

**UJI SENSITIVITAS EKSTRAK DAUN SENDOK (*Plantago major*) TERHADAP  
BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

**Oleh:**

**SILVIA DEVI ENGGARWATI  
NIM. 155080500111046**



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

**UJI SENSITIVITAS EKSTRAK DAUN SENDOK (*Plantago major*) 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:**

**SILVIA DEVI ENGGARWATI  
NIM. 155080500111046**



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

SKRIPSI

UJI SENSITIVITAS EKSTRAK DAUN SENDOK (*Plantago major*) TERHADAP  
BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO

Oleh :  
**SILVIA DEVI ENGGARWATI**  
NIM. 155080500111046

telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal 16 Mei 2019  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Mengetahui,  
Ketua Jurusan MSP

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing



**(Dr. N. M. Firdaus, MP)**  
NIP. 19680919 200501 1 001  
TANGGAL : 25 JUN 2019

**(Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS)**  
NIP. 19550213 198403 1 001  
TANGGAL : 25 JUN 2019

## IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : Uji Sensitivitas Ektrak Daun Sendok (*Plantago major*)  
terhadap Bakteri *Pseudomonas flourescens* secara *in vitro*

Nama Mahasiswa : Silvia Devi Enggarwati

NIM : 155080500111046

Program Studi : Budidaya Perairan

### PENGUJI PEMBIMBING:

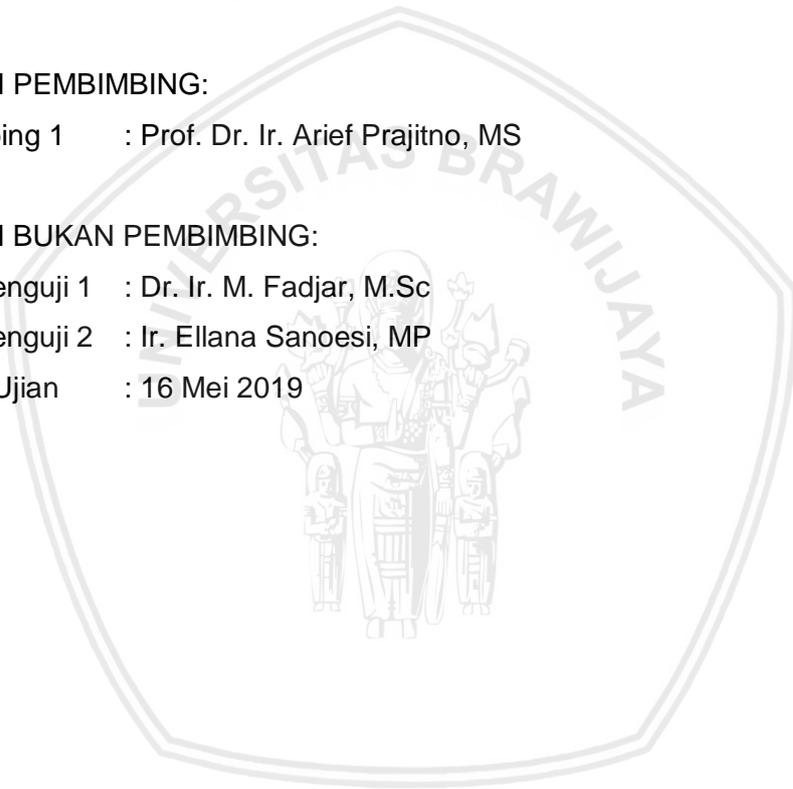
Pembimbing 1 : Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS

### PENGUJI BUKAN PEMBIMBING:

Dosen Penguji 1 : Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc

Dosen Penguji 2 : Ir. Ellana Sanoesi, MP

Tanggal Ujian : 16 Mei 2019



## PERNYATAAN ORISINILITAS

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

Apabila terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi yang diberikan sesuai hukum dan peraturan yang berlaku di Indonesia.



Malang, Mei 2019

Mahasiswa,

Silvia Devi Enggarwati

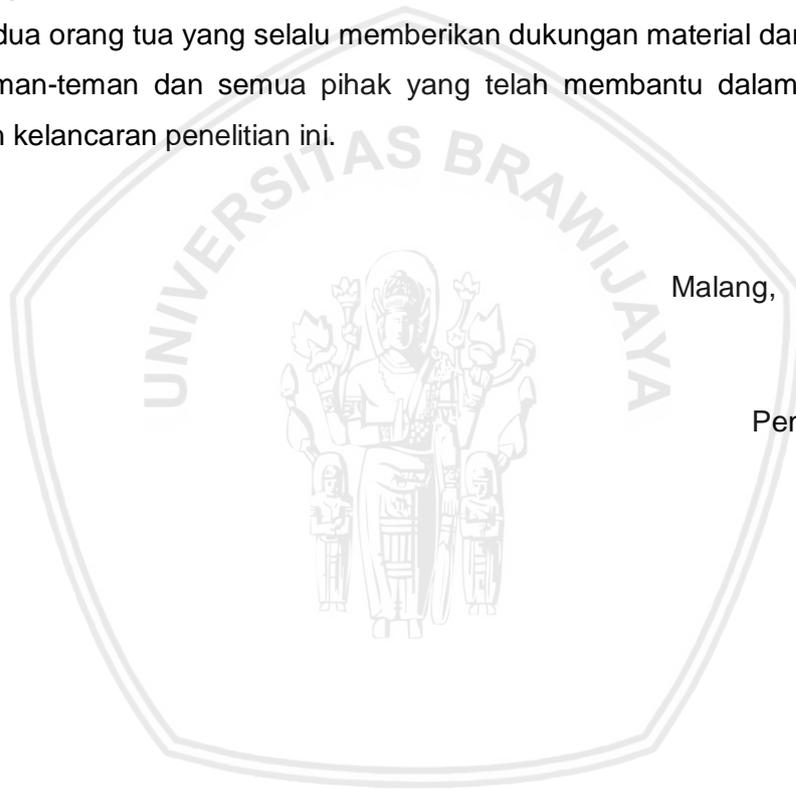
## UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Tuhan Yang Maha Esa yang telah memberikan kelancaran dalam melaksanakan penelitian ini.
2. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS. selaku dosen pembimbing yang telah memberi arahan dan bimbingan sehingga penelitian ini dapat terselesaikan dengan baik.
3. Kedua orang tua yang selalu memberikan dukungan material dan doa.
4. Teman-teman dan semua pihak yang telah membantu dalam pelaksanaan dan kelancaran penelitian ini.

Malang, Mei 2019

Penulis



## RINGKASAN

**SILVIA DEVI ENGGARWATI.** Uji Sensitivitas Ekstrak Daun Sendok (*Plantago major*) terhadap Bakteri *Pseudomonas fluorescens* secara *in vitro* (di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS**).

---

---

Indonesia memiliki potensi perikanan yang relatif tinggi. Namun eksploitasi yang berlebihan telah menyebabkan sumberdaya perikanan menurun, sehingga diperlukan alternatif pemasok sumberdaya perikanan yaitu budidaya perikanan. Permasalahan yang seringkali muncul dalam proses budidaya ialah infeksi penyakit oleh bakteri, salah satunya adalah bakteri *P. fluorescens*. Upaya pengobatan menggunakan antibiotik sering digunakan untuk pengobatan infeksi bakteri, namun hal ini dapat menyebabkan resistensi pada bakteri dan residu pada tubuh ikan dan lingkungan. Alternatif pengobatan yang dapat dilakukan yakni dengan menggunakan ekstrak tumbuhan sebagai bahan alami yang efektif dan ramah lingkungan, salah satu tumbuhan yang dapat digunakan sebagai antibakteri ialah daun sendok (*P. major*). *P. major* diketahui memiliki senyawa aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau zat antibakteri.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan divisi Parasit dan Penyakit ikan pada bulan Desember 2018-Februari 2019. Tujuan dari penelitian ini ialah untuk mengetahui sensitivitas ekstrak daun sendok (*P. major*) terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*. Penelitian ini menggunakan metode eksperimental untuk mengetahui keterkaitan suatu variabel independen dengan variabel kontrol dengan manipulasi variabel independen berdasarkan tujuan penelitian. Penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan lima perlakuan dosis (A) 400 ppm ; (B) 800 ppm ; (C) 1200 ppm; (D) 1600 ppm; (E) 2000ppm dan tiga kali ulangan serta kontrol positif dan kontrol negatif.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ekstrak daun sendok (*P. major*) memberikan pengaruh terhadap bakteri *P. fluorescens* dengan perlakuan terbaik yakni perlakuan C. Hubungan antara dosis ekstrak daun *P. major* dengan rerata zona bening yang terbentuk pada bakteri *P. fluorescens* menghasilkan persamaan linier yaitu  $y = 7,423667 + 0,000423x$  yang memiliki koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0.60.

Pada penelitian ini dapat disimpulkan bahwa ekstrak ethanol daun sendok (*P. major*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Penambahan konsentrasi ekstrak yang diberikan memberikan pengaruh terhadap zona bening, sehingga semakin tinggi dosis ekstrak yang diberikan maka zona bening semakin besar ditunjukkan dengan pola linier yang terbentuk dari hubungan keduanya.

## KATA PENGANTAR

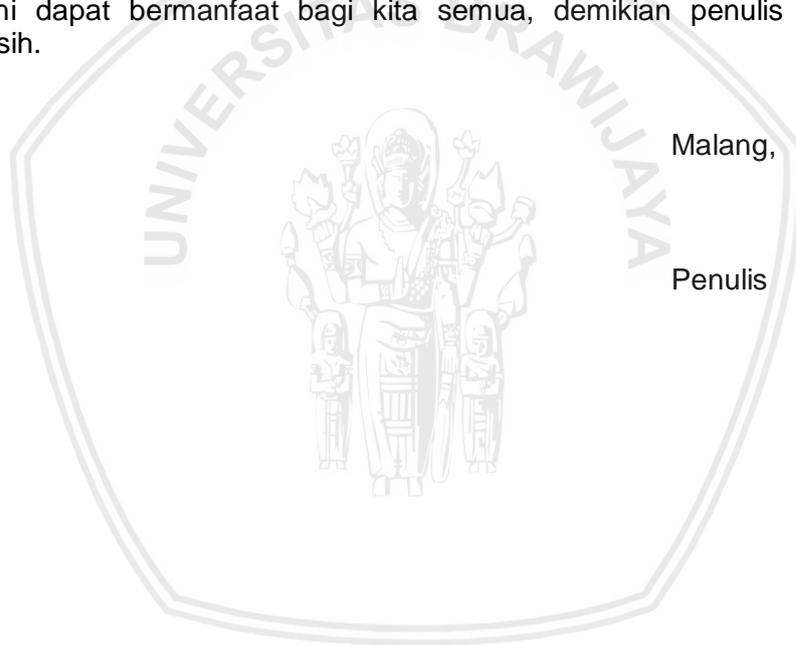
Puji dan syukur penulis panjatkan kepada Tuhan Yang Maha Esa, yang melimpahkan rahmat dan karuniaNya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan Skripsi dengan judul “Uji Sensitivitas Ekstrak Daun Sendok (*Plantago major*) terhadap Bakteri *Pseudomonas fluorescens* secara *In Vitro*”. Laporan ini disusun sebagai salah satu persyaratan untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, dibawah bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.

Laporan Skripsi ini, menyajikan pokok-pokok bahasan yang meliputi kegiatan uji sensitivitas *P. major* terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*, serta faktor-faktor yang mempengaruhinya.

Hasil dari penelitian ini memerlukan pengembangan yang lebih mendalam dengan diterapkan secara *in vivo* pada ikan budidaya. Sehingga dapat menjadi solusi bagi pada pembudidaya. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun. Kritik konstruktif dari pembaca sangat diharapkan agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita semua, demikian penulis sampaikan terimakasih.

Malang, Mei 2019

Penulis



## DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL .....	i
HALAMAN PENGESAHAN .....	ii
IDENTITAS TIM PENGUJI .....	iii
PERNYATAAN ORISINILITAS .....	iv
UCAPAN TERIMA KASIH.....	v
RINGKASAN .....	vi
KATA PENGANTAR .....	vii
DAFTAR ISI.....	viii
DAFTAR TABEL .....	x
DAFTAR GAMBAR .....	xi
DAFTAR LAMPIRAN .....	xii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	5
1.4 Hipotesis .....	5
1.5 Kegunaan .....	5
1.6 Tempat dan Waktu .....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	6
2.1 Biologi Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	6
2.1.1 Klasifikasi .....	6
2.1.2 Morfologi.....	6
2.1.3 Habitat .....	7
2.1.4 Pertumbuhan Bakteri .....	8
2.1.5 Gejala Klinis Infeksi Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	9
2.2 Biologi Tanaman Sendok ( <i>P. major</i> ).....	10
2.2.1 Klasifikasi .....	10
2.2.2 Morfologi.....	10
2.2.3 Habitat dan Penyebaran .....	11
2.2.4 Kandungan Bahan Aktif .....	12
2.2.5 Aktifitas Antimikroba.....	13
2.3 Uji Sensitivitas secara <i>in vitro</i> .....	14
3. METODE PENELITIAN.....	16
3.1 Materi Penelitian .....	16
3.1.1 Alat Penelitian .....	16
3.1.2 Bahan Penelitian .....	17
3.2 Metode Penelitian .....	18
3.3 Rancangan Penelitian .....	18
3.4 Prosedur Penelitian .....	20
3.4.1 Persiapan Penelitian .....	20
3.4.2 Pelaksanaan Penelitian .....	25
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	30
4.1 Identifikasi Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	30
4.2 Uji Cakram .....	31

4.3 Parameter Penunjang.....	39
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	40
5.1 Kesimpulan .....	40
5.2 Saran .....	40
DAFTAR PUSTAKA.....	40
LAMPIRAN.....	47



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat-alat penelitian .....	16
2. Bahan-bahan penelitian .....	17
3. Hasil Uji Cakram .....	32
4. Data hasil pengukuran zona bening .....	34
5. Kategori hambatan berdasarkan diameter zona bening .....	35
6. Hasil Uji Sidik Ragam .....	36
7. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) .....	36



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	7
2. Kurva pertumbuhan bakteri .....	9
3. Tanaman Sendok ( <i>P. major</i> ).....	11
4. Denah Percobaan .....	19
5. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	30
6. Grafik Uji Polinomial Ortogonal.....	37



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat dan Bahan.....	47
2. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Sendok ( <i>P. major</i> ).....	57
3. Pembuatan Media Agar Miring .....	59
4. Peremajaan Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	60
5. Pembuatan Media Cair ( <i>Tryptic Soy Borth</i> ).....	61
6. Kultur Bakteri <i>P. fluorescens</i> di Media Cair .....	62
7. Pembuatan Natrium Fisiologis .....	63
8. Pengenceran Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	64
9. Pembuatan Dosis Ekstrak Daun Sendok ( <i>P. major</i> ) .....	65
10. Uji Cakram .....	67
11. Hasil Uji Fitokimia Daun Sendok ( <i>P. major</i> ) .....	68
12. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	69
13. Hasil Uji Cakram .....	70
14. Perhitungan Ekstrak Dosis Uji .....	72
15. Analisis Data .....	74

## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia dikenal sebagai negara maritim terbesar di dunia karena memiliki potensi kekayaan sumberdaya perikanan yang relatif besar. (Triarso, 2012). Namun pemanfaatan sumberdaya tersebut dilaporkan telah berlebih. Oleh karena itu, alternatif pemasok hasil perikanan diharapkan berasal dari budidaya ikan (Sukadi, 2002). Sektor perikanan budidaya di Indonesia dapat terbagi perikanan budidaya tambak dan budidaya laut. Pada tahun 2014, perikanan budidaya tambak memiliki potensi luas lahan sebesar 2,96 juta hektar dan budidaya laut sebesar 12,12 juta hektar (Anonimous, 2016).

Budidaya perikanan merupakan salah satu usaha yang sangat menguntungkan. Hal ini tentu saja apabila dalam proses produksi tidak mengalami kegagalan, baik dalam produksi *hatchery* maupun pembesarannya (Koesharyani, Gardenia dan Supriyadi 2012). Kegagalan pada produksi budidaya dapat disebabkan oleh tingginya tingkat produksi yang berimbas pada kualitas air yang menurun. Menurut Wahjuningrum, Sholeh dan Nuryati (2006), tingkat produksi yang tinggi dapat berpotensi menurunkan kondisi lingkungan. Kondisi lingkungan yang kurang baik ini kemudian menjadi penyebab munculnya penyakit.

Penyakit merupakan salah satu kendala utama dalam keberhasilan suatu usaha budidaya perairan. Timbulnya penyakit adalah suatu proses yang dinamis dan merupakan interaksi antara inang (*host*), jasad penyakit (*pathogen*) dan lingkungan. Secara umum, timbulnya penyakit pada ikan merupakan hasil interaksi yang kompleks antara 3 komponen dalam ekosistem budidaya yaitu inang (ikan) yang lemah akibat berbagai *stressor*, patogen yang virulen dan kualitas lingkungan yang kurang optimal. Penyakit dan parasit potensial

menyebarkan dan menyerang pada sistem budidaya. Penyakit dibagi menjadi dua yaitu penyakit infeksi dan non-infeksi. Penyakit infeksi dapat diakibatkan oleh parasit, virus, bakteri dan jamur. Penyakit utama ikan adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri maupun virus. Infeksi bakteri patogen dan virus yang dapat menyebabkan mortalitas sampai 100% (Sarjito, Prayitno dan Haditomo, 2013).

