyprinus carpio* linn) using indirect ELISA technique. *Veteriner* . **1** (2) : 1-6.
- Carsel, H. R. 2018. Metodologi Penelitian Kesehatan dan Pendidikan. Yogyakarta : Penebar Media Pustaka. 260 hlm.
- Dalimartha, S., 2000, Atlas Tumbuhan Obat Indonesia, Trubus Agriwidya, Jakarta.
- Fauzzi, A dan S. Anna. 2005. Pemodelan Sumberdaya Perikanan dan Kelautan. Jakarta : Gramedia Pustaka Utama. 341 hlm.
- Fieser, F.L. 1961. Advanced Organic chemistry, Reinhold Publishing Co. New York. 800-804 hlm.
- Fifendy, M. 2017. Mikrobiologi Edisi Pertama. Penerbit Kencana: Depok. 240 hlm.

- Fitri, L dan Y, Yasmin. 2011. Isolasi dan pengamatan morfologi koloni bakteri *kitinolitik*. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi, Biologi Edukasi*. **3** (2) : 20-25.
- Ghufron, M dan H.Kordi. 2010. Panduan Lengkap Memelihara Ikan Air Tawar di Kolam Terpal. Yogyakarta. Lily Publisher. 282 hlm.
- Haryani, A., R. Grandiosa, I. D. Buwono dan A. Santika. 2012. Uji efektivitas daun papaya (*Clarica papaya*) untuk pengobatan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas koki (*Carassius auratus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **3** (3): 213-220.
- Hatmanti, A. 2003. Penyakit bakterial pada budidaya krustacea serta cara penangannya. *Oseana*. **28** (3) : 1-10.
- Hermanto, N. 2012. Daun Sukun Si Daun Ajaib Penakluk Aneka Penyakit. Jakarta Selatan : PT. Agromedia Pustaka. 110 hlm.
- Hidayat, S dan R. M. Napitupulu. 2015. Kitab Tumbuhan Obat. Jakarta : AgriFilo. 416 hlm.
- Irianto, A. 2005. Patologi Ikan Teleostei. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press. 256 hlm.
- Katrin, D., N. Idiawati dan B. Sitorus. 2015. uji aktivitas antibakteri dari ekstrak kasar daun malk (*Litsea gracieae* Vidal) terhadap bakteri *Stapylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *JKK*. **4** (1) : 7-12.
- Khairuman dan K. Amri. 2012. Pembesaran Nila di kolam Air deras. Jakarta Selatan. PT Agromedia Pustaka. iii + 92 hlm.
- Kurniawan, B dan W. F. Aryana. 2015. Binahong (*Cassia Alata* L) as in hibitor of *Escherichicola* growt. *J. MAJORITY*. **4** (4) : 100-104
- Kusmawarti, A dan N. Indriani. 2008. Daya hambat ekstrak kasar bahan aktif Biji Picung (*Pangium edule* Reinw.) terhadap pertumbuhan bakteri penghasil histamin. *Jurnal Pascapanen dan Bioteknologi Kelautan dan Perikanan*. **3** (1): 29-36.
- Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2012. Pelacakan Gen Aerolysin dari *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas yang Diberi Pakan Ekstrak kasar Bawang Putih. *Jurnal Veteriner*. **13** (1) : 43-50.
- Mahmuda, F. L dan S. Atun. 2017. Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak kasar etanol temukunci (*Boesenbergia pandurata*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. *Jurnal Penelitian Saintek*. **22** (1) : 59-66.
- Mahyuddin, K. 2010. Panduan Lengkap Agribisnis Patin. Depok : Penebar Swadaya. 212 hlm.
- Manuaba, I.B.G. 2003. Penuntun Kepaniteraan Klinik Obstetri Dan Ginekologi. Jakarta : EGC. 443 hlm.

- Minarno, E. B. 2016. Analisis kandungan saponin pada pada daun dan tangkai daun *Carica pubescens* Lenne & K. Koch. *El-Hayah*. 5 (4) : 143-152.
- Ningsih, W., Firmansyah dan S. Anggraini. 2016. Formulasi dan uji aktivitas antibakteri gel pembersih tangan ekstrak kasar etanol daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray). *Jurnal Ilmiah Farmasi*. 12 (2) : 79-85.
- Nuria, M. C., A. Faizatun, dan Sumantri. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, Dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu Perikanan*. 5 (2) : 26-37.
- Nurjannah. S., Isbiyantoro dan H. Fadillah. 2018. Ekstrak kasar daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray) sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus mutans* dan *Streptococcus sanguinis*. *Jurnal Farmasi Lampung*. 7 (1) : 33-40.
- Prajitno, A. 2007. Penyakit Ikan-Udang : Bakteri . Malang :Penerbit Universitas Negeri Malang. 107 hlm.
- Redha, A. 2010. : Struktur, Sifat Antioksidatif dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. 9 (2) : 196 – 202.
- Roihana, S., Sukoso dan S. Andayani. 2012. Aktivitas antibakteri ekstrak kasar Teripang *Holothuria sp.* terhadap bakteri *Vibrio harveyi* secara *In vitro*. *J.Exp. Life Sci*. 2 (1) : 1-5.
- Samsundari, S. 2006. Pengujian ekstrak kasar temulawak dan kunyit terhadap resistensi bakteri *Aeromonas hydrophila* yang menyerang Ikan Mas *Cyprinus carpio*. *GAMMA*. 2 (1) :78-83.
- Saparinto, C. 2008. Budidaya Ikan di Kolam Terpal. Jakarta : Penebar Swadaya. 99 hlm.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Yogyakarta : Kanisius. 244 hlm.
- Setiowati, T dan D. Furqonita. 2007. Biologi Interaktif. Jakarta : Azka Press. 220 hlm.
- Simanjuntak, P. 1995. Tumbuhan Sebagai Sumber Zat Aktif Sebagai Anti Malaria. *Bul. Penelit. Kesehat*. 23 (2) : 1-11.
- Sitanggang, M. 2008. Mengatasi Penyakit dan Hama pada Ikan Hias. Jakarta. Agromedia Pustaka. 54 hlm.
- Soleha, T. U. 2015. Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik. Mikrobiologi Fakultas Kedokteran. *Universitas Lampung*. 2 (2): 1-5.
- Sudjadi, B dan S. Laila. 2006. Biologi Sains Dalam Kehidupan. Bogor : Ghalia Indonesia Printing. 159 hlm.

