

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SEMBUKAN
(*Paederia foetida* L.) TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas fluorescens*
SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh

**RUSYDA NUR ADILAH
NIM. 155080501111028**



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

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SEMBUKAN
(*Paederia foetida* L.) TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas fluorescens*
SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

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

Oleh:

**RUSYDA NUR ADILAH
NIM. 155080501111028**



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

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK DAUN SEMBUKAN
(*Paederia foetida* L.) TERHADAP BEKTERI *Pseudomonas fluorescens*
SECARA *IN VITRO***

Oleh:

**RUSYDA NUR ADILAH
NIM. 155080501111028**

Telah dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal 15 Mei 2019
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat



Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP

Dr. W. M. Firdaus, MP
NIP. 19680919 200501 1 001
Tanggal: 25 JUN 2019

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

A handwritten signature in black ink, which appears to be 'Arief Praitno'.

Prof. Dr. Ir. Arief Praitno, MS
NIP. 19550213 198403 1 001
Tanggal: 25 JUN 2019

IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sembukan (*Paederia foetida* L.) Terhadap Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara *In Vitro*

Nama Mahasiswa : Rusyda Nur Adilah

Nim : 155080501111028

Program Studi : Budidaya Perairan

PENGUJI PEMBIMBING:

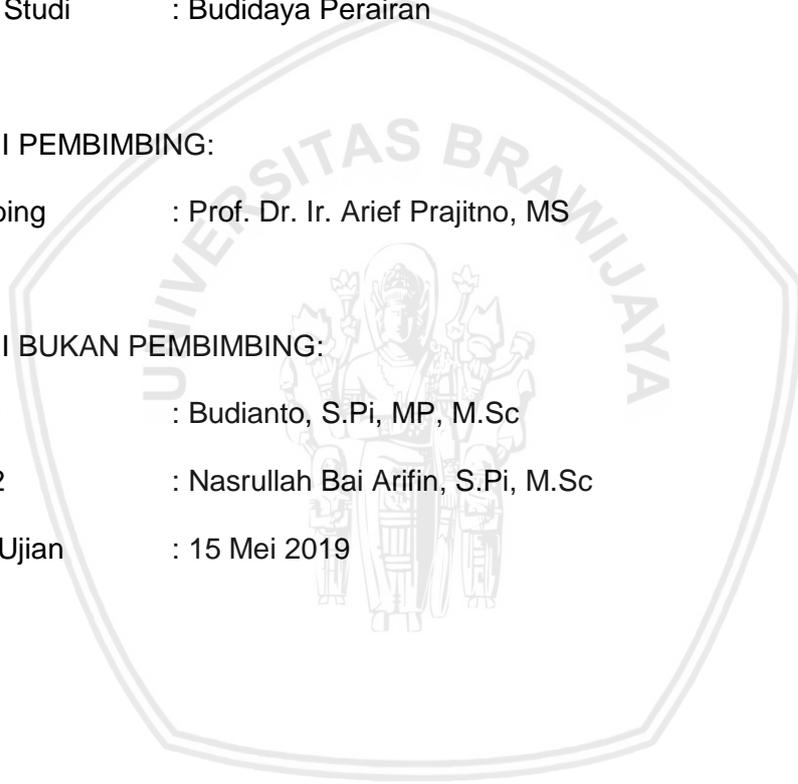
Pembimbing : Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING:

Penguji 1 : Budianto, S.Pi, MP, M.Sc

Penguji 2 : Nasrullah Bai Arifin, S.Pi, M.Sc

Tanggal Ujian : 15 Mei 2019



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah tertulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka. Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya akan menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, 15 Mei 2019

Mahasiswa

Rusyda Nur Adilah

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT karena atas kelimpahan rahmat dan hidayahnya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini. Penulis juga menyampaikan ucapan terimakasih kepada:

1. Kedua orang tua Bapak Makin dan Ibu Nunik Rohmawati yang telah memberikan bantuan moril maupun materil selama pelaksanaan kegiatan penelitian ini.
2. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku pembimbing yang telah meluangkan waktu memberikan ilmu maupun materil serta bimbingan dalam pelaksanaan penelitian ini.
3. Budianto, S.Pi, MP, M.Sc dan Nasrullah Bai Arifin, S.Pi, M.Sc selaku dosen penguji atas dedikasi dan juga waktu untuk hadir dalam ujian skripsi penulis.
4. Seluruh pihak yang membantu selama proses penelitian skripsi ini.

Malang, 15 Mei 2019

Penulis

RINGKASAN

Rusyda Nur Adilah. Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sembukan (*Paederia foetida* L.) Terhadap Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara *In Vitro*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.**

P. fluorescens merupakan bakteri gram negatif yang ada di lingkungan yang beragam. Bakteri ini termasuk bakteri patogen terhadap berbagai ikan budidaya. Ciri khas dari bakteri ini adalah penyebab infeksi sekunder pada ikan, tetapi patogenitasnya lebih rendah. Penginfeksiannya bakteri ini dapat menyebabkan kematian masal, dimana terjadi lesi hemoragik pada kulit dan dasar kulit serta menyebabkan hemoragi petechial terlihat jelas pada insang, ginjal, hati, lumen dan submukosa usus.

Salah satu pengobatan yang dilakukan dengan menggunakan antibiotik dan imunostimulan. Pemberian antibiotik secara terus menerus dapat menyebabkan organisme patogen menjadi resisten. Penggunaan bahan-bahan alami seperti fitofarmaka sebagai obat yang mengandung zat imunostimulan dan antibakterial. Tumbuhan *P. foetida* L. digunakan sebagai tanaman obat yang berfungsi sebagai antibiotik, anti fungi.

Penelitian ini bertujuan mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi yang berbeda sebagai salah satu bahan untuk uji daya hambat bakteri *P. fluorescens* 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 – Maret 2019.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan 2 kontrol, yaitu kontrol positif dan negatif. Rancangan penelitian yang dilakukan dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 5 perlakuan dengan 3 kali ulangan. Konsentrasi ekstrak daun *P. foetida* L. yang digunakan yaitu 2% (A), 4% (B), 6% (C), 8% (D), 10% (E). Uji fitokimia dilakukan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang ada didalam daun *P. foetida* L. lalu diperoleh hasil senyawa aktif berupa flavonoid, tanin, triterpenoid, polifenol, serta saponin yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. terhadap bakteri *P. fluorescens* diperoleh hasil berbeda sangat nyata yaitu pada pengamatan diameter zona bening didapatkan nilai tertinggi pada perlakuan 4% (B) dengan rata-rata zona bening sebesar 2,90 mm, sedangkan rata-rata zona bening terendah pada perlakuan 10% (E) sebesar 15,95 mm. Zona bening yang dihasilkan pada hasil uji polinomial ortogonal menunjukkan hasil kuadratik dengan koefisien nilai determinasi $R^2 = 0,82$ dengan persamaan $y = 10,507 - 4,157 X_j + 0,367 X_j^2$, berdasarkan persamaan tersebut didapatkan konsentrasi optimum pada 5,663% diperoleh rerata zona hambat sebesar 22,279 mm.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa atas berkah, karunia serta ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Daun Sembukan (*Paederia foetida* L.) Terhadap Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara *In Vitro*”. Penulis mengucapkan terimakasih kepada Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS. selaku dosen pembimbing skripsi dan semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan laporan.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan dalam laporan ini, oleh karena itu penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Penulis berharap laporan ini dapat bermanfaat bagi penulis pada khususnya dan pembaca pada umumnya. Demikian penulis sampaikan, terimakasih.

Malang, 15 Mei 2019

Penulis

DAFTAR ISI

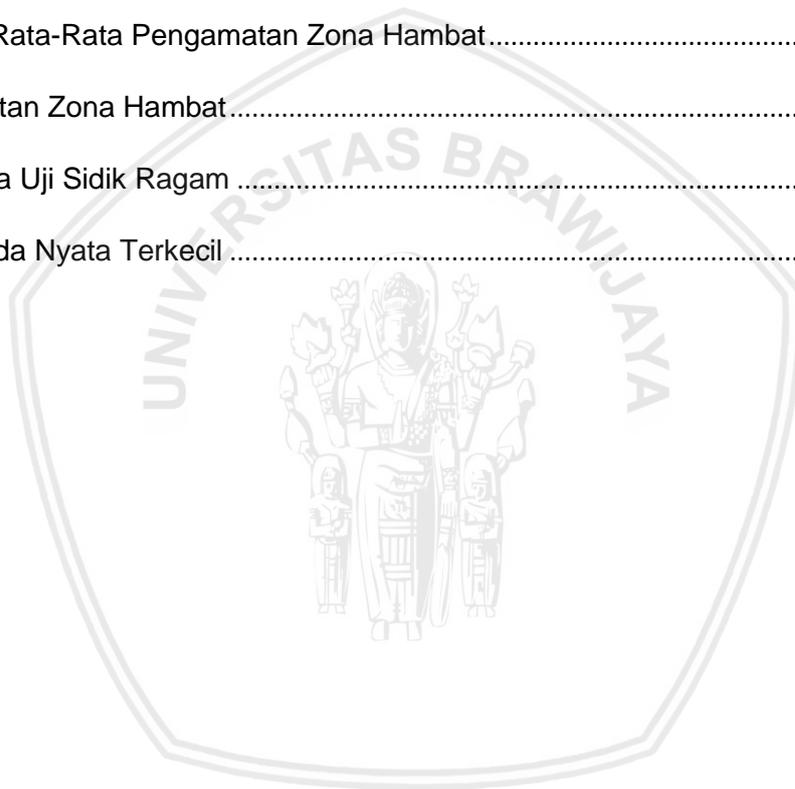
	HALAMAN
SAMPUL	i
HALAMAN JUDUL.....	ii
LEMBAR PENGESAHAN	Error! Bookmark not defined.
IDENTITAS TIM PENGUJI	iv
PERNYATAAN ORISINALITAS	v
UCAPAN TERIMAKASIH.....	vi
RINGKASAN.....	vii
KATA PENGANTAR.....	viii
DAFTAR ISI	ix
DAFTAR TABEL.....	xi
DAFTAR GAMBAR.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN	xiii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Hipotesis	3
1.5 Kegunaan.....	3
1.6 Waktu dan Tempat Pelaksanaan.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Biologi Tanaman <i>P. foetida</i> L.	4
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman <i>P. foetida</i> L.....	4
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	5
2.1.3 Kandungan Bahan Aktif	6
2.1.4 Aktivitas Antimikroba.....	7
2.1.5 Faktor yang Mempengaruhi Cara Kerja Zat Anti Bakteri	8
2.1.6 Ekstraksi Daun <i>P. foetida</i> L.....	9
2.2 Biologi Bakteri <i>P. fluorescens</i>	10
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri <i>P. fluorescens</i>	10
2.2.2 Pertumbuhan Bakteri	11
2.2.3 Infeksi dan Tanda Penyebaran Bakteri <i>P. fluorescens</i>	14
2.2.4 Pencegahan dan Pengobatan Bakteri <i>P. fluorescens</i>	15

2.2.5 Pengaruh Daya Hambat Ekstrak secara <i>In Vitro</i>	16
3. MATERI DAN METODE	18
3.1 Materi Penelitian	18
3.1.1 Alat Penelitian.....	18
3.1.2 Bahan Penelitian.....	19
3.2 Metode Penelitian.....	20
3.3 Pengambilan Data.....	20
3.4 Rancangan Penelitian	21
3.5 Prosedur Penelitian	23
3.5.1 Persiapan Penelitian	23
3.5.2 Pelaksanaan Penelitian	32
3.5.3 Parameter Uji.....	34
3.6 Analisa Data.....	34
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	35
4.1 Identifikasi Bakteri <i>P. fluorescens</i>	35
4.2 Hasil Uji Fitokimia.....	36
4.3 Uji Cakram	38
5. KESIMPULAN DAN SARAN	45
5.1 Kesimpulan	45
5.2 Saran	45
DAFTAR PUSTAKA	46
LAMPIRAN	52



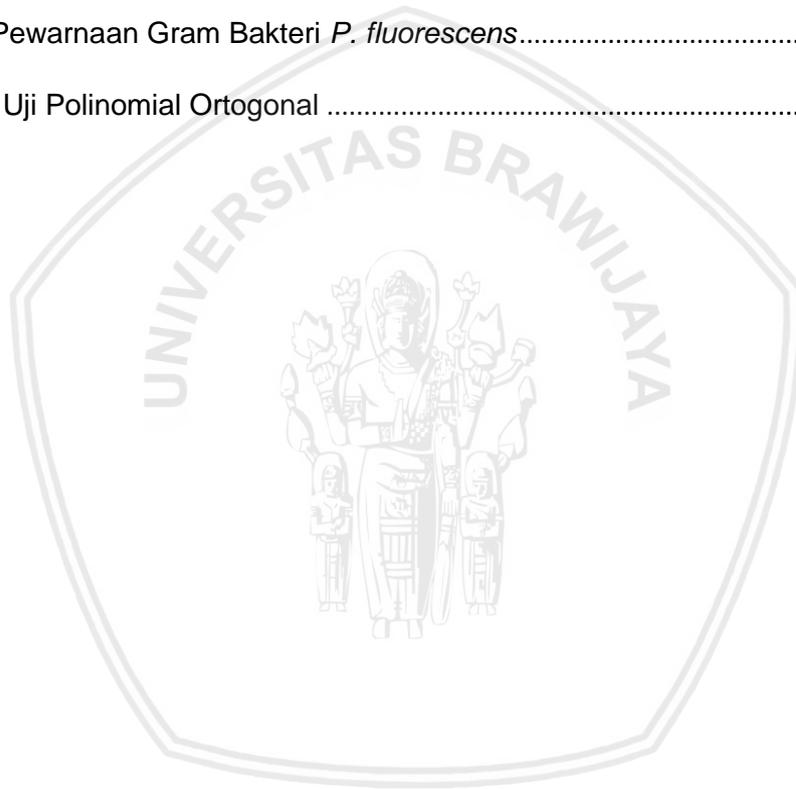
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kriteria Kekuatan Antibakteri	17
2. Alat dan Fungsi	18
3. Bahan dan Fungsi.....	19
4. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun <i>P. foetida</i> L.....	37
5. Hasil Rata-Rata Pengamatan Zona Hambat.....	40
6. Kekuatan Zona Hambat.....	40
7. Analisa Uji Sidik Ragam	41
8. Uji Beda Nyata Terkecil	42



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Morfologi Daun <i>P. foetida</i> L.....	4
2. Bakteri <i>P. fluorescens</i>	10
3. Kurva Pertumbuhan Bakteri.....	14
4. Denah Rancangan Percobaan	22
5. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri <i>P. fluorescens</i>	35
6. Grafik Uji Polinomial Ortogonal	43



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan Bahan.....	52
2. Pembuatan Ekstrak Daun <i>P. foetida</i> L.....	60
3. Pembuatan Media Agar	62
4. Pembuatan Media Cair (<i>Tryptic Soy Borth</i>).....	63
5. Pembuatan Natrium Fisiologis.....	64
6. Peremajaan Bakteri <i>P. fluorescens</i>	65
7. Kultur Bakteri <i>P. fluorescens</i>	66
8. Pengenceran Bakteri <i>P. fluorescens</i>	67
9. Perhitungan Ekstrak Konsentrasi Uji	68
10. Proses Uji Cakram.....	70
11. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>P. fluorescens</i>	72
12. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun <i>P. foetida</i> L.....	73
13. Hasil Uji Cakram	74
14. Hitungan Rancangan Percobaan.....	77

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

P. fluorescens merupakan bakteri gram negatif yang ada di lingkungan yang beragam. Bakteri ini termasuk bakteri patogen terhadap berbagai ikan budidaya. Ikan yang terserang *P. fluorescens* akan terserang penyakit kulit merah yang dapat menyebabkan kematian (Yuan-Yuan Sun dan Li Sun, 2015). *P. fluorescens* berbentuk batang, termasuk kedalam kelas *Gammaproteobacteria*. Ukuran dari bakteri ini memiliki lebar 0,5 μm dan panjang 2,0 – 2,5 μm . Pertumbuhan pembentukan koloni cukup cepat dalam 2-3 hari pada suhu 28°C. Koloni bakteri ini dapat menghasilkan pigmen warna menjadi kuning-hijau buram (Martinez-Garcia, Ruano-Rosa, Schiliro, Prieto, Ramos, Rodriguez-Palenzuela, dan Mercado-Blanco, 2015).

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

Beberapa metode yang telah diterapkan dalam mengontrol penyakit antara lain penggunaan antibiotik, vaksin, dan imunostimulan (Monoppo, dan Kolppita, 2011). Pemberian antibiotik secara terus menerus dapat menyebabkan organisme patogen menjadi resisten, sehingga penggunaan antibiotik menjadi tidak efektif (Apriyanto, Harpeni, Setyawan, dan Tarsim, 2014). Penggunaan

antibiotik yang tidak terkontrol untuk pengobatan penyakit dapat menyebabkan gangguan pada keseimbangan dinamika alami mikroorganisme dalam pemeliharaan ikan dan juga dapat membahayakan manusia sebagai konsumen, oleh karena itu perlu dicari alternatif untuk menanggulangi permasalahan penyakit tanpa menggunakan antibiotik dan bahan kimia lainnya (Sya'bani, Yustiati, Rustikawati, dan Lusastuti, 2015).

Penggunaan antibiotik tersebut dapat digantikan dengan menggunakan bahan alami sebagai salah satu solusinya. Bahan alami tersebut dengan memanfaatkan fitofarmaka sebagai zat imunostimulan dan antibakterial (Wahjuningrum, Hasanah, dan Rahma, 2016). Dampak negatif yang ditimbulkan oleh berlebihan penggunaan bahan kimia sintesis serta resistensi antimikroba yang muncul membuat masyarakat mencari alternatif serta solusi yang berbeda menggunakan produk organik dan sintesis bebas bahan kimia yang bertujuan untuk meningkatkan produksi ikan, perlu adanya pengembangan antibakteri yang berasal dari sumber alami (Eissa, El-Gheit, dan Shaheen, 2014).

Tanaman obat mempunyai khasiat untuk mengobati berbagai penyakit. Tumbuhan berkhasiat obat adalah jenis tanaman yang pada bagian-bagian tertentu baik akar, batang, kulit, daun maupun hasil ekskresinya dipercaya dapat menyembuhkan (Kartika, 2017). Tumbuhan *P. foetida* L. digunakan sebagai tanaman obat yang diantaranya berkhasiat sebagai antibiotik, dan anti fungi (Abriyanto, Subikis, dan Sudarso, 2012). Daun *P. foetida* mempunyai bahan aktif saponin, flavonoid dan tanin diproduksi oleh tanaman yang berfungsi sebagai substansi pelindung dalam jaringan maupun luar jaringan (Sukorini, 2006).

Penelitian ekstrak daun *P. foetida* L. yang digunakan untuk menghambat bakteri *P. fluorescens* belum pernah dilakukan. Penelitian ini perlu dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi yang berbeda terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*.

1.2 Perumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas dapat diperoleh rumusan masalah sebagai berikut :

- Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

- Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*

1.4 Hipotesis

H₀ : Diduga pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi yang berbeda tidak memiliki pengaruh terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*

H₁ : Diduga pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi yang berbeda memiliki pengaruh terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*

1.5 Kegunaan

Penelitian ini berguna untuk mengetahui manfaat ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi yang berbeda sebagai salah satu bahan untuk uji daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

1.6 Waktu dan Tempat Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budididaya Ikan Divisi Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang pada bulan Januari-Maret 2019

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Tanaman *P. foetida* L.