Beberapa penyakit yang seringkali menginfeksi ikan antara lain disebabkan oleh bakteri *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp. dan *Flexibacter columnaris*. Serangan penyakit ini dapat menyebabkan kematian ikan antara 30-80% (Murwantoko, Rozi, Istiqomah dan Nitimulyo, 2013). Golongan bakteri *Pseudomonas* spp. yang patogen terhadap ikan antara lain *P. anguilliseptica*, *P. aeruginosa* dan *P. fluorescens* (Hardi, Pebrianto dan Septiani, 2014). *P. fluorescens* dapat menginfeksi ikan *juvenile* sampai ikan yang sudah dewasa. Infeksi bakteri *P. fluorescens* sangat ganas sehingga dapat menimbulkan kematian. Kerugian yang ditimbulkan juga sangat besar. Penularan infeksi bakteri *P. fluorescens* dapat melalui air maupun bagian tubuh ikan yang terinfeksi (Cahyono, 2001).

Bakteri *P. fluorescens* termasuk jenis bakteri aerobik dan mampu menghasilkan pigmen pendarfluor (Hasanuddin, 2011). *P. fluorescens* merupakan salah satu organisme dominan yang ada pada ekosistem perairan tawar. *P. fluorescens* ditemukan membentuk koloni pada bagian sirip kulit, insang dan lumen usus ikan. *P. fluorescens* merupakan patogen sekunder yang dapat menyebabkan kerusakan pada jaringan tubuh ikan. Infeksi oleh *P. fluorescens* dapat mengalami peningkatan yang disebabkan oleh kondisi ikan yang stress. Bakteri *P. fluorescens* diketahui sangat sensitif terhadap beberapa obat antibiotik seperti *Kanamycin*, *Nalidixic acid*, *Gentamicin* dan *Neomycin*. Sehingga penggunaan antibiotik yang kurang tepat sasaran akan dapat menyebabkan

repository.ub.ac.id

bakteri *P. fluorescens* resisten terhadap antibiotik tersebut (Darak dan Barde, 2015).

Penggunaan antibiotik dalam jangka waktu lama akan berdampak negatif, diantaranya dapat menimbulkan resistensi terhadap bakteri, memerlukan biaya yang cukup mahal dan dapat mencemari lingkungan. Antibiotik yang digunakan untuk mengobati penyakit ikan biasanya diberikan melalui pakan, perendaman, atau penyuntikan, sehingga menyebabkan akumulasi residu antibiotik pada tubuh ikan. Selain itu Setyowati, Prayitno dan Sarjito (2014), menambahkan bahwa akumulasi residu yang disebabkan oleh pemberian antibiotik pada ikan dapat membahayakan konsumen apabila mengonsumsi ikan tersebut. Menurut Andriani, Prayitno dan Sarjito (2014), hingga saat ini bahan yang sering digunakan untuk menanggulangi penyakit infeksi oleh bakteri pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Oleh karena itu, diperlukan adanya penelitian untuk mencari alternatif pengobatan penyakit infeksi oleh bakteri *P. fluorescens* yang lebih ekomonis, ramah lingkungan dan efektif dengan bahan yang mudah didapatkan bagi para pembudidaya.

Kekayaan bahan alami yang cukup melimpah di Indonesia menjadikan pertimbangan untuk digunakan sebagai bahan alternatif dalam pengendalian penyakit infeksi bakteri (Supriyadi dan Iftitah, 2009). Pemanfaatan tanaman obat sebagai penanggulangan penyakit bakteri aman digunakan dan terbukti sangat efektif dalam menyembuhkan infeksi bakteri (Aisiah, 2012). Penggunaan bahan alami untuk mengatasi penyakit infeksi bakteri merupakan suatu langkah yang tepat. Selain berfungsi sebagai antimikroba, bahan alami juga meningkatkan kekebalan tubuh ikan terhadap perubahan lingkungan (Syawal, Syafridiman dan Hidayah, 2008). Salah satu bahan alami yang dapat digunakan sebagai alternatif pengobatan infeksi bakteri adalah tanaman Sendok (*P. major*).

Tanaman *P. major* merupakan tanaman yang tumbuh berlimpah di Indonesia. *P. major* telah lama dikenal sebagai tanaman obat. *P. major* memiliki kandungan zat aktif yang dapat dimanfaatkan sebagai obat (Sutrisna, Maskoen, Sujatno dan Sastramihardja, 2014). Beberapa ekstrak *P. major* diketahui efektif digunakan dalam pengobatan infeksi bakteri. Ekstrak *P. major* dapat digunakan untuk menghambat infeksi bakteri *E. coli* dan *Bacillus cereus*. Selain itu, penggunaan ekstrak *P. major* dengan konsentrasi yang berbeda telah terbukti efektif dalam menghambat beberapa pertumbuhan bakteri antara lain, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis* dan *Salmonella enteritidis* (Najafian, Hamed, Farshchi dan Feyzabadi, 2008).

*P. major* memiliki kandungan dan jumlah bahan kimia yang berbeda pada setiap bagiannya. Menurut Mohamed, Kobeasy, Osama, Abdel-Fatah, El-Salam dan Mohamed (2011), diperoleh kandungan bahan kimia tertinggi terdapat pada bagian daun tanaman *P. major* yang terdiri atas *poliphenol* sebesar 13.05 mg, *flavonoid* sebesar 6.14 mg dan *tannin* sebesar 5.63 mg. Sedangkan pada bagian biji *P. major* memiliki kandungan *poliphenol* sebesar 7.43 mg, *flavonoid* sebesar 3.03 mg dan *tannin* sebesar 2.43 mg. Sehingga pada penelitian ini menggunakan bagian daun *P. major* sebagai ekstrak antibakteri terhadap bakteri *P. fluorescens* untuk mengetahui sensitivitasnya.

## 1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas dapat diperoleh rumusan masalah sebagai berikut:

- Bagaimanakah sensitivitas ekstrak daun sendok (*P. major*) terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*?

### 1.3 Tujuan

Tujuan dilakukannya penelitian ini adalah untuk mengetahui sensitivitas ekstrak daun sendok (*P. major*) terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*.

### 1.4 Hipotesis

$H_0$  : Diduga pemberian ekstrak daun sendok (*P. major*) dengan dosis yang berbeda tidak berpengaruh terhadap bakteri *P. fluorescens*.

$H_1$  : Diduga pemberian ekstrak daun sendok (*P. major*) dengan dosis yang berbeda berpengaruh terhadap bakteri *P. fluorescens*.

### 1.5 Kegunaan

Penelitian ini berguna untuk mengetahui sensitivitas ekstrak daun sendok (*P. major*) dengan dosis yang berbeda terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*.

### 1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Desember 2018 – Februari 2019, di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Biologi Bakteri *P. fluorescens*

#### 2.1.1 Klasifikasi

Klasifikasi bakteri *P. fluorescens* menurut Martínez-García, Ruano-Rosa, Schiliro, Pierto, Ramos, Rodriguez-Palenzuela dan Mercado-Blanco (2015), adalah:

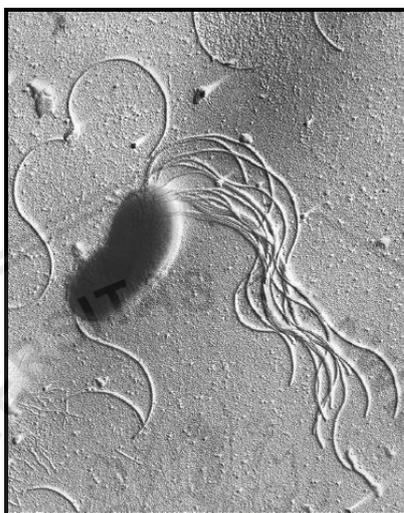
Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Pseudomonadales
Family	: Pseudomonadaceae
Genus	: Pseudomonas
Species	: <i>Pseudomonas fluorescens</i>

#### 2.1.2 Morfologi

Bakteri Pseudomonas memiliki karakteristik antara lain merupakan bakteri gram negatif, berbentuk batang (*rods*), aerob obligat, motil mempunyai flagel. Bakteri ini tumbuh dengan baik pada suhu 4°C atau dibawah 43°C. (Suyono dan Salahudin, 2011). *P. fluorescens* dapat membentuk siderofor yang fungsinya mengikat ion Fe<sup>3+</sup>. Secara individu, bakteri *P. fluorescens* berbentuk batang dengan ukuran 0,5-4,0 µm. *P. fluorescens* bersifat gram negatif, membentuk enzim katalase, oksidase positif dan memerlukan oksigen untuk tumbuh (Arwiyanto, Maryudani dan Azizah, 2007).

Adiathy, Suniti dan Suada (2017) menambahkan bahwa Pseudomonas memiliki bentuk koloni bulat, cembung, warna putih kekuningan, dan berpendar hijau. Kelompok Pseudomonas penghasil pigmen pendar hijau ini disebut sebagai kelompok Pseudomonas yang berpendarfluor. Diantara spesies yang

termasuk dalam *Pseudomonas* yang berpendarfluor adalah *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. ovalis*, *P. mildenbergii*, *P. reptilivora*, *P. geniculata*, dan *P. calcioprecipitans*. *P. fluorescens* mempunyai kemampuan untuk menghasilkan pigmen hijau sampai kebiruan. Morfologi bakteri *P. fluorescens* dapat dilihat pada Gambar 1.



**Gambar 1.** Bakteri *P. fluorescens*  
(Scales, Dickson, Lipuma dan Huffnagle, 2014)

### 2.1.3 Habitat

*Pseudomonas* banyak ditemukan pada tanah, tanaman dan air (Suyono dan Salahudin, 2011). *Pseudomonas* merupakan bakteri yang dapat hidup di air tawar, payau dan asin. Beberapa diantaranya memiliki sifat patogen yang dapat menginfeksi ikan. Serangan penyakit ini dapat disebabkan karena manajemen pemeliharaan yang kurang baik. *P. fluorescens* merupakan salah satu bakteri dari genus *Pseudomonas* yang bersifat patogen. *P. fluorescens* merupakan bakteri patogen yang menginfeksi ikan air tawar. (Afrianto, Liviawaty, Jamaris dan Hendi, 2015).

Bakteri *P. fluorescens* termasuk jenis bakteri aerobik dan mampu menghasilkan pigmen warna hijau kebiruan secara ekstraseluler (Hasanuddin, 2011). *P. fluorescens* merupakan salah satu organisme dominan yang ada pada

ekosistem perairan tawar. *P. fluorescens* ditemukan membentuk koloni pada bagian sirip kulit, insang dan lumen usus ikan (Darak dan Barde, 2015). Penularan infeksi bakteri *P. fluorescens* dapat melalui air dan bagian tubuh ikan yang terinfeksi (Cahyono, 2001).

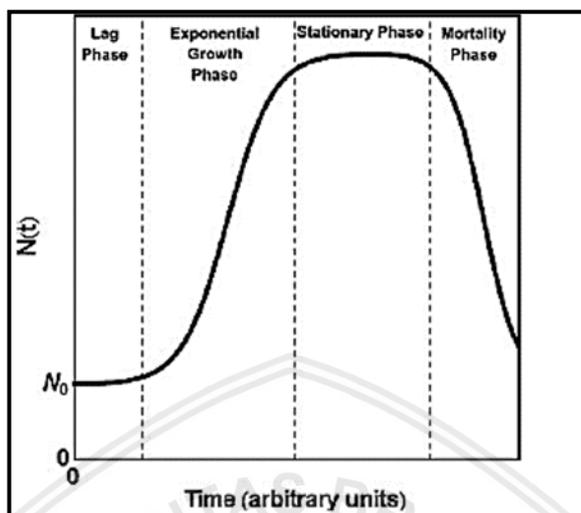
#### 2.1.4 Pertumbuhan Bakteri

Fase pertumbuhan bakteri pada umumnya terdiri atas empat fase yaitu fase lag (adaptasi), fase log (eksponensial), fase stationer (tetap) dan fase kematian (*death*). Fase lag disebut periode penyesuaian pada lingkungan, biasanya ditandai dengan tidak adanya penambahan jumlah sel atau massa sel dan lama waktu fase ini dapat berlangsung cepat dalam hitungan menit hingga jam tergantung macam bakteri, umur biakan, dan nutrisi yang terdapat pada media (Respati, 2017).

Fase kedua adalah fase eksponensial, pertumbuhan bakteri berlangsung sangat cepat, dimulai pada jam ke-2 sampai jam ke-16, pada fase ini suatu jenis mikroba memperbanyak diri dengan cara membelah diri menjadi dua, kemudian masing-masing membelah lagi menjadi dua sehingga pada setiap generasi jumlahnya menjadi dua kali populasi sebelumnya. Waktu yang dibutuhkan untuk terjadinya proses ini disebut waktu generasi. Fase berikutnya adalah fase stasioner, terjadi mulai jam ke-16 sampai jam ke-24. pada fase ini tidak terjadi penambahan jumlah bakteri, jumlah sel yang tumbuh sama dengan jumlah sel yang mati karena cadangan makanan sudah mulai menipis (Khoiriyah dan Ardiningsih, 2014).

Pada fase kematian, sel yang mati menjadi lebih banyak dari pada terbentuknya sel yang baru. Fase Kematian (*Death Phase*), sel-sel yang berada dalam fase stationer akhirnya akan mati bila tidak dipindahkan ke media segar lainnya. Bentuk logaritmik fase menurun atau kematian merupakan penurunan secara garis lurus yang digambarkan oleh jumlah sel-sel hidup terhadap waktu,

jumlah bakteri hidup berkurang dan menurun. (Sharah, Karlina dan Desmelati, 2015). Kurva pertumbuhan bakteri dapat dilihat pada Gambar 2.



**Gambar 2.** Kurva pertumbuhan bakteri (Peleg dan Corradini, 2011)

#### 2.1.5 Gejala Klinis Infeksi Bakteri *P. fluorescens*

*P. fluorescens* dapat menyebabkan penyakit bisul pada ikan. Ikan yang terinfeksi *P. fluorescens* memperlihatkan gejala-gejala diantaranya yaitu munculnya bisul terutama pada bagian kulit, sirip, rongga perut dan organ dalam. Penyakit bisul yang disebabkan oleh bakteri *P. fluorescens* ini sering disebut *hemorrhagic septicemia* (Kordi, 2004). *P. fluorescens* dapat menyerang ikan muda dan ikan yang sudah dewasa. Penularannya dapat terjadi melalui air maupun bagian tubuh ikan yang terinfeksi. Gejala yang nampak pada ikan yang terinfeksi adalah nafsu makan menurun, ikan bergerombol di dekat outlet, lesi pada kulit, sirip dan sisik rusak, pendarahan pada tubuh ikan, insang rusak berwarna keputih-putihan hingga kebiru-biruan dan ikan lemah. Faktor yang menunjang berkembangnya bakteri ini adalah kualitas perairan yang buruk, kandungan bahan organik yang tinggi dan perubahan musim (Cahyono, 2001).

*P. fluorescens* dapat menyebabkan penyakit pada ikan *silver carp*, ikan mas, ikan *grass carp* dan *black carp*. Infeksi oleh *P. fluorescens* dapat

menyebabkan kematian massal. *Hemorrhagic ptechial* terlihat jelas pada insang, ginjal, hati, lumen dan usus (Afrianto, Liviawaty, Jamaris dan Hendi, 2015). *P. fluorescens* merupakan patogen sekunder yang menyebabkan kerusakan pada jaringan tubuh ikan. *P. fluorescens* menyebabkan infeksi penyakit pada berbagai spesies ikan dalam jangkauan yang luas dan menyebabkan rata-rata kematian 40% - 80% dari total populasi. Gejala klinis yang nampak pada infeksi *P. fluorescens* antara lain adalah lesi dan hemoragik pada kulit maupun sirip ikan (Darak dan Barde, 2015).

## 2.2 Biologi Tanaman Sendok (*P. major*)

### 2.2.1 Klasifikasi

Klasifikasi Tanaman Sendok (*P. major*) menurut Hutapea (2000), adalah:

Divisi	: Spermatophyta
Sub divisi	: Angiospermae
Kelas	: Plantaginales
Suku	: Plantaginaceae
Marga	: Plantago
Jenis	: <i>Plantago major</i> L.

### 2.2.2 Morfologi

*P. major* memiliki banyak akar yang kurang lebih sama panjang berwarna keputih-putihan. Lebar daun dapat mencapai 20 cm berbentuk bulat telur sampai berbentuk bulat panjang, bergigi atau tidak beraturan. Daun dari *P. major* menyempit pada bagian bawahnya dan membentuk tangkai daun yang mana kurang lebih sama panjang dengan daun. Daun *P. major* biasanya memiliki 3-5 urat daun, kasar atau berbulu. *P. major* memiliki bunga berukuran 2-4 mm (Sagar dan Harper, 1964).