- Sukadi, M.F. 2002. Peningkatan teknologi budidaya perikanan. *Jurnal Iktiologi Indonesia*. **2** (2) : 61-66.
- Sumayani., R. Kusdarwati dan Y. Cahyoko. 2008. Daya antibakteri perasan Rimpang Lengkuas (*Alpinia galanga*) dengan dosis berbeda terhadap pertumbuhan *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*. *Berkala Ilmiah Perikanan*. **3** (1) : 83-87.
- Sutrisno. 2007. Budidaya Ikan Air Tawar. Bekasi. Ganeca Extra. 75 hlm.
- Taofik. M., E. Yuianti, A. Barizi, dan E. K. Hayati. (2010) Isolasi dan identifikasi senyawa aktif ekstrak air daun paitan (*Tithonia diversifolia*) sebagai bahan insektisida botani untuk pengendalian hama tungau *Eriophyidae*. *Alchemi*. **2** (1) : 104-157.
- Trina, Fitmawati dan N. Sofiyanti. 2014. Identifikasi tumbuhan antidiabetes berdasarkan analisis kuantitatif asam tanat. *JOM FMIPA*. **1** (2) : 409 – 416.
- Verawati., M. Aria dan M. Novicaresa. 2011. Aktivitas anti inflamasi ekstrak kasar etanol daun Kembang Bulan *Tithonia diversifolia*. A. Grey terhadap mencit putih betina. *Scientia*. **1** (1) : 47-52.
- Wahdaningsih,S., E. K. Untari dan Y. Fauziah. 2014. Antibakteri *Fraksi n-Heksana Kulit Hylocereus polyrhizus* Terhadap *Staphylococcus epidermidis* dan *Propionibacterium acnes*. *Pharm Sci Res*. **1** (3) : 180 – 193.
- Wahjuningrum, D., M. Hasanah dan Rahman. 2016. Efikasi daun sembukan *Paederia foetida* untuk pencegahan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan nila. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **15** (2) : 108–116.
- Wahyuni, M., C. Saleh dan S. Kartika. 2015. Uji toksisitas (*Brine Shrimp Lethality Test*) dan uji aktivitas anti bakteri daun kembang bulan (*Tithonia diversifolia* A. Gray) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Mulawarman*. **12** (2) : 79-82.
- Wiyanto, D.B. 2010. Uji sktivitas antibakteri ekstrak kasar rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dan *Euचेuma denticullatum* terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyii*. *Jurnal Kelautan*. **3** (1) : 1-17.
- Yuliah. 2006. Tanaman Bunga di Sekitar Kita. Surabaya : PT. Citra Cipta Purwosari. 116 hlm.
- Yuliani, S dan S. Satuhu. 2012. Pandunan Lengkap Minyak Asiri. Jakarta : Penebar Swadaya. 204 hlm.
- Zahro, L dan R. Agustini. 2013. Uji efektifitas antibakteri ekstrak kasar saponin jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *UNESA Journal of Chemistry*. **2** (3) : 120-129.

Zulkarnain, M., P. Purwanti dan E. Indrayani. 2013. Analsisi pengaruh nilai produksi perikanan budidaya terhadap produksi domestik bruto sektor perikanan di Indonesia. *Jurnal ESCOFiM*. 1(1) : 52-68.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Fungsi

No.	Alat	Kegunaan
1.	Autoklaf	Sebagai alat untuk mensterilisasi peralatan yang akan digunakan.
2.	Kulkas	Sebagai tempat penyimpanan bahan pada suhu dingin.
3.	Cawan Petri	Sebagai tempat untuk uji cakram.
4.	Erlenmeyer 500 ml	Tempat pembuatan media.
5.	Toples 3000 ml	Sebagai tempat maserasi.
6.	Gelas ukur 100 ml	Sebagai alat untuk mengukur larutan.
7.	Bunsen	Untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada saat perlakuan.
8.	Tabung Reaksi	Sebagai tempat untuk peremajaan bakteri.
9.	Hot Plate	Sebagai alat pemanas media.
10.	Timbangan digital	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-2} .
11.	Timbangan Analitik	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-3} .
12.	<i>Vortex Mixer</i>	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan.
13.	Jerigen 5 Liter	Tempat penyimpanan etanol 95%.
14.	Mikropipet 10-100 μ l	Untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan.
15.	Nampan	Sebagai tempat menyimpan alat.
16.	<i>Washing bottle</i>	Sebagai tempat menyimpan akuades.
17.	<i>Sprayer</i>	Sebagai tempat menyimpan alkohol.
18.	<i>Rotatory Evaporator</i>	Sebagai alat untuk menguapkan daun yang telah dimaserasi
19.	Botol Sampel \pm 50 ml	Sebagai tempat penyimpanan sampel.
20.	LAF (<i>Laminary Air Flow</i>)	Sebagai tempat dilakukannya perlakuan.
21.	Inkubator	Sebagai alat untuk menginkubasi.
22.	Spatula	Sebagai alat untuk mengambil bahan.

Lampiran 2. Bahan dan Fungsi

No	Bahan	Kegunaan
1.	Etanol 95%	Sebagai bahan pelarut.
2.	Daun Kipahit (<i>T. diversifolia</i>)	Sebagai bahan yang digunakan untuk ekstraksi.
3.	TSA (<i>Trypticase Soy Agar</i>)	Sebagai media agar bakteri.
4.	TSB (<i>Trytitone Soy Broth</i>)	Sebagai media pembiakan bakteri.
5.	Bakteri <i>A. hydrophila</i>	Sebagai bakteri yang akan digunakan pada saat perlakuan.
6.	Aquades	Sebagai bahan pelarut.
7.	Kertas Cakram	Sebagai bahan untuk mengetahui zona bening dari ekstrak yang digunakan.
8.	DMSO (<i>Dimetil Sulfoksida</i>) 10%	Sebagai pelarut ekstrak.
9.	Kapas	Sebagai penutup alat yang akan disterilisasi.
10.	Kertas Saring <i>Whattman</i> No. 41	Sebagai penyaring bahan yang telah di maserasi.
11.	Alumunium Foil	Sebagai penutup seluruh bagian toples pada saat proses maserasi.
12.	Plastik Wrap	Sebagai pembungkus botol sampel.
13.	Spirtus	Sebagai bahan bakar bunsen.
14.	Plastik 2 kg	Sebagai bahan pembungkus cawan petri dan tabung reaksi pada saat di destruksi.
15.	Alkohol 70%	Sebagai bahan aseptis.
16.	Larutan Kristal Violet	Sebagai pewarna utama yang berwarna ungu.
17.	Larutan Iodin	Sebagai larutan yang memperkuat warna.
18.	Larutan Safranin	Sebagai pewarna sekunder yang berwarna merah.