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Tanaman *P. foetida* L.

Klasifikasi tanaman *P. foetida* L. menurut Khushbu, Anar, Mayuree, Carol, Roshmi, dan Subodh (2010) adalah:

<i>Kingdom</i>	: Plantae
<i>Subkingdom</i>	: Tracheobionta
<i>Superdivisi</i>	: Spermatophyta
<i>Division</i>	: Magnoliophyta
<i>Class</i>	: Magnoliopsida
<i>Subclass</i>	: Asteridae
<i>Order</i>	: Rubiales
<i>Family</i>	: Rubiaceae
<i>Genus</i>	: <i>Paederia</i> L.
<i>Species</i>	: <i>Paederia foetida</i> L.



Gambar 1. Morfologi Daun *P. foetida* L. (Dokumentasi Pribadi, 2019)

Tanaman *P. foetida* L. masuk kedalam keluarga dari rubiaceae dan merupakan tanaman semak yang melilit serta memanjang pada tanaman lain. Tanaman ini memiliki rasa pahit dan memiliki bau yang menyengat (Das, Kanodia, Mukherjee, dan Hakim, 2013). Tanaman *P. foetida* L. merupakan tanaman asli dari daerah asia dan beriklim tropis. Tanaman *P. foetida* L. dikenal memiliki kandungan belerang dan akan menimbulkan bau yang kuat ketika daun atau batangnya dihancurkan. Kandungan minyak pada tanaman ini yang menyebabkan bau dan banyak ditemukan terutama pada daunnya (Uddin, Hossain, Haque, dan Hasan, 2013).

Tanaman *P. foetida* L. merupakan tanaman melilit dengan panjang 1,5-7 m. Batang muda berwarna keunguan atau coklat kemerahan sedangkan batang tua berwarna kuning kecoklatan. Daun dari tanaman ini berbentuk bulat, bulat panjang hingga linier dengan ukuran 2-21 x 0,7-9 cm. Pangkal daun berbentuk hati, bulat dan puncaknya menumpuk. Ukuran tangkai daun 0,5-6 cm. Memiliki warna bunga merah muda atau ungu termasuk dalam bunga biseksual (Morshed, Islam, Parvin, Ahmed, Islam, Mustofa dan Shahdaat, 2012). Tanaman *P. foetida* L. memiliki tangkai daun bengkok. Daun berbentuk elip hingga oval, lonjong, bulat menyempit, ujung lancip, bertekstur kasar dan berbulu dengan pangkal membulat. Bunga berwarna ungu berbentuk corong. Buah berbentuk bulat panjang dan pipih (Bahira, Garnayak, Raut, Moharana, dan Behera, 2018).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Tanaman *P. foetida* L. ini dianggap sebagai tanaman asli dari asia yang beriklim tropis yang berasal dari India hingga Jepang dan Asia Tenggara (Behera, Jena, Barik, dan Naik 2017). Tumbuhan ini tumbuh subur di tanah berpasir, lempung, dan tanah liat. Tanaman ini membutuhkan air yang cukup untuk menciptakan kelembaban ditempat hidupnya, dapat tumbuh pada berbagai

kondisi baik asam, netral, maupun basa. tanaman ini juga memerlukan tempat tumbuh yang sedikit terlindungi (Nurchayanti dan Wandra, 2012).

Genus *Paederia* memiliki kurang lebih 20-30 spesies diseluruh dunia yang secara umum tersebar di Asia, umumnya dikenal sebagai *skunk vine*, tanaman merambat dapat ditemukan di Himalaya yang berlokasi didaerah timur Dehradun hingga ketinggian 1.800 meter dan juga di Assam, Bihar, Bengal, Orissa, dan Andhra Pradesh. Tanaman *P. foetida* L. adalah tanaman asli dari Asia beriklim tropis sedang yang berasal dari India hingga Jepang dan Asia Tenggara. *P. foetida* L. dapat tumbuh tinggi dipohon-pohon diberbagai habitat mulai dari Msichammocks hingga bukit tinggi pasir Xeric meskipun tampaknya tanaman ini lebih menyukai dataran rendah berair dan berlumpur dan dicelah pohon dan didaerah lainnya (Soni, Irchhaiya, Dixit, dan Alok, 2013).

2.1.3 Kandungan Bahan Aktif

Kandungan kimia yang terdapat pada batang dan daun sebulan adalah asperuloside, daecetylasperuloside, scandoside, flavonoid, paedorosidic acid, dan minyak astiri (Abriyanto, Sabikis, dan Sudarso, 2012). Kandungan yang terdapat dalam tanaman ini cukup banyak antara lain pada tangkai dan daun sebulan mengandung asperuloside, deacetylas, peruloside, scandoside, paeroside, paederosidic acid, dan alkanoid gamma-sitosterol, arbutin, oleanolic acid, irodoid, serta minyak menguap (Pratama, Fridayanti, dan Ibrahim, 2015).

Senyawa aktif yang terdapat pada daun sebulan antara lain saponin, tanin, fenol, flavonoid, terpenoid dan alkaloid (Wahjuningrum, Hasanah, dan Rahman, 2016). Daun *P. foetida* L. menghasilkan senyawa yang memiliki kandungan yang beragam. Bagian daun tanaman mengandung glikosida iridoid yang merupakan *cyclopentanoid monoterpenes* yang aktif. Glikosida iridoid yaitu anti oksidan, antibakteri, anti analgesik, anti inflamasi, dan hepatoprotektif.

Tanaman ini juga mengandung alkaloid dan minyak atsiri (Chanda, Sarethy, De, dan Singh, 2013).

2.1.4 Aktivitas Antimikroba

Bakteri dapat dikendalikan dengan cara dibasmi, dihambat atau ditiadakan atau dibunuh dengan proses dan sarana fisik atau dengan bahan kimia. Suatu zat atau bahan yang dapat membunuh bakteri disebut sebagai antimikrobia. Zat antimikrobia terbagi menjadi antijamur dan antibakteri. Antibakteri adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan dan metabolisme melalui penghambatan pertumbuhan bakteri. Inaktivasi bakteri dapat berupa penghambatan pertumbuhan bakteri (bakteriostatik) atau bahkan bersifat membunuh bakteri (bakterisidal) (Zahro dan Agustini, 2013). Senyawa yang berperan dalam merusak dinding sel antara lain fenol, flavonoid, dan alkaloid. Dinding sel sebagai komponen pertahanan sel bakteri mengalami kerusakan sehingga mengakibatkan senyawa metabolit sekunder dapat masuk lebih dalam dan mengganggu organel lain. Membran sel yang terletak tepat dibagian dalam dinding sel dapat dirusak oleh senyawa fenol, flavonoid, dan saponin. Beberapa dari senyawa tersebut dapat menguraikan fosfolipid menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat sehingga membran tidak dapat mempertahankan bentuk akibatnya membran bocor sehingga zat-zat dapat keluar masuk sel tanpa kendali sehingga metabolisme terganggu dan bakteri lisis (Dewei, Ratnasari, dan Trimulyono, 2014).

Mekanisme kerja antibakteri adalah menyerang membran sitoplasma kehilangan kestabilan pada proton dan elektron dan koagulasi pada komponen penyusun sel (Sasongko, Mushollaeni dan Herman, 2014). Senyawa flavonoid menyebabkan dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri (Dima, Fatimawati, dan Lolo, 2016). Tanin

berfungsi sebagai antimikroba. Aktivitas lain dari tanin yaitu sebagai antioksidan, dan sebagai astrigen (Surahmida dan Handrianto, 2018). Mekanisme kerja tanin sebagai antimikroba adalah menghambat enzim *reverse transkriptase* dan DNA *topoisomerase* sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk. Tanin memiliki aktivitas antibakteri yang berhubungan dengan kemampuan untuk menginaktivkan enzim dan mengganggu transport protein pada lapisan sel dan juga mempunyai target pada polipeptida dinding sel sehingga pembentukan dinding sel menjadi kurang sempurna. Sel bakteri akan menjadi lisis karena tekanan osmotik maupun fisik sehingga bakteri akan mati (Ngajow, Abidjulu, dan Kamu, 2013).

2.1.5 Faktor yang Mempengaruhi Cara Kerja Zat Anti Bakteri

Aktivitas senyawa antibakteri ditandai dengan terbentuknya zona bening disekitar *paper disc*. Faktor-faktor yang mempengaruhi ukuran daerah zona hambat yaitu sensitivitas organisme, medium kultur, kondisi inkubasi, dan kecepatan difusi agar. Faktor-faktor yang mempengaruhi kecepatan difusi agar yaitu konsentrasi mikroorganisme, komposisi media, suhu inkubasi, dan waktu inkubasi (Siregar, Sabdono, dan Pringgenies, 2012). Faktor yang mempengaruhi penghambatan mikroorganisme mencakup kepadatan mikroorganisme, kepekaan terhadap antimikroba, volume bahan yang disterilkan, lamanya bahan antimikroba diaplikasikan pada mikroorganisme, konsentrasi bahan anti mikroba, suhu dan kandungan bahan organik (Purnama, Melki, Ayu, dan Rozirwan, 2011).

Adapun faktor yang dapat mempengaruhi kerja zat antimikroba. Faktor-faktor tersebut diantaranya adalah umur tanaman yaitu paling baik berusia 5-6 bulan, keadaan mikroba, suhu lingkungan dan kandungan zat aktif antimikroba tanaman, yang mana semakin besar kandungan zat aktif antimikroba suatu tanaman maka semakin besar pula kemampuannya dalam menghambat

pertumbuhan mikroorganisme (Rahmi, Roebiakto, dan Lutpiatina, 2016). Perbedaan besarnya zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi disebabkan karena adanya perbedaan besar kecilnya konsentrasi atau kandungan zat aktif antibakteri yang terkandung didalamnya serta kecepatan difusi bahan anti bakteri kedalam media agar. Faktor-faktor lain yang dapat mempengaruhi terbentuknya zona hambat adalah kepekaan pertumbuhan bakteri, reaksi antara bahan aktif dengan medium dan suhu inkubasi (Lestari, Rosyid, dan Wahyudi, 2016).

2.1.6 Ekstraksi Daun *P. foetida* L.

Ekstraksi merupakan langkah awal yang dilakukan untuk mendapatkan senyawa yang akan diambil. Pemilihan metode ekstraksi disesuaikan dengan adanya senyawa yang terkandung didalamnya. Pelarut maserasi yang digunakan harus memenuhi kriteria yang ditetapkan. Efektifitas penarikan senyawa aktif dalam proses ekstraksi tergantung dari kemampuan pelarut yang digunakan (Agustina, Andiarna, Lusiana, Purnamasari, dan Hadi, 2018). Hasil dari proses maserasi diperoleh ekstrak cair yang selanjutnya dievapoasi (penguapan vakum) hingga diperoleh ekstrak kental. Penguapan dengan cara ini dilakukan untuk menurunkan tekanan pada permukaan sehingga menurunkan titik didihnya dan dapat mengurangi terjadinya penguraian senyawa yang terdapat dalam ekstrak tersebut (Sa'adah, dan Nurhasnawati, 2015).

Maserasi adalah teknik yang digunakan untuk menarik atau mengambil senyawa yang diinginkan dari suatu larutan atau padatan dengan teknik perendaman terhadap bahan yang akan diekstraksi. Sampel yang telah dihaluskan direndam dalam suatu pelarut organik selama beberapa waktu. Proses ini sangat menguntungkan dalam isolasi senyawa bahan alam karena selain murah dan mudah dilakukan dengan perendaman sampel tumbuhan akan

terjadi pemecahan dinding dan membran sel akibat perbedaan tekanan antara didalam dan diluar sel, sehingga metabolit sekunder yang ada dalam sitoplasma akan terlarut dalam pelarut organik dan ekstraksi senyawa akan sempurna karena dapat diatur lama perendaman yang dilakukan. Pelarut yang mengalir kedalam sel dapat menyebabkan protoplasma membengkak dan bahan kandungan sel akan larut sesuai dengan kelarutannya (Yulianingtyas dan Kusmartono, 2016).

2.2 Biologi Bakteri *P. fluorescens*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri *P. fluorescens*

Klasifikasi bakteri *P. fluorescens* menurut Martinez-Garcia, Ruano-Rosa, Schiliro, Prieto, Ramos, Rodriguez-Palenzuela, dan Mercado-Blanco (2015) adalah sebagai berikut:

<i>Domain</i>	: Bacteria
<i>Phylum</i>	: Proteobacteria
<i>Class</i>	: Gammaproteobacteria
<i>Family</i>	: Pseudomonadaceae
<i>Genus</i>	: Pseudomonas
<i>Species</i>	: <i>Pseudomonas fluorescens</i>



Gambar 2. Bakteri *P. fluorescens* (Dokumentasi Pribadi, 2019)

Bakteri *P. fluorescens* adalah bakteri gram negatif bersifat obligat aerobik dan dianggap sebagai mikroorganisme psikrotrofik. Bakteri ini tidak dapat tumbuh pada suhu diatas 32°C (Trivedi, Patil, Shettigar, Gangwar, dan Jana, 2015). Bakteri *P. fluorescens* merupakan bakteri berbentuk batang lurus atau agak lengkung dengan ukuran 0,5-1 x 1,5-50 µm. Bakteri ini bersifat gram negatif dan aerob. Bakteri ini mampu bergerak dengan *flagellum polar* (Soenandar dan Tjachjono, 2012).

Genus *P. fluorescens* termasuk dalam bakteri aerob dan merupakan gram negatif dengan memiliki beberapa flagel. Bakteri ini banyak ditemukan didalam air, tanah, minyak yang tercemar dan mendominasi di akar tanaman. Bakteri *P. fluorescens* adalah bakteri *Rhizobacterium* non patogenik yang terkenal dengan kemampuannya menghasilkan pigmen-pigmen berwarna (Rani, Mahoto, dan Sharma, 2017).

2.2.2 Pertumbuhan Bakteri

Salah satu faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri adalah nutrisi. Nutrisi dalam media penanaman harus mengandung seluruh elemen yang penting untuk sumber energi dan pertumbuhan sel bakteri. Unsur-unsur tersebut adalah karbon, nitrogen, sulfur, fosfor dan mineral. Kekurangan sumber-sumber nutrisi ini dapat mempengaruhi pertumbuhan mikroba hingga akhirnya dapat menyebabkan kematian (Wulandari, Sulistijowati, dan Mile, 2015). Faktor yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri menurut Lestari dan Hartati (2017) adalah sebagai berikut :

1. Suhu

Pada suhu rendah dibawah suhu minimum bakteri tidak dapat berkembang biak bahkan ada yang tahan sampai bertahun-tahun pada suhu minus 70°C. Pada suhu tinggi keberadaan bakteri lebih berbahaya, bila bakteri dipanaskan

diatas suhu maksimum akan segera mati. Berdasarkan hal tersebut bakteri dibagi dalam 3 golongan yaitu :

- Psychrofil suhu minimum pertumbuhan 0°C , optimum 10°C - 15°C , maksimum 30°C
- Mesophil suhu minimum pertumbuhan 15°C - 25°C , optimum 25°C - 37°C , maksimum 40°C - 55°C
- Thermofil suhu minimum 25°C - 45°C , optimum 50°C - 60°C , maksimum 60°C - 90°C

2. Cahaya

Cahaya mempengaruhi keberadaan bakteri. Cahaya matahari dapat menyebabkan kematian bakteri pada beberapa spesies karena adanya ultraviolet. Bakteri adalah kemotrof sehingga pertumbuhannya tidak tergantung cahaya.

3. Kelembaban

Air sangat penting untuk pertumbuhan bakteri karena hanya dapat mengambil makanan dalam bentuk larutan. Bakteri dapat tumbuh baik dalam suasana basah atau udara yang lembab dan tidak tumbuh pada media dan udara yang kering. Bakteri tidak dapat merombak bahan makanan pada suasana kering.

4. Keasaman pH

Perubahan pH dapat menghambat pertumbuhan organisme. Perubahan pH dapat dicegah dengan menggunakan pelarut penyangga (senyawa atau pasangan senyawa yang dapat menahan perubahan pH) seperti KH_2PO_4 yang merupakan kombinasi garam-garam fosfat kedalam media.

5. Pengaruh tekanan osmotik

Protoplasma bakteri mengandung zat yang terlarut karena itu tekanan osmosisnya selalu lebih tinggi bila dibandingkan air murni. Sel bakteri yang

dimasukkan kedalam air murni maka akan terjadi mekanisme plasmolisis (bakteri dalam keadaan menggelembung), tetapi jika bakteri berada dalam larutan hipertonis akan terjadi lepasnya plasma dari dinding sel menyebabkan kematian pada bakteri dan mekanisme tersebut disebut plasmolisis. Bakteri yang berada pada lingkungan hipertosis akan menyebabkan bakteri mengalami kematian.

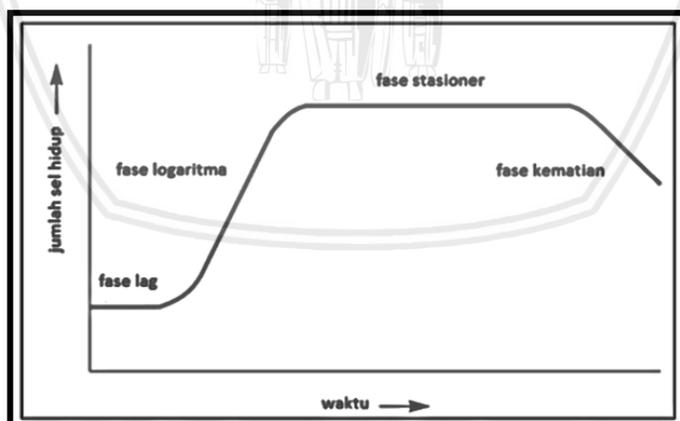
Fase pertumbuhan bakteri dapat dilihat dari kurva pertumbuhan bakteri. Kurva pertumbuhan bakteri dapat dipisahkan menjadi empat fase utama yaitu fase lag (fase lamban), fase pertumbuhan ekponensial (fase pertumbuhan cepat) fase *stasioner* (fase statis) dan fase *decline* (penurunan populasi). Fase-fase tersebut mencerminkan keadaan bakteri dalam kultur pada waktu tertentu. Diantara setiap fase terdapat suatu periode peralihan dimana waktu dapat berlalu sebelum semua sel memasuki fase yang baru (Setiawati, Suryatmana, Herdiyantoro, dan Ilmiyati, 2014).

Menurut Wignyanto dan Hidayat (2017), pertumbuhan bakteri dibagi menjadi empat tahapan yaitu :

1. Fase lag : mikroorganisme mulai menyesuaikan diri dengan lingkungan baru terjadi pada fase ini. Beberapa enzim dan zat perantara dibentuk agar keadaannya memungkinkan bisa terjadi untuk pertumbuhan lebih lanjut, pada fase ini ukuran sel telah membesar tetapi belum terjadi pembelahan.
2. Fase pertumbuhan yang dipercepat : pertumbuhan masih lambat atau waktu generasinya masih panjang, walaupun sudah mulai ada pembelahan diri. Fase pertumbuhan yang dipercepat bersama-sama dengan fase permulaan sering disebut *phase of adjustment*.
3. Fase pertumbuhan logaritma : fase ini mengalami pertambahan dalam hal jumlah dan juga ukuran. Terjadi periode waktu tertentu bioma menjadi dua kali lipat. Pada fase logaritma atau kadang dikenal fase ekponensial ini, jumlah sel yang ada dalam kultur mengalami kenaikan jumlah yang pesat.