*P. major* termasuk tanaman herbal dengan tinggi mencapai 10-20 cm dan akar keputih-putihan. *P. major* memiliki daun berbentuk bulat telur sampai elips, tepi daun bergerigi tidak beraturan dan permukaan kasar. Bunga berbentuk malai dengan panjang 5-10 cm dan padat. *P. major* memiliki buah dengan panjang sekitar 2-4 cm, berbiji elips dan berwarna cokelat tua sampai agak hitam (Hidayat dan Napitupulu, 2015). Menurut Sharifa, Neoh, Iswadi, Khairul, Abdul, Jamaludin, Mohamed dan Hing (2008), menambahkan bahwa *P. major* memiliki bunga yang kecil, berwarna kehijauan dan ujung runcing panjang tanpa cabang. Bijinya cukup kecil dengan bentuk bulat telur (0,4-0,8 x 0,8-1,5 mm) dan rasanya agak pahit. Tanaman *P. major* dapat dilihat pada Gambar 3.



**Gambar 3.** Tanaman Sendok (*P. major*)  
(Dokumentasi Pribadi, 2019).

### 2.2.3 Habitat dan Penyebaran

Spesies *P. major* ini memiliki jangkauan distribusi yang sangat luas, membentang hampir dari kutub ke kutub. *P. major* dapat ditemukan di Aden, Angola, Abyssinia, Madagaskar, Dakar, Ceylon, Assam, Indocina, Malaya, Amman, Laos, Kochin China, Filipina, Jawa, Selandia Baru, dan Australia. Juga ditemukan di Samoa, Hawaii, Kepulauan Galapagos, Florida, Chili, St. Helena dan Tristan da Cunfa. Titik paling utara yang dicapai adalah Spitsberge (Sagar dan Harper, 1964).

*P. major* merupakan tumbuhan yang banyak tumbuh di daerah tropis, termasuk di Indonesia (Fitriani, Sutrisna, Salim, Maskoen, Sujatno dan Sastramihardja, 2013). Banyak orang yang menganggap *P. major* sebagai gulma, tetapi *P. major* juga merupakan tanaman obat yang sudah dikenal sejak berabad-abad (Samuelsen, 2000). *P. major* di beberapa daerah mulai dibudidayakan. Di daerah Jawa *P. major* dapat tumbuh dari ketinggian 300 m dpl hingga ketinggian 3300 m dpl, namun mulai banyak tumbuh pada ketinggian 700 m dpl atau lebih. Semakin meningkat ketinggian tempatnya, maka semakin tinggi populasinya. *P. major* L juga dapat ditemukan pada ketinggian 2200 m dpl, sedangkan lingkungan potensial untuk habitat atau tempat tumbuhnya adalah mulai ketinggian 2100 m dpl (Sugiyarto, Setyawan dan Pitoyo, 2006).

#### 2.2.4 Kandungan Bahan Aktif

Berbagai aktivitas farmakologis telah ditemukan melalui sebuah uji dengan menggunakan *P. major*, termasuk untuk penyembuhan luka, anti-inflamasi, anti-oksidan dan anti-bakteri. Senyawa aktif yang terkandung dalam *P. major* termasuk *lipid*, *caffeic acid derivatives*, *flavonoids* dan *terpenoids*. Ekstrak *ethanol* dari *P. major* menunjukkan hasil yang signifikan secara *in vitro* dalam menghambat berbagai macam bakteri dan fungi (Schmelzer dan Gurib-Fakim, 2008).

*P. major* telah banyak dilaporkan memiliki kandungan flavonoid seperti luteolin dan apigenin. Banyak penelitian berhasil mengisolasi flavonoid dari tanaman ini. Flavonoid merupakan salah satu senyawa polifenol. *P. major* juga memiliki kandungan *fatty acids* dan *iridoid glycosides* yang dilaporkan terkandung dalam daun *P. major*. Tanaman ini juga telah terbukti mengandung beberapa senyawa aktif biologis penting lainnya seperti vitamin dan senyawa fenolik (*caffeic acid*) (Adom, Taher, Mutalabisin, Amri, Kudos, Sulaiman, Sengupta dan Susanti, 2017).

### 2.2.5 Aktifitas Antimikroba

Antibakteri merupakan zat yang berfungsi membunuh atau menekan pertumbuhan dan reproduksi bakterinya. Berdasarkan aktivitas zat antibakteri dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakterostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) atau menghambat germinasi spora bakteri (Sartika, Melki dan Purwiyanto, 2013). Ruang lingkup antibakteri dibagi menjadi 3 bagian. Pertama, antibakteri spektrum luas (*broad spectrum*) yaitu senyawa antibakteri yang dapat menghambat berbagai macam mikroba. Kedua, antibakteri berspektrum terbatas (*limited spectrum*) apabila zat antibakteri tersebut efektif menghambat organisme tunggal atau penyakit tertentu. Ketiga, antibakteri berspektrum sempit (*narrow spectrum*) yang hanya efektif menghambat sebagian Gram negatif atau bakteri Gram positif (Ratnakomala, Apriliana dan Fahrurrozi, 2016).

Ekstrak etanol *P. major* menimbulkan aktivitas bakterisidal terhadap bakteri Gram positif dan Gram negatif dengan kandungan beberapa senyawa aktif biologis penting seperti flavonoid, alkaloid, glikosida iridoid, asam lemak, vitamin dan senyawa fenolik (*caffeic acid*) (Adom, Taher, Mutalabisin, Amri, Kudus, Sulaiman, Sengupta dan Susanti, 2017). Ekstrak *ethanol* dengan konsentrasi 100-200 mg/ml *P. major* menyebabkan dinding sel bakteri gram positif runtuh dan pembentukkan *bleb* pada bakteri gram negatif (Sharifa, Neoh, Iswadi, Khairul, Abdul, Jamaludin, Mohamed dan Hing, 2008).

Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan di dalam jaringan tanaman. Flavonoid termasuk dalam golongan senyawa *phenolic* dengan struktur kimia  $C_6-C_3-C_6$  (Redha, 2010). Senyawa flavonoid disintesis oleh tanaman sebagai sistem pertahanan dan dalam responsnya terhadap infeksi oleh mikroorganisme, sehingga tidak mengherankan apabila senyawa ini efektif sebagai senyawa antimikroba

terhadap sejumlah mikroorganisma. Flavonoid merupakan salah satu senyawa polifenol yang memiliki bermacam-macam efek antara lain efek antioksidan, anti tumor, anti radang, antibakteri dan anti virus (Parubak, 2013).

Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membrane sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler. Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim *reverse transcriptase* dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Robinson, 1995 dalam Nuria, Faizatun dan Sumantri, 2009).

Mekanisme fenol sebagai agen antibakteri berperan sebagai toksin dalam protoplasma, merusak dan menembus dinding serta mengendapkan protein sel bakteri. Senyawa fenol mendenaturasi protein sel untuk membunuh mikroorganisma. Ikatan hidrogen yang terbentuk antara fenol dan protein mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Ikatan hidrogen tersebut akan mempengaruhi permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma sebab keduanya tersusun atas protein. Permeabilitas dinding sel dan membran sitoplasma yang terganggu dapat menyebabkan ketidakseimbangan makromolekul dan ion dalam sel sehingga sel menjadi lisis (Carolina dan Noventi, 2016).

### **2.3 Uji Sensitivitas secara *in vitro***

Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode silinder yaitu meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari

gelas atau besi tahan karat diisi dengan larutan yang akan diuji, di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Metode lubang yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri dan diisi dengan larutan yang akan diuji. Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat daerah hambatan disekeliling cakram (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

Metode dilusi adalah salah satu metode yang digunakan untuk mengetahui potensi suatu senyawa terhadap aktifitas mikroba dengan menentukan Konsentrasi Hambat Minimal (KHM) dan Konsentrasi Bunuh Minimal (KBM) (Lennette, Barilows, Hausler dan Shadoni, 1991 *dalam* Fatisa, 2013). Metode dilusi dilakukan untuk mengamati aktivitas antibakteri melalui kontak langsung dengan mikroorganisme. Nilai KHM diperoleh dengan mengamati perubahan kekeruhan suspensi bakteri yang telah diinkubasi 37°C selama 24 jam dan nilai KBM diperoleh dengan melihat ada tidaknya pertumbuhan bakteri pada media *Trypticase Soy Agar* (TSA) sehingga hasil penelitian akan lebih *representative* (Pasril dan Yuliasanti, 2014). Prinsip metode dilusi adalah senyawa antimikroba diencerkan sehingga diperoleh beberapa konsentrasi (Rakasiwi dan Soegihardjo, 2014).

### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 1 dan Lampiran 1.

**Tabel 1.** Alat-alat penelitian

No	Alat	Kegunaan
1.	Toples Kaca	Untuk wadah maserasi
2.	Evaporator	Untuk memisahkan ekstrak dari pelarut dengan menguapkan cairan pelarut
3.	Botol sampel 10 ml	Untuk wadah sampel hasil ekstraksi
4.	Sendok bahan	Untuk membantu mengambil bahan yang akan ditimbang
5.	Destruktor	Untuk mendestruksi alat yang telah digunakan
6.	<i>Autoclave</i>	Untuk mensterilkan alat dan bahan yang digunakan
7.	Inkubator	Untuk inkubasi bakteri <i>P. fluorescens</i>
8.	Oven	Untuk mengeringkan cawan petri
9.	Kulkas	Untuk menyimpan bahan pada suhu rendah
10.	Timbangan digital	Untuk menimbang media yang digunakan
11.	<i>Hotplate</i>	Untuk memanaskan media yang digunakan
12.	Jarum ose	Untuk mengambil biakan bakteri <i>P. fluorescens</i>
13.	Tabung reaksi	Untuk tempat peremajaan dan pembiakan bakteri <i>P. fluorescens</i>
14.	Rak tabung reaksi	Untuk tempat tabung reaksi
15.	Nampan	Untuk tempat alat yang digunakan
16.	Jerigen 5 liter	Untuk tempat <i>aquades</i>
17.	<i>Erlenmeyer</i> 500 ml	Untuk tempat media yang digunakan
18.	Gelas ukur 100 ml	Untuk menakar jumlah larutan yang digunakan
19.	Pipet volume	Untuk membantu mengambil larutan
20.	<i>Blue tip</i>	Untuk mengambil larutan dalam skala kecil
21.	<i>Yellow tip</i>	Untuk mengambil larutan dalam skala kecil

22.	Micropipet 100 $\mu$ l	Untuk mengambil larutan dengan volume 0-100 $\mu$ l
23.	Micropipet 100-1000 $\mu$ l	Untuk mengambil larutan dengan volume 100-1000 $\mu$ l
24.	Vortex <i>mixer</i>	Untuk menghomogenkan larutan secara merata
25.	LAF ( <i>Laminar Air Flow</i> )	Untuk tempat dilakukannya perlakuan dalam kondisi steril
26.	Bunsen	Untuk menjaga kondisi steril pada saat inokulasi
27.	Timbangan analitik	Untuk menimbang sampel ekstrak yang akan digunakan
28.	Cawan petri	Untuk tempat uji cakram
29.	Triangle	Untuk membantu meratakan biakan bakteri <i>P. fluorescens</i>
30.	Jangka sorong	Untuk membantu menghitung diameter zona bening
31.	Objek glass	Untuk tempat membuat preparat
32.	Mikroskop	Untuk mengamati bentuk dan morfologi bakteri <i>P. fluorescens</i>
33.	Sarung tangan	Untuk meminimalisir kontaminasi
34.	Masker	Untuk meminimalisir kontaminasi

### 3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 2 dan Lampiran 1.

**Tabel 2.** Bahan-bahan penelitian

No.	Bahan	Kegunaan
1.	Daun Sendok ( <i>P. major</i> )	Sebagai ekstrak yang akan diuji
2.	Bakteri <i>P. fluorescens</i>	Sebagai bahan penelitian
3.	<i>Triptic Soy Borth</i> (TSB)	Sebagai media pembiakan bakteri
4.	<i>Pseudomonas Selective Agar</i> (PSA)	Sebagai media selektif bakteri <i>P. fluorescens</i>
5.	Etanol 70%	Sebagai bahan pelarut saat proses maserasi
6.	Alcohol 70%	Sebagai bahan aseptis
7.	<i>Dimethyl sulfoxide</i> (DMSO) 100%	Sebagai pelarut ekstrak
8.	Kertas cakram 6 mm	Sebagai media difusi ekstrak terhadap bakteri pada media padat
9.	Kertas saring	Sebagai bahan untuk membantu proses penyaringan hasil maserasi

10.	Kertas label	Sebagai pemberi tanda untuk setiap perlakuan
11.	Akuades	Sebagai pelarut
12.	Spirtus	Sebagai bahan bakar Bunsen
13.	Larutan iodin	Sebagai larutan untuk memperkuat pewarna primer
14.	Larutan safranin	Sebagai indikator pewarna sekunder
15.	Larutan kristal violet	Sebagai indikator pewarna primer
16.	<i>Aluminium foil</i>	Sebagai penutup alat yang berisi bahan yang akan digunakan
17.	Kapas	Sebagai penutup alat saat proses sterilisasi
18.	Plastik <i>wrap</i>	Sebagai pembungkus cawan saat diinkubasi
19.	Plastik 2 kg	Sebagai pembungkus alat saat destruksi

### 3.2 Metode Penelitian

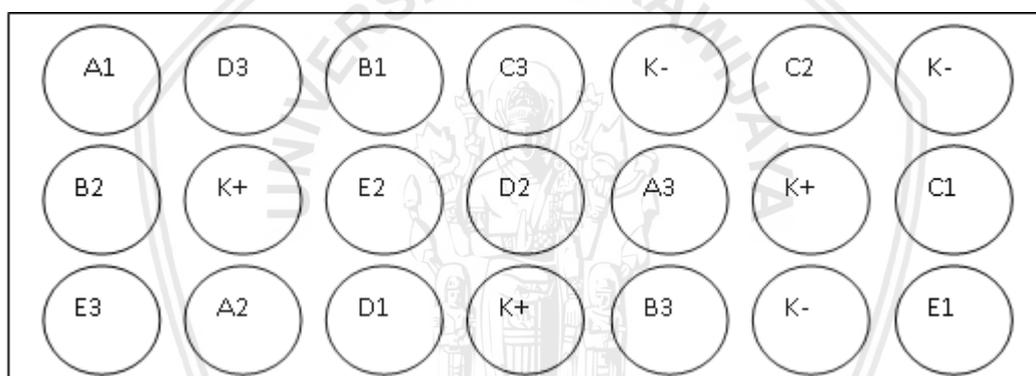
Penelitian ini menggunakan metode eksperimental. Menurut Setyanto (2013), metode eksperimental merupakan metode penelitian yang digunakan untuk melihat hubungan sebab akibat dari satu atau lebih variabel independen dengan satu atau lebih variabel kontrol. Metode ini menggunakan manipulasi terhadap satu atau lebih variabel independen sesuai dengan tujuan penelitian. Kemudian mengelompokkan subyek penelitian ke dalam kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Dalam desain klasik, kelompok eksperimen adalah kelompok subyek yang akan dikenai perlakuan (*treatment*). Sedangkan kelompok kontrol adalah kelompok subyek yang tidak dikenai perlakuan. Selanjutnya membandingkan kelompok eksperimen yang dikenai perlakuan dengan kelompok kontrol yang tidak dikenai perlakuan.

### 3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Siska dan Salam (2012) struktur data Rancangan acak lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana diantara rancangan-rancangan

percobaan yang lain. Dalam rancangan ini perlakuan dikenakan sepenuhnya secara acak terhadap satuan-satuan percobaan atau sebaliknya. Pola ini dikenal sebagai pengacakan lengkap atau pengacakan tanpa pembatasan. Penerapan percobaan RAL biasanya digunakan jika kondisi satuan-satuan percobaan relative homogen. Rancangan percobaan ini digunakan untuk jumlah perlakuan dan jumlah satuan percobaan yang relatif tidak banyak.

Penelitian ini dilakukan dengan menggunakan perlakuan berupa pemberian dosis ekstrak *P. major* yang berbeda terhadap bakteri *P. fluorescens*. Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dengan 3 kali ulangan. Denah penelitian disajikan pada Gambar 4.