Lampiran 3 Alat- alat Penelitian



Autoklaf



Kulkas



LAF (Laminary Air Flow)



Nampan



Inkubator



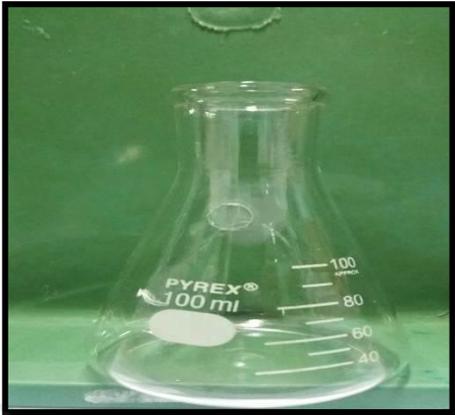
Destruktor



Lampiran 3. (lanjutan)



Cawan Petri



Erlenmeyer



Beaker Glass



Gelas Ukur



Hot Plate



Bunsen

Lampiran 3. (lanjutan)



Mikropipet



Botol Film



Vortex Mixer



Sprayer



Toples Kaca



Jarum Ose

Lampiran 3. (lanjutan)



Triangle



Spatula



Wassing Bottle



Mikroskop



Rak Tabung Reaksi



Tabung Reaksi

Lampiran 3. (lanjutan)



Pinset



Jangka Sorong Digital



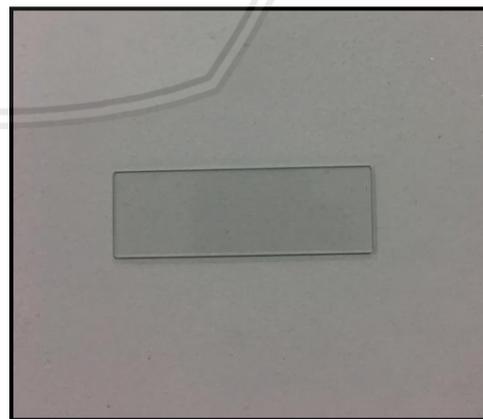
Rotary Evaporator



Pipet Volume



Corong



Objek Glass

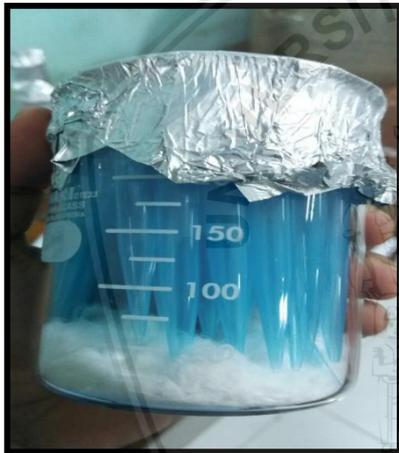
Lampiran 3. (lanjutan)



Pipet Tetes



Blender

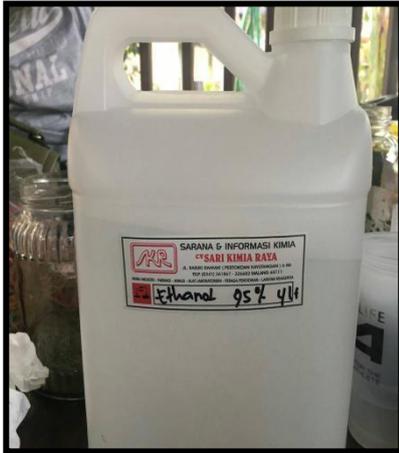


Blue tip



Yellow Tip

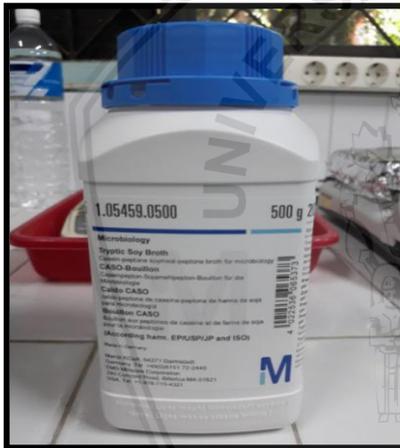
Lampiran 4. Bahan- bahan Penelitian



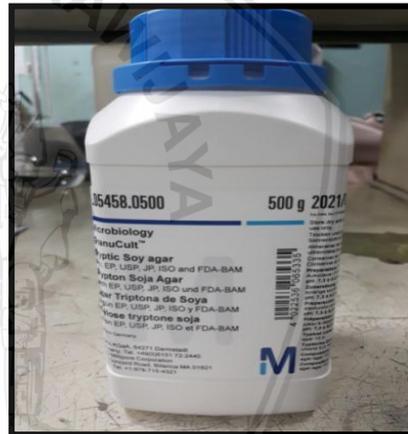
Etanol 95%



Aquades



TSB (*Triphthone Soy Broth*)



TSA (*Trypticase Soy Agar*)



Plastik Wrap



Alumunium Foil

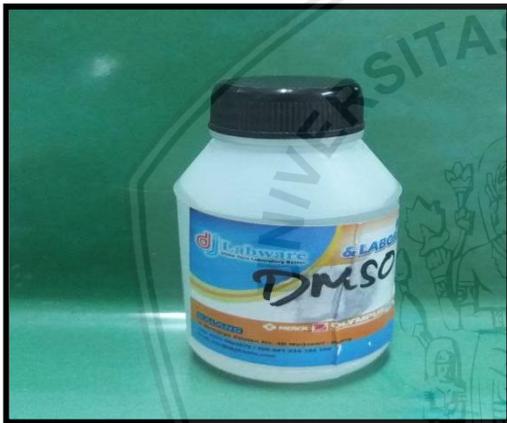
Lampiran 4. (lanjutan)



Kertas Saring



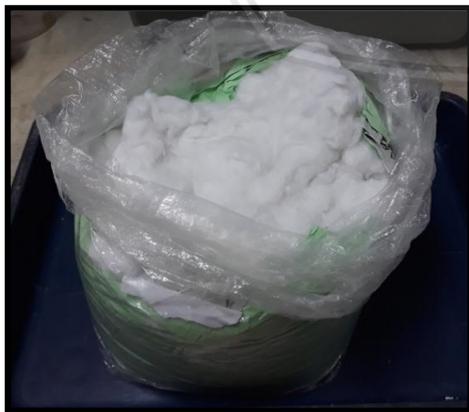
Sarung Tangan



DMSO 10%



Kertas Cakram

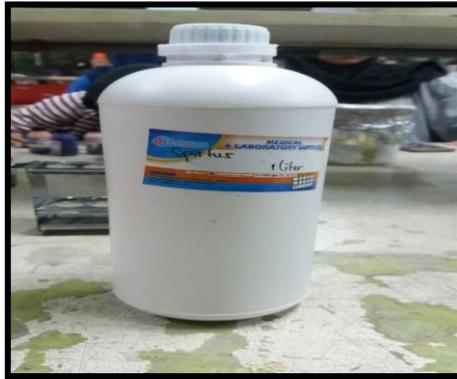


Kapas

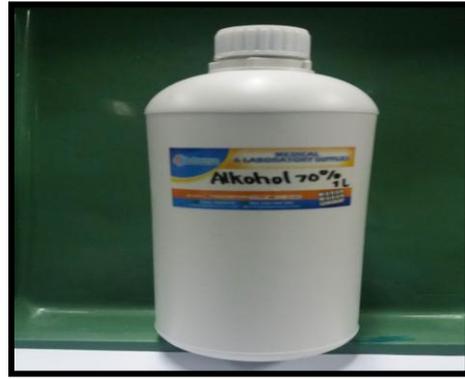


Kertas

Lampiran 4. (lanjutan)