Waktu generasi pada fase ini berlangsung singkat dan tetap. Metabolisme pada fase ini berlangsung paling cepat, jadi sintesis bahan sel sangat singkat dan tetap. Kondisi ini berlangsung terus sampai salah satu atau beberapa nutrisi habis atau telah terjadi timbunan metabolisme yang bersifat racun yang menyebabkan pertumbuhan terhambat.

4. Fase stasioner : fase ini jumlah mikroorganisme cenderung stabil, karena jumlah sel yang membelah diri dan yang mati sama. Kematian bakteri disebabkan karena adanya penurunan kandungan nutrisi dan meningkatnya timbunan zat-zat racun.
5. Fase kematian yang dipercepat diikuti fase kematian logaritma : fase ini biasanya dikenal dengan fase menurun. Pada fase ini kecepatan kematiannya semakin meningkat sedang kecepatan pembelahan terus menerus menurun akhirnya menjadi nol. Pada fase kematian logaritma kecepatan kematian menjadi maksimal dan jumlah sel yang mati meningkat dengan cepat.



Gambar 3. Kurva Pertumbuhan Bakteri (Kusuma, Kurniawati, Rahmi, Rusdan, dan Widyanto, 2017)

2.2.3 Infeksi dan Tanda Penyebaran Bakteri *P. fluorescens*

Bakteri *P. fluorescens* adalah patogen dalam budidaya yang dapat menginfeksi banyak spesies ikan, termasuk diantaranya ikan mas India, ikan mas

hitam, ikan mas Jepang dan ikan flounder Jepang. Infeksi ikan yang diakibatkan oleh *P. fluorescens* biasanya dikenal dengan penyakit kulit merah biasanya terjadi sepanjang tahun. infeksi tersebut biasanya terjadi pada ikan yang mengalami luka misalnya disebabkan oleh penanganan dan pengangkutan menggunakan transportasi yang kurang tepat. Penyakit ini sering menyebabkan kematian disebabkan karena kurangnya alat kontrol yang efektif sehingga menyebabkan kerugian ekonomi yang besar (Wei-wie Zhang, Yong-hua Hu, Hua-lei Wang, dan Li Sun, 2009).

Bakteri *P. fluorescens* merupakan patogen pada suatu sistem budidaya umum yang dapat menginfeksi berbagai jenis spesies ikan budidaya diantaranya ikan mas (*Cyprinus carpio*), ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dan ikan flounder. Ikan yang terinfeksi bakteri ini menyebabkan timbulnya penyakit kulit merah pada ikan dengan tanda-tanda klinis terjadi pendarahan dan adanya koreng pada kulit ikan. Penyakit kulit merah akibat *P. fluorescens* di Cina sangat mempengaruhi keseimbangan budidaya baik budidaya ikan air tawar maupun ikan air laut (Yong-Hua, Wei Dang, dan Li Sun, 2012). Gejala yang tampak pada ikan yang terinfeksi *P. fluorescens* adalah ikan berwarna gelap (kusam), nafsu makan berkurang atau sama sekali tidak ada nafsu makan, ikan bergerombol didekat pintu pengeluaran air, luka pada kulit, sirip dan sisi rusak, pendarahan pada tubuh ikan, perut busung, insang rusak berwarna keputih-putihan hingga kebiru-biruan, ikan lemah, dan timbul luka (Cahyono, 2001).

2.2.4 Pencegahan dan Pengobatan Bakteri *P. fluorescens*

Pengendalian infeksi *P. fluorescens* dalam sistem budidaya dilakukan dengan menggunakan senyawa antibiotik karena belum adanya vaksin komersial yang bisa digunakan dalam pengobatan, sampai saat ini masih sangat sedikit yang mengetahui tentang virulensi *P. florensens* yang dapat

menghambat patogen ini (Yong-hua Hu, Wei Dang, dan Li sun, 2012). Bakteri *P. fluorescens* umumnya resisten terhadap antibiotik β -laktum tetapi sensitif terhadap gentamisin dan torbamisin. Antibiotik telah lama digunakan untuk pengobatan infeksi bakteri pada ikan tetapi kebiasaan penggunaan antibiotik dapat menyebabkan masalah dengan menimbulkan resistensi bakteri dan residu berbahaya pada lingkungan budidaya (Foysal, Rahman, dan Alam, 2011).

Menurut Saparinto (2009), pengobatan pada ikan yang terinfeksi bakteri *P. fluorescens* dapat menggunakan beberapa antibiotik seperti oksitetrasiklin dengan perendaman selama 24 jam dengan konsentrasi 2-5 mg/l. Pengobatan melalui makanan bisa menggunakan teramisin dengan konsentrasi 50 mg/kg ikan/hari selama minimal 6 hari berturut-turut. Penggunaan antibiotik yang tidak tepat dalam jangka waktu yang lama dapat menyebabkan resiko resistensi bakteri. Bahan-bahan alami lebih dianjurkan digunakan sebagai anti bakteri yang lebih ramah lingkungan.

2.2.5 Pengaruh Daya Hambat Ekstrak secara *In Vitro*

Kemampuan antimikroba dalam melawan bakteri dapat diukur dengan menggunakan metode dilusi dan difusi. Metode dilusi terdiri dari dua teknik pengerjaan yaitu dilusi pembenihan cair dan teknik dilusi agar yang bertujuan untuk penentuan aktivitas antimikroba secara kuantitatif. Antimikroba dilarutkan kedalam media agar atau kaldu yang kemudian ditanami bakteri yang akan diuji, dilakukan inkubasi selama semalam. Konsentrasi terendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri disebut dengan MIC (*Minimal Inhibitory Concentration*). Nilai MIC dapat pula dibandingkan dengan konsentrasi obat yang didapatkan berupa serum dan cairan tubuh lainnya untuk mendapatkan perkiraan respon klinik (Soleha, 2015).

Metode yang digunakan dalam uji antibakteri dengan menggunakan metode difusi kertas cakram. Metode ini dilakukan dengan meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji diatas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Pencelupan cakram pada larutan uji hingga seluruh permukaan cakram basah. Pengamatan dilakukan setelah bakteri diinokulasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat zona bening disekitar cakram (Mulyadi, Wuryanti, dan Ria, 2013). Menurut Sulaiman, Astuti, dan Shinta, (2017), sifat antibakteri dapat dibedakan berdasarkan kekuatannya. Kriteria kekuatan antibakteri yaitu diameter zona hambat disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Kriteria Kekuatan Antibakteri

Diameter Zona Bening	Kriteria Kekuatan
0-9 mm	Lemah
10-14 mm	Sedang
15-20 mm	Kuat

3. MATERI DAN METODE

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan dalam penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro* disajikan pada Tabel 2. Untuk lebih jelasnya gambar alat-alat penelitian disajikan pada Lampiran 1.

Tabel 2. Alat dan Fungsi

No	Alat	Kegunaan
1	Autoklaf	Sebagai alat untuk mensterilisasi peralatan yang akan digunakan
2	<i>Beaker glass</i>	Sebagai tempat sterilisasi bahan
3	Blender	Sebagai alat untuk menghaluskan daun semburan (<i>P. foetida</i> L.)
4	Blue tip	Sebagai alat untuk membantu mengambil larutan
5	Bola hisap	Sebagai alat bantu pipet volum untuk mengambil larutan
6	Botol film 10 ml	Sebagai wadah ekstrak yang akan disimpan
7	Bunsen	Sebagai alat untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada saat perlakuan
8	Cawa Petri	Sebagai tempat untuk uji cakram
9	Toples 2000 ml	Sebagai tempat maserasi
10	Corong	Sebagai alat untuk membantu memasukkan larutan
11	Timbangan analitik	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^3
12	Destruktor	Sebagai alat untuk mendestruksi cawan dan tabung reaksi yang sudah digunakan
13	Erlenmeyer 500 ml	Sebagai tempat pembuatan media
14	<i>Rotary Evaporator</i>	Sebagai alat untuk menguapkan daun yang telah dimaserasi
15	Gelas ukur 100 ml	Sebagai alat untuk mengukur larutan
16	Hot plate	Sebagai alat pemanas media
17	Inkubator	Sebagai alat untuk menginkubasi
18	Jangka sorong	Sebagai alat untuk mengukur zona bening daya hambat bakteri
19	Jarum ose	Sebagai alat untuk melakukan penyetrikan bakteri pada bahan padat
20	Timbangan digital	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^2
21	Kulkas	Sebagai tempat penyimpanan bahan pada suhu dingin
22	<i>Laminar Air Flow</i>	Sebagai tempat dilakukan perlakuan

Tabel 2. Alat dan Fungsi

No	Alat	Kegunaan
23	<i>Vortex mixer</i>	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
24	Micropipet 100 µl	Sebagai alat untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan
25	Micropipet 1000 µl	Sebagai alat untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan
26	Mikroskop	Sebagai alat untuk mengamati bakteri dengan perbesaran yang ditentukan
27	Yellow tip	Sebagai alat untuk membantu mengambil larutan
28	<i>Colony Counter</i>	Sebagai alat untuk menghitung bakteri
29	Pipet volume	Sebagai alat untuk membantu mengambil larutan
30	Rak tabung reaksi	Sebagai alat untuk meletakkan tabung reaksi
31	<i>Triangle</i>	Sebagai alat untuk membantu meratakan bakteri yang ditanam dengan bahan cair
32	Sprayer	Sebagai tempat menyimpan alkohol
33	Tabung reaksi	Sebagai tempat peremajaan bakteri

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro* disajikan pada Tabel 3. Untuk lebih jelasnya gambar bahan-bahan penelitian dapat disajikan pada Lampiran 1.

Tabel 3. Bahan dan Fungsi

No	Bahan	Keterangan
1	Akuades	Sebagai bahan pengencer
2	Alkohol 70%	Sebagai bahan aseptis
3	<i>Aluminium foil</i>	Sebagai bahan untuk menutupi seluruh bagian toples kaca saat proses maserasi
4	Bakteri <i>P. fluorescens</i>	Sebagai bahan penelitian
5	Daun semburan (<i>P. foetida</i> L.)	Sebagai bahan ekstrak yang akan diujikan daya hambat
6	DMSO 10%	Sebagai pelarut ekstrak
7	Etanol 96%	Sebagai bahan pelarut saat proses maserasi
8	Kertas cakram	Sebagai bahan untuk mengetahui besar zona hambat dari ekstrak yang digunakan
9	Kertas saring	Sebagai bahan untuk memisahkan larutan dan endapan setelah maserasi
10	Larutan iodin	Sebagai bahan untuk melakukan pewarnaan bakteri
11	Larutan kristal violet	Sebagai bahan untuk melakukan pewarnaan bakteri
12	Larutan safranin	Sebagai bahan untuk melakukan pewarnaan bakteri

Tabel 3. Bahan dan Fungsi

No	Bahan	Keterangan
13	NaCl	Sebagai bahan untuk membuat Nafis
14	Plastik wrap	Sebagai bahan untuk membungkus toples saat maserasi
15	PSA (<i>Pseudomonas Selective Agar</i>)	Sebagai media peremajaan bakteri
16	Spiritus	Sebagai bahan bakar bunsen
17	TSB (<i>Tryptone Soy Broth</i>)	sebagai media pengencer

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah penelitian eksperimen. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang digunakan untuk melihat pengaruh perlakuan tertentu terhadap variabel-variabel yang diteliti dan dalam kondisi yang dikendalikan, oleh karena itu didalam penelitian eksperimen terdapat kelas eksperimen kontrol (Hermansyah, Gunawan, dan Herayanti, 2015).

Metode eksperimen merupakan suatu penelitian ilmiah dimana peneliti memanipulasi dan mengontrol satu atau lebih variabel bebas dan melakukan pengamatan terhadap variabel-variabel terikat untuk menemukan variasi yang muncul bersamaan dengan memanipulasi terhadap variabel bebas (Setyanto, 2013). Penelitian eksperimen adalah penelitian yang berusaha mencari pengaruh variabel tertentu terhadap variabel yang lain dalam kondisi yang terkontrol secara ketat. Adapun empat bentuk metode eksperimen yaitu *pre experimental*, *true experimental*, *actorial*, dan *quasi experimental* (Anggara, 2015).

3.3 Pengambilan Data

Metode observasi merupakan sebuah teknik pengumpulan data yang mengharuskan peneliti turun ke lapangan untuk mengamati hal-hal yang berkaitan dengan penggalan data perilaku subjek secara luas, menangkap berbagai macam interaksi, dan secara terbuka mengeksplorasi topik-topik yang

akan diteliti. Observasi digunakan pada penelitian kualitatif dan kuantitatif. Penelitian kualitatif cenderung menggunakan observasi *unsystematic* atau *unstructured*, sedangkan penelitian kuantitatif cenderung menggunakan observasi sistematis atau terstruktur (Ni'matuzahro dan Prasetyaningrum, 2018).

Pengambilan data yang dilakukan dalam penelitian ini dilakukan dengan observasi. Observasi adalah kegiatan pengambilan data untuk melihat seberapa jauh efek tindakan yang telah mencapai sasaran. Pengamatan partisipatif dilakukan oleh orang yang terlibat secara aktif dalam proses tindakan. Pengamatan ini dapat dilaksanakan dengan pedoman pematik, catatan, lapangan, jurnal harian, dan observasi aktivitas (Suryani, 2017). Keuntungan yang diperoleh dengan metode observasi yaitu pertama dapat mengeliminasi unsur subjektif dalam penelitian, kedua adalah penelitian yang dilakukan dibawah studi observasi mampu mengukur atau melihat apa yang terjadi, dan yang ketiga respon yang diberikan oleh responden bersifat independen terutama cocok untuk responden yang mengalami kesulitan dalam memberikan respon secara verbal terkait dengan apa yang mereka rasakan (Swarjana, 2012).

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan percobaan yang dilakukan yaitu menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 5 perlakuan yang dilakukan 3 kali ulangan dengan 2 kontrol. Menurut Siska dan Salam (2012), desain eksperimen atau rancangan percobaan adalah suatu percobaan sedemikian rupa sehingga informasi yang berhubungan dengan atau diperlukan untuk persoalan yang sedang diteliti dikumpulkan. Menurut Juwitanti, Ain, dan Soedarsono (2013), RAL adalah rancangan percobaan yang paling sederhana diantara semua rancangan percobaan. Rancangan ini dicirikan dengan diberikannya perlakuan secara acak pada seluruh bahan percobaan. RAL sangat mudah digambarkan dan

analisisnya sangat sederhana, akan tetapi rancangan ini hendaknya digunakan hanya bila perlakuannya sedikit dan bahan percobaan homogen.

Menurut Fitasari Reo, dan Niswi, (2016), data penelitian dianalisis menggunakan metode RAL. Adapun model matematika RAL adalah :

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

Keterangan :

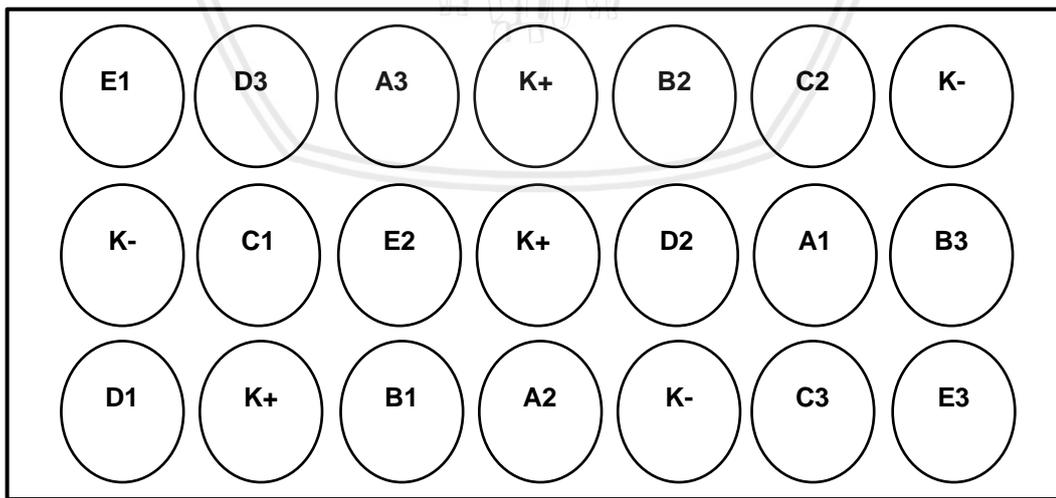
Y_{ij} = nilai pengamatan pada perlakuan ke-i ulangan ke-j

μ = nilai tengah umum

T_i = pengaruh perlakuan ke-i

ϵ_{ij} = kesalahan (galat) percobaan pada perlakuan ke-i

Penelitian ini menggunakan variabel bebas berupa pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi yang berbeda. Dasar penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi yang berbeda. Perlakuan dalam penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dengan melakukan pengulangan 3 kali dan menggunakan 2 kontrol yaitu kontrol positif dan kontrol negatif, untuk lebih jelasnya tentang denah penelitian disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Denah Rancangan Percobaan

Keterangan :

Perlakuan A : Bakteri *P. fluorescens* dengan pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi 2 %

- Perlakuan B : Bakteri *P. fluorescens* dengan pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi 4 %
- Perlakuan C : Bakteri *P. fluorescens* dengan pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi 6 %
- Perlakuan D : Bakteri *P. fluorescens* dengan pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi 8 %
- Perlakuan E : Bakteri *P. fluorescens* dengan pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi 10 %
- Kontrol positif : Bakteri *P. fluorescens* dengan pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi 20 %
- Kontrol negatif : Bakteri *P. fluorescens* dengan pemberian DMSO 10%

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

a. Pembuatan Ekstrak Daun *P. foetida* L.

Proses ekstraksi daun *P. foetida* L. dilakukan dengan metode maserasi. Daun yang diperoleh dari perkebunan di daerah malang dicuci terlebih dahulu, kemudian dilakukan pengeringan di bawah sinar matahari yang dilakukan selama 7 hari. Daun semburan yang sudah kering kemudian dipotong kecil-kecil lalu dihaluskan dengan menggunakan blender sampai berubah menjadi serbuk. Serbuk kemudian disaring dengan menggunakan ayakan untuk memisahkan serbuk yang sudah halus dan yang masih kasar kemudian ditimbang. Daun yang sudah halus dicampur dengan pelarut berupa etanol 96% dalam toples kaca ukuran 2.000 ml dengan perbandingan 1:5. Penggunaan etanol 96% karena untuk mengikat senyawa polar dibutuhkan pelarut polar. Serbuk daun semburan yang dibutuhkan sebanyak 200 gram kemudian dimasukkan kedalam toples. Larutan etanol 96% yang diperlukan sebanyak 1.000 ml kemudian dihomogenkan. Toples yang berisi larutan ditutup rapat kemudian dilapisi aluminium foil serta dilapisi plastik wrap untuk meminimalkan proses penguapan. Proses maserasi dilakukan selama 24 jam.

Larutan maserasi disaring dengan menggunakan kertas saring dan dimasukkan kedalam erlenmeyer dengan bantuan corong untuk memisahkan

antara endapan dan larutan maserasi. Proses maserasi dilakukan dengan menggunakan alat *rotary evaporator* selama 2 jam 25 menit dengan suhu 60°C-75°C. Cara kerja dari *rotary evaporasi* ini dengan menguapkan semua kandungan larutan yang ada di daun sembukan hingga mendapatkan ekstrak daun sembukan dalam bentuk pasta berwarna hijau tua. Ekstrak yang didapat dimasukkan kedalam botol film dan ditimbang menggunakan timbangan digital. Botol film kemudian dibungkus dengan aluminium foil dengan dilapisi plastik wrap dan disimpan didalam kulkas. Ekstrak daun sembukan yang akan digunakan dapat dilakukan pengenceran menggunakan DMSO 10% dengan perlakuan konsentrasi yang diinginkan, untuk lebih jelasnya tentang pembuatan ekstrak daun sembukan disajikan pada Lampiran 2.