**Gambar 4.** Denah Percobaan

Keterangan :

- |                 |   |
|-----------------|---|
| Kontrol Positif | : Bakteri <i>P. fluorescens</i> dengan pemberian dosis ekstrak daun sendok ( <i>P. major</i> ) sebesar 5000 ppm |
| Kontrol Negatif | : Bakteri <i>P. fluorescens</i> pada media agar tanpa pemberian ekstrak daun sendok ( <i>P. major</i> )         |
| Perlakuan A     | : Bakteri <i>P. fluorescens</i> dengan pemberian dosis ekstrak daun sendok ( <i>P. major</i> ) sebesar 400 ppm  |
| Perlakuan B     | : Bakteri <i>P. fluorescens</i> dengan pemberian dosis ekstrak daun sendok ( <i>P. major</i> ) sebesar 800 ppm  |
| Perlakuan C     | : Bakteri <i>P. fluorescens</i> dengan pemberian dosis ekstrak daun sendok ( <i>P. major</i> ) sebesar 1200 ppm |
| Perlakuan D     | : Bakteri <i>P. fluorescens</i> dengan pemberian dosis ekstrak daun sendok ( <i>P. major</i> ) sebesar 1600 ppm |
| Perlakuan E     | : Bakteri <i>P. fluorescens</i> dengan pemberian dosis ekstrak daun sendok ( <i>P. major</i> ) sebesar 2000 ppm |

### 3.4 Prosedur Penelitian

#### 3.4.1 Persiapan Penelitian

##### a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat-alat yang akan digunakan dicuci dengan sabun dan dibilas sampai bersih. Alat-alat yang telah dibersihkan, dikeringkan menggunakan tisu dan dibungkus menggunakan kertas koran atau kertas bekas (tabung reaksi dan Erlenmeyer yang berisi media ditutup menggunakan kapas dan *aluminium foil* pada bagian atas). *Aquades* ditambahkan ke dalam *autoclave* sampai menutupi sistem pemanas (*heater*), untuk mencegah penimbunan kapur pada elemen pemanas. Keranjang yang telah berisi alat dan bahan dimasukkan ke dalam *autoclave*. *Autoclave* ditutup dengan cara menutup semua tuas secara diagonal agar seimbang kekuatan saat menutup *autoclave*. Klep udara pada *autoclave* dibuka dengan posisi tegak. *Autoclave* dinyalakan pada posisi ON sehingga lampu power berwarna kuning. Temperatur diputar pada posisi maksimal, sehingga lampu heating menyala hijau dan ditunggu hingga keluar uap air. Apabila uap air sudah keluar, maka klep udara ditutup dan tunggu sampai *autoclave* pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm. Temperatur *autoclave* diturunkan sampai lampu *sterilizing* menyala kuning dan diatur *timer* selama 15 menit. Alarm berbunyi tanda proses sterilisasi sudah selesai dan turunkan temperatur sampai dengan minimal. Matikan *autoclave* pada posisi OFF dan klep dibuka secara perlahan sampai jarum menunjukkan angka "0". *Autoclave* dapat dibuka. Alat yang telah disterilisasi dapat dimasukkan ke dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilisasi didiamkan sampai suhu ruang dan disimpan dalam lemari pendingin.

##### b. Pembuatan Ekstrak Daun Sendok (*P. major*)

Daun sendok (*P. major*) diperoleh dari daerah Nganjuk. Daun sendok yang cukup tua dipanen sebanyak 1.200 gram dan dikeringkan secara

konvensional di bawah sinar matahari selama 7 hari, sehingga diperoleh berat kering sebesar 780 gram. Daun *P. major* yang sudah kering, dihaluskan menggunakan blender sampai menjadi serbuk. Serbuk daun *P. major* ditimbang sebanyak 200 gram dan dimasukkan ke dalam toples kaca. Pelarut ethanol 70% sebanyak 2000 ml ditambahkan ke dalam toples kaca yang berisi serbuk daun *P. major* dan dihomogenkan. Toples kaca ditutup dengan rapat dan dilapisi *aluminium foil* agar tidak terjadi penguapan. Toples yang berisi serbuk daun *P. major* dan pelarut ditunggu selama 5 hari dengan di kocok setiap 24 jam. Hasil maserasi daun *P. major* disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan larutan dan endapan serbuk daun *P. major*.

Pembuatan ekstrak daun *P. major* sesuai dengan pernyataan dari Ayu, Fatimawali dan Citraningtyas (2014), daun *P. major* dalam bentuk serbuk ditimbang sebanyak 200 gram dan diekstraksi dengan menggunakan 2000 ml (perbandingan 1:10) etanol 70% dengan cara maserasi selama 5 hari (setiap hari digojok). Ekstrak kemudian disaring menggunakan kertas saring dan dipekatkan dengan alat vacum evaporator. Menurut Nuria, Faizatun dan Sumantri (2009), maserasi dilakukan untuk menarik senyawa-senyawa yang berkhasiat, baik yang tahan pemanasan maupun yang tidak tahan pemanasan. Pemilihan metode maserasi karena pengerjaan dan peralatan yang digunakan sederhana dan mudah diusahakan. Penggunaan etanol 70% sebagai cairan penyari karena bersifat netral, kapang dan kuman sulit tumbuh dalam etanol 20% ke atas, tidak beracun, absorpsinya baik, etanol dapat bercampur dengan air dalam segala perbandingan, selektif dalam menghasilkan jumlah senyawa aktif yang optimal, serta panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit.

Larutan hasil maserasi selanjutnya dipekatkan untuk mendapatkan ekstrak daun *P. major* menggunakan *rotary evaporator*. Pemekatan dilakukan menggunakan *rotary evaporator* pada suhu 50°C dengan putaran 60 rpm,

tujuannya adalah agar golongan senyawa yang ada dalam bahan alami tidak mudah rusak. Proses evaporasi dilakukan selama kurang lebih 5 jam untuk 600ml larutan hasil maserasi daun *P. major* dan diperoleh hasil sebanyak 17,1gram ekstrak daun *P. major* yang berupa pasta. Proses pembuatan ekstrak disajikan pada Lampiran 2. Berikut ini adalah perhitungan perolehan berat kering dan rendemen daun *P. major* :

$$\text{Berat Kering} = \frac{780 \text{ gram}}{1200 \text{ gram}} \times 100\% = 65\%$$

$$\text{Rendemen} = \frac{17,1 \text{ gram}}{200 \text{ gram}} \times 100\% = 8,55\%$$

Menurut Tampemawa, Pelealu dan Kandou (2016), proses evaporasi harus dilakukan untuk memastikan kandungan residu sepenuhnya merupakan senyawa-senyawa aktif tanaman, tanpa etanol. Etanol merupakan senyawa volatil yang mudah menguap, sehingga yang tersisa setelah proses evaporasi adalah senyawa-senyawa aktif yang diinginkan.

### c. Pembuatan Media Agar Miring

Pembuatan media agar miring digunakan untuk peremajaan bakteri *P. fluorescens*. Media yang digunakan untuk peremajaan bakteri *P. fluorescens* adalah *Pseudomonas Selective Agar* (PSA) ditimbang sebanyak 0,44gram menggunakan timbangan digital. Media PSA dimasukkan dalam *Erlenmeyer* dan ditambahkan aquades 9 ml. Media dihomogenkan sampai larut. *Erlenmeyer* ditutup menggunakan kapas untuk meminimalisir penguapan. *Erlenmeyer* yang berisi media dipanaskan diatas *hotplate* sampai mendidih dan larutan bening transparan. Media didiamkan sampai agak dingin dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Tabung reaksi di tutup menggunakan kapas dan *aluminium foil*. Media disterilisasi pada *autoclave* dengan suhu 121°C dengan tekanan 1 atm

selama 15 menit. Media yang telah disterilisasi di keluarkan dari autoclave dan dimiringkan dengan kemiringan 30°. Ditunggu media sampai padat. Proses pembuatan agar miring disajikan pada Lampiran 3.

**d. Peremajaan Bakteri *P. fluorescens***

Peremajaan bakteri *P. fluorescens* dari isolat dilakukan pada media agar miring yang bertujuan untuk memperbaiki biakan bakteri. Menurut Winarti, Kusriani dan Fachriyah (2009), sebelum dipakai untuk pengujian, bakteri yang akan dipakai diregenerasi terlebih dahulu dengan menggosokkan biakan dari stok bakteri ke media agar miring dalam tabung reaksi.

Pada tahap peremajaan bakteri disiapkan media agar miring (PSA) yang sudah padat dan isolat bakteri *P. fluorescens*. Agar miring dan isolat bakteri dipastikan dalam kondisi suhu ruang dan dimasukkan ke dalam LAF. Jarum ose dipijarkan pada bunsen untuk pengondisian aseptis. Isolat bakteri diambil satu ose dan digosokkan pada agar miring dari pangkal hingga ke ujung secara zig-zag. Media agar miring di tutup kapas dan aluminium foil untuk dimasukkan ke dalam inkubator selama 24-48 jam. Proses peremajaan bakteri *P. fluorescens* disajikan pada Lampiran 4.

**e. Pembuatan TSB (*Tryptone Soy Broth*)**

Pembuatan TSB digunakan sebagai media cair untuk pembiakan atau kultur bakteri *P. fluorescens*. TSB ditimbang menggunakan timbangan digital sebanyak 0,3 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Aquades sebanyak 10 ml ditambahkan ke dalam Erlenmeyer. TSB dihomogenkan hingga larut. TSB dipindahkan ke dalam tabung reaksi dan ditutup menggunakan kapas serta aluminium foil. TSB di sterilisasi pada *autoclave* dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit. TSB yang telah disterilisasi dikeluarkan dari *autoclave* dan ditunggu sampai suhu ruang. TSB disimpan pada lemari pendingin. Proses pembuatan TSB disajikan pada Lampiran 5.

**f. Kultur Bakteri *P. fluorescens***

Kultur bakteri *P. fluorescens* dilakukan pada media cair berupa *Tryptone Soy Borth* (TSB) untuk memperbanyak biakan bakteri *P. fluorescens*. Pada kultur bakteri *P. fluorescens* disiapkan media TSB yang sudah steril dan biakan bakteri hasil peremajaan pada agar miring. TSB steril dan agar miring dipastikan berada pada kondisi suhu ruang dan dimasukkan ke dalam LAF. Jarum ose di aseptiskan dengan cara dipijarkan pada Bunsen. Bakteri pada agar miring diambil satu ose menggunakan jarum ose dan dimasukkan ke dalam TSB steril. TSB yang berisi bakteri divortex agar homogen dan bakteri tidak mengumpal. TSB ditutup kapas dan aluminium foil. TSB dimasukkan ke dalam inkubator selama 24-48 jam. Proses kultur bakteri *P. fluorescens* disajikan pada Lampiran 6.

**g. Pembuatan Natrium Fisiologis**

Pembuatan Nafis digunakan untuk pengenceran bakteri. NaCl ditimbang 0,27 gram menggunakan timbangan digital. NaCl dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan menggunakan akuades sebanyak 30 ml. Larutan diambil 10 ml menggunakan pipet volume dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi. Proses tersebut dilakukan sebanyak tiga kali. Tabung reaksi ditutup kapas dan aluminium foil. Tabung reaksi yang berisi larutan diesterilisasi dalam *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm. Proses pembuatan larutan Nafis disajikan pada Lampiran 7.

**h. Pengenceran Bakteri *P. fluorescens***

Pengenceran bakteri *P. fluorescens* dilakukan dengan menggunakan bakteri yang telah dikultur pada TSB sebagai kepadatan awal ( $10^{10}$  CFU/mL) dan dilakukan pengenceran bertingkat menggunakan Nafis. Bakteri pada TSB diambil sebanyak 1 mL menggunakan mikropipet dan dimasukkan ke dalam Nafis  $10^9$

CFU/mL serta dihomogenkan menggunakan *vortex*. Pengenceran dilakukan sebanyak tiga kali sampai mendapatkan kepadatan bakteri *P. fluorescens*  $10^7$  CFU/mL. Proses pengenceran bakteri disajikan pada Lampiran 8.

**i. Pembuatan PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)**

Media PSA digunakan sebagai media padat untuk uji cakram. PSA ditimbang menggunakan timbangan digital sebanyak 6,78 gram dan dimasukkan ke dalam Erlenmeyer. Aquades ditambahkan ke dalam Erlenmeyer sebanyak 140 ml. PSA dihomogenkan sampai larut dan dipanaskan menggunakan hotplate sampai mendidih dan media berwarna kuning transparan. Erlenmeyer yang berisi PSA ditutup kapas dan aluminium foil untuk dilakukan proses sterilisasi. Sterilisasi dilakukan menggunakan autoclave dengan suhu  $121^{\circ}\text{C}$  dan tekanan 1 atm selama 15 menit. Media PSA yang telah disterilisasi didiamkan sampai suhu ruang. Media PSA dituang ke cawan petri sebanyak  $\pm 20$  ml dan dilakukan di dalam *Laminary Air Flow* (LAF) untuk mengurangi resiko kontaminasi.

**3.4.2 Pelaksanaan Penelitian**

**a. Pewarnaan Gram**

Prosedur pewarnaan gram dilakukan dengan menyiapkan bakteri yang akan diidentifikasi dan objek glass. Objek glass ditetesi aquades steril satu tetes. Bakteri *P. fluorescens* pada agar miring diambil satu ose menggunakan jarum ose dan diletakkan pada objek glass dan diratakan agar tidak menggumpal saat diidentifikasi dan difiksasi pada bunsen. Bakteri pada objek glass ditetesi larutan kristal violet sebanyak satu tetes dan diratakan, ditunggu selama satu menit. Bakteri dibilas dengan aquades dan dikeringkan dengan cara diangin-anginkan. Bakteri ditetesi larutan iodine sebanyak satu tetes dan diratakan, ditunggu selama satu menit. Bakteri dibilas aquades dan dikeringkan. Bakteri dicuci dengan alkohol 70% sebanyak satu tetes dan dikeringkan. Bakteri ditetesi larutan safranin sebanyak satu tetes dan diratakan, ditunggu selama 30 detik. Bakteri

dibilas aquades dan dikeringkan. Bakteri diamati dibawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

#### **b. Uji Fitokimia**

Menurut Lau, Wahyudin dan Lallo (2018), ekstrak etanol daun *P. major* di uji fiokimia untuk mengetahui golongan senyawa kimianya meliputi uji alkaloid, uji flavonoid, uji saponin, uji tannin dan uji polifenol.

- Alkaloid

Ekstrak etanol daun *P. major* yang terenkapsulasi dicampur dengan 5 ml kloroform dan 5 ml amoniak lalu dipanaskan, dikocok dan disaring. Sebanyak 5 tetes asam sulfat 2 N ditambahkan pada masing-masing filtrat, lalu dikocok dan didiamkan. Bagian atas dari masing-masing filtrat diambil dan diuji dengan pereaksi Dragendorf (endapan jingga), Mayer (endapan putih), dan Wagner (endapan coklat).

- Flavonoid

Ekstrak etanol daun *P. major* terenkapsulasi sebanyak  $\pm 1$  ml dicampurkan dengan 3 ml metanol, lalu dikocok, dipanaskan, dikocok lagi kemudian disaring. Filtrat yang diperoleh ditambahkan serbuk Mg 0,1 g dan HCl pekat 2 tetes. Hasil ditunjukkan dengan terbentuknya endapan merah (flavon), endapan merah tua (flavonol/flavonon), dan endapan hijau (senyawa glikosisa/aglikon).

- Saponin

Sebanyak 0,5 g ekstrak etanol daun *P. major* terenkapsulasi dimasukkan ke dalam tabung reaksi, ditambahkan 10 ml air panas, didinginkan kemudian dikocok selama 10 detik. Hasil positif jika terbentuk busa setinggi 1 sampai 10 cm yang stabil tidak kurang dari 10 menit dan tidak hilang dengan penambahan 1 tetes HCl 2 N.

- Tanin

Sebanyak 0,5 g Ekstrak etanol daun *P. major* terenkapsulasi disari dengan 10 ml aquades kemudian disaring, filtratnya diencerkan dengan air sampai tidak berwarna. Larutan diambil sebanyak 2 ml dan ditambahkan 2 tetes  $\text{FeCl}_3$  1%. Jika terjadi warna hijau, biru atau kehitaman menunjukkan adanya tanin.

- Polifenol

Ekstrak etanol daun *P. major* terenkapsulasi direaksikan dengan larutan  $\text{FeCl}_3$  10% dalam akuades. Hasil ditunjukkan dengan terbentuk warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat.

**c. Pembuatan Dosis Ekstrak *P. major***

Penelitian ini menggunakan lima perlakuan dosis yang berbeda yaitu 400ppm, 800ppm, 1200ppm, 1600ppm dan 2000ppm. Dosis diperoleh dari pengenceran larutan *stock*. Larutan *stock* dibuat dengan menimbang 25mg ekstrak *P. major* menggunakan timbangan analitik dan dimasukkan ke dalam botol film. Pelarut yang digunakan ialah DMSO 10% sebanyak 5ml ditambahkan ke dalam botol film dan divortex, sehingga diperoleh larutan *stock* dengan dosis 5000ppm sebanyak 5ml. Menurut Assidqi, Tjahjaningsih dan Sigit (2012), pelarut DMSO 10% merupakan pelarut organik dan tidak bersifat bakterisidal. Selain itu, pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa polar maupun non polar adalah *dimethylsulfoxide* (DMSO). DMSO dapat digunakan sebagai pengencer ekstrak untuk memperoleh ekstrak dengan kadar konsentrasi tertentu.