Spirtus



Alkohol 70%



Daun Kipahit



Bakteri *A. hydrophila*



Larutan Kristal Violet



Larutan Iodin

Lampiran 5. Perhitungan Ekstrak Kasar Dosis Uji

Pelarut yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kasar dosis uji yaitu DMSO 10%, adapun perhitungan dosis yang digunakan sebagai berikut:

a. Dosis 5000 ppm

Pembuatan dosis 5000 ppm merupakan dosis stok ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*) tertinggi yang digunakan dalam pembuatan dosis 500 – 2500 ppm.

- Pembuatan stok ekstrak kasar sebesar 5000 ppm dengan rumus berikut:

$$5000 \text{ ppm} = \frac{25 \text{ mg}}{5 \text{ ml DMSO } 10\% (0,5 \text{ ml DMSO } 100\% + 4,5 \text{ ml aquades steril})}$$

b. Dosis 0 ppm

Pembuatan dosis 0 ppm adalah perlakuan tanpa adanya campuran dari ekstrak kasar daun kipahit (*T. diversifolia*).

c. Dosis 500 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 2 \text{ ml} \times 500 &= V_2 \times 5000 \\ V_2 &= 0,2 \text{ ml} \\ \text{DMSO } 10\% &= 2 \text{ ml} - 0,2 \text{ ml} = 1,8 \text{ ml} \end{aligned}$$

d. Dosis 1000 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 2 \text{ ml} \times 1000 &= V_2 \times 5000 \\ V_2 &= 0,4 \text{ ml} \\ \text{DMSO } 10\% &= 2 \text{ ml} - 0,4 \text{ ml} = 1,6 \text{ ml} \end{aligned}$$

Lampiran 5. Perhitungan Ekstrak Kasar Dosis Uji (Lanjutan)

e. Dosis 1500 ppm

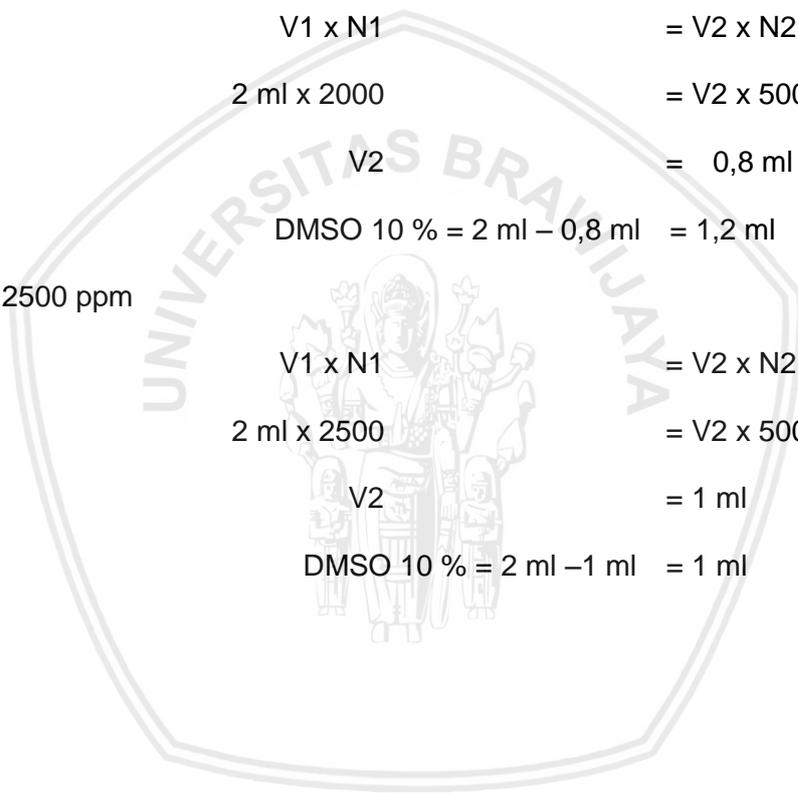
$$\begin{aligned}
 V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\
 2 \text{ ml} \times 1500 &= V_2 \times 5000 \\
 V_2 &= 0,6 \text{ ml} \\
 \text{DMSO } 10 \% &= 2 \text{ ml} - 0,6 \text{ ml} = 1,4 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

f. Dosis 2000 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\
 2 \text{ ml} \times 2000 &= V_2 \times 5000 \\
 V_2 &= 0,8 \text{ ml} \\
 \text{DMSO } 10 \% &= 2 \text{ ml} - 0,8 \text{ ml} = 1,2 \text{ ml}
 \end{aligned}$$