Proses ekstraksi dilakukan bertujuan untuk mengambil senyawa kimia yang terkandung dalam sampel. Prinsip ekstraksi didasarkan pada perpindahan masa komponen zat yang terlarut kedalam pelarut sehingga terjadi perpindahan pada lapisan antar muka dan berdifusi masuk kedalam pelarut. Pelarut yang digunakan pada penelitian adalah etanol 96% sebagai pelarut polar. Etanol memiliki kelebihan dibandingkan dengan air dan metanol. Senyawa kimia yang mampu disari dengan etanol lebih banyak dari pada penyari metanol dan air (Aminah, Tomayahu, dan Abidin, 2017).

Serbuk daun tanaman *P. foetida* L. ditimbang sebanyak 60 gr dan diekstraksi dengan perendaman menggunakan 300 ml pelarut etanol selama 24 jam. Pengadukan dibantu menggunakan *shaker*, kemudian disaring dan ampasnya dimaserasi kembali dengan pelarut yang sama sampai diperoleh ampas pucat (Sukmawati, Hayati, dan Muti'ah, 2014).

b. Uji Fitokomia

Uji fitokimia digunakan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang ada dalam daun *P.foetida* L. Menurut Sitepu dan Masrah (2018), skrining

fitokimia untuk mengetahui adanya senyawa metabolit sekunder meliputi uji saponin, uji terpenoid, uji tanin, dan uji flavonoid pada masing-masing ekstrak etanol 96% daun *P. foetida* L. identifikasi senyawa metabolit sekunder daun *P. foetida* L. adalah sebagai berikut:

- Flavonoid

Sampel sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol ditambahkan 10 ml metanol, direfluks selama 10 menit kemudian disaring panas melalui kertas saring. Filtrat diencerkan dengan 10 ml air, setelah dingin ditambahkan 5 ml eter minyak tanah kemudian dikocok hati-hati lalu diamkan sebentar. Lapisan metanol kemudian diambil lalu diuapkan pada suhu 40°C kemudian sisanya dilarutkan dalam 5 ml etil asetat lalu disaring. Hasil dari filtrat kemudian digunakan untuk flavoida dengan cara sampel sebanyak 1 ml filtrat diuapkan sampai kering, sisanya dilarutkan dalam 2 ml etanol 96% lalu ditambahkan serbuk 2,5 gram serbuk seng dan 2 ml asam klorida 2N selanjutnya didiamkan selama 1 menit. Asam klorida pekat kemudian ditambahkan 10 tetes, jika dalam waktu 2-5 menit terjadi warna merah intensif menunjukkan adanya flavonoid.

- Tanin

Sampel sebanyak 1 gram ekstrak etanol dididihkan selama 3 menit dalam 100 ml air suling lalu didinginkan dan disaring. Filtrat ditambahkan 1-2 tetes pereaksi besi (III) klorida 1%, jika terjadi warna biru kehitaman atau hijau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

- Triterpenoid

Sampel sebanyak 1 gram ekstrak etanol dimaserasi dengan 20 ml n-heksan selama 2 jam kemudian disaring dan filtrat diuapkan dan sisanya ditambahkan pereaksi Liebermann-Burchard. Warna ungu atau merah yang berubah menjadi biru ungu atau biru hijau menunjukkan adanya triterpenoid.

- Saponin

Sampel sebanyak 0,5 gram ekstrak etanol dimasukkan kedalam tabung reaksi lalu ditambahkan 10 ml air panas kemudian didinginkan dan kemudian dikocok kuat-kuat selama 10 detik. Buih yang terbentuk selama tidak kurang dari 10 menit memiliki tinggi 1-10 cm dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes asam klorida 2N menunjukkan adanya saponin.

c. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang akan digunakan terlebih dahulu dilakukan sterilisasi dengan menggunakan autoklaf. Langkah awal yang dilakukan yaitu dengan mencuci alat-alat yang akan disterilisasi dengan sabun dan biarkan sampai kering, kemudian bungkus alat-alat yang akan disterilisasi menggunakan kertas bekas atau koran bekas dan diikat dengan karet. Erlenmeyer dan tabung reaksi ketika akan disterilisasi ditutup dengan kapas bertujuan untuk menyerap uap air. Akuades dituang secukupnya kedalam autoklaf sampai batas elemen besi yang ada didalam, kemudian alat dan bahan dimasukkan kedalam autoklaf kemudian autoklaf ditutup secara diagonal.

Tombol *On* dinyalakan, kemudian suhu diputar maksimal hingga lampu hijau untuk proses *heating* menyala, ditunggu hingga uap air pada klep keluar kemudian klep pada autoklaf ditutup kearah samping. Suhu diturunkan hingga lampu kuning untuk *sterilization* menyala, setelah mencapai suhu 121°C dan tekanan menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan selama 15 menit. Tombol *Off* di tekan tunggu beberapa saat sampai suhu menunjukkan angka 0 (nol) kemudian buka klep uap lalu buka penutup autoklaf secara diagonal, alat dan bahan yang sudah disterilisasi diambil. Alat dan bahan yang tidak langsung dipakai setelah disterilkan dapat disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan disimpan dalam lemari pendingin.

c. Pembuatan Media Agar Miring

Media agar miring digunakan untuk peremajaan bakteri *P. fluorescens*, media yang dipakai dengan menggunakan media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*). Media PSA yang dibutuhkan sebanyak 0,44 gram di timbang dengan menggunakan timbangan digital. Media yang sudah di timbang kemudian dimasukan ke erlenmeyer dan ditambahkan dengan 9 ml akuades dan dihomogenkan. Media PSA dipanaskan diatas *hot plate* dan diaduk sampai mendidih. Media yang sudah dipanaskan kemudian dipindahkan kedalam tabung reaksi. Tabung reaksi kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Media yang sudah siap dimasukkan autoklaf dengan suhu 121^oC selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media diambil dari autoklaf kemudian dimiringkan dengan kemiringan 30^o lalu ditunggu hingga media berubah menjadi padat, untuk lebih jelasnya tentang pembuatan media agar miring disajikan pada Lampiran 3.

Perhitungan pembuatan PSA adalah sebagai berikut

$$\text{PSA} = \frac{24,5}{500} \times 9 \text{ ml PSA} = 0,44 \text{ gram}$$

d. Pembuatan Media TSB (*Tryptitone Soy Broth*)

Media TSB merupakan media cair yang digunakan untuk kultur bakteri. Cara pembuatan TBS dengan cara menimbang sebesar 0,3 gram dengan timbangan digital. Media yang sudah ditimbang kemudian dimasukan kedalam erlenmeyer dan ditambahkan dengan 10 ml akuades dan dihomogenkan. Media yang sudah dihomogenkan kemudian dimasukkan kedalam tabung reaksi. Tabung reaksi kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Media yang sudah siap dimasukkan autoklaf dengan suhu 121^oC selama 15 menit dengan tekanan 1 atm, untuk lebih jelasnya tentang pembuatan PSA disajikan pada Lampiran 4.

Perhitungan pembuatan TSB adalah sebagai berikut :

$$\text{TSB} = \frac{30}{1.000} \times 10 \text{ ml} = 0,3 \text{ gram}$$

e. Pembuatan NaFis (Natrium Fisiologis)

Pembuatan NaFis digunakan untuk pengenceran bakteri. Pembuatan NaFis dilakukan penimbangan garam NaCl sebanyak 0,27 gram dengan menggunakan timbangan digital kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer. NaCl dilarutkan pada akuades steril sebanyak 30 ml kemudian dihomogenkan. Larutan Nafis kemudian dimasukkan kedalam 3 tabung reaksi sebanyak 10 ml pada setiap tabung. Tabung reaksi kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium kemudian dimasukkan dalam beaker glass yang ditutup dengan aluminium foil. NaFis kemudian disterilisasi pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm, untuk lebih jelasnya tentang pembuatan NaFis disajikan pada Lampiran 5.

Perhitungan pembuatan NaFis adalah sebagai berikut:

$$\text{NaCl} = \frac{0,9}{100} \times 10 \text{ ml NaFis} = 0,09 \text{ gram}$$

f. Pembuatan Media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)

Media PSA merupakan media yang digunakan sebagai media agar dalam melakukan uji cakram. Pembuatan media PSA dengan menimbang sebanyak 20,58 gram dengan timbangan digital. Media yang sudah ditimbang dimasukkan kedalam erlenmeyer dan ditambah 420 ml akuades dan dihomogenkan. Media PSA diapanaskan diatas *hot plate* dan diaduk sampai mendidih. Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Disterilkan dalam akutoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Media dibiarkan hingga suhunya menjadi hangat kemudian dituang ke cawan petri sebanyak 20 ml.

Perhitungan pembuatan media PSA adalah sebagai berikut:

$$\text{PSA} = \frac{24,5}{500} \times 420 \text{ ml PSA} = 20,58 \text{ gram}$$

g. Uji Biokimia Bakteri *P. fluorescens*

Uji biokimia dilakukan untuk mengetahui aktivitas biokimia atau metabolisme bakteri untuk menguraikan molekul kompleks (karbohidrat, lemak, protein, dan asam nukleat) dan molekul-molekul sederhana (asam amino dan monosakarida). Menurut Sompie, Kepel, dan Budiarmo (2016), uji biokimia meliputi uji indol, uji katalase, uji H₂S. Uji indol memiliki hasil positif bila kultur berwarna merah pada saat penambahan reagen. Uji katalase apabila terjadi pembentukan gelembung udara didalam tabung reaksi maka diperoleh hasil positif. Uji H₂S bila terbentuk warna hitam pada media berarti mampu membentuk H₂S maka hasilnya positif tapi jika terbentuk warna kuning berarti bakteri tidak mampu membentuk H₂S maka hasilnya negatif.

Beberapa identifikasi bakteri berdasarkan uji biokimia menurut Ismail, Yulvizar, dan Putriani (2017) yaitu :

- Uji Oksidase *Triple Sugar Iron Agar* (TSIA)

Satu koloni isolat bakteri diinokulasikan pada media PSIA dengan cara ditusuk tegak lurus pada bagian *butt* dan cara zig zag pada bagian *slant*. Biakan kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam dan diamati perubahan warna media. Perubahan bagian *slant* media berwarna merah dan *butt* berwarna kuning maka bakteri mampu menfermentasikan glukosa, namun bila *slant* dan *butt* media berwarna kuning maka bakteri mampu menfermentasi glukosa, laktoda dan sukrosa

- Uji Indol

Satu koloni isolat bakteri diinokulasi kedalam media SIM dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Pengamatan hasil uji indol dilakukan dengan

menambahkan 10-12 tetes reagen *Kovac's*. Uji positif ditandai dengan terbentuknya lapisan warna merah dibagian atas biakan.

- Uji *Methyl red* dan *Voges Proskeuer* (MR-VP)

Satu koloni isolat bakteri diinokulasi kedalam media MR-VP dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 48 jam. Pengamatan uji MR dilakukan dengan menambahkan tiga tetes reagen MR ke dalam media. Uji positif ditandai dengan perubahan warna media menjadi merah artinya terbentuk asam. Uji VP dilakukan dengan menambahkan tiga tetes KOH 3% dan lima tetes alfa-naftol lalu dikocok selama 30 detik.

- Uji Katalase

Uji katalase dilakukan dengan meneteskan dua tetes H₂O₂ 3% pada isolat bakteri berumur 24 jam diatas kaca objek. Reaksi positif katalase ditandai dengan terbentuknya gelembung udara. Terbentuknya gelembung udara menunjukkan enzim katalase yang dapat mengubah H₂O₂ menjadi H₂O dan O₂.

- Uji Ketahanan Suhu

Satu koloni isolat bakteri diinokulasi kedalam media *MRS broth* dan diinkubasi pada suhu 14°C dan 37°C. Pertumbuhan bakteri ditandai dengan adanya kekeruhan pada media.

h. Peremajaan Bakteri

Isolat murni bakteri *P. fluorescens* didapatkan dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara dengan kepadatan 10¹⁰. Peremajaan bakteri *P. fluorescens* dapat dilakukan dengan disiapkan isolat bakteri terlebih dahulu, lalu isolat bakteri pada media agar miring diambil dengan jarum ose. Jarum ose dipanaskan terlebih dahulu diatas bunsen hingga berpijar dan digoreskan pada media agar yang tidak ditumbuhi bakteri. Jarum ose yang digoreskan pada media kosong bertujuan untuk menurunkan suhu pada jarum

ose agar bakteri tidak mati. Bakteri yang ada di jarum ose digoreskan kemedial agar dengan metode gores. Tampung reaksi kemudian ditutup dengan kapas dan aluminium foil, kemudian diinkubasi selama 24-48 jam dengan suhu inkubator 32°C, untuk lebih jelasnya tentang peremajaan bakteri disajikan pada Lampiran 6.

i. Kultur Bakteri *P. fluorescens*

Kultur bakteri *P. fluorescens* dilakukan didalam LAF dengan mengambil satu gores bakteri yang sudah diremajakan pada agar miring dengan menggunakan jarum ose. Jarum ose yang berisi bakteri dicelupkan pada media TSB yang telah dipersiapkan sebelumnya. Media TSB ditutup dengan kapas dan aluminium foil. Media TSB yang sudah terdapat bakteri kemudian di *vortex* agar bakteri dapat homogen. Media TSB dimasukkan inkubasi selama 24-48 jam dengan suhu inkubator 32°C, untuk lebih jelasnya tentang kultur bakteri *P. fluorescens* disajikan pada Lampiran 7.

j. Pengenceran Bakteri

Pengenceran Bakteri *P. fluorescens* dilakukan dengan menggunakan bakteri hasil kultur bakteri pada TSB dan telah diinkubasi setelah 24 jam dengan kepadatan awal 10^{10} dan dilakukan pengenceran bertingkat pada larutan NaFis. Bakteri pada TSB diambil sebanyak 1.000 μ l menggunakan mikropipet dan dimasukkan kedalam tabung reaksi pertama kemudian dihomogenkan dengan *vortex* maka diperoleh pengenceran pertama dengan kepadatan 10^9 . Pengenceran dilakukan sebanyak tiga kali sampai mendapatkan kepadatan bakteri *P. fluorescens* 10^7 , untuk lebih jelasnya tentang pengenceran bakteri disajikan pada Lampiran 8.

k. Pembuatan Konsentrasi Ekstrak *P. foetidal* L.

Penelitian ini menggunakan lima perlakuan konsentrasi yang berbeda yaitu 2%, 4%, 6%, 8%, 10%. Ekstrak daun semburan ditimbang sebanyak 1

gram menggunakan timbangan analitik kemudian dimasukkan kedalam botol film. Larutan stok ekstrak dengan konsentrasi 20% sebanyak 5 ml. DMSO 10% sebanyak 5 ml dicampurkan dengan cara pertama masukkan 0,5 ml DMSO 100% ke dalam botol film berisi ekstrak daun sembuk, divortex agar homogen. Hal ini dilakukan agar ekstrak daun sembuk lebih mudah larut. Akuades sebanyak 4,5 ml ditambahkan dan divortex.

Pada konsentrasi 2% diambil 0,2 ml larutan *stock* dan ditambahkan 1,8 ml pelarut DMSO 10%. Pada konsentrasi 4% diambil 0,4 ml larutan *stock* dan ditambahkan 1,6 ml pelarut DMSO 10%. Pada konsentrasi 6% diambil 0,6 ml larutan *stock* dan ditambahkan 1,4 ml pelarut DMSO 10%. Pada konsentrasi 8% diambil 0,8 ml larutan *stock* dan ditambahkan 1,2 ml pelarut DMSO 10%. Pada konsentrasi 10% diambil 1 ml larutan *stock* dan ditambahkan 1 ml pelarut DMSO 10%, untuk lebih jelasnya tentang perhitungan konsentrasi ekstrak yang digunakan disajikan pada Lampiran 9.

3.5.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Pewarnaan Gram

Pewarnaan gram dapat dilakukan dapat menggukan bakteri yang ada di media agar miring. Mekanisme dari pewarnaan gram adalah sebagai berikut objek glass yang sudah disiapkan direndam alkohol terlebih dahulu agar steril. Bakteri pada media PSA diambil satu ose kemudian taruh diatas objek glass yang sudah ditetesi dengan akuades ratakan kemudian difiksasi diatas bunsen. Kristal violet ditetaskan keatas objek glass sebanyak 2 tetes ratakan tunggu hingga 1 menit. Dibilas dengan akuades ditunggu hingga kering. Iodin ditetaskan keatas objek glass sebanyak 2 tetes ratakan kemudian tunggu hingga 1 menit. Dibilas dengan akuades ditunggu hingga kering. Alkohol 70% teteskan pada objek glass tunggu hingga 30 detik kemudian bilas dengan akuades tunggu

hingga kering. Safranin diteteskan keatas objek glass sebanyak 2 tetes ratakan kemudian tunggu hingga 30 detik. Dibilas akuades ditunggu hingga kering. Dilakukan pengamatan dengan menggunakan mikroskop dengan perbesaran 1.000x.

b. Uji Cakram

Uji cakram yang dilakukan dalam penelitian ini berfungsi untuk mengetahui besarnya zona hambat terhadap daya anti bakteri yang terkandung pada daun *P. foetida* L. Adapun tahapan dalam pengujian uji cakram yaitu dengan menyiapkan cawan petri yang sudah disterilisasi. Media PSA yang sudah disteril disiapkan kemudian dituang kedalam cawan petri sebanyak 21 cawan tunggu hingga membentuk gel. Kertas cakram steril diberi beberapa perlakuan yaitu dengan dilakukan perendaman kedalam ekstrak daun *P. foetida* L. dengan konsentrasi 2%, 4%, 6%, 8%, 10%. Perlakuan kontrol positif merupakan perlakuan dengan merendam kertas cakram pada konsentrasi 20% dan kontrol negatif direndam dengan DMSO 10%. Semua perlakuan cakram dilakukan perendaman selama 15 menit. Bakteri *P. fluorescens* diambil 100 µl dengan kepadatan 10^7 dan dimasukkan kedalam cawan petri berisi media PSA kemudian diratakan dengan *triangle*. Kertas cakram yang sudah direndam selama 15 menit dimasukkan kedalam cawan petri dengan media PSA yang sudah terdapat bakteri. Media yang sudah ditanam bakteri dan diberi kertas cakram diinkubasi selama 24-48 jam pada inkubator dengan suhu 32°C. Dilakukan pengamatan zona bening yang terdapat disekitar kertas cakram pada waktu 24 jam dan 48 jam dan diukur menggunakan jangka sorong, untuk lebih jelasnya tentang uji cakram yang digunakan disajikan pada Lampiran 10.

3.5.3 Parameter Uji

Parameter uji dalam penelitian ini ada dua yaitu parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama adalah hasil pengamatan zona bening atau zona hambat yang terlihat disekitar kertas cakram pada media yang ditumbuhi bakteri *P. fluorescens* selama inkubasi selama 24 jam. Parameter penunjang adalah suhu inkubasi yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri *P. fluorescens*.