Pada dosis 400ppm diambil 0.12 ml larutan *stock* dan ditambahkan 1.38ml pelarut DMSO 10%. Dosis 800ppm diperoleh dari 0.24ml larutan *stock* dan 1.26ml DMSO 10%. Dosis 1200ppm diperoleh dari 0.36ml larutan *stock* dan 1.14ml DMSO 10%. Dosis 1600ppm diperoleh dari 0.48ml larutan *stock* dan 1.02ml DMSO 10%. Dosis 2000ppm diperoleh dari 0.6ml larutan *stock* dan 0.9ml

DMSO 10%. Menurut Andayani, Mubarak dan Rinanda (2016), DMSO memiliki kemampuan untuk menembus membran sel, namun pada penggunaan DMSO sebagai pelarut, konsentrasi akhir DMSO tidak boleh melebihi 10% karena dapat menyebabkan pecahnya membran sel. Proses pembuatan dosis ekstrak *P. major* disajikan pada Lampiran 9 dengan perhitungan dosis pada Lampiran 14.

#### d. Uji Cakram

Prosedur uji cakram dilakukan dengan menyiapkan cawan petri yang berisi media PSA yang sudah memadat, bakteri *P. fluorescens* dengan kepadatan  $10^7$  CFU/mL, larutan ekstrak dengan dosis yang telah ditentukan dan kertas cakram pada LAF. Kertas cakram steril direndam ke dalam lima perlakuan dosis ekstrak *P. major*. Masing-masing dosis berisi tiga kertas cakram dan didiamkan selama 15 menit agar kandungan ekstrak *P. major* terserap ke dalam kertas cakram. Perlakuan kontrol positif yaitu dengan merendam kertas cakram pada dosis 5000 ppm dan perlakuan kontrol negatif direndam DMSO 10%. Semua perlakuan ditunggu sampai 15 menit. Bakteri *P. fluorescens* sebanyak 0.1 ml dimasukkan ke dalam cawan petri yang berisi media PSA dan diratakan menggunakan *triangle*. Kertas cakram yang sudah direndam pada larutan ekstrak diambil dan ditiriskan untuk selanjutnya dimasukkan ke dalam cawan petri yang sudah ditanami bakteri *P. fluorescens*. Cawan petri dibalik dan dilapisi plastik wrap untuk meminimalisir kontaminasi, lalu di masukkan ke dalam inkubator dan diamati pada 24 jam pertama untuk melihat pengaruh ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* melalui zona bening yang terbentuk. Zona bening diukur menggunakan jangka sorong digital.

Metode difusi cakram adalah metode yang paling sering digunakan dimana cara kerja difusi cakram yaitu antibakteri yang akan diuji diserapkan pada kertas cakram dan ditempelkan pada media agar yang telah dihomogenkan

dengan bakteri kemudian diinkubasi sampai terlihat zona hambat didaerah sekitar cakram (Novita, 2016). Prosedur uji cakram disajikan pada Lampiran 10.

**e. Parameter Uji**

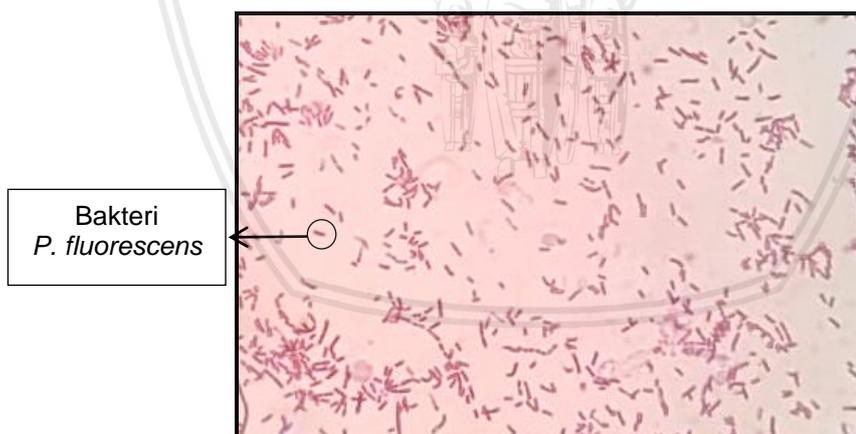
Parameter uji pada penelitian ini terbagi menjadi dua yaitu parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama yaitu hasil pengamatan zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram. Parameter penunjang yaitu suhu inkubasi yang digunakan selama penelitian untuk menunjang pertumbuhan bakteri *P. fluorecens*.



## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Identifikasi Bakteri *P. fluorescens*

Proses identifikasi *P. fluorescens* dilakukan dengan menggunakan pewarnaan gram yang bertujuan untuk mengetahui bahwa bakteri yang digunakan merupakan *P. fluorescens*. Hasil pewarnaan gram dapat menunjukkan bentuk morfologi sel bakteri dan mengetahui bakteri tergolong dalam bakteri gram positif ataupun gram negatif. Menurut Hidayat dan Alhadi (2012), pewarnaan gram merupakan pewarnaan differensial yang sangat berguna dan paling banyak digunakan dalam laboratorium mikrobiologi. Pewarnaan ini merupakan salah satu tahap penting identifikasi bakteri. Pewarnaan gram memisahkan bakteri menjadi kelompok bakteri gram positif dan gram negatif. Sedangkan sifat fisiologi bakteri diketahui melalui uji biokimia. Hasil pewarnaan gram bakteri *P. fluorescens* dapat dilihat pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *P. fluorescens* dengan Perbesaran 1000x (Dokumentasi Pribadi, 2019)

Berdasarkan hasil pewarnaan gram dapat diketahui bahwa bakteri *P. fluorescens* tergolong dalam kelompok bakteri gram negatif karena menghasilkan warna merah. Hal ini didukung oleh Safrida, Yulvizar dan Devira (2012), menambahkan bahwa bakteri gram negatif ditandai dengan warna merah muda yang menunjukkan bahwa bakteri tersebut tidak mampu mengikat warna kristal

violet dan hanya terwarnai oleh safranin. Menurut Rahayu dan Gumilar (2017), terbentuknya warna merah karena pencucian menggunakan alkohol dapat meningkatkan porositas dinding sel bakteri gram negatif dengan melarutkan lipid lapisan luar, sehingga warna dari kristal violet dapat lebih mudah dihilangkan dari lapisan peptidoglikan yang tidak tertaut silang dengan kuat. Karena sel-sel bakteri gram negatif mengalami kehilangan warna setelah pencucian dengan alkohol sehingga sel-selnya menyerap pewarna tandingan (safranin).

Karakteristik morfologi yang nampak dari hasil pewarnaan gram bakteri *P. fluorescens* yaitu memiliki bentuk batang. Menurut Martinez-Garcia, Ruano-Rosa, Schilirò, Prieto, Ramos, Rodríguez-Palenzuela dan Mercado-Blanco (2015), bakteri *P. fluorescens* memiliki sel berbentuk batang (*rods*) dengan ukuran lebar sekitar 0.5  $\mu\text{m}$  dan panjang 2-2.5  $\mu\text{m}$ .

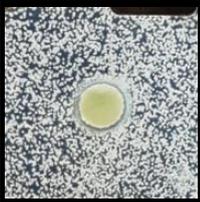
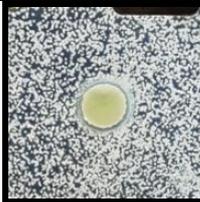
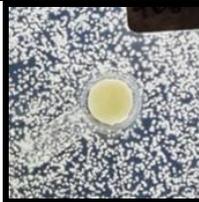
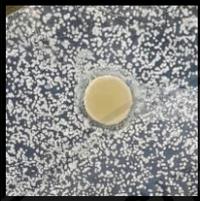
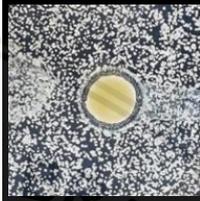
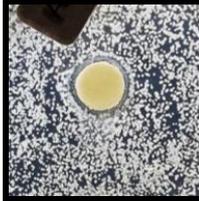
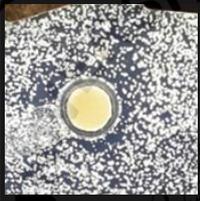
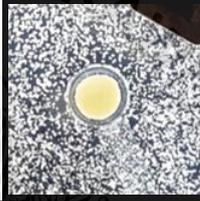
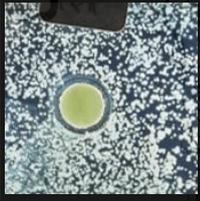
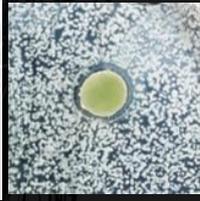
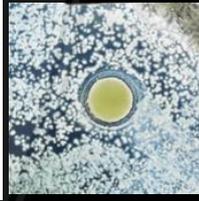
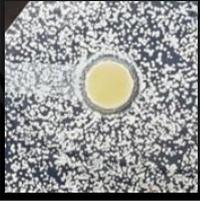
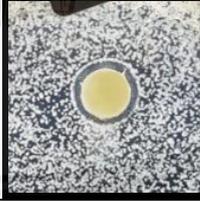
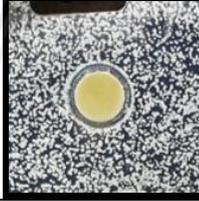
Identifikasi bakteri *P. fluorescens* juga dilakukan dengan uji biokimia. Hasil uji biokimia bakteri *P. fluorescens* yang dilakukan di Laboratorium Uji Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau Jepara disajikan pada Lampiran 11. Berdasarkan hasil uji biokimia bakteri *P. fluorescens* memiliki bentuk batang, katalase positif, oksidase positif,  $\text{H}_2\text{S}$  negative dan dapat menghasilkan pigmen *fluorescents*. Menurut Suyono dan Salahudin (2011), Bakteri ini memiliki karakterisasi yaitu oksidase positif, katalase positif dan tumbuh dengan baik pada suhu 4°C atau dibawah 43°C.

#### 4.2 Uji Cakram

Uji cakram dilakukan dengan menggunakan lima perlakuan dosis ekstrak daun *P. major* (400ppm, 800ppm, 1200ppm, 1600ppm dan 2000ppm) serta kontrol positif dan kontrol negatifnya. Berdasarkan hasil uji cakram yang dilakukan untuk mengetahui sensitivitas ekstrak daun *P. major* terhadap bakteri

*P. fluorescens* secara *in vitro* didapatkan hasil zona bening atau daya hambat yang terbentuk pada setiap perlakuan disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Hasil Uji Cakram

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A (400ppm)			
B (800ppm)			
C (1200ppm)			
D (1600ppm)			
E (2000ppm)			

Hasil uji cakram menunjukkan bahwa setiap perlakuan yang diberikan dapat menghasilkan zona bening, sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Perlakuan dosis yang berbeda menghasilkan zona bening yang berbeda pula. Zona bening yang terbentuk dari dosis 400ppm sampai dengan 2000ppm mengalami peningkatan. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak dengan dosis yang diberikan berpengaruh terhadap zona bening yang terbentuk. Menurut Rahmawati, Sudjarwo dan Widodo (2014), jika

semakin luas zona bening yang terbentuk maka semakin besar suatu bahan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Selain itu, Novita (2016), menambahkan bahwa konsentrasi senyawa antibakteri yang terkandung dalam ekstrak akan mempengaruhi aktivitas antibakteri yang dihasilkan. Sehingga semakin tinggi kandungan senyawa antibakteri dalam ekstrak yang digunakan akan semakin menghambat pertumbuhan bakteri karena aktivitas antibakterinya semakin tinggi pula.

Kandungan senyawa antibakteri dalam daun *P. major* menyebabkan pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* terhambat. Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa perusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein (Pelczer dan Chan, 1986 dalam Kusmiyati dan Agustini, 2007).

Berdasarkan hasil uji fitokimia (Lampiran 12) yang telah dilakukan terhadap ekstrak daun *P. major* menunjukkan hasil positif mengandung senyawa aktif flavonoid, alkaloid, tannin, saponin, dan polifenol. Menurut Heni, Arreneuz, dan Zahara (2015), senyawa aktif alkaloid dan saponin memiliki mekanisme kerja untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antibakteri dan mekanisme penghambatan dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel tersebut. Selain itu, alkaloid juga menghambat pembentukan sintesis protein sehingga dapat mengganggu metabolisme bakteri. Ardananurdin, Winarsih dan Widayat (2004), menambahkan bahwa polifenol bekerja melalui penghambatan enzim

mikroorganisme oleh bagian senyawa yang teroksidasi, kemungkinan melalui reaksi dengan gugus sulfhidril atau melalui interaksi yang non spesifik dengan protein mikroorganisme. Selain itu polifenol juga dapat menyebabkan denaturasi protein bakteri. Flavonoid berefek antimikroba melalui kemampuan untuk membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein yang dapat larut serta dengan dinding sel bakteri. Sehingga akan mengganggu kestabilan dinding sel bakteri dan menyebabkan senyawa intraseluler bakteri keluar.

Berdasarkan penelitian sebelumnya oleh Sutrisna, Maskoen, Sujatno dan Sastramihardja (2014), juga memperoleh hasil bahwa daun sendok (*P. major*) mengandung zat aktif yang dapat dimanfaatkan sebagai obat, seperti *alkaloid*, *flavonoid*, *saponin*, dan *tannin*. Namun juga ditemukan senyawa aktif lain pada ekstrak *P. major* yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri yaitu *aucubin*. *Aucubin* merupakan senyawa turunan dari *iridoid glycoside* yang memiliki aktivitas antibakteri dan berperan sebagai hepatoprotektor. Selain itu, ekstrak tanaman ini juga memiliki kandungan *Beta-sitosterol* yang berfungsi untuk meningkatkan system imun serta produksi sel darah putih.

Hasil uji cakram untuk mengetahui sensitivitas ekstrak daun *P. major* yang diberikan terhadap pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* pada pengamatan 24 jam disajikan pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Data hasil pengukuran zona bening ekstrak daun sendok (*P. major*) terhadap bakteri *P. fluorescens* setelah 24 Jam

Perlakuan	Ulangan (mm)			Total (mm)	Rerata (mm)
	1	2	3		
A	8.04	7.54	7.26	22.84	7.61
B	7.41	7.61	7.89	22.91	7.64
C	8.26	8.02	7.92	24.2	8.07
D	8.12	8.3	7.94	24.36	8.12
E	8.15	8.18	8.32	24.65	8.22
Total				118.96	

Hasil pengukuran zona bening menunjukkan bahwa terdapat peningkatan rerata diameter zona bening dari perlakuan A (400 ppm) sampai dengan perlakuan E (2000 ppm). Perlakuan E memiliki rerata zona bening tertinggi yaitu sebesar 8.22 mm dan terendah pada perlakuan A sebesar 7.61 mm. Peningkatan zona bening yang terbentuk dari perlakuan dosis yang diberikan diketahui tidak cukup besar. Hal ini dapat disebabkan karena kandungan bahan antibakteri yang terserap tidak berbeda jauh antara dosis yang diberikan, sehingga menghasilkan zona bening dengan nilai rerata yang tidak berbeda jauh. Menurut Dali, Natsir, Usman dan Ahmad (2011), faktor-faktor yang mempengaruhi besarnya zona hambat yaitu kepekaan bakteri, suhu inkubasi, pH, stabilitas antibakteri, ukuran inokulum, waktu inkubasi dan aktivitas metabolik mikroorganismenya. Kemampuan biologis bakteri juga berbeda-beda dalam merespon bahan antibakteri.

Luas diameter zona bening dapat dikategorikan berdasarkan kemampuan daya hambatnya sebagaimana disajikan pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Kategori hambatan berdasarkan diameter zona bening

Diameter Zona Bening	Kategori Hambatan
<5 mm	Lemah
5-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
>20 mm	Sangat Kuat

(Surjowardojo, Susilorini dan Benarivo, 2016)

Berdasarkan kategori hambatan ekstrak daun *P. major* dapat dikategorikan sebagai antibakteri dengan hambatan sedang, karena zona hambat yang dihasilkan pada perlakuan A, B, C, D dan E memiliki rata-rata diameter zona hambat di bawah 10mm. Berdasarkan hal tersebut ekstrak daun *P. major* dapat dikatakan mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*, namun perlakuan dosis yang diberikan menghasilkan daya hambat yang belum cukup kuat untuk menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.

Menurut Samuelsen (2000), ekstrak ethanol 70% daun *P. major* sangat efektif menghambat bakteri *Salmonella flexneri* (zona bening 10-15mm), namun lemah terhadap bakteri *S. aureus*, *S. sonnei*, *E. coli* dan *M. Smegmatis* (zona bening 6-10mm). Hal ini dapat disebabkan karena perbedaan aktifitas pertahanan antar bakteri.

Adapun pengaruh yang dihasilkan dari perlakuan dosis ekstrak daun *P. major* yang diberikan terhadap zona bening yang terbentuk dapat diketahui dengan dilakukannya uji sidik ragam. Perhitungan nilai uji sidik ragam dapat disajikan pada Tabel 6.