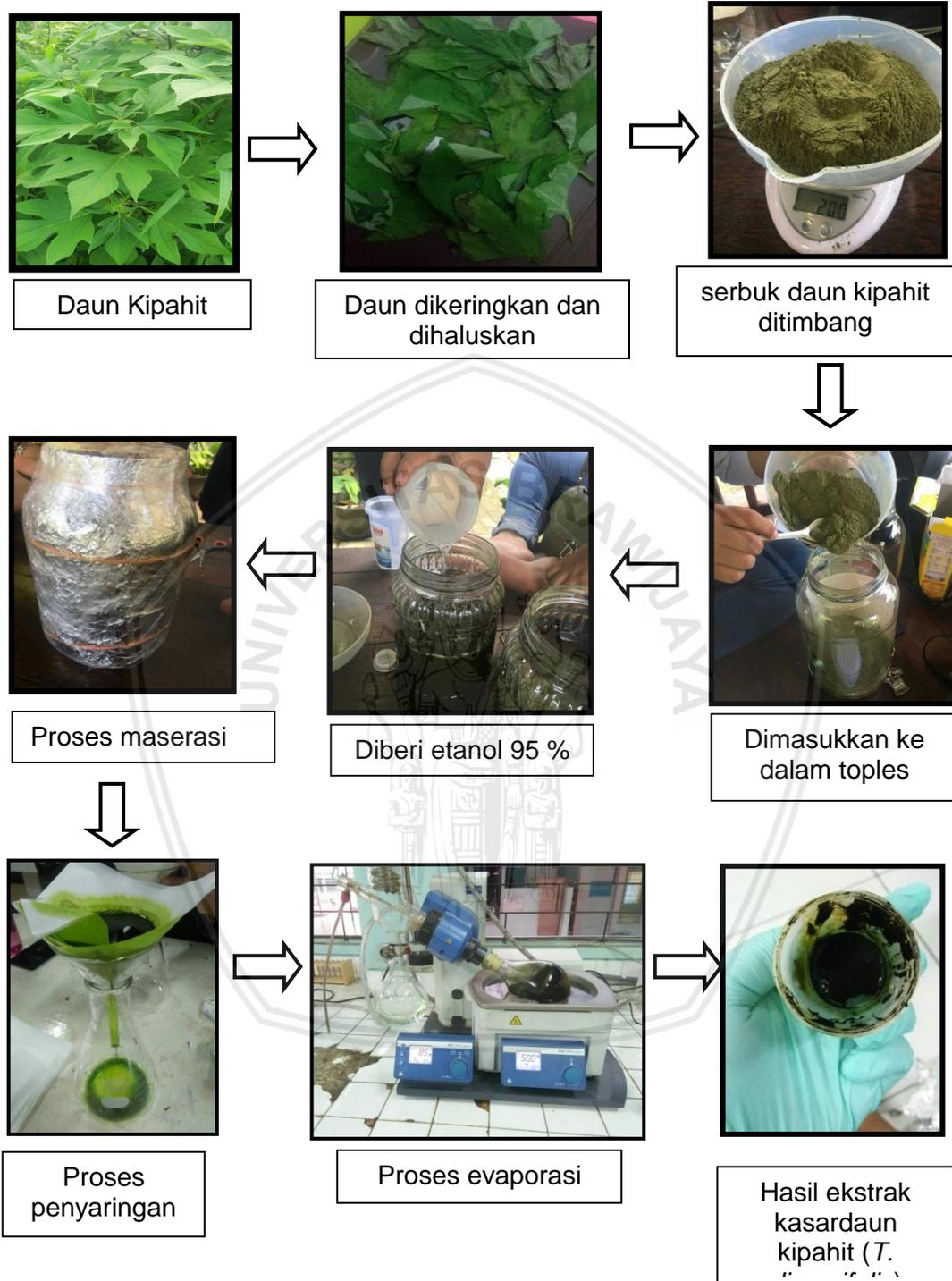
g. Dosis 2500 ppm

$$\begin{aligned}
 V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\
 2 \text{ ml} \times 2500 &= V_2 \times 5000 \\
 V_2 &= 1 \text{ ml} \\
 \text{DMSO } 10 \% &= 2 \text{ ml} - 1 \text{ ml} = 1 \text{ ml}
 \end{aligned}$$



Lampiran 6. Kegiatan Penelitian

A. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Kipahit (*T. diversifolia*)



Lampiran 6. (lanjutan).