3.6 Analisa Data

Berdasarkan hasil uji daya hambat (zona bening) pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. terhadap bakteri *P. fluorescens* maka dilakukan analisa data secara statistik. Analisa data statistik dilakukan menggunakan analisa keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dilakukan yaitu RAL. Uji ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon zona hambat (zona bening) yang diukur. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilakukan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi Bakteri *P. fluorescens*

Pada penelitian ini dilakukan identifikasi bakteri dengan cara pewarnaan gram. Pewarnaan gram digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri dan membedakan gram positif dan gram negatif. Didapatkan hasil yaitu, bakteri *P. fluorescens* termasuk dalam bakteri gram negatif. Jika dilakukan pengamatan dibawah mikroskop bakteri gram negatif akan berwarna merah. Bakteri gram negatif tidak dapat mempertahankan kompleks warna kristal violet dengan pembilasan alkohol. Bakteri gram negatif akan terwarnai oleh pewarna tandingan berupa safranin yang akan terserap pada dinding selnya, sedangkan bakteri gram positif akan berwarna ungu dikarenakan dapat menahan kompleks pewarna primer yaitu kristal violet. Hasil pewarnaan gram bakteri *P. fluorescens* disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *P. fluorescens* dengan perbesaran 1.000x (Dokumentasi Pribadi, 2019)

Uji biokimia pada bakteri *P. fluorescens* dilakukan di Laboratorium Uji Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara, Pada uji biokimia yang dilakukan pada bakteri *P. fluorescens* didapatkan hasil yang disajikan pada Tabel 4. sedangkan hasil uji biokimia bakteri *P. fluorescens* disajikan pada Lampiran 11.

Tabel 4. Hasil Uji Biokimia *P. fluorescens*

Uji Biokimia	Hasil Identifikasi	Hasil Identifikasi Menurut Trivedi (2015)
Gram	-	-
Bentuk	Batang	
Katalase	+	
Oksidase	+	+
H ₂ S	-	-
Indol	-	-
Citrate	+	+
OF medium	Oksidatif	
VP	-	-
MR	-	
TSIA	A/A	
Urea	-	-
Glukosa	+	-
Sukrosa	-	-
37°C	+	
Pigment fluorecent	+	+

Menurut Desi, Novia, dan Asnurita (2017), uji biokimia merupakan suatu cara yang dilakukan untuk mengidentifikasi dan mendeterminasi biakan murni satu jenis isolasi melalui sifat-sifat fisiologisnya. Menurut Scales, Dickson, Lipuma, dan Huffnagle (2014), adapun karakteristik dari *P. fluorescens* adalah termasuk kedalam gram negatif dan berbentuk batang. Bergerak dengan menggunakan *flagella polar*. Organisme yang tidak dapat membentuk spora serta menghasilkan pigmen *pyocyanin fluorescent*. Suhu optimal untuk pertumbuhan untuk isolat lingkungan berada pada kisaran 25-30°C dan untuk isolat organisme berada pada kisaran 34-37°C dan bakteri bersifat oksidase positif serta katalase negatif.

4.2 Hasil Uji Fitokimia

Uji fitokimia dari ekstrak daun *P. foetida* L. bertujuan untuk mengetahui kandungan senyawa aktif yang terkandung yaitu senyawa flavonoid, tanin, triterpenoid, polifenol, saponin. Pada uji fitokimia yang dilakukan pada ekstrak daun *P. foetida* L. didapatkan hasil yang disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun *P. foetida* L.

No	Identifikasi Senyawa	Parameter	Hasil	Hasil Menurut Sitepu dan Masrah, 2018
1	Flavonoid	Merah, merah muda, merah tua	+	+
2	Alkaloid Meyer	Endapan putih	-	+
	Dragendrof	Endapan jingga	-	
	Bouchardat	Endapan cokelat	-	
3	Tanin	Hijau kehitaman, biru kehitaman, cokelat kehitaman	+	+
4	Terpenoid	Hijau bebiruan	-	
	Steroid	Orange, jingga	+	+
	Triterperoid	kecokelatan		
5	Polifenol	Hijau kehitaman, biru kehitaman, cokelat kehitaman	+	-
6	Saponin	Busa permanen	+	-

Berdasarkan hasil uji fitokimia yang telah dilakukan terhadap ekstrak daun *P. foetida* L. menunjukkan hasil positif mengandung senyawa aktif flavonoid, tanin, triterpenoid, polifenol, saponin dan negatif mengandung senyawa aktif alkanoid dengan parameter yang dihasilkan, untuk lebih jelasnya hasil uji fitokimia disajikan pada lampiran 12. Senyawa yang berperan sebagai antibakteri yaitu saponin, hal tersebut sesuai dengan pendapat dari Dewangga, dan Nirwana (2019), saponin bekerja sebagai antibakteri dengan cara membentuk senyawa kompleks dengan membran sel melalui ikatan hidrogen, sehingga dapat menghancurkan sifat permeabilitas dinding sel yang akhirnya menimbulkan kematian sel. Saponin juga mengandung gugus hidrogen yang akan merusak dinding sel bakteri dan menembus kedalam sel dengan cara melarutkan lapisan lipidnya sehingga sel akan mengalami kerusakan.

Hasil dari uji fitokimia yang diperoleh tidak sesuai dengan pendapat Surahmaida dan Handrianto (2018), hasil uji fitokimia dengan menggunakan

ekstrak etanol pada daun sembung mengandung alkaloid, tanin dan flavonoid, tetapi tidak mengandung saponin karena tidak terbentuknya busa saat pengujian fitokimia. Menurut Sudarmi, Darmayasa, dan Muksin (2017), penyebab tidak teridentifikasinya senyawa dalam uji fitokimia kemungkinan dikarenakan adanya pengaruh faktor lingkungan yang mempengaruhi pembentukan metabolit sekunder pada tumbuhan yaitu ketinggian tempat tumbuh, pH tanah, kelembaban udara dan intensitas cahaya matahari. Menurut Azizah, Zulharmita, dan Wati (2018), faktor yang dapat mempengaruhi hasil analisis kandungan kimia yaitu sifat senyawa kimia, pelarut yang digunakan serta alat yang tersedia, selain itu lingkungan tempat tumbuh seperti tanah dan penggunaan pupuk juga dapat mempengaruhi hasil analisis kandungan kimia dari tumbuhan yang mengakibatkan perbedaan kandungan senyawa kimia dan kadar senyawa kimia.

4.3 Uji Cakram

Pada penelitian ini bakteri yang digunakan adalah *P. fluorescens* diperoleh dari isolat murni dari BBPBAP Jepara. Uji cakram dilakukan untuk mengetahui antibakteri yang terkandung dalam ekstrak daun *P. foetida* L. ini dapat berpengaruh atau tidak terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Kertas cakram dimasukkan perendaman kedalam ekstrak daun *P. foetida* L. dengan pemberian konsentrasi yang berbeda pada masing-masing perlakuan dilakukan perendaman selama 15 menit kemudian dilakukan penanaman di cawan petri yang sudah berisi bakteri *P. fluorescens* dan diinkubasi dalam waktu 24-48 jam.

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak *P. foetida* L. terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro* didapatkan hasil zona bening setelah diinkubasi selama 24 jam, untuk lebih jelasnya tentang hasil uji cakram disajikan pada Lampiran 13.

Uji cakram dilakukan dengan menggunakan ekstrak daun *P. foetida* L. dengan penggunaan konsentrasi sebesar 2%, 4%, 6%, 8%, 10% dan kontrol (positif dan negatif). Penentuan konsentrasi dimulai dengan 2% ini didasarkan pada hasil penelitian pendahuluan dimana kertas cakram yang direndam dalam ekstrak dengan konsentrasi 2% memiliki daya hambat yang jelas. Kontrol positif digunakan sebagai pembanding dengan konsentrasi ekstrak sebesar 20%. Kemampuan antibakteri pada ekstrak daun *P. foetida* L. dapat diketahui dari hasil uji kertas cakram. Kertas cakram yang telah direndam dengan ekstrak daun *P. foetida* L. kemudian diletakkan kedalam cawan petri yang telah ditanam bakteri *P. fluorescens* memiliki zona bening dapat disimpulkan bahwa ekstrak tersebut memiliki sifat antibakteri.

Berdasarkan hasil pengamatan zona bening pada uji cakram selama penelitian, setiap perlakuan konsentrasi memiliki zona bening, hasil dari zona bening berbeda pada setiap konsentrasi. Menurut Alfiah, Khotimah, dan Turnip (2015), perbedaan diameter zona hambat ini dapat disebabkan adanya perbedaan kandungan metabolit sekunder yang terkandung dalam ekstrak. Faktor lain yang mempengaruhi perbedaan zona hambat yaitu temperatur inkubasi, waktu pemasangan cakram dan jarak cakram antimikroba.

Menurut Surjowardojo, Susilorini, Benarivo, (2016), beberapa faktor yang mempengaruhi besar kecilnya zona hambat pada bakteri. Faktor-faktor tersebut adalah kepekaan pertumbuhan, reaksi antara bahan aktif dengan medium dan suhu inkubasi, pH lingkungan, komponen media, kerapatan koloni, waktu inkubasi, dan aktivitas metabolik mikroorganisme. Menurut Anisah, Khotimah, dan Yanti (2014), aktivitas penghambatan yang tidak mengalami peningkatan yang besar menunjukkan bahwa senyawa antibakteri yang terkandung pada ekstrak bersifat bakteriostatik. Antibakteri yang bersifat bakteriostatik merupakan

jenis antibakteri yang hanya dapat menghambat pertumbuhan bakteri dan tidak langsung membunuh bakteri.

Adapun data pengukuran hasil uji dengan menggunakan kertas cakram dari ekstrak daun *P. foetida* L. dengan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan didapatkan rata-rata zona hambat setelah dilakukan pengamatan selama 24 jam. Hasil rata-rata pengamatan zona hambat untuk lebih jelasnya disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Rata-Rata Pengamatan Zona Hambat

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata±STDEV
	1	2	3		
A (2%)	16,11	15,30	18,40	49,81	16,60±1,61
B (4%)	24,53	23,38	20,78	68,69	22,90±1,92
C (6%)	22,33	22,90	20,16	65,39	21,80±1,45
D (8%)	19,92	19,29	18,36	57,57	19,19±0,78
E (10%)	16,87	15,58	15,41	47,86	15,95±0,80
Total				289,32	

Hasil dari zona hambat diatas dapat dibandingkan dengan kriteria kekuatan diameter zona hambat, data kriteria kekuatan zona hambat tersebut disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Kekuatan Zona Hambat

Diameter Zona Bening	Kriteria Kekuatan
0-9 mm	Lemah
10-14 mm	Sedang
15-20 mm	Kuat

Kekuatan anti bakteri pada daun *P. foetida* L. terhadap bakteri *P. fluorescens* pada masing-masing perlakuan diperoleh hasil yang berbeda. Pada perlakuan A konsentrasi 2% didapatkan rerata 16,60 mm, perlakuan B konsentrasi 4% didapatkan rerata 22,90 mm, perlakuan C konsentrasi 6% didapatkan rerata 21,80 mm , perlakuan D konsentrasi 8% didapatkan rerata 19,19 mm, perlakuan E konsentrasi 10% didapatkan rerata 15,95 mm rata-rata pengukuran zona bening berada pada jarak 15-20 hasil tersebut termasuk dalam daya hambat kuat.

Bedasarkan Tabel 6. hasil pengamatan dapat diketahui bahwa perlakuan B konsentrasi 4% memiliki rerata zona bening sebesar 22,90 mm dan pada perlakuan E konsentrasi 10% dengan hasil rerata zona bening terendah sebesar 15,95 mm. Kemudian dilakukan uji analisa sidik ragam untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan. Tabel analisa sidik ragam yang disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Analisa Uji Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	112,959	28,240	14,678	3,48	5,99
Acak	10	19,239	1,923886667			
Total	14					

Keterangan :

** : Berbeda sangat nyata

Pada Tabel 8. perhitungan analisa sidik ragam diatas menunjukkan bahwa ekstrak daun *P. foetida* L. memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Ketika nilai F hitung lebih besar dari F tabel 5% dan lebih besar dari F tabel 1% atau nilai dari 14,678 lebih besar dari nilai 3,48 dan lebih besar dari 5,99. Maka H_0 ditolak da H_1 diterima yang berarti perlakuan tersebut memberikan pgaruh sangat berbeda nyata. Perbedaan masing-masing perlakuan terhadap zona hambat bakteri didukung dengan perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf $p > 5\%$ (Kepercayaan 95%) maupun taraf 1% (kepercayaan 1%). Diperoleh hasil uji F dinyatakan berbeda sangat nyata, maka akan dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Hasil tabel uji BNT disajikan pada Tabel 9.

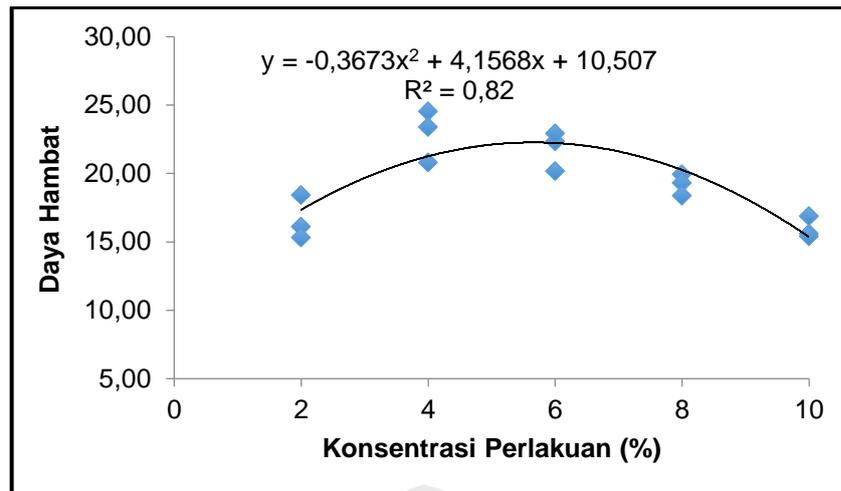
Tabel 9. Uji Beda Nyata Terkecil

Perlakuan	Rerata	E	A	D	C	B	Notasi
		15,95	16,60	19,19	21,80	22,90	
E	15,95	–					a
A	16,60	0,65 ^{ns}	–				a
D	19,19	3,24 [*]	2,59 [*]	–			b
C	21,80	5,84 ^{**}	5,19 ^{**}	2,61 [*]	–		c
B	22,90	6,94 ^{**}	6,29 ^{**}	3,71 ^{**}	1,10 ^{ns}	–	c

Keterangan :

- ns : tidak berbeda nyata
- * : berbeda nyata
- ** : berbeda sangat nyata

Pada hasil tabel uji BNT didapatkan nilai hasil dari perlakuan E (10%) tidak berpengaruh terhadap semua perlakuan sehingga diberi notasi a. Perlakuan A (2%) tidak berpengaruh terhadap perlakuan E (10%) sehingga diberi notasi a. Perlakuan D (8%) berbeda nyata dengan perlakuan E (10%) dan A (2%) sehingga diberi notasi b. Perlakuan C (6%) berbeda sangat nyata dengan perlakuan E (10%), A (2%) dan berbeda nyata dengan perlakuan D (8%) sehingga diberi notasi c. B (4%) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata pada perlakuan A (2%), D (8%), dan E (10%) dan tidak berbeda nyata pada perlakuan C (6%) sehingga di beri notasi c. Dari data diatas dapat disimpulkan bahwa perlakuan B (4%) dan C (6%) merupakan konsentrasi terbaik yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri *P. fluorescens* untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antar perlakuan dengan zona bening maka perlu dilakukan uji polinomial ortogonal. Hasil perhitungan uji polinomial ortogonal yang berupa grafik disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Grafik Uji Polinomial Ortogonal

Berdasarkan grafik diatas dapat diketahui bahwa pemberian penambahan konsentrasi perlakuan ekstrak daun *P. foetida* L. terhadap zona bening yang dihasilkan pada hasil uji polinomial ortogonal menunjukkan hasil kuadratik dengan koefisien nilai determinasi $R^2 = 0,82$ dengan persamaan $y = 10,507 - 4,157 X_j + 0,367 X_j^2$, berdasarkan persamaan tersebut didapatkan konsentrasi optimum pada 5,663% diperoleh rerata zona hambat sebesar 22,279. Dari grafik tersebut maka dapat disimpulkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak daun *P. foetida* L. yang digunakan zona hambat yang terbentuk belum tentu selalu semakin besar ketika sudah mencapai titik optimum. Hal ini menunjukkan ekstrak daun *P. foetida* L. mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Menurut Utami, Nurhartadi, Putra, 2013) diameter zona hambat tidak selalu naik sebanding dengan naiknya konsentrasi antibakteri, kemungkinan ini terjadi karena perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar serta jenis dan konsentrasi senyawa antibakteri yang berbeda juga memberikan diameter zona hambat yang berbeda pada lama waktu tertentu.

Berdasarkan penelitian mengenai aktivitas antibakteri daun *P. foetida* L. terhadap bakteri *P. fluorescens* bersifat bakteristatik dengan dengan respon yang kuat. Bakteristatik ini bila zona hambat mengalami penurunan pada waktu

pengamatan 48 jam zona bening yang ada pada cawan semakin mengecil dan mulai di tumbuh oleh bakteri. Menurut Kusumawati, Supriningrum dan Rozadi (2015), antibakteri bakterostatik bekerja menghambat perbanyakan populasi bakteri dan tidak mematikan, sedangkan bakteriosida bekerja membunuh bakteri. Bakterostatik dapat bertindak sebagai bakteriosida dalam konsentrasi tinggi. Kadar minimal yang dibutuhkan untuk menghambat bakteri atau membunuhnya masing-masing dikenal sebagai Kadar Hambat Tumbuh Minimal (KHTM) dan Kadar Bunuh Minimal (KBM)

4.3 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah suhu selama waktu inkubasi. Pertumbuhan bakteri dapat dipengaruhi oleh faktor lingkungan yaitu suhu. Pada penelitian ini suhu inkubasi yang digunakan adalah 32 °C. Masing-masing bakteri dapat tumbuh pada kisaran suhu tertentu. Menurut Arief, Sulmartiwi, Prayoga, Saputri (2010), bakteri *Pseudomonas* sp. dapat tumbuh optimal pada kisaran 25-35 °C dengan suhu maksimum 40 °C.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. terhadap bakteri *P. fluorescens* diperoleh hasil berbeda sangat nyata yaitu pada pengamatan diameter zona bening didapatkan nilai tertinggi pada perlakuan 4% (B) sebesar 22,90 mm, sedangkan rata-rata zona bening terendah pada perlakuan 10% (E) sebesar 15,95 mm. Zona bening yang dihasilkan pada hasil uji polinomial ortogonal menunjukkan hasil kuadratik dengan koefisien nilai determinasi $R^2 = 0,82$ dengan persamaan $y = 10,507 - 4,157 X_j + 0,367 X_j^2$, berdasarkan persamaan tersebut didapatkan konsentrasi optimum pada 5,663% diperoleh rerata zona hambat sebesar 22,279 mm.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian tentang ekstrak daun *P. foetida* L. dapat menghambat aktifitas bakteri *P. fluorescens* dengan konsentrasi terbaik pada 4% dimana dengan konsentrasi sedikit sudah bisa menghambat pertumbuhan bakteri. akan tetapi disarankan dilakukan uji *in vivo* terlebih dahulu untuk membuktikan keefektifan bahan tersebut pada organisme budidaya.