**Tabel 6.** Hasil Uji Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	0.970	0.242	4.247*	3.48	5.99
Acak	10	0.571	0.0571			
Total	14	1.541				

Keterangan: \* (berbeda nyata)

Hasil uji sidik ragam menunjukkan hasil bahwa penggunaan ekstrak daun *P. major* sebagai bahan antibakteri terhadap *P. fluorescens* memiliki pengaruh yang berbeda nyata. Hal ini dikarenakan hasil nilai  $F_{hitung}$  yang diperoleh ialah sebesar 4.247. Hasil tersebut lebih besar daripada nilai  $F_{tabel}$  5% (3.48) dan lebih kecil dari  $F_{tabel}$  1% (5.99). Sehingga perlu dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui adanya pengaruh yang dihasilkan antar perlakuan yang diberikan. Hasil uji BNT untuk perlakuan dosis ekstrak *P. major* yang diberikan terhadap bakteri *P. fluorescens* dapat disajikan pada Tabel 7.

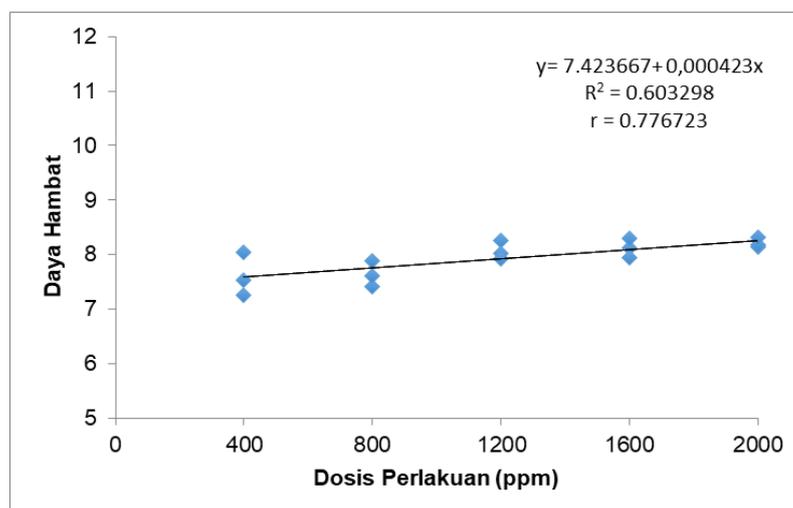
**Tabel 7.** Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		7.61	7.64	8.07	8.12	8.22	
A	7.61	—					a
B	7.64	0.02 <sup>ns</sup>	—				a
C	8.07	0.45*	0.43 <sup>ns</sup>	—			b
D	8.12	0.51*	0.48*	0.05 <sup>ns</sup>	—		b
E	8.22	0.60*	0.58*	0.15 <sup>ns</sup>	0.10 <sup>ns</sup>	—	b

Keterangan: ns = non signifikan, \* = berbeda nyata, \*\* = berbeda sangat nyata

Hasil uji BNT menunjukkan bahwa perlakuan A (400ppm) dan B (800ppm) tidak memberikan pengaruh yang signifikan (*non-significant*) sehingga diberi notasi a. Perlakuan B (800ppm) tidak memberikan pengaruh yang signifikan (*non-significant*) terhadap perlakuan A sehingga diberi notasi a. Perlakuan C (1200ppm) berbeda nyata dengan perlakuan A dan B sehingga diberi notasi b. Perlakuan D (1600ppm) berbeda nyata dengan perlakuan A dan B, tetapi tidak memberikan pengaruh yang signifikan (*non-significant*) terhadap perlakuan C sehingga diberi notasi b. Perlakuan E (2000ppm) berbeda nyata dengan perlakuan A dan B tetapi tidak memberikan pengaruh yang signifikan (*non-significant*) terhadap perlakuan C dan D sehingga diberi notasi b. Perlakuan E diketahui memiliki hasil zona bening yang lebih tinggi dari semua perlakuan namun tidak berpengaruh signifikan terhadap perlakuan C dan D. Hal ini dikarenakan zona bening yang terbentuk memiliki rerata yang tidak berbeda jauh. Sehingga diperoleh perlakuan terbaik ialah perlakuan C (1200ppm).

Uji selanjutnya yaitu uji polinomial orthogonal untuk mengetahui hubungan pemberian ekstrak daun *P. major* terhadap bakteri *P. fluorescens*. Hasil pengujian polinomial orthogonal disajikan dalam bentuk grafik yang menyatakan hubungan antara dosis ekstrak daun *P. major* dengan rerata daya hambat yang terbentuk. Grafik hubungan keduanya disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Grafik Uji Polinomial Ortogonal

Grafik hubungan antara dosis ekstrak daun *P. major* dengan rerata zona bening yang terbentuk pada bakteri *P. fluorescens* menghasilkan perpotongan garis pola linier dengan persamaan yaitu  $y = 7.423667 + 0,000423x$  dan memiliki koefisien determinasi ( $R^2$ ) sebesar 0.60. Nilai koefisien determinasi yang diperoleh pada penelitian ini menunjukkan bahwa penggunaan ekstrak daun *P. major* terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* memberikan pengaruh sebesar 60%. Pada perlakuan A (400ppm) sampai perlakuan E (2000ppm) mengalami peningkatan pada hasil diameter zona bening yang terbentuk. Peningkatan diameter zona bening ini dipengaruhi oleh penambahan dosis yang diberikan, sehingga didapatkan hubungan bahwa semakin tinggi konsentrasi yang diberikan maka akan semakin besar pula kemampuan suatu bahan antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.

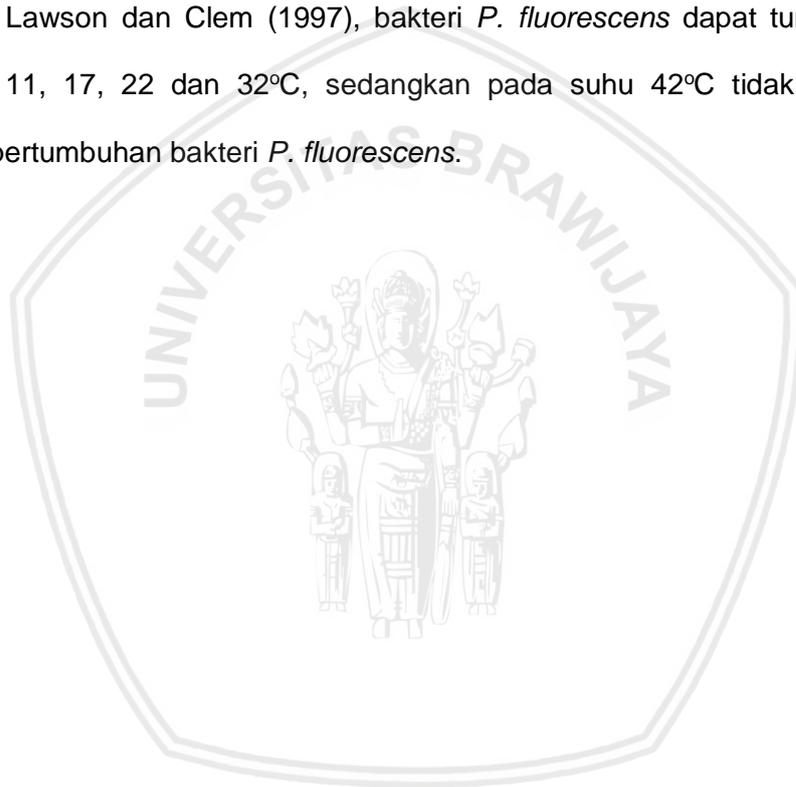
Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan C (1200ppm) merupakan dosis yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*, meskipun masih tergolong dalam kategori hambatan sedang. Semua perlakuan dosis yang diberikan terhadap bakteri *P. fluorescens* menunjukkan sifat bakteristatik karena ekstrak *P. major* mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut Jamili, Hidayat dan Hifizah (2014), Senyawa antimikroba dari bahan herbal dapat bersifat bakteristatik, yaitu hanya mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri. Sehingga zona hambatan yang terbentuk secara perlahan-lahan kembali menurun atau dengan kata lain, efektifitas ramuan herbal juga menurun.

Pada penelitian ini zona bening yang terbentuk juga dapat dipengaruhi oleh beberapa hal seperti kecepatan pertumbuhan bakteri dan difusi kertas cakram. Menurut Suryati, Bahar dan Ilmawati (2017), terdapatnya zona hambat juga bergantung beberapa faktor seperti kecepatan difusi, ukuran molekul, stabilitas bahan antibakteri, sifat media agar yang digunakan, jumlah organisme

yang diinokulasi, kecepatan tumbuh bakteri, konsentrasi bahan kimia dan kondisi saat inkubasi.

#### 4.3 Parameter Penunjang

Parameter penunjang digunakan untuk dapat menunjang hasil penelitian yang dilakukan. Parameter penunjang yang digunakan pada penelitian ini adalah suhu inkubasi. Suhu inkubasi yang digunakan selama penelitian ini adalah 32°C sesuai dengan toleransi suhu pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Menurut Bly, Quiniou, Lawson dan Clem (1997), bakteri *P. fluorescens* dapat tumbuh pada suhu 4, 11, 17, 22 dan 32°C, sedangkan pada suhu 42°C tidak ditemukan adanya pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.



## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian uji sensitivitas ekstrak daun sendok (*P. major*) terhadap bakteri *P. flourescens* secara *in vitro* dapat diperoleh kesimpulan bahwa ekstrak daun *P. major* dapat digunakan sebagai antibakteri dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. flourescens*. Dosis terbaik dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. flourescens* ditunjukkan oleh perlakuan C dengan dosis 1200ppm dengan kategori hambatan sedang.

### 5.2 Saran

Pada penelitian ini diperoleh hasil bahwa ekstrak daun *P. major* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. flourescens* dengan dosis terbaik pada perlakuan C (1200ppm), sehingga disarankan untuk dapat digunakan sebagai alternative pengobatan pada ikan yang terinfeksi bakteri *P. flourescens*. Adapun dalam penerapannya diperlukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk mengetahui keefektifan dosis tersebut pada hewan uji yang terinfeksi bakteri *P. flourescens*.

## DAFTAR PUSTAKA

- Adiathy, I. A. G. D., N. W. Suniti dan I. K. Suada. 2017. Pengaruh inokulasi *Pseudomonas* spp. indigenus terhadap penyakit akar gada dan pertumbuhan tanaman kubis (*Brassica oleracea* L.). *E-journal Agroekoteknologi Tropika*. **6** (3): 329-338.
- Adom, M. B., M. Taher, M. F. Mutalabisin, M. S. Amri, M. B. A. Kudos, M. W. A. Sulaiman, P. Sengupta and D. Susanti. 2017. Chemical constituents and medical benefits of *Plantago major*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. **96** : 348-360.
- Afrianto, E., E. Liviawaty, Z. Jamaris dan Hendi. 2015. Penyakit Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta. 220hlm.
- Aisiah, S. 2012. Efikasi ekstrak mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan toksisitasnya pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Sains Akuatik*. **14** (1): 55-63.
- Andayani, R., Z. Mubarak dan D. R. Rinanda. 2016. Aktivitas antibakteri tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) terhadap *Enterococcus faecalis* secara *in vitro*. *Journal of Syiah Kuala Dentistry Society*. **1** (2):201-210.
- Anonimous.2016.[https://www.bps.go.id/publication/2016/12/20/9b1d875a713acc\\_a4d7c6d19c/statistik-sumber-daya-laut-dan-pesisir-2016.html](https://www.bps.go.id/publication/2016/12/20/9b1d875a713acc_a4d7c6d19c/statistik-sumber-daya-laut-dan-pesisir-2016.html).(Diakses pada tanggal 1 Maret 2019).
- Arwiyanto, T., Y. M. S. Maryudani dan N. N. Azizah. 2007. Sifat - sifat fenotipik *Pseudomonas fluoresen*, agensia pengendalian hayati penyakit lintat pada tembakau temanggung. *Biodiversitas*. **8** (2): 147-151.
- Assidqi, K., W. Tjahjaningsih dan S. Sigit. 2012. Potensi ekstrak daun patikan kebo (*Euphorbia hirta*) sebagai antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*. *Journal of Marine and Coastal Science*. **1** (2): 113-124.
- Bly, J. E., S. M-A. Quiniou, L. A. Lawson and L. W. Clem. 1997. Inhibition of *Saprolegnia* pathogenic for fish by *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Diseases*. **20** : 35-40.
- Cahyono, B. 2001. Budi Daya Ikan di Perairan Umum. Kanisius. Yogyakarta. 95 hlm.
- Carolina, N. Dan W. Noventi. 2016. Potensi ekstrak daun sirih hijau (*Piper betle* L.) sebagai alternatif terapi *Acne vulgaris*. *Majority*. **5** (1): 140-145.
- Dali, S., H. Natsir, H. Usman dan A. Ahmad. 2011. Bioaktivitas antibakteri fraksi protein alga merah *Gelidium amansii* dari perairan Cikoang Kabupaten Takalar, Sulawesi Selatan. *Majalah Farmasi dan Farmakologi*. **15** (1): 47-52.
- Darak, O. and R. D. Barde. 2015. *Pseudomonas fluorescens* associated with bacterial disease in Catla catla in Marathwada Region of Maharashtra.

*International Journal of Advanced Biotechnology and Research.* **6** (2): 189-195.

- Fatima, Y. 2013. Daya antibakteri ekstrak kulit dan biji buah pulasan (*Nephelium mutabile*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli* secara *in vitro*. **10** (1): 31-38.
- Fitriani, A., E. Sutrisna, I. A. Salim, A. M. Maskoen, M. Sujatno, H. S. Sastramihardja. 2013. The hepatoprotective effect of ethanol extract of plantain (*Plantago major* L.) on drug induced hepatotoxicity rat (*Rattus norvegicus*) model. *Asian Journal of Phytomedicine and Clinical Research.* **2** (3): 97-108.
- Hardi, E. H., C. A. Pebrianto dan G. Saptiani. 2014. Toksisitas produk ekstraseluler dan intraseluler bakteri *Pseudomonas* sp. pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Veterinari.* **15** (3): 312-322.
- Hasanuddin. 2011. Uji aktivitas antibiosis pseudomonads pendarfluor terhadap *Rigidoporus lignosus* (Klotzsch) Imazeki penyebab penyakit akar putih. *Jurnal Hama dan Penyakit Tumbuhan.* **11** (1): 87-94.
- Heni, S. Arreneuz dan T. A. Zaharah. 2015. Efektivitas antibakteri ekstrak kulit batang belimbing hutan (*Baccaurea angulata* Merr.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jurnal Kimia Khatulistiwa.* **4** (1): 84-90.
- Hidayat, H. 2015. Identifikasi morfologi dan uji aktivitas antimikroba terhadap bakteri *Escherichia coli* dari fermentasi buah markisa (*Passiflora* sp.). *Jurnal Ilmu-Ilmu MIPA.* **15** (1-2): 76-85.
- Hidayat, R. Dan F. Alhadi. 2012. Identifikasi *Streptococcus Equi* dari kuda yang diduga menderita strangles. *Jurnal Ilmu Pertanian Indonesia.* **17** (3): 199-203.
- Hidayat, S. dan R. M. Napitupulu. 2015. Kitab Tumbuhan Obat. AgriFlo (Penebar Sawaya Grup). Jakarta Timur. 422 hlm.
- Hutapea, J. R. 2000. Inventaris Tanaman Obat Indonesia (I) Jilid 1. Badan Penelitian dan Pengembangan Kesehatan Departemen Kesehatan Republik Indonesia. Jakarta. 255 hlm.
- Indriani, A. D., S. B. Prayitno dan Sarjito. 2014. Penggunaan ekstrak jahe merah (*Zingiber officinale* var. Rubrum) sebagai alternatif pengobatan ikan nila (*Oreochromis niloticus*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology.* **3** (3): 58-65.
- Jamili, M. A., M. N. Hidayat dan A. Hifizah. 2014. Uji daya hambat ramuan herbal terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dan *Salmonella thypi*. *Jurnal ilmu dan Industri Peternakan.* **1** (3): 227-239.
- Khoiriyah, H. dan P. Ardiningsih. 2014. Penentuan waktu inkubasi optimum terhadap aktivitas bakteriosin *Lactobacillus* sp. RED<sub>4</sub>. *Jurnal Kimia Khatulistiwa.* **3** (4): 53-56.