B. Peremajaan Bakteri *A. hydrophila*



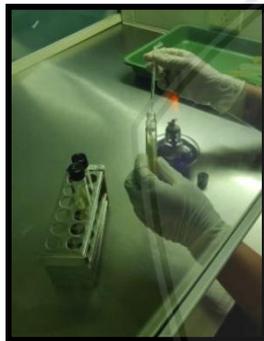
Media TSA ditimbang



Media dicampur dengan akuades



Media dipanaskan diatas hot plate dan diaduk



Bakteri diambil dari isolat murni



Media dimiringkan



Proses sterilisasi

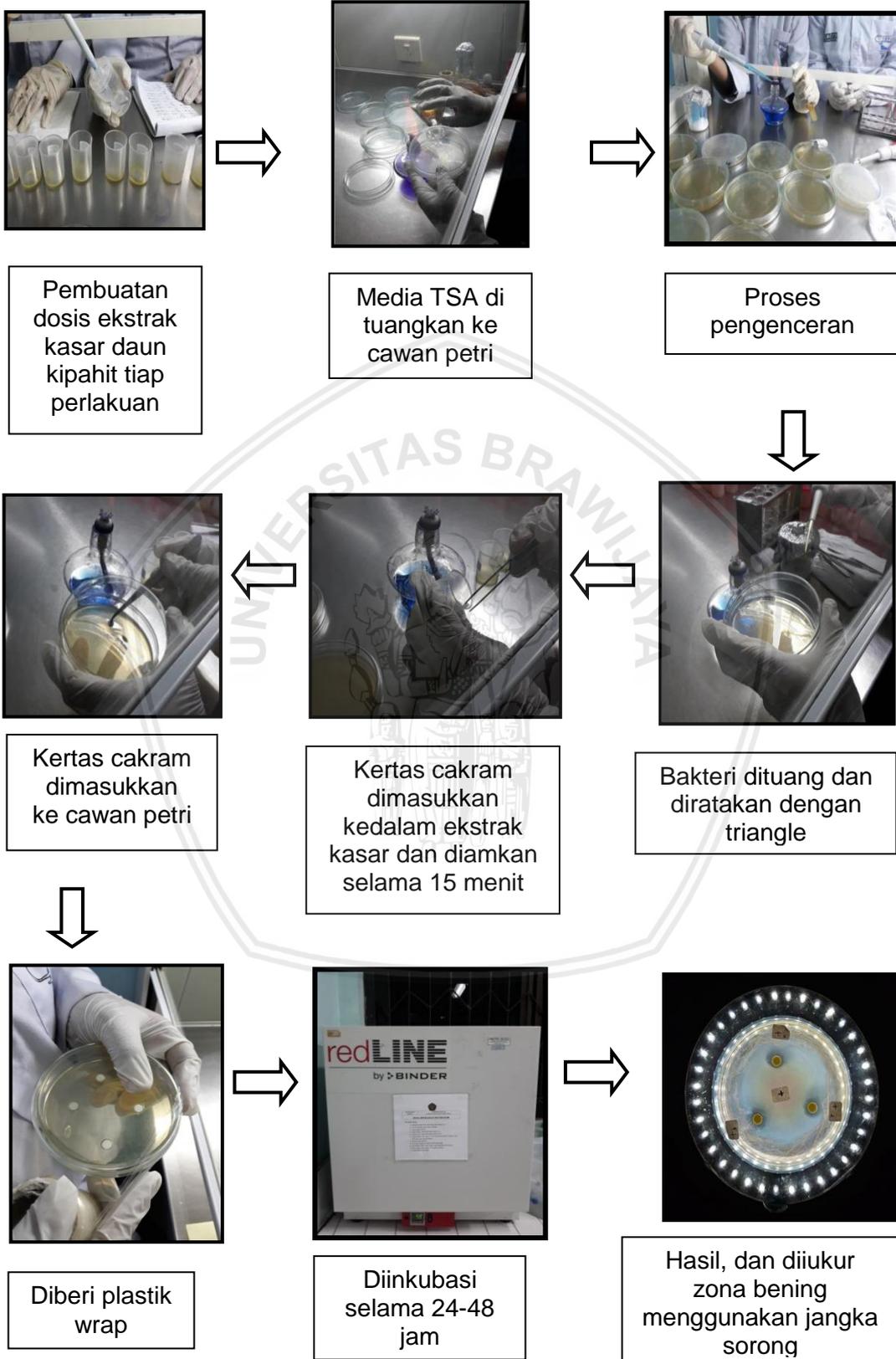


Digoreskan kedalam media agar miring



Diinkubasi selama 24 jam

Lampiran 6. (lanjutan)
C. Pelaksanaan Uji Cakram



Lampiran 7. Hasil Uji Biokimia Bakteri *A. hydrophila* dari BBPAP Jepara



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
www.bbpbapjepara.djpb.kkp.go.id ; Email: bbpbajpr@gmail.com

HASIL UJI BIOKIMIA

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

Uji Bio Kimia	Isolat
	<i>Aeromonas hydrophilla</i>
Gram	—
Bentuk	Batang
Katalase	+
Oksidase	+
H ₂ S	—
Indol	+
Motil	+
OF medium	Fermentatif
VP	+
MR	—
Gelatin	+
Urea	—
Glukosa	+
Sukrosa	+

Lab. Mikrobiologi BBPAP Jepara
Penyelia



Si Murti Astuti, SP.



Lampiran 8. Hasil Uji Fitokimia



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU
Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 34D / 102.7 / 2019
Sifat : Biasa
Perihal : Surat Keterangan Analisa Kualitatif

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

1. Identitas Pemohon
Nama : Dana Ma'arijita
NIM : 155080501111011
Fakultas : Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya
Alamat Instansi : Malang

2. Identitas Sampel
Nama daerah sampel : Insulin
Nama latin : *Tithonia diversifolia*
Bagian Sampel : Daun
Bentuk sampel : Ekstrak
Pelarut : Etanol 95%
Tanggal penerimaan : 09 April 2019
Tanggal pemeriksaan : 11 April 2019

3. Hasil

No	Identifikasi Senyawa	Parameter	Hasil
1.	Flavonoid	Merah Bata, Merah Muda, Merah Tua	Negatif
2.	Alkaloid		
	Meyer	Endapan Putih	Positif
	Dragendrof	Endapan Jingga	Positif
	Bouchardat	Endapan Cokelat	Positif
3.	Tanin	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman, Coklat Kehitaman	Positif
4.	Saponin	Busa Permanen	Positif

4. Lampiran

Nama Sampel	Flavonoid	Alkaloid		
		Meyer	Dragendrof	Bouchardat
Daun Insulin (<i>Tithonia diversifolia</i>)				
Nama Sampel	Tanin	Saponin		
Daun Insulin (<i>Tithonia diversifolia</i>)				

5. Pustaka
• Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1978. "Materia Medika Indonesia", Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

15 April 2019
Kepala UPT Laboratorium Herbal
MATERIA MEDICA BATU

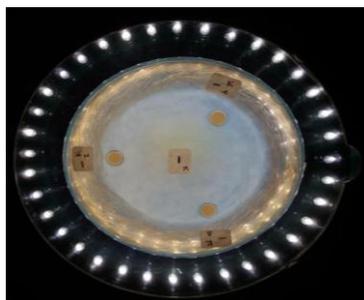
H. Hossin RM, Drs., Apt., MKes.
NIP.19611102 199103 1 003



Lampiran 9. Hasil Uji Daya Hambat



K (+)



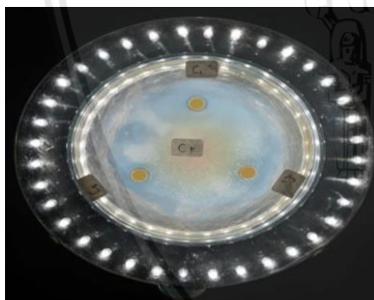
K (-)



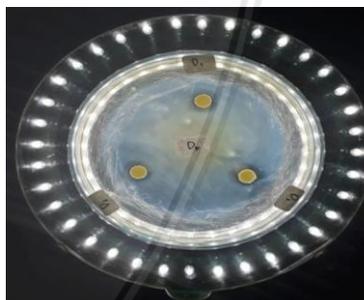
A (500 ppm)



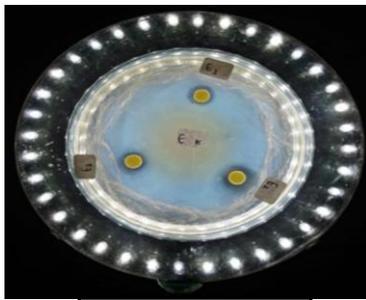
B (1000 ppm)



C (1500 ppm)



D (2000 ppm)



E (2500 ppm)

Lampiran 10. Analisa Data Pengaruh Daya Hambat Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Kipahit (*T. diversifolia*) terhadap Zona Hambatan (mm) Bakteri *A. hydrophila* Secara *in Vitro*

- Data Rata-rata Zona Hambatan (mm) Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata±SD
	1	2	3		
A (500 ppm)	9,1	9,46	9,28	27,840	9,280 ± 0,180
B (1.000 ppm)	11,27	9,38	9,14	29,790	9,930 ± 1,167
C (1.500 ppm)	9,67	11,16	10,59	31,420	10,473 ± 0,752
D (2.000 ppm)	11,01	11,96	10,98	33,950	11,317 ± 0,557
E (2.500 ppm)	11,69	13,47	10,64	35,800	11,933 ± 1,431
K (-)	6,08	6,25	6,03	18,360	6,120 ± 0,115
K (+)	12,68	13,76	11,16	37,600	12,533 ± 1,306
	Total			214,760	

Perhitungan :

- Faktor Korelasi = $\frac{G^2}{N}$

$$= \frac{214,760^2}{21}$$

$$= 2196,28$$
- JK Total = $\sum y^2 - FK$

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

$$= (9,1^2 + 9,46^2 + 9,28^2 + 11,27^2 + \dots) - 2196,28$$

$$= 94,065$$
- JK Perlakuan = $\frac{(\sum A)^2 + (\sum B)^2 + (\sum C)^2 + (\sum D)^2 + (\sum E)^2}{n} - FK$

$$= \frac{27,480 + 29,790 + 31,420 + 33,950 + 35,800}{3} - 2196,28$$

$$= 81,994$$
- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan

$$= 94,065 - 81,994 = 12,071$$
- db Total = $(n \times r) - 1$

$$= (7 \times 3) - 1 = 20$$



Lampiran10. (lanjutan)

6. db Perlakuan = n – 1
= 7 – 1 = 6

7. db Galat = db Total – db Perlakuan
= 20 – 6
= 14

• Tabel Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	6	81,994	13,666	15,850**	2,85	4,46
Acak	14	12,071	0,862			
Total	20	94,065				

Keterangan : ** Berbeda Sangat Nyata

Karena F hitung lebih besar dari F tabel 5% dan F tabel 1% maka diperoleh hasil Berbeda nyata. Sehingga dilanjutkan dengan uji BNT.