DAFTAR PUSTAKA

- Abriyanto, A. E., Sabikis, dan Sudarso. 2012. Aktivitas anti fungi ekstrak etanol daun sembukan (*Paederia foetida L*) terhadap *Candida albicans*. *Pharmacy*. **9**(3):1-10.
- Afrianto, E., E. Liviawaty, Z. Jamaris, dan Hendi. 2015. Penyakit Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta. 65 hlm.
- Agustina, E., F. Andiarna, N. Lusiana, R. Purnamasari, dan M. I. Hadi. 2018. Identifikasi senyawa aktif dari ekstrak daun jamu air (*Syzygium aqueum*) dengan perbandingan beberapa pelarut pada metode maserasi. *Biotropic The Journal of Tropical Biology*. **2**(2):109-118.
- Alfiah, R. R., S. Khotimah, dan M. Turnip. 2015. Efektifitas ekstrak metanol daun sembung rambat (*Mikania micrantha Kunth*) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. *Jurnal Protobiont*. **4**(1):52-57.
- Aminah, N. Tomayahu, dan Z. Abidin. 2017. Penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol kulit buah alpukat (*Persea americana Mill.*) dengan metode spektrofotometri uv-vis. *Jurnal fitofarmaka Indonesia*. **4**(2):226-230.
- Anggara, S. 2015. Metode Penelitian Administrasi. Pustaka Setia Bandung. Bandung. 15 hlm.
- Anisah, S. Khotimah, dan A. H. Yanti. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak rimpang jeringau (*Acorus calamus L.*) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Protobiont*. **3**(3):1-5.
- Apriyanto, H., E. Harpeni, A. Setyawan, dan Tarsim. 2014. Pemanfaatan ekstrak buah *Rhizophora* sp. sebagai anti bakteri terhadap bakteri patogen ikan air tawar. *E-jurnal Rekayasa Dan Teknologi Budidaya Perairan*. **3**(1):290-296.
- Arief, M., L. Sulmartiwi, Prayogo, dan H. M. Saputri. 2010. Isolasi bakteri indigen sebagai pendegradasi bahan organik pada media pembenihan ikan lele dumbo (*Clarias sp.*) sistem resirkulasi tertutup. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **2**(2):117-122.
- Azizah, Z. Zulharmita, dan S. W. Wati. 2018. Skrining fitokimia dan penetapan kadar flavonoid total ekstrak etanol daun pare (*Momordica charantina L.*). *Jurnal Farmasi Higea*. **10**(2):162-172.
- Bahira, S., D. Garnayak, S. Raut, T. Moharana, dan S. Behera. 2018. An ethnobotanical assessment of some medical plants in pradhanpat waterfall and its adjoining regions of deogarh (Odisha) India. *International Journal of Herbal Medicine*. **6**(6):1-9.
- Behera, B., S. Behera, P. K. Jena, D. P. Barik. dan S. K. Naik. 2017. Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from internode explants of *Paederia foetida L.* A valuable medicinal plant. *Biosciences Biotechnology Research Asia*. **14**(3):892-900.
- Cahyono, B. 2001. Budidaya Ikan Perairan Umum. Kanisius. Yogyakarta. 28 hlm.

- Chanda, S., I. P. Sarethy, B. De, dan K. Singh. 2013. *Paederia foetida* a promising ethno medicinal tribal plant of north eastern India. *Journal of Forestry Research*. **24**(4):801-808.
- Das, S., L. Kanodia, A. Mukherjee, dan A. Hakim. 2013. Effect of ethanolic extract of leaves of *Paederia foetida* Linn. on acetic acid induced colitis in albino rats. *Indian Journal of Pharmacology*. **45**(5):453-458.
- Desi, Y., P. Novia, dan Asnurita. 2017. Karakter morfologi dan biokimia berbagai isolat rizobakteria dari rizosfer jagung (*Zea mays*). *Pros Sem Masy Biodiv Indon*. **3**(1):1-5.
- Dewangga, V. S., A. P. Nirwana. 2019. Uji daya hambat estrak etanol daun skrikaya (*Annona squamosa* L.). *Jurnal Kesehatan Kusuma Husada*. 50-56.
- Dewi, M. K., E. Ratnasari, dan G. Trimulyono. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak daun majapahit (*Crescentia cujete*) terhadap pertumbuhan bakteri *Ralstonia solanacearum* penyebab penyakit layu. *Lentera Bio*. **3**(1):51-57.
- Dima, L. L. R. H., Fatimawali, dan W. A. Lolo. 2016. Uji Aktivitas antibakteri ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera* L) terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus*. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*. **5**(2):282-289.
- Eissa, N., E. A. El-Gheit, A. dan A. Shaeen. 2014. Protective effect of *Pseudomonas fluorescens* as a probiotic in cotrolling fish pathogens. *American Journal of BioScience*. **2**(5):175-181.
- Fitasari, E., K. Reo, dan N. Niswi. 2016. Penggunaan kadar protein berbeda pada ayam kampung terhadap penampilan produksi dan pencernaan protein. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. **26**(2):73-83.
- Foysal, M. J., Rahman, dan Alam. 2011. Antibiotic sensitivity and *In vitro* antimicrobial activity of plant extracts to *Pseudomonas fluorescens* isolate collected from diseased fish. *International Journal of Natural Sciences*. **1**(4):82-88.
- Hermansyah, Gunawan, dan L. Herayanti. 2015. Pengaruh penggunaan laboratorium virtual terhadap penguasaan konsep dan kemampuan berpikir kreatif siswa pada materi getaran dan gelombang. *Jurnal Pedidikan Fisika dan Teknologi*. **1**(2):97-102.
- Ismail, Y. S., C. Yulvizar, dan Putriani. 2017. Isolasi , karakteristik dan uji aktivitas antimikroba bakteri asam laktat dari fermentasi biji kakao (*Theobroma cacao* L.). *Jurnal Bioleuser*. **1**(2):45-53.
- Juwitanti, E., C. Ain, dan P. Soedarsono. 2013. Kandungan nitrat dan fosfat air pada proses pembusukan enceng gondok (*Eichhornia* sp.). *Diponegoro Journal of Maquares*. **2**(4):46-52.
- Kartika, T. 2017. Potensi tumbuhan liar berkhasiat obat di sekitar pekarangan kelurahan silaberanti Kecamatan Silaberanti. *Sain matika*. **14**(2):89-99.
- Khushbu, C., P. Anar, P. Mayuree, M. Carol, S. Roshni, dan A. Subodh. 2010. *Paederia foetida* Linn as a potential medicinal plant a review. *Journal of Pharmacy Research*. **3**(12):3135-3137.

- Kusuma, S., A. D. Kurniawati, Y. Rahmi, I. H. Rusdan, dan R. M. Widyanto. 2017. Pengawasan Mutu Makanan. UB Press. Malang. 69 hlm.
- Kusumawati, E., R. Supriningrum, dan R. Rozadi. 2015. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kecombrang *Etilingera elatior* (Jack) R.M.S terhadap *Salmonella typhi*. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. **1**(1):1-7.
- Lestari, A. P., A. Rosyid, dan I. Wahyudi. 2016. Aktivitas ekstrak daun cabe rawit (*Capsicum frutescens* L.) terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *in vitro*. *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*. **1**(2):1-6.
- Lestari, P. B., dan T. W. Hartati. 2017. Mikrobiologi Berbasis Inkuriry. Gunung Samudera. Malang. 116 hlm.
- Manoppo, H., dan M. E. F. Kolopita. 2011. Pengimbuhan ragi roti dalam pakan meningkatkan respons imun nospesifik dan pertumbuhan ikan nila. *Jurnal Veter*. **16**(2):204-211.
- Manurung, U. N. 2018. Identifikasi bakteri patogen pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di lokasi budidaya ikan air tawar Kabupaten Kepulauan Sangihe. *Prosiding Seminar Nasional KSP2K II*. **1**(2):186-193.
- Martinez-Garcia, P. M., D. Ruano-Rosa, E. Schiliro, P. Prieto, C. Ramos, P. Podriguez-Palenzuela, dan J. Mercado-Blanco. 2015. Complete genome sequence of *Pseudomonas fluorescens* strain PICF7 an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea* L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahliae*. *Biomed Central*. **10**(10):1-10.
- Morshed, H., M. S. Islam. S. Parvin, M. U. Ahmed, M. S. Islam, A.G. M. Mostofa, dan M. S. B. Sayeed. 2012. Antimikroba and cytotoxic activity of the methanol extract of *Paederia foetida* Linn. (*Rubiaceae*). *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **2**(1):77-80.
- Mulyadi, M., Wuryanti, dan P. Ria. 2013. Kosentrasi hambat minimum (KHM) kadar sampel alang-alang (*Imperata cylindrica*) dalam etanol melalui metode difusi cakram. *Chem info*. **1**(1):35-42.
- Ngajow, M., J. Abidjulu, dan V. S. Kamu. 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Jurnal MIPA Unsrat Online*. **2**(2):128-132.
- Ni'matuzahroh, dan S. Prasetyaningrum. 2018. Observasi Teori dan Aplikasi dalam Psikologi. UMM Press. Malang. 45 hlm.
- Nurchayanti, A. D. R., dan J. Wandra. 2012. Mikoriza. Bios Majalah Ilmiah Semipopuler. Diponegoro. 44 hlm.
- Pratama, R. S., A. Fridayanti, dan A. Ibrahim. 2015. Efektifitas antiinflamasi fraksi air ekstrak daun sembukau (*Paederia foetida* L.) pada tikus putih (*Rattus norvegicus*). *Jurnal Sains dan Kesehatan*. **1**(1):29-33.
- Pratiwi, H., N. Aini, dan R. Soelistyono. 2016. Penekanan klorosis dengan *Pseudomonas fluorescens* dan belerang untuk peningkatan hasil kacang tanah di tanah alkalin. *Buletin Palawija*. **14**(1):9-17.

- Purnama, R., Melki, dan W. Ayu, Rozirwan. 2011. Potensi ekstrak rumput laut *Halimeda renchii* dan *Euchema cottonii* sebagai antibakteri *Vibrio* sp. *Maspari Journal*. **2**:82-88.
- Rahmi, A., E. Roebiakto, dan L. Lutpiatina. 2016. Potensi ekstrak rimpang kencur (*Kaempferia galanga* L.) menghambat pertumbuhan *Candida albicans*. *Medical Laboratory Technology Journal*. **2**(2):70-76.
- Rani, P., N. K. Mahato, dan A. Sharma. 2017. Genome mining and predictive function profiling of acidophilic rhizobacterium *Pseudomonas fluorescens* pt14. *Indian Journal Microbial*. **57**(2):15-161.
- Sa'adah, H., dan H. Nurhasnawati. 2015. Perbandingan pelarut etanol dan air pada pembuatan ekstrak umbi bawang tiwai (*Eleutherine americane* Merr) menggunakan metode maserasi. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. **1**(2):149-153.
- Saparinto, C. 2009. Budidaya Ikan di Kolam Terpal. Penebar Swadaya. Jakarta. 101 hlm.
- Sasongko, P., W. Mushollaeni, dan Herman. 2014. Aktivitas antibakteri asap cair dari limbah tempurung kelapa terhadap daging kelinci asap. *Buana Sains*. **14**(2):193-197.
- Scales, B. S., R. P. Dickson, J. J. LiPuma, dan G. B. Huffnagke. 2014. Microbioly, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Journal Asmong CMR*. **27**(4): 927-948.
- Seryanto, A. E. 2013. Memperkenalkan kembali metode eksperimen. *Jurnal Ilmu Komunikasi*. **3**(1):37-48.
- Setiawati, M. R., P. Suryatmana. D. Herdiyantoro, dan Z. Ilmiyati. 2014. Karakteristik pertumbuhan dan waktu generasi isolat *Azotobacter* sp. dan bakteri endofitik asal ekosistem lahan sawah. *Jurnal Agroekotek*. **6**(1):12-20.
- Siregar, A. F., A. Sabdono, dan D. Pringgenies. 2012. Potensi antibakteri ekstrak rumput laut terhadap bakteri penyakit kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus*. *Journal of Marine Research*. **1**(2):152-160.
- Siska, M., dan R. Salam. 2012. Desain eksperimen pengaruh zeolit terhadap penurunan limbah kadmium (cd). *Jurnal Ilmiah Teknik Industri*. **11**(2):173-184.
- Sitepu, N. B., dan Masrah. 2018. Pengaruh ekstrak etanol herba sembukun (*Paederia scandens*) terhadap aktivitas enzim Alanine Transaminase (ALT) dan Aspartate Transaminase (AST) pada mencit jantan (*Musmusculus*) yang diinduksi parasetamol. *Jurnal Saintika*. **10**(1):12-18.
- Soenandar, M., dan R. H. Tjachjono. 2012. Membuat Pestisida Organik. Agromedia Pustaka. Jakarta. 39 hlm.
- Soleha, T. U. 2015. Uji Kepekaan terhadap antibiotik. *Jurnal Unila*. **5**(9):120-123.

- Sompie, I. P. R., B. J. Kepel, dan F. Budiarmo. 2016. Isolasi bakteri resisten merkuri pada urin pasien dengan tumpatan amalgam di puskesmas paniki bawah. *Jurnal e Biomedik*. **4**(2): 1-7.
- Soni, R. K., R. Irchhaiya, V. Dexit, dan S. Alok. 2013. *Paederia foetida* Linn phytochemistry, pharmacological, and tradisional uses. *International Journal Pharmaceutical Sciences and research*. **4**(12):4525-4530.
- Sudarmi, K., I. B. G. Darmayasa, dan I. K. Muksin. 2017. Uji fitokimia dan daya hambat ekstrak daun juwet (*Syzygium cumini*) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* ATCC. *Jurnal Simbiosis*. **5**(2):47-51.
- Sukmawati, D. A. N., E. K. Hayati, dan R. Mutiah. 2013. Uji fitokimia dan uji toksisitas ekstrak etanol tanaman kesembukan (*Paederia foetida* Linn) dengan metode brine shrimp lethality test. *ALCHEMY*. **3**(2):189-193.
- Sukorini, H. 2006. Pengaruh pestisida organik dan interval penyemprotan terhadap hama *Plutellaxylostella* pada budidaya tanaman kubis organik. *GAMMA*. **2**(1):11-16.
- Sulaiman, A. Y., P. Astuti, dan A. D. P. Shita. 2017. Uji antibakteri ekstrak daun kersen (*Muntingia calabura* L.) terhadap koloni *Streptococcus viridians*. *Indonesia Journal for Health Sciences*. **1**(2):1-6.
- Surahmaida, dan P. Handrianto. 2018. Analisis kandungan kimia daun dan batang sembuk (*Paederia foetida*) dengan menggunakan 2 pelarut yang berbeda. *Journal of Pharmacy and Science*. **3**(2):23-27.
- Surjowardojo, P., T. E. Susilorini, dan V. Benarivo. 2016. Daya hambat dekok kulit apel manalagi (*Malus sylvestris* Mill) terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* dan *Streptococcus agalactiae* penyebab mastitis pada sapi perah. *Jurnal Ternak Tropika*. **17**(1):11-21.
- Suryani, L. 2017. Upaya meningkatkan sopan santun berbicara dengan teman sebaya melalui bimbingan kelompok. *E-Jurnal mitra pendidikan*. **1**(1):112-124.
- Swarjana, I. K. 2012. Metodologi Penelitian Kesehatan. ANDI. Yogyakarta. 104 hlm.
- Sya'bani N., A. Yustiati, I. Rustikawati, dan A. M. Lusiastuti. 2015. Frekuensi penanaman probiotik *Bacillus* sp. dan *Staphylococcus* sp. pada media pemeliharaan benih ikan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) untuk ketahanan terhadap *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan Kelautan*. **2**(1):130-140.
- Trivedi, M.K., S.Patil, H. Shettigar, M. Gangwar, dan S. Jana. 2015. Antimicrobial sensitivity pattern of *Pseudomonas fluorescens* after biofield treatment. *Journal infectious diseases and therapy*. **3**(3):1-5.
- Uddin, N., M. K. Hossain, M. R. Haque, dan C. M. Hasan. 2013. Chemical investigation of *Paederia foetida* (Rubiaceae). *Asian Journal of Chemistry*. **25**(2):1163-1164.
- Utami, R., E. Nurhartadi, dan A. Y. T. Putra. 2013. Pengaruh penambahan minyak atsiri kunyit putih (*Kaempferia rotunda*) pada edible film pati tapioka

- terhadap aktivitas antimikroba dan sensoris. *Jurnal Teknosains pangan*. **2**(2):51-56.
- 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.
- Wei-wei, Z. H. Yong-hua, W. Hua-lei, dan S. Li. 2009. Identification and characterization of a virulence associated protease from a pathogenic *Pseudomonas fluorescens* strain. *Veterinary Microbiology*. 139:183-188.
- Wignyanto, N. Hidayat. 2017. Bioindustri. UB Press. Malang. 23 hlm.
- Wulandari, K., R. Sulistijowati, dan L. Mile. 2015. Kitosan kulit udang vaname sebagai edible coating pada bakso ikan tuna. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **3**(3):118-121.
- Yong-hua, H., W. Dang, dan L. Sun. 2012. A tonB-dependent outer membrane receptor of *Pseudomonas fluorescens* virulence and vaccine potential. *Arch Microbial*. 194:795-802.
- Yuan-yuan, S., dan L. Sun. 2015. *Pseudomonas fluorescens* iron-responsive proteins and their involvement in host infection. *Veterinary Microbiology*. 176:309-320.
- Yulianingtyas, A., dan B. Kusmartono. 2016. Optimasi volume pelarut dan waktu maserasi pengambilan flavonoid daun belimbin wuluh (*averhoa bilimbi* L.). *Jurnal Teknik Kimia*. **10**(2):58-64.
- Zahro, L., dan R. Agustini. 2013. Uji efektivitas antibakteri ekstrak kasar saponin jamur tiram putih (*Pleurotus ostreatus*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Unesa Journal of Chemistry*. **2**(3):120-129.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan



(Autoklaf)



(Beaker Glass)



(Blender)



(Blue Tip)



(Bola Hisap)

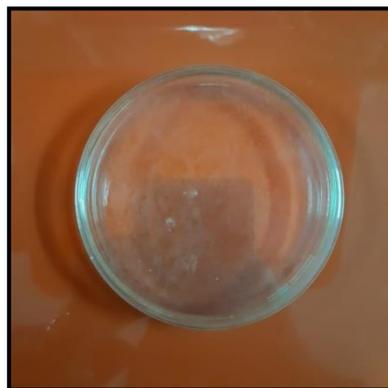


(Botol Film 10 ml)

Lampiran 1. Alat dan Bahan (Lanjutan)



(Bunsen)



(Cawan Petri)



(Toples 2000 ml)



(Corong)



(Cover glass)



(Destruktor)

Lampiran 1. Alat dan Bahan (Lanjutan)



(Erlenmeyer 500 ml)



(Rotary Evaporator)



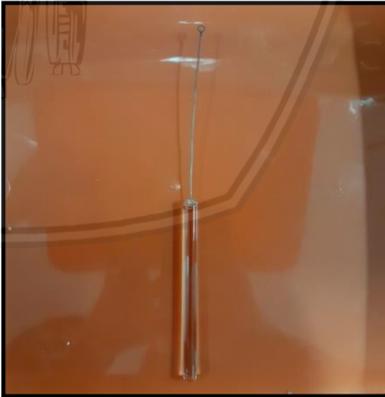
(Gelas Ukur)



(Hot Plate)



(Jangka Sorong)



(Jarum Ose)

Lampiran 1. Alat dan Bahan (Lanjutan)



(Timbangan digital)



(Kulkas)



(Laminar Air Flow)



(Vortex mixer)



(Micropipet 100 µl)



(Micropipet 1000 µl)

Lampiran 1. Alat dan Bahan (Lanjutan)



(Mikroskop)



(Yellow Tip)



(Colony Counter)



(Pipet Volume)



(Rak Tabung Reaksi)

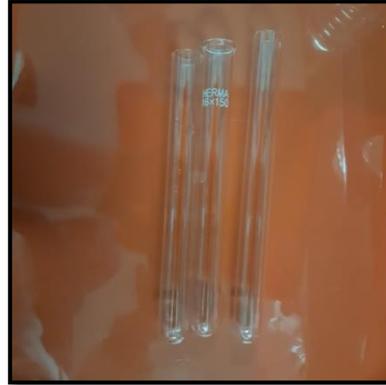


(Triangel)

Lampiran 1. Alat dan Bahan (Lanjutan)



(Spayer)



(Tabung Reaksi)



(Timbangan Analitik)



(Akuades)



(Alkohol 70%)



(Aluminium Foil)

Lampiran 1. Alat dan Bahan (Lanjutan)



(DMSO 10%)



(Etanol 96%)



(Kertas Cakram)



(Larutan Iodin)



(Larutan Kristal Violet)



(Larutan Safranin)

Lampiran 1. Alat dan Bahan (Lanjutan)



(NaCl)



(Plastik Wrap)



(PSA)



(Kertas Saring)



(Spiritus)



(TSB)

Lampiran 2. Pembuatan Ekstrak Daun *P. foetida* L.