Uji BNT (Uji Nyata Terkecil)

$$SED = \sqrt{\frac{2KT \text{ Acak}}{\pi (\text{ulangan})}} = \sqrt{\frac{2 \times 0,862}{3}} = 0,758$$

BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED = 2,14479 x 0,758 = 1,626

• Tabel Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Perlakuan	Rerata	K- 6,12	A 9,28	B 9,93	C 10,47	D 11,32	E 11,93	K+ 12,53	Notasi
K-	6,12								a
A	9,28	3,16*							b
B	9,93	3,81*	0,65 ^{ns}						bc
C	10,47	4,35*	1,19 ^{ns}	0,54 ^{ns}					bc
D	11,32	5,20*	2,04*	1,39 ^{ns}	0,84 ^{ns}				c
E	11,93	5,81*	2,65*	2,00*	1,46 ^{ns}	0,62 ^{ns}			c
K+	12,53	6,41*	3,25*	2,60*	2,06*	1,22 ^{ns}	0,60 ^{ns}		c

Keterangan :

ns : tidak berbeda nyata

* : berbeda sangat nyata



Lampiran 10. (lanjutan)

Perlakuan terbaik dari uji BNT ini adalah K+/E/D-C/B/A-K-, selanjutnya dilakukan uji polynomial orthogonal

- Tabel Uji Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	27,84	-2	2	-1	1
B	29,79	-1	-1	2	-4
C	31,42	0	-2	0	6
D	33,95	1	-1	-2	-4
E	35,8	2	2	1	1
Q= Σci*Ti		20,080	0,700	-0,360	-2,800
Hasil Kuadrat		10	14	10	70
Kr= (Σci^2)*r		30	42	30	210
JK=Q^2/Kr		13,440	0,01167	0,004	0,037

- Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	13,494			3,48	5,99
Linier	1	13,440	13,440	15,570	**	
Kuadratik	1	0,012	0,012	0,014	Ns	
Kubik	1	0,004	0,004	0,005	Ns	
Kuartik	1	0,037	0,037	0,043	Ns	
Acak	10	8,632	0,863	1	Ns	
Total	14					

Keterangan :

Ns : tidak berbeda nyata
 ** : berbeda sangat nyata

$$\begin{aligned}
 1. \text{ KT Linier} &= \frac{\text{JK linier}}{\text{db linier}} \\
 &= \frac{13,440}{1} \\
 &= 13,44
 \end{aligned}$$

Lampiran 10. (lanjutan)

$$\begin{aligned}
 2. \text{ KT Kuadrat} &= \frac{\text{JK kuadrat}}{\text{db kuadrat}} \\
 &= \frac{0,012}{1} \\
 &= 0,012
 \end{aligned}$$

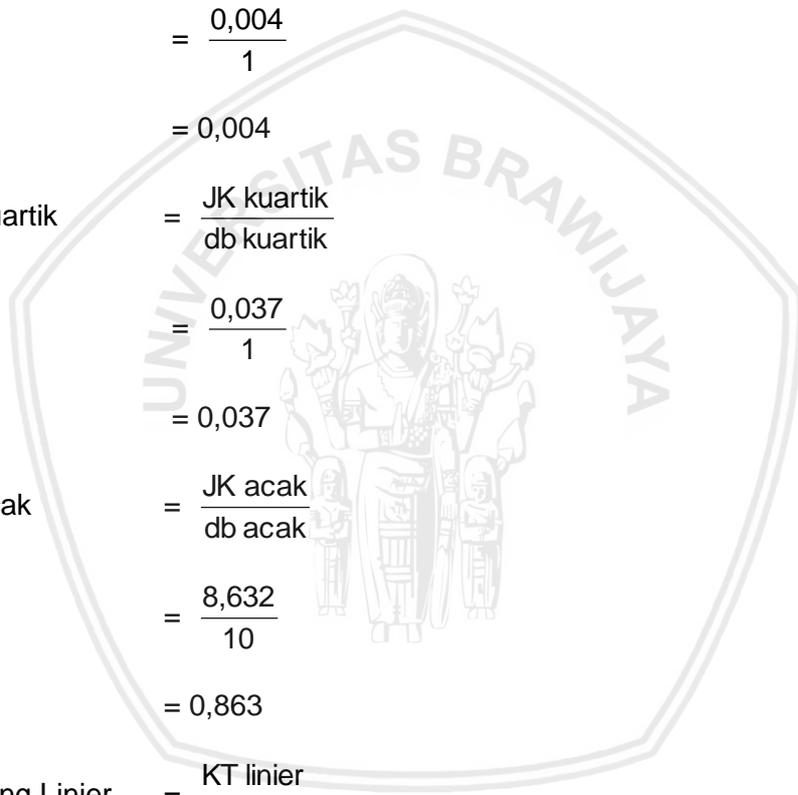
$$\begin{aligned}
 3. \text{ KT Kubik} &= \frac{\text{JK kubik}}{\text{db kubik}} \\
 &= \frac{0,004}{1} \\
 &= 0,004
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 4. \text{ KT Kuartik} &= \frac{\text{JK kuartik}}{\text{db kuartik}} \\
 &= \frac{0,037}{1} \\
 &= 0,037
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 5. \text{ KT Acak} &= \frac{\text{JK acak}}{\text{db acak}} \\
 &= \frac{8,632}{10} \\
 &= 0,863
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 6. \text{ F Hitung Linier} &= \frac{\text{KT linier}}{\text{KT acak}} \\
 &= \frac{13,440}{0,863} \\
 &= 15,570
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 7. \text{ F Hitung Kuadrat} &= \frac{\text{KT kuadrat}}{\text{KT acak}} \\
 &= \frac{0,012}{0,863} \\
 &= 0,014
 \end{aligned}$$



Lampiran 10. (lanjutan)

$$\begin{aligned}
 8. \text{ F Hitung Kubik} &= \frac{\text{KT kubik}}{\text{KT acak}} \\
 &= \frac{0,004}{0,863} \\
 &= 0,005
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 9. \text{ F Hitung Kuartik} &= \frac{\text{KT kuartik}}{\text{KT acak}} \\
 &= \frac{0,037}{0,863} \\
 &= 0,043
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 10. \text{ F Hitung Acak} &= \frac{\text{KT acak}}{\text{KT acak}} \\
 &= \frac{0,863}{0,863} \\
 &= 1
 \end{aligned}$$

Hasil sidik ragam polinomial orthogonal diatas menunjukkan bahwa nilai F hitung linier berbeda sangat nyata terhadap nilai F hitung 5% dan 1% yaitu 15,570.