Daun *P. foetida* L.



Dikeringkan selama 7 hari



Daun *P. foetida* timbang sebanyak 200 gram



Daun *P. foetida* yang sudah kering dihaluskan



Ditambahkan etanol 96% 1000 ml dengan perbandingan 1:5



Maserasi dilakukan selama 24 jam

Lampiran 2. Pembuatan Ekstrak Daun *P. foetida* L. (Lanjutan)



Dilakukan evaporasi dengan lama waktu 2 jam 25 menit



Hasil dari maserasi disaring



Didapatkan ekstrak daun *P. foetida* berupa pasta

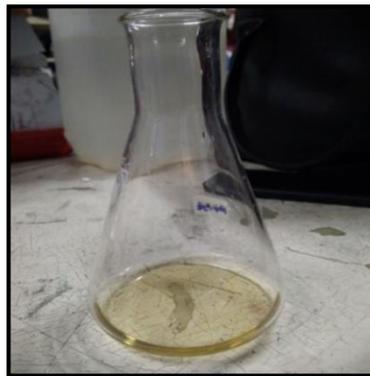


Dibungkus aluminium foil dan plastik wrap disimpan dalam kulkas penyimpanan

Lampiran 3. Pembuatan Media Agar



PSA ditimbang sebanyak 0,44 gram



Dimasukkan erlenmeyer dan ditambahkan aquades 9 ml



Dimasukkan ke dalam tabung reaksi



Dipanaskan menggunakan hotplate



Dilakukan sterilisasi menggunakan autoklaf



PSA dimiringkan dengan kemiringan 30°C, ditunggu sampai padat

Lampiran 4. Pembuatan Media Cair (*Tryptic Soy Borth*)



Media TSB
ditimbang 0,3 gram



Media dilarutkan
dengan aquades dan
dihomogenkan



Dilakukan sterilisasi



Media dimasukkan ke
dalam tabung reaksi

Lampiran 5. Pembuatan Natrium Fisiologis



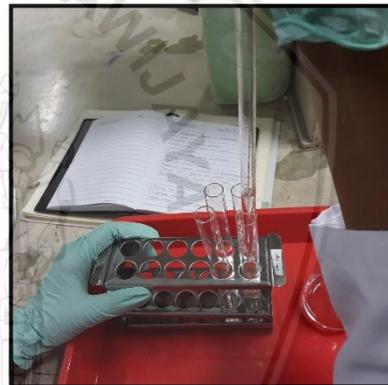
NaCl sebanyak 0,27 gram



Akuades ditambahkan sebanyak 30 ml dan dihomogenkan



Tabung reaksi ditutup kapas dan aluminium foil



Larutan diambil 10 ml dan dibagi ke dalam tabung reaksi

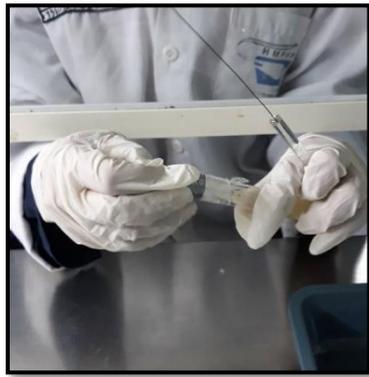


Tabung reaksi yang berisi larutan dimasukkan ke dalam autoklaf

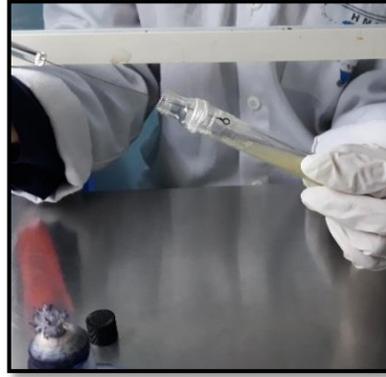


Sterilisasi dilakukan menggunakan autoklaf

Lampiran 6. Peremajaan Bakteri *P. fluorescens*



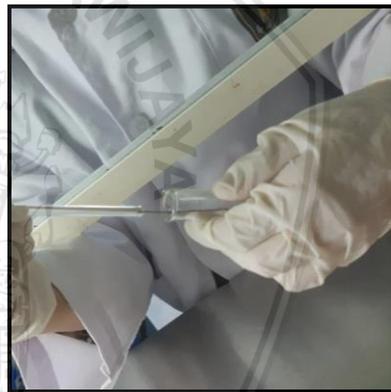
Isolat bakteri *P. fluorescens* disiapkan



Diambil satu ose isolat bakteri *P. fluorescens*



Tabung reaksi ditutup kapas, aluminium foil dan plastik wrap



Isolat bakteri digoreskan pada agar miring baru

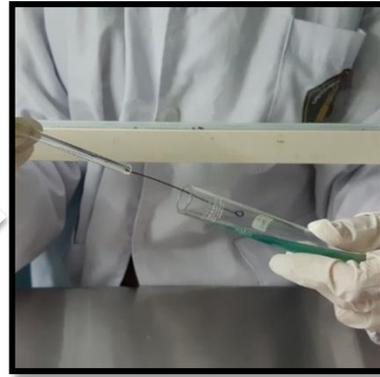


Bakteri diinkubasi selama 24-48 jam

Lampiran 7. Kultur Bakteri *P. fluorescens* di Media Cair



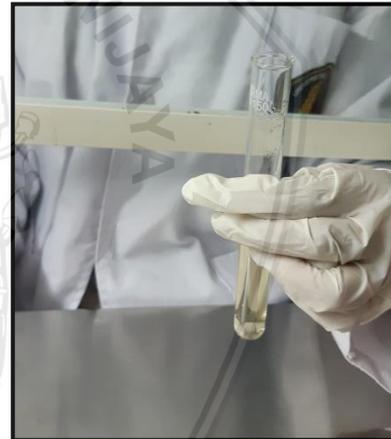
Disiapkan bakteri *P. fluorescens* yang telah diremajakan



Diambil satu ose bakteri *P. fluorescens*



TSB divortex sampai homogen



Dimasukkan ke dalam TSB



Bakteri *P. fluorescens* pada TSB diinkubasi selama 24-48jam

Lampiran 8. Pengenceran Bakteri *P. fluorescens*



Bakteri pada media cair disiapkan



Suspensi bakteri diambil sebanyak 1 ml



Ditutup kapas dan divortex



Dimasukkan dalam NaFis sebagai pengenceran pertama 10^9



Dilakukan pengenceran bertingkat sampai 10^7



Diperoleh bakteri kepadatan 10^7

Lampiran 9. Perhitungan Ekstrak Konsentrasi Uji

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

a. Konsentrasi 20%

Pembuatan konsentrasi 20% merupakan konsentrasi stok ekstrak daun *P.foetida* L. tertinggi yang digunakan dalam pembuatan konsentrasi 2%-10%.

Pembuatan ekstrak stok sebesar 20% dengan rumus berikut :

$$20\% = \frac{1 \text{ gram ekstrak kasar}}{5 \text{ ml (0,5 DMSO 100\% + 4,5 akuades steril)}}$$

b. Konsentrasi 2%

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 2 \text{ ml} \times 20.000 &= V_2 \times 200.000 \\ V_2 &= 0,2 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\text{DMSO 10\%} = 2 \text{ ml} - 0,2 \text{ ml} = 1,8 \text{ ml}$$

c. Konsentrasi 4%

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 4 \text{ ml} \times 20.000 &= V_2 \times 200.000 \\ V_2 &= 0,4 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\text{DMSO 10\%} = 2 \text{ ml} - 0,4 \text{ ml} = 1,6 \text{ ml}$$

d. Konsentrasi 6%

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 6 \text{ ml} \times 20.000 &= V_2 \times 200.000 \\ V_2 &= 0,6 \text{ ml} \end{aligned}$$

$$\text{DMSO 10\%} = 2 \text{ ml} - 0,6 \text{ ml} = 1,4 \text{ ml}$$

Lampiran 9. Perhitungan Ekstrak Konsentrasi Uji (Lanjutan)

e. Konsentrasi 8%

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$8 \text{ ml} \times 20.000 = V2 \times 200.000$$

$$V2 = 0,8 \text{ ml}$$

$$\text{DMSO } 10\% = 2 \text{ ml} - 0,8 \text{ ml} = 1,2 \text{ ml}$$

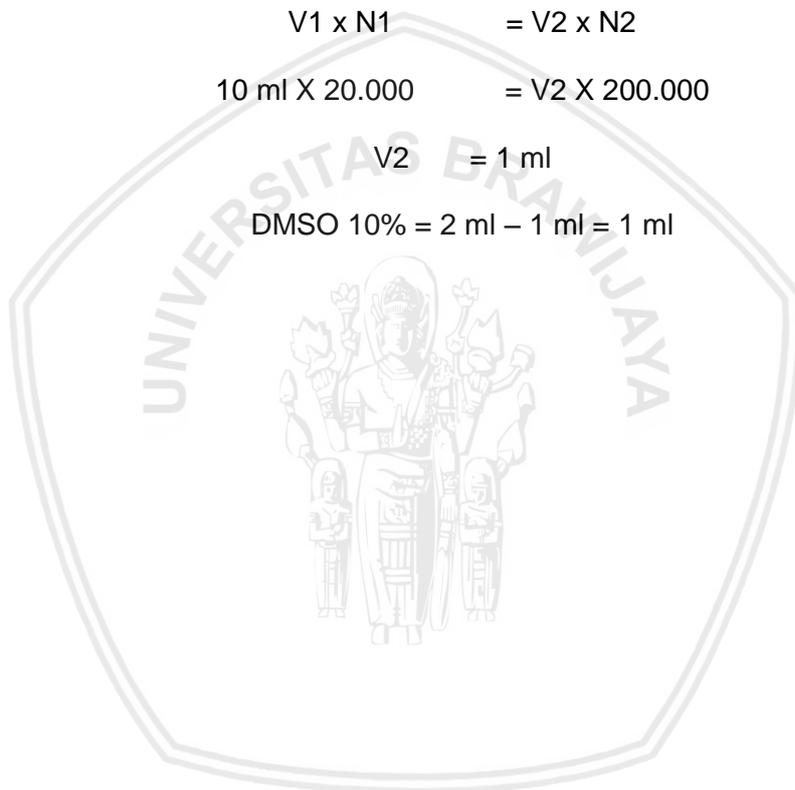
f. Konsentrasi 10 %

$$V1 \times N1 = V2 \times N2$$

$$10 \text{ ml} \times 20.000 = V2 \times 200.000$$

$$V2 = 1 \text{ ml}$$

$$\text{DMSO } 10\% = 2 \text{ ml} - 1 \text{ ml} = 1 \text{ ml}$$



Lampiran 10. Proses Uji Cakram



Kultur Bakteri *P. Media* PSA



Dilarutkan dengan akuades



Di Sterilisasi



Dipanaskan diatas hotplate



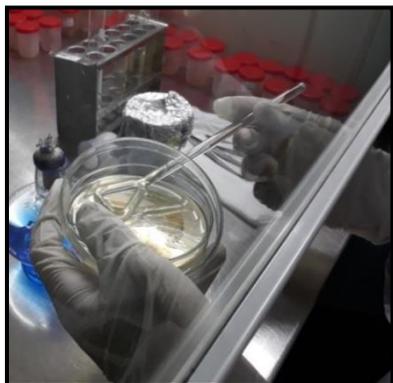
Dituang dan di tunggu sampai memadat



Dibuat konsentrasi



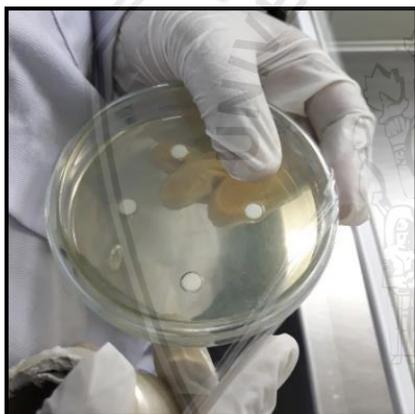
Lampiran 10. Proses Uji Cakram (Lanjutan)



Dimasukkan bakteri dan diratakan



Kertas cakram direndam pada konsentrasi



Kertas cakram dimasukkan



Diinkubasi selama 24-48 jam

Lampiran 11. Hasil Uji Biokimia Bakteri *P. fluorescens*



**KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA
BALAI BESAR PERIKANAN BUDIDAYA AIR PAYAU
LABORATORIUM UJI BBPBAP JEPARA**

Alamat surat: PO Box 1 Jepara , Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418
Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724
www.bbpbajepara.dipb.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>Pseudomonas fluorescens</i>
Gram	-
Bentuk	Batang
Katalase	+
Oksidase	+
H ₂ S	-
Indol	-
Citrate	+
OF medium	Oksidatif
VP	-
MR	-
TSIA	A/A
Urea	-
Glukosa	+
Sukrosa	-
37 ^o C	+
Pigment flourecent	+

Lab. Mikrobiologi BBPBAP Jepara
Penyelia

Sri Murti Astuti, SP.





Lampiran 12. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun *P. foetida* L.



PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR
DINAS KESEHATAN
UPT LABORATORIUM HERBAL
MATERIA MEDICA BATU
 Jalan Lahor No.47 Telp/Fax (0341) 593396. Batu
KOTA BATU

65313

Nomor : 074 / 38D / 102.7 / 2019
 Sifat : Bina
 Perihal : Surat Keterangan Analisa Kualitatif

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

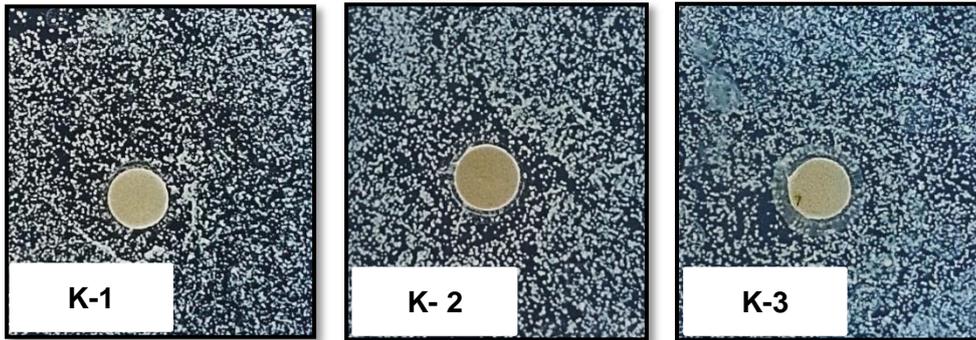
- Identitas Pemohon**
 Nama : Ayu Dila Pebrians
 NIM : 155080500111018
 Fakultas : Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya
 Alamat Instansi : Malang
- Identitas Sampel**
 Nama daerah sampel : Simbukan
 Nama latin : *Paederia foetida*
 Bagian Sampel : Daun
 Bentuk sampel : Serbuk
 Tanggal penerimaan : 09 April 2019
 Tanggal pemeriksaan : 11 April 2019
- Hasil**

No	Identifikasi Senyawa	Parameter	Hasil
1.	Flavonoid	Merah Bata, Merah Muda, Merah Tua	Positif
2.	Alkaloid	Meyer	Endapan Putih
		Dragendrof	Endapan Jingga
		Bouchardat	Endapan Cokelat
3.	Tanin	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman, Coklat Kehitaman	Positif
4.	Terpenoid	Steroid	Hijau Kebiruan
		Triterpenoid	Orange, Jingga Kecokelatan
5.	Polifenol	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman, Coklat Kehitaman	Positif
6.	Saponin	Busa Permanen	Positif
- Lampiran**

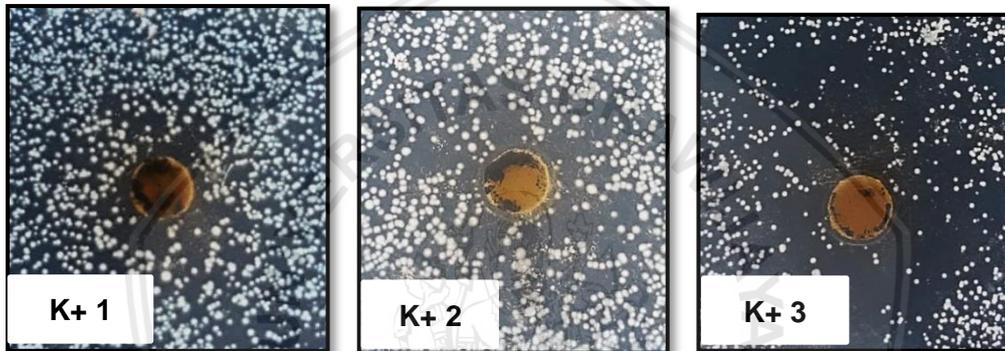
Nama Sampel	Flavonoid	Alkaloid		
		Meyer	Dragendrof	Bouchardat
Daun Simbukan (<i>Paederia foetida</i>)				
Nama Sampel	Tanin	Terpenoid	Polifenol	Saponin
Daun Simbukan (<i>Paederia foetida</i>)				

Lampiran 13. Hasil Uji Cakram

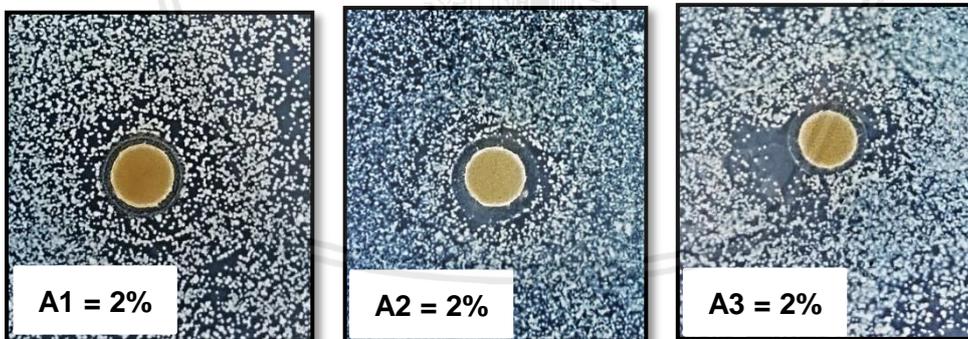
1. Perlakuan Kontrol Negatif



2. Perlakuan Kontrol Positif

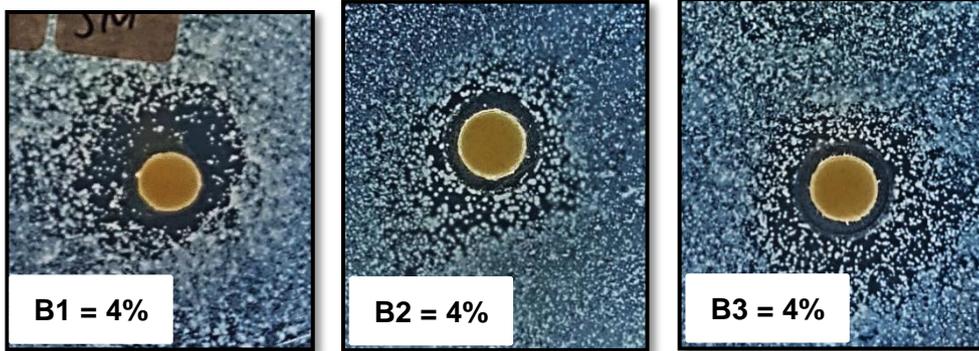


3. Perlakuan A dengan Konsentrasi 2%

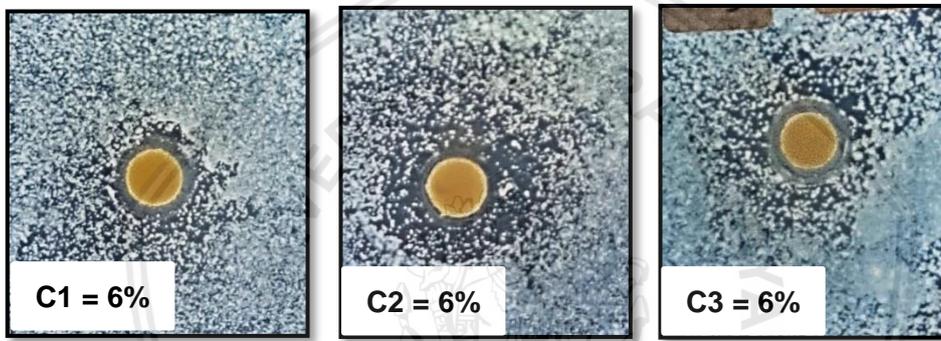


Lampiran 13. Hasil Uji Cakram (Lanjutan)

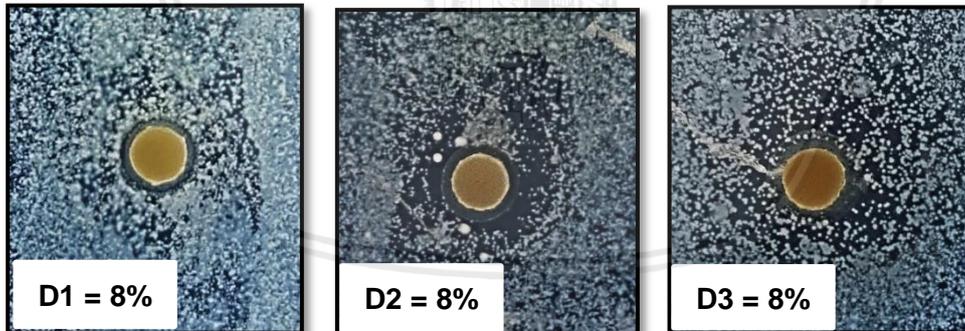
4. Perlakuan B dengan konsentrasi 4%



5. Perlakuan C dengan konsentrasi 6%

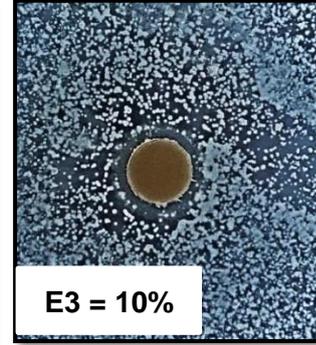
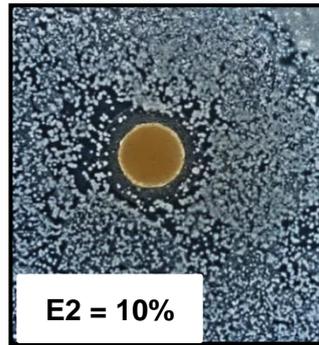
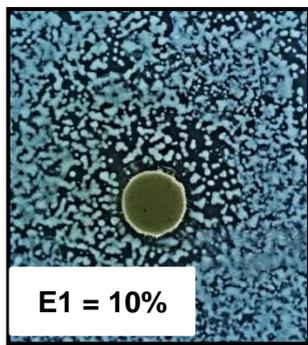


6. Perlakuan D dengan konsentrasi 8%



Lampiran 13. Hasil Uji Cakram (Lanjutan)

7. Perlakuan E dengan konsentrasi 10%



Lampiran 14. Hitungan Rancangan Percobaan

Analisa Data Pengaruh Pemberian ekstrak daun *P. foetida* L. terhadap bakteri *P. fluorescens* secara secara *in vitro*

- Data Rerata Zona Hambat (mm) Bakteri *P. fluorescens*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata±STDEV
	1	2	3		
A (2%)	16,11	15,30	18,40	49,81	16,60±1,61
B (4%)	24,53	23,38	20,78	68,69	22,90±1,92
C (6%)	22,33	22,90	20,16	65,39	21,80±1,45
D (8%)	19,92	19,29	18,36	57,57	19,19±0,78
E (10%)	16,87	15,58	15,41	47,86	15,95±0,80
Total				289,32	

Perhitungan :

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

$$= \frac{83706,06}{15}$$

$$= 5580,40$$

$$2. \text{ JK Total} = \sum ij^2 - \text{FK}$$

$$= (A1^2+A2^2+A3^2+,,,,,,+E3^2) - \text{FK}$$

$$= (259,53^2+234,09^2+338,56^2+,,,,,,+237,47^2) -$$

$$5580,40$$

$$= 132,198$$

$$3. \text{ JK Perlakuan} = \frac{(\sum A)^2+(\sum B)^2+ (\sum C)^2+(\sum D)^2+ (\sum E)^2}{r} - \text{FK}$$

=

$$\frac{(2481,04)^2+(4718,32)^2+(4275,85)^2+(3314,30)^2+(2290,58)^2}{3}$$

$$5580,40$$

$$=112,95$$

Lampiran 14. Hitungan Rancangan Percobaan (Lanjutan)

$$\begin{aligned} 4. \text{ JK Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 132,198 - 112,959 = 19,239 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 5. \text{ db Total} &= (n \times r) - 1 \\ &= (5 \times 3) - 1 \\ &= 14 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} 6. \text{ db Perlakuan} &= n - 1 \\ &= 5 - 1 \\ &= 4 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Derajat Bebas Acak (db Acak)} &= n \times (r - 1) \\ &= 5 \times (3 - 1) \\ &= 10 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengah Perlakuan (KTP)} &= \frac{\text{JK Perlakuan}}{\text{db perlakuan}} \\ &= \frac{112,959}{4} \\ &= 28,240 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kuadrat Tengah Acak (KTA)} &= \frac{\text{JK Acak}}{\text{db acak}} \\ &= \frac{19,239}{10} \end{aligned}$$

$$= 1,923886667$$

$$\begin{aligned} \text{F Hitung} &= \frac{\text{KT Perlakuan}}{\text{KT Acak}} \\ &= \frac{28,240}{1,923886667} \\ &= 14,678 \end{aligned}$$

Lampiran 14. Hitungan Rancangan Percobaan (Lanjutan)

- Tabel Analisa Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	112,959	28,240	14,678	3,48	5,99
Acak	10	19,239	1,923886667			
Total	14					

Keterangan : * Berbeda Nyata

Karena F hitung lebih besar dari F tabel 5% dan lebih besar dari F tabel 1% maka dinyatakan hasil tersebut sangat berbeda nyata, sehingga dilanjutkan dengan uji BNT.

Uji BNT (Uji Nyata Terkecil)

$$\begin{aligned} \text{SED} &= \sqrt{\frac{2 \times \text{KT Acak}}{\pi (\text{Ulangan})}} \\ &= \sqrt{\frac{2 \times 1,923886667}{3}} = 1,133 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 5\%} &= T \text{ tabel 5\% (db acak)} \times \text{SED} \\ &= 2,228 \times 1,133 \\ &= 2,523 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{BNT 1\%} &= T \text{ tabel 1\% (db acak)} \times \text{SED} \\ &= 3,169 \times 1,133 \\ &= 3,589 \end{aligned}$$

Lampiran 14. Hitungan Rancangan Percobaan (Lanjutan)

• Tabel Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Perlakuan	Rerata	E	A	D	C	B	Notasi
		15,95	16,60	19,19	21,80	22,90	
E	15,95	–					a
A	16,60	0,65 ^{ns}	–				a
D	19,19	3,24 [*]	2,59 [*]	–			b
C	21,80	5,84 ^{**}	5,19 ^{**}	2,61 [*]	–		c
B	22,90	6,94 ^{**}	6,29 ^{**}	3,71 ^{**}	1,10 ^{ns}	–	c

Keterangan :

- ns : tidak berbeda nyata
- * : berbeda nyata
- ** : berbeda sangat nyata

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

• Tabel Uji Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadrat	Kubik	Kuartik
A	49,81	-2	2	-1	1
B	68,69	-1	-1	2	-4
C	65,39	0	-2	0	6
D	57,57	1	-1	-2	-4
E	47,86	2	2	1	1
Q= Σci*Ti		-15,02	-61,7	20,29	-15,03
Hasil Kuadrat		10	14	10	70
Kr= (Σci ²)*r		30	42	30	210
JK=Q ² /Kr		7,520	90,64024	13,723	1,076



Lampiran 14. Hitungan Rancangan Percobaan (Lanjutan)

- Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	98,160			3,48	5,99
Linier	1	7,5200133	7,520013333	3,90876	*	
Kuadratik	1	90,6	90,640238	47,1131	**	
Kubik	1	13,723	13,72280333	7,13285	**	
Kuartik	1	1,076	1,075718571	0,55914	ns	
Acak	10	19,2389	1,923886667	1	ns	
Total	14					

Keterangan :

ns : tidak berbeda nyata

** : berbeda sangat nyata

$$R^2 \text{ Linier} = \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Linier} + \text{JK Acak}}$$

$$= \frac{7,5200133}{7,5200133 + 19,2389}$$

$$= 0,2810287$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}}$$

$$= \frac{90,6}{90,6 + 19,2389}$$

$$= 0,8249088$$

$$R^2 \text{ Kubik} = \frac{\text{JK Kubik}}{\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}}$$

$$= \frac{13,723}{13,723 + 19,2389}$$

$$= 0,4163261$$

Hasil perhitungan R^2 diatas menunjukkan bahwa nilai R^2 kuadratik lebih besar dibandingkan dengan nilai R^2 linier dan kubik yaitu sebesar 0,8249088.

Lampiran 14. Hitungan Rancangan Percobaan (Lanjutan)

Berdasarkan hasil tersebut, maka arah laju kurva yang digunakan adalah kurva kuadratik. Langkah selanjutnya yaitu mencari persamaan regresi kuadratik.

X	Uj
2	-2
4	-1
6	0
8	1
10	2

$$U_j = \frac{X - \text{Rerata } X}{d}$$

$$X = 2 \rightarrow U_j = \frac{X - \text{Rerata } X}{d}$$

$$= \frac{2-6}{2}$$

$$= -2$$

$$X = 4 \rightarrow U_j = \frac{X - \text{Rerata } X}{d}$$

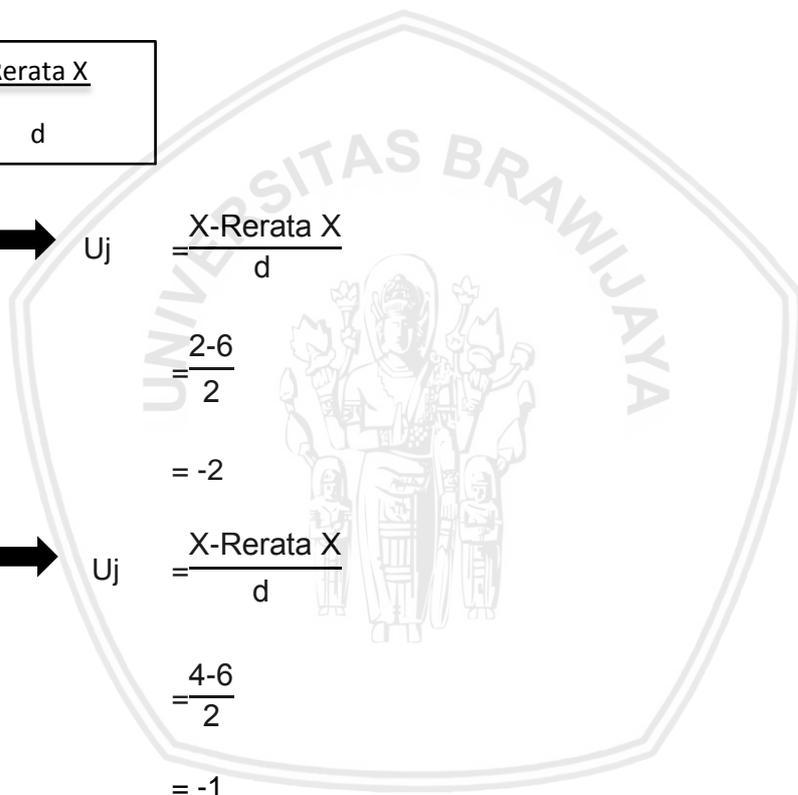
$$= \frac{4-6}{2}$$

$$= -1$$

$$X = 6 \rightarrow U_j = \frac{X - \text{Rerata } X}{d}$$

$$= \frac{6-6}{2}$$

$$= 0$$



Lampiran 14. Hitungan Rancangan Percobaan (Lanjutan)

$$\begin{aligned}
 X = 8 \quad \longrightarrow \quad U_j &= \frac{X - \text{Rerata } X}{d} \\
 &= \frac{8 - 6}{2} \\
 &= 1
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 X = 10 \quad \longrightarrow \quad U_j &= \frac{X - \text{Rerata } X}{d} \\
 &= \frac{10 - 6}{2} \\
 &= 2
 \end{aligned}$$

Data Regresi Kuadratik

	2	4	6	8	10	Total
X_j	2	4	6	8	10	30
U_j	-2,0	-1,0	0,0	1,0	2,0	0,0
U_j²	4,0	1,00	0,00	1,00	4,0	10,0
U_j⁴	16,000	1,000	0,000	1,000	16,000	34,000
Y_{ij}	49,81	68,69	65,39	57,57	47,86	289,320
U_jY_{ij}	-99,62	-68,690	0,000	57,570	95,7200	-15,0
U_j²Y_{ij}	199,24	68,69	0	57,57	191,44	516,94

Setelah mendapatkan data regresi seperti pada tabel diatas, maka disubstitusikan pada rumus berikut:

$$\begin{aligned}
 \text{Persamaan 1 (Mencari } b_1) &= \sum U_j \cdot Y_{ij} &= b_1 \cdot r \cdot \sum U_j^2 \\
 &= -15,02 &= b_1 \cdot 3 \cdot 10 \\
 b_1 &= -0,5006
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Persamaan 2} &= \sum Y_{ij} &= b_0 \cdot n + b_2 \cdot r \cdot \sum U_j^2 \\
 &= 289,32 &= b_0 \cdot 15 + b_2 \cdot 3 \cdot 10 \\
 &= 289,32 &= 15 b_0 + 30 b_2 \dots\dots (\text{Persamaan 2})
 \end{aligned}$$



Lampiran 14. Hitungan Rancangan Percobaan (Lanjutan)

$$\text{Persamaan 3} \quad = \sum U_j^2 \cdot Y_{ij} \quad = b_0 \cdot r \cdot \sum U_j^2 + b_2 \cdot r \cdot \sum U_j^4$$

$$516,94 = b_0 \cdot 3 \cdot 10 + b_2 \cdot 3 \cdot 34$$

$$516,94 = 30 b_0 + 102 b_2 \dots\dots (\text{Persamaan 3})$$

Kemudian substitusikan persamaan 2 dan persamaan 3 untuk mencari b_0 dan b_2 .

$$289,32 = 15 b_0 + 30 b_2$$

$$516,94 = 30 b_0 + 102 b_2$$

$$578,64 = 30 b_0 + 60 b_2$$

$$516,94 = 30 b_0 + 102 b_2$$

$$61,7 = -42 b_2$$

$$b_2 = -1,469$$

Nilai b_2 kemudian disubstitusikan ke Persamaan 2

$$289,32 = 15 b_0 + 30 b_2$$

$$289,32 = 15 b_0 + 30 \cdot (-1,469)$$

$$289,32 = 15 b_0 - 44,07$$

$$289,32 + 44,07 = 15 b_0$$

$$b_0 = 22,226$$

Berdasarkan hasil persamaan diatas, maka diperoleh hasil sebagai berikut :

$$y = b_0 + b_1 \cdot U_j + b_2 \cdot U_j^2$$

$$y = 22,226 + (-0,5006) U_j + (-1,469) \cdot U_j^2$$

Kebalikan transformasi $U_j = \frac{X_j - 2}{6}$, pada persamaan tersebut yaitu:

$$y = 22,226 + (-0,5006) \cdot \frac{X_j - 2}{2} + (-1,469) \cdot \left(\frac{X_j - 2}{2}\right)^2$$

$$y = 22,226 - \frac{0,5006 X_j}{2} + \frac{3,0036}{2} + (-1,469) \cdot \frac{X_j^2 - 2 \cdot 6 X_j + 36}{4}$$

$$y = 22,226 - \frac{0,5006 X_j}{2} + \frac{3,0036}{2} - \frac{1,469 X_j^2}{4} + \frac{17,628 X_j}{4} - \frac{52,884}{4}$$

Lampiran 14. Hitungan Rancangan Percobaan (Lanjutan)

$$y = 22,226 - 0,250 X_j + 1,502 - 0,367 X_j^2 + 4,407 X_j - 13,221$$

$$y = 10,507 + 4,157 X_j - 0,367 X_j^2$$

Mencari titik puncak kurva kuadratik ialah turunan pertama persamaan tersebut =

$$0 \text{ atau } y = 0$$

Persamaan:

$$y = 10,507 + 4,157 X_j - 0,367 X_j^2$$

$$y' = 4,157 - 2 \cdot 0,367 X_j$$

$$y' = 4,157 - 0,734 X_j$$

$$0,734 = 4,157 X_j$$

$$x = 5,663$$

Nilai $x = 5,663$ kemudian disubstitusikan ke dalam persamaan $y = 10,507 + 4,157 X_j - 0,367 X_j^2$, sehingga diperoleh hasil sebagai berikut.

$$y = 10,507 + 4,157 X_j - 0,367 X_j^2$$

$$y = 10,507 + 4,157 \cdot 5,663 - 0,367 \cdot (5,663)^2$$

$$y = 10,507 + 4,157 \cdot 5,663 - 0,367 \cdot 33,06$$

$$y = 10,507 + 23,541 - 11,769$$

$$= 22,279$$

- Grafik Hubungan Zona Hambat Antar Perlakuan Ekstrak Daun *P. foetida* L. Terhadap Bakteri *P. fluorescens*.