- Mencari persamaan linier $y=b_0+b_1x$

X	Y	XY	X ²
500	9,00	4500	250000
500	9,46	4730	250000
500	9,28	4640	250000
1000	11,27	11270	1000000
1000	9,38	9380	1000000
1000	9,14	9140	1000000
1500	9,67	14505	2250000
1500	11,16	16740	2250000
1500	10,59	15885	2250000
2000	11,01	22020	4000000



2000	11,96	23920	4000000
2000	10,98	21960	4000000
2500	11,69	29225	6250000
2500	13,47	33675	6250000
2500	10,64	26600	6250000
<hr/>			
$\Sigma x = 22500$	158,7	248190	41250000
<hr/>			
Rerata = 1500	10,58		
<hr/>			

$$\begin{aligned}
 b_1 &= \frac{(\Sigma xy) - \frac{(\Sigma x \Sigma y)}{n}}{(\Sigma x^2) - \frac{(\Sigma x)^2}{n}} \\
 &= \frac{(248190) - \left(\frac{22500 \times 158,7}{15}\right)}{4125000 - \frac{22500^2}{15}} \\
 &= \frac{248190 - 238050}{4125000 - 33750} \\
 &= \frac{10140}{750000} \\
 &= 0,001352
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 b_0 &= \frac{(\Sigma y)}{n} - (b_1 \cdot \frac{(\Sigma x)}{n}) \\
 &= \frac{158,7}{15} - 0,001352 \left(\frac{22500}{15}\right) \\
 &= 10,58 - (0,001352 \times 1500) \\
 &= 10,58 - 2,028 = 8,552
 \end{aligned}$$

Persamaan Linier : $y = b_0 + b_1 x$

$$= 8,552 + 0,0014 x$$

$$\begin{aligned}
 X(500) &= 8,552 + 0,0014 (500) \\
 &= 8,552 + 0,7 \\
 &= 9,252
 \end{aligned}$$

Lampiran 10. (lanjutan)

$$\begin{aligned} X(1000) &= 8,552 + 0,0014 (1000) \\ &= 8,552 + 1,4 \\ &= 9,952 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} X(1500) &= 8,552 + 0,0014 (1500) \\ &= 8,552 + 2,1 \\ &= 10,652 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} X(2000) &= 8,552 + 0,0014 (2000) \\ &= 8,552 + 2,8 \\ &= 11,352 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} X(2500) &= 8,552 + 0,0014 (2500) \\ &= 8,552 + 3,5 \\ &= 12,052 \end{aligned}$$

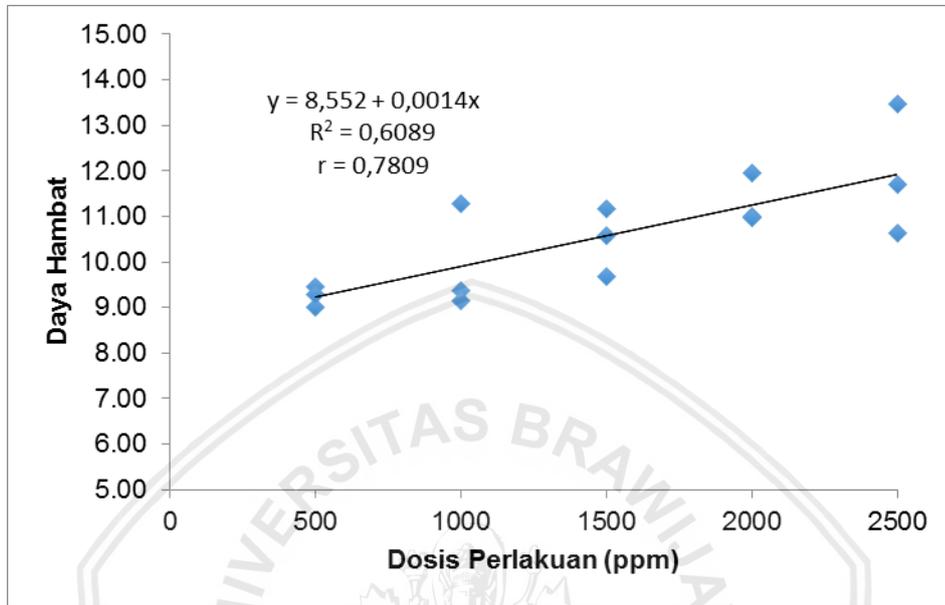
$$\begin{aligned} R^2 &= \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Linier} - \text{JK Acak}} \\ &= \frac{13,440}{13,440 + 8,632} \\ &= \frac{13,440}{22,072} \\ &= 0,6089 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} r &= \sqrt{R^2} \\ &= \sqrt{0,609^2} \\ &= 0,7809 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan b_0 dan b_1 , maka didapatkan persamaan linier sebagai berikut : $y = 8,552 + 0,0014 x$

Lampiran 10. (Lanjutan)

- Grafik Hubungan Zona Hambat Antar Perlakuan Ekstrak kasar daun Kipahit (*T. diversifolia*) terhadap bakteri *A. hydrophila*



Lampiran 11. Data Perbandingan Ukuran Zona Bening Pada Pengukuran 24 jam dan 48 jam.

Perlakuan	Ulangan	Pengukuran			
		24 Jam	Rata-Rata 24 jam	48 jam	Rata-rata 48 jam
A	1	9.1		9.27	
	2	9.46	9.28	9.76	9.50
	3	9.28		9.48	
B	1	11.27		12.29	
	2	9.38	9.93	10.22	10.62
	3	9.14		9.34	
C	1	9.67		9.73	
	2	11.16	10.47	12.25	11.00
	3	10.59		11.03	
D	1	11.01		11.44	
	2	11.96	11.32	12.12	11.59
	3	10.98		11.21	
E	1	11.69		13.02	
	2	13.47	11.93	13.89	12.71
	3	10.64		11.21	
K-	1	6.08		6.12	
	2	6.25	6.12	7.11	6.65
	3	6.03		6.71	
K+	1	12.68		13.19	
	2	13.76	12.53	14.75	13.53
	3	11.16		12.65	