- Koesharyani, I., L. Gardenia dan H. Supriyadi. 2012. Multi infeksi pada udang *Litopenaeus vannamei*: diagnosis dengan Polymerase Chain Reaction (PCR) dan Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Jurnal Riset Akuakultur*. **7**(1) : 73-84.
- Kusmiyati dan N. W. S. Agustini. 2007. Uji aktivitas senyawa antibakteri dari mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. **8** (1): 48-53.
- Martínez-García, P. M., D. Ruano-Rosa, E. Schilirò, P. Prieto, C. Ramos, P. Rodríguez-Palenzuela and 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*. *Standart in Genomic Sciences*. **10** (10): 1-7.
- Mohamed, I. Kobeasy, Osama, M. Abdel-Fatah<sup>1</sup>, S. M. A. El-Salam and Z. E. M. Mohamed. 2011. Biochemical studies on *Plantago major* L. and *Cyamopsis tetragonoloba* L. *International Journal of Biodiversity and Conservation*. **3** (3): 83-91.
- Murwantoko, Rozi, I. Istiqomah dan K. H. Nitimulyo. 2013. Isolasi, karakterisasi, dan patogenitas bakteri penyebab penyakit pada gurami (*Osphronemus goramy*) di Kabupaten Bantul. *Jurnal Perikanan*. **15** (2): 83-90.
- Najafian , Y., S. S. Hamed, M. K. Farshchi and Z. Feyzabadi. 2008. *Plantago major* in tradional persian medicine and modern phytotherapy: a narrative review. *Electronic Physician*. **10** (2): 6390-6399.
- Novita, W. 2016. Uji aktivitas antibakteri fraksi daun sirih (*Piper betle* L) terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus mutans* secara *in vitro*. *Jurnal Medical Jurnal*. **4** (2): 140-155.
- Nuria, M. C., A. Faizatun dan Sumantri. 2009. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun jarak pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Mediagro*. **5** (2): 26-37.
- Parubak, A. S. 2013. Senyawa flavonoid yang bersifat antibakteri dari akway (*Drimys becariana*.Gibbs). *Chemistry Progress*. **6** (1): 34-37.
- Pasril, Y. dan A. Yuliasanti. 2014. Daya antibakteri ekstrak daun sirih merah (*Piper Crocatum*) terhadap bakteri *Enterococcus Faecalis* sebagai bahan medikamen saluran akar dengan metode dilusi. *Insisiva Dental Journal*. **3** (1): 88-95.
- Peleg, M. and M. G. Corradini. 2011. Microbial growth curves: what the models tell us and what they cannot. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. **51** (10): 917-945.
- Rahayu, S. A. Dan M. H. Gumilar. 2017. Uji cemaran air minum masyarakat sekitar margahayu raya bandung dengan identifikasi bakteri *Escherichia coli*. *Indonesian Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. **4** (2): 50-56.

- Rahmawati, N., E. Sudjarwo dan E. Widodo. 2014. Uji aktivitas antibakteri ekstrak herbal terhadap bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Ilmu-Ilmu Peternakan*. **24** (3): 24-31.
- Rakasiwi, b. L. dan C. J. Soegihardjo. 2014. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanolik daging buah buni (*Antidesma bunius* (L.) Spreng) terhadap *Staphylococcus aureus* ATCC 25922 dan *Escherichia coli* ATCC 25923. *Jurnal Framasi Sains dan Komunitas*. **11** (1): 23-31.
- Ratnakomala, S., P. Apriliana, Fahrurrozi, P. Lisdiyanti dan Wien Kusharyoto. 2016. Aktivitas antibakteri aktinomisetes laut dari Pulau Enggano. *Berita Biologi*. **15** (3): 207-319.
- Redha, A. 2010. Flavonoid: struktur, sifat antioksidatif dan peranannya dalam sistem biologis. *Jurnal Belian*. **9** (2): 196 – 202.
- Respati, N. Y. 2017. Optimasi suhu dan pH media pertumbuhan bakteri pelarut fosfat dari isolat bakteri termofilik. *Jurnal Prodi Biologi*. **6** (7): 423-430.
- Safrida, Y. D., C. Yulvizar dan C. N. Devira. 2012. Isolasi dan karakterisasi bakteri berpotensi probiotik pada ikan kembung (*Rastrelliger* sp.). *Jurnal Ilmu-Ilmu Perairan, Pesisir dan Perikanan*. **1** (3): 200-203.
- Sagar, G. R. and J. L. Harper. 1964. Biological flora of the british isles. *Journal of Ecology*. **52** (1): 189-221.
- Samuelsen, A. B. 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. a review. *Journal of Ethnopharmacology*. **71** :1–21.
- Sarah, A., R. Karnila dan Desmelati. 2015. Pembuatan kurva pertumbuhan bakteri asam laktat yang di isolasi dari ikan peda kembung (*Rastrelliger* sp.). *Jurnal Online Mahasiswa Bidang Perikanan dan Ilmu Kelautan*. **2** (2). 1-8.
- Sarjitno, S. B. Prayitno dan h. C. Haditomo. 2013. Buku Pengantar Parasit dan Penyakit Ikan. UPT UNDIP Press Semarang. Semarang. 95 hlm.
- Sartika, R., Melki dan A. I. S. Purwiyanto. 2013. Aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *Eucheuma cottoni* terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera* dan *Salmonella typhosa*. *Maspari Journal*. **5** (2): 98-103.
- Scales, B. S., R. P. Dickson, J. J. Lipuma and G. B. Huffnagle. 2014. Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Journals American Society for Microbiology*. **27** (4): 927-948.
- Schmelzer, G. H. dan A. Gurib-Fakim. 2008. Plant resources of Tropical Africa 11 (1) Medicine plants 1. PROTA Foundation. Netherland. 791 p.
- Setyanto, A. E. 2013. Memperkenalkan kembali metode eksperimen dalam kajian komunikasi. *Jurnal Ilmu Komunikasi*. **3** (1): 37-48.

- Setyowati, E., S. B. Prayitno dan Sarjito. 2014. Pengaruh perendaman ekstrak daun jambu biji (*Psidium guajava*. L) terhadap kelulushidupan dan histologi hati ikan patin (*Pangasius hypophtalamus*) yang diinfeksi bakteri *Edwardsiella tarda*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3** (4): 174-182.
- Sharifa, A. A., Neoh Y. L., Iswadi M.I., Khairul O., Abdul H. M., Jamaludin M., Mohamed A. A. B and H. L. Hing. 2008. Effects of methanol, ethanol and aqueous extract of *Plantago major* on gram positive bacteria, gram negative bacteria and yeast. *Annals of Microscopy*. **8** : 42-44.
- Siska, M. dan R. Salam. 2012. Desain eksperimen pengaruh zeolit terhadap penurunan limbah kadmium (Cd). *Jurnal Ilmiah Teknik Industri*. **11** (2): 173-184.
- Sugiyarto, A. D. Setyawan dan A. Pitoyo. 2006. Estimasi kemelimpahan dan distribusi *Plantago major* L. di Gunung Lawu. *Biodiversitas*. **7** (2): 143-146.
- Sukadi, M. F. 2002. Peningkatan teknologi budidaya perikanan. *Jurnal Iktiologi Indonesia*. **2** (2): 61-66.
- Supriyadi, H., dan D. Iftitah. 2009. Kegunaan ekstrak daun meniran (*Phyllanthus niruri*) bagi pengendalian penyakit ikan akibat infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Media Akuakultur*. **4** (1): 54-58.
- Surjowardojo, P. dan T. E. Susilorini, 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.
- Suryati, N., E. Bahar dan Ilmawati. 2017. Uji efektivitas antibakteri ekstrak aloe vera terhadap pertumbuhan *Escherichia coli* secara *in vitro*. *Jurnal kesehatan Andalas*. **6** (3): 518-522.
- Sutrisna, E., A. M. Maskoen, M. Sujatno and H. S. Sastramihardja. 2014. Pengaruh pemberian ekstrak etanol daun sendok (*Plantago major* L.) terhadap penghambat overekspresi gen regenerating-1, peningkatan kadar caspase-3 dan gambaran histopatologi jaringan mukosa lambung tikus model hipergastrinemia. *Indonesian Journal of Applied Sciences*. **4** (1): 6-10.
- Suyono, Y. dan F. Salahuding. 2011. Identifikasi dan karakterisasi bakteri *Pseudomonas* pada tanah yang terindikasi terkontaminasi logam. *Jurnal Biopropal Industri*. **2** (1): 8-13.
- Syawal, H., Syafriadiman dan Syauqi Hidayah. 2008. Pemberian ekstrak kayu siwak (*Salvadora persica* L.) untuk meningkatkan kekebalan ikan mas (*Cyprinus carpio* L.) yang dipelihara dalam keramba. *Biodiversitas*. **9** (1): 44-47.
- Triarso, I. 2012. Petensi dan peluang pengembangan usaha perikanan tangkap di Pantura Jawa Tengah. *Jurnal Saintek Perikanan*. **8** (1): 65-73.

- Wahjuningrum, D., S. H. Sholeh dan S. Nuryati. 2006. Pencegahan infeksi virus *white spot syndrome virus* (WSSV) pada udang windu *Penaeus monodon* dengan cairan ekstrak pohon mangrove (CEPM) *Avicennia sp.* dan *Sonneratia sp.* *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **5** (1): 65-75.
- Winarti, D. Kusriani dan E. Fachriyah. 2009. Isolasi, identifikasi dan uji aktivitas antibakteri minyak atsiri akar sidaguri (*Sida rhombifolia* Linn). *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. **12** (2):52-56.



## LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan



Rotary evaporator



Toples kaca



Kulkas



Blender



Timbangan digital



Autoklaf

Lampiran 1. (Lanjutan)



Destruktor



Inkubator



Laminary Air Flow (LAF)



Timbangan analitik



Vortex



Hot plate

Lampiran 1. (Lanjutan)



Colony counter



Mikroskop



Jangka Sorong



Rak Tabung Reaksi



Mikropipet 100µL



Mikropipet 100-1000 µL

Lampiran 1. (Lanjutan)



Erlenmeyer



Corong



Tabung Reaksi



Gelas Ukur



Beaker glass



Sprayer

Lampiran 1. (Lanjutan)



Botol Film



(Jerigen)



Pipet Volume



Bola Hisap



Jarum Ose

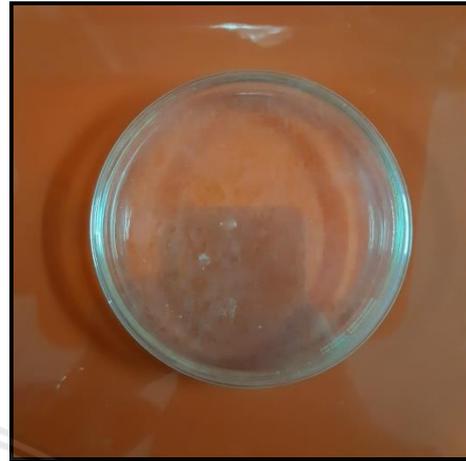


Sendok Bahan

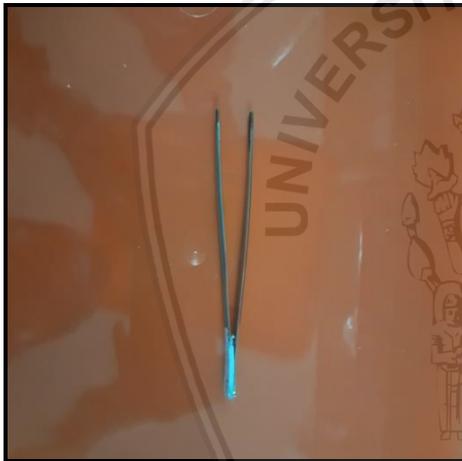
Lampiran 1.. (Lanjutan)



Bunsen



Cawan petri



Pinset



Triangel



Nampan

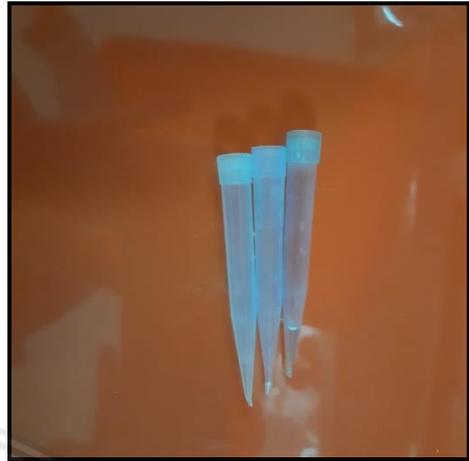


Jerigen

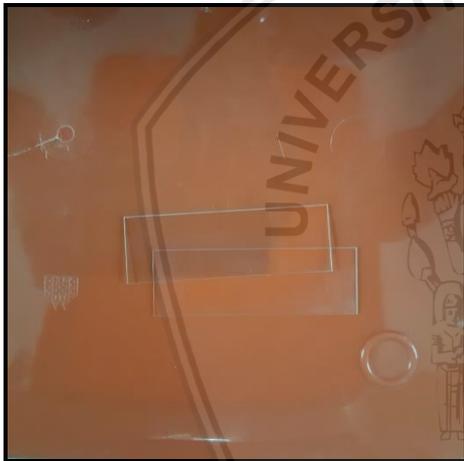
Lampiran 1. (Lanjutan)



*Yellow Tip*



*Blue Tip*



*Pipet tetes*



*Object glass*



*(Alumunium Foil)*



*(Plastik Wrap)*

Lampiran 1. (Lanjutan)



Ethanol 70 %



Alkohol 70%



DMSO 100%



Spiritus



Aquades



Kristal Violet

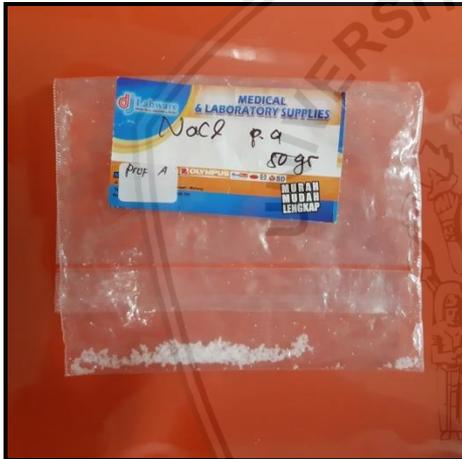
Lampiran 1. (Lanjutan)



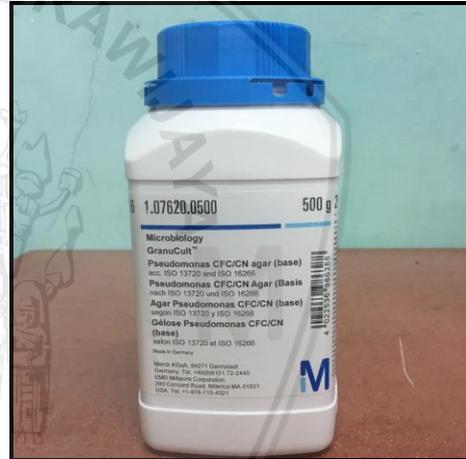
Safranin



Iodine



NaCl



PSA (Pseudomonas Selective Agar)



TSB (Tryptic Soy Borth)



Aluminium foil



Lampiran 1. (Lanjutan)



Plastik wrap



Ekstrak daun *P. major*



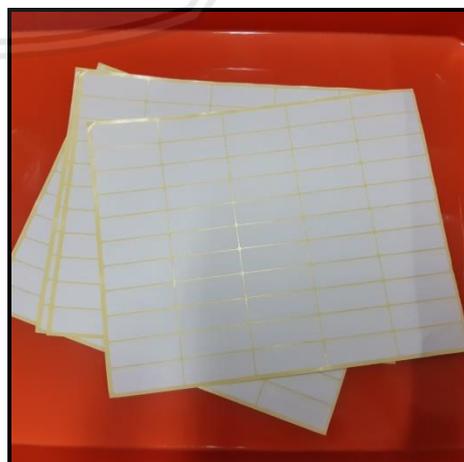
Masker



Sarung Tangan



Kapas



Plastik

Lampiran 2. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Sendok (*P. major*)



Daun sendok (*P. major*)  
dipetik



Dikeringkan dibawah  
sinar matahari selama 7  
hari



Serbuk daun *P. major*  
ditimbang 200 gram



Daun *P. major* kering  
diblender sampai halus



Serbuk dimasukkan ke  
dalam toples kaca



Ethanol 70%  
ditambahkan sebanyak  
2 L



Lampiran 2. (Lanjutan)



Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring



Toples ditutup aluminium foil dan plastik wrap. Dimaserasi selama 5 hari



Larutan dimasukkan ke dalam rotary evaporator



Evaporasi dilakukan selama  $\pm$  5jam



Diperoleh ekstrak daun *P. major*

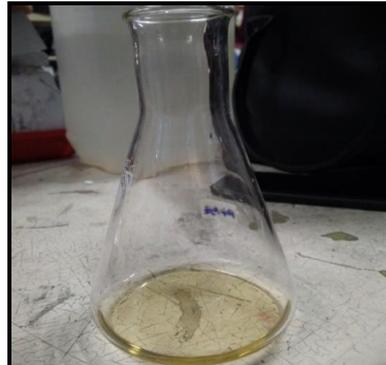


Hasil evaporasi diambil dan dimasukkan dalam botol film

Lampiran 3. Pembuatan Media Agar Miring



PSA ditimbang sebanyak 0,44 gram



Dimasukkan erlenmeyer dan ditambahkan aquades 9 ml



Dimasukkan ke dalam tabung reaksi



Dipanaskan menggunakan *hotplate*

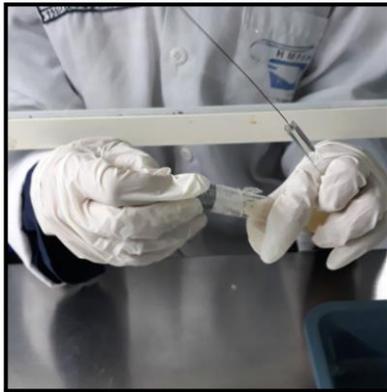


Dilakukan sterilisasi menggunakan autoclave

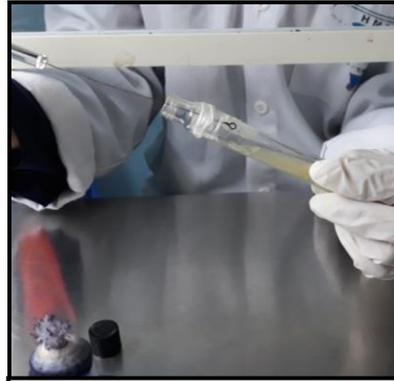


PSA dimiringkan dengan kemiringan 30°, ditunggu sampai padat

Lampiran 4. Peremajaan Bakteri *P. fluorescens*



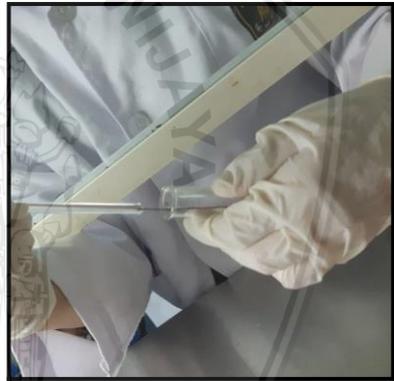
Isolat bakteri *P. fluorescens* disiapkan



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 5. Pembuatan Media Cair (*Tryptic Soy Borth*)



Media TSB ditimbang



Media dilarutkan dengan aquades dan dihomogenkan



Dilakukan sterilisasi

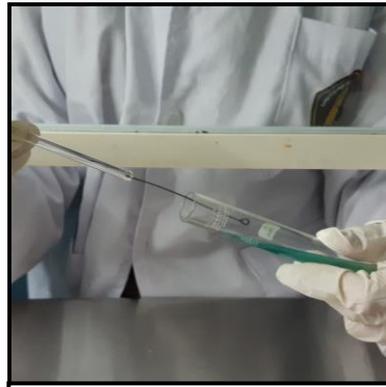


Media dimasukkan ke dalam tabung reaksi

Lampiran 6. Kultur Bakteri *P. fluorescens* di Media Cair



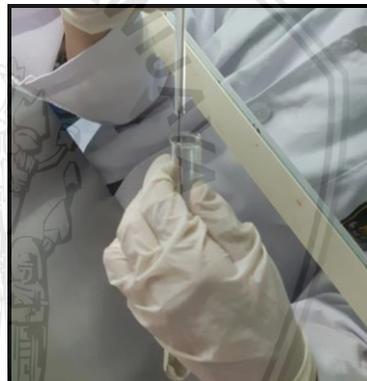
Disiapkan bakteri *P. fluorescens* yang telah diremajakan



Diambil satu ose bakteri *P. fluorescens*



TSB divortex sampai homogen



Dimasukkan ke dalam TSB



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

Lampiran 7. Pembuatan Natrium Fisiologis



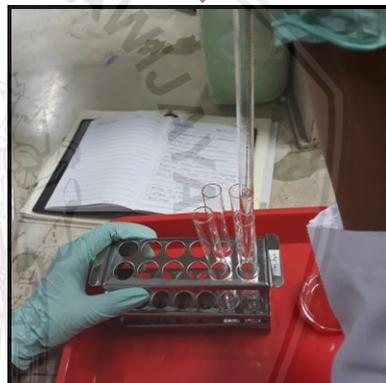
NaCl sebanyak 0,27 gram



Aquades 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 autoclave



Sterilisasi dilakukan menggunakan autoclave

Lampiran 8. Pengenceran Bakteri *P. fluorescens*



Bakteri pada media cair disiapkan



Suspensi bakteri diambil sebanyak 1 ml



Ditutupi kapas dan divortex



Dimasukkan dalam NaFis sebagai pengenceran pertama ( $10^9$  CFU/ mL)



Dilakukan pengenceran bertingkat sampai  $10^7$  CFU/ mL



Diperoleh bakteri kepadatan  $10^7$  CFU/ mL

Lampiran 9. Pembuatan Dosis Ekstrak Daun Sendok (*P. major*)



Ekstrak daun *P. major*  
ditimbang sebanyak  
25 mg untuk larutan stok



DMSO 100% ditambahkan  
sebanyak 0,5 ml



Aquadest ditambahkan  
sebanyak 4,5 ml



Larutan divortex untuk  
melarutkan ekstrak



Larutan stok ekstrak  
divortex



Larutan stok ekstrak *P.*  
*major* diambil sesuai  
dosis yang dibutuhkan

Lampiran 9. (Lanjutan)



DMSO 10% ditambahkan untuk mendapatkan dosis yang diinginkan



Larutan ekstrak dimasukkan ke dalam masing-masing botol film



Larutan dosis ekstrak divortex

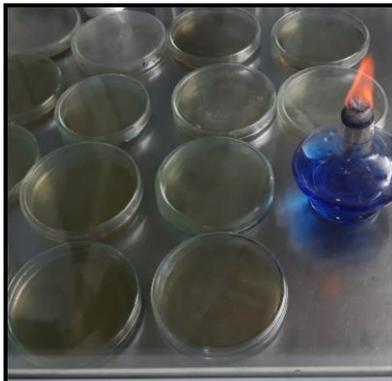


Kertas cakram direndam dalam masing-masing larutan dosis

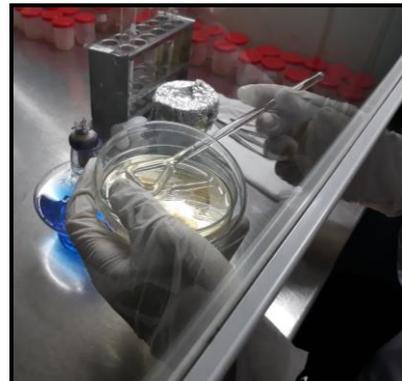


Kertas cakram direndam selama 15 menit

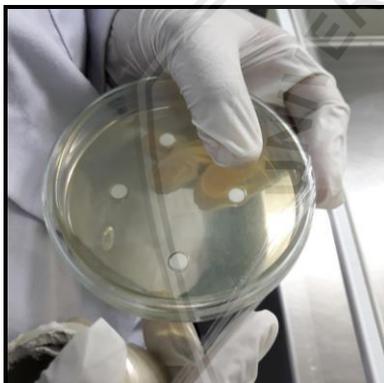
Lampiran 10. Uji Cakram



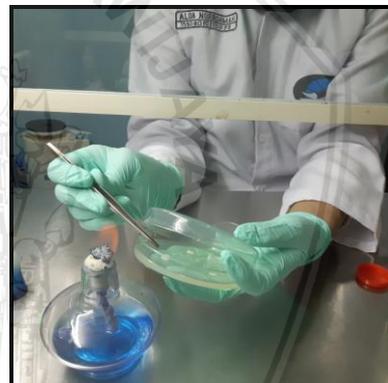
Disiapkan media PSA pada cawan petri



Penanaman bakteri *P. fluorescens* pada cawan petri



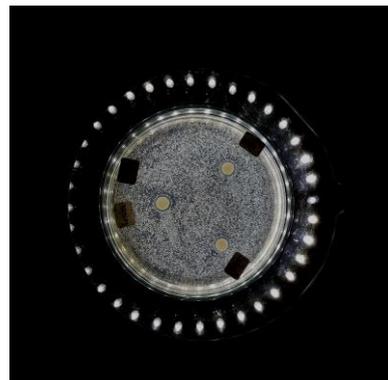
Penanaman bakteri *P. fluorescens* pada cawan petri



Kertas cakram dimasukkan pada permukaan media



Bakteri di inkubasi selama 24 jam



Hasil inkubasi 24 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 BBPAP JEPARA  
 Alamat surat: PO Box 1 Jepara, Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418  
 Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724  
[www.bbpbapjepara.djpb.kkp.go.id](http://www.bbpbapjepara.djpb.kkp.go.id) ; Email: bbpbapjr@gmail.com

HASIL UJI BOKIMIA

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 <sub>2</sub> S	—
Indol	—
Citrate	+
OF medium	Oksidatif
VP	—
MR	—
TSIA	A/A
Urea	—
Glukosa	+
Sukrosa	—
37 <sup>0</sup> C	+
Pigment flourecent	+

Lab. Mikrobiologi BBPAP Jepara

Penyelia



Sri Murti Astuti, SP.



Lampiran 12. Hasil Uji Fitokimia Daun Sendok (*Plantago major*)



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

65313

Nomor : 074 / 35D / 102.7 / 2019  
Sifat : Biasa  
Perihal : Surat Keterangan Analisa Kualitatif

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

1. Identitas Pemohon  
Nama : Silvia Devi Enggawati  
NIM : 155080500111046  
Fakultas : Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya  
Alamat Instansi : Malang

2. Identitas Sampel  
Nama daerah sampel : Sendok  
Nama latin : *Plantago major*  
Bagian Sampel : Daun  
Bentuk sampel : Ekstrak  
Pelarut : Etanol 70%  
Tanggal penerimaan : 09 April 2019  
Tanggal pemeriksaan : 11 April 2019

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

4. Lampiran

Nama Sampel	Flavonoid	Alkaloid		
		Meyer	Dragendrof	Bouchardat
Daun Sendok ( <i>Plantago major</i> )				
Nama Sampel	Tanin	Saponin	Polifenol	
Daun Sendok ( <i>Plantago major</i> )				

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

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 15 April 2019  
Materi Medica Batu  
  
Dr. Husin RM, Drs., Apt., MKes.  
NIP.19611102 199103 1 003

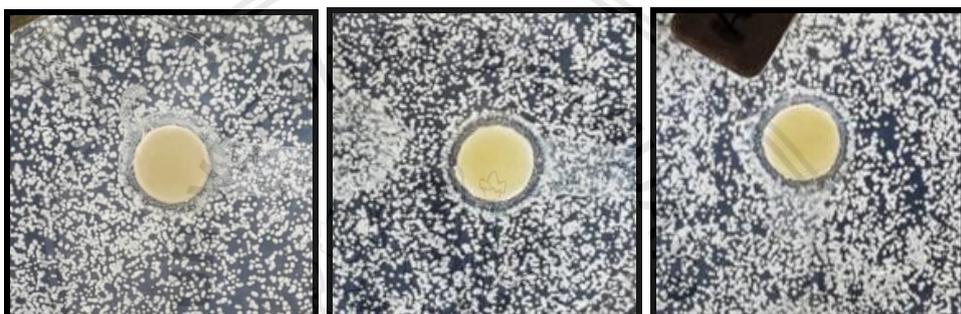


Lampiran 13. Hasil Uji Cakram Ekstrak Daun Sendok (*P. major*) terhadap bakteri *P. fluorescens*

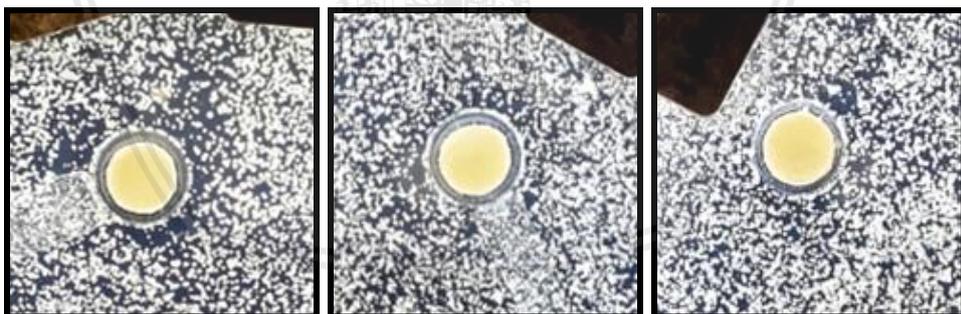
1. Perlakuan A (400ppm)



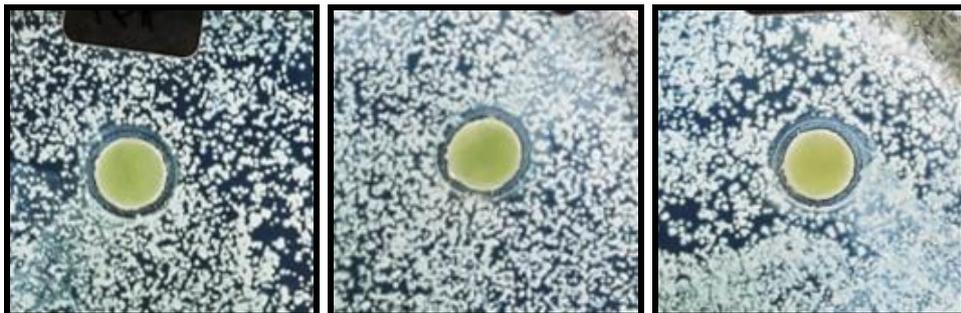
2. Perlakuan B (800ppm)



3. Perlakuan C (1200ppm)

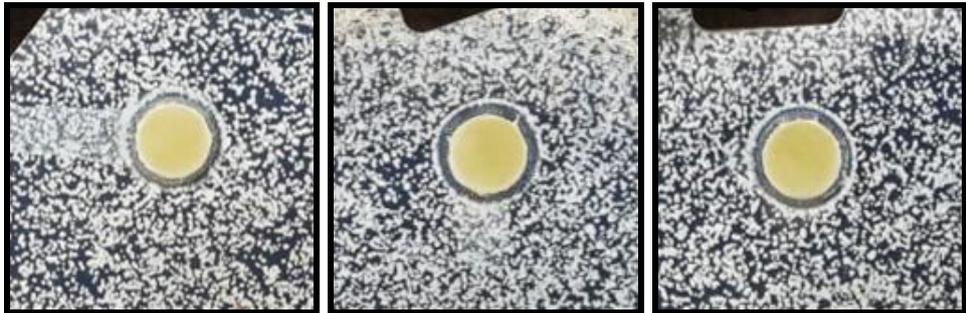


4. Perlakuan D (1600ppm)

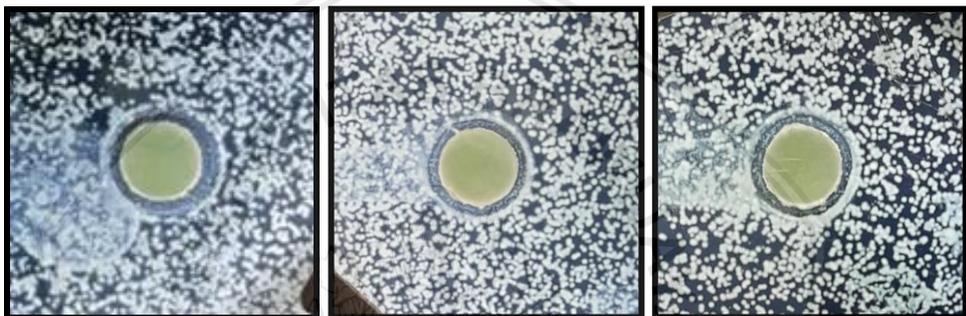


Lampiran 13. (Lanjutan)

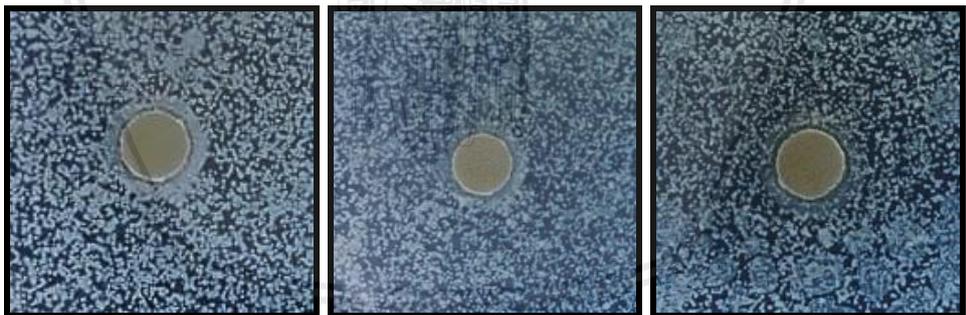
5. Perlakuan E (2000ppm)



6. Kontrol positif



7. Kontrol negatif



Lampiran 14. Perhitungan Ekstrak Dosis Uji

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

a. Dosis 5000 ppm

Pembuatan dosis 5000 ppm merupakan dosis stok ekstrak kasar daun sendok tertinggi yang digunakan dalam pembuatan dosis 400 – 2000 ppm.

Pembuatan stok ekstrak sebesar 5000 ppm dengan rumus berikut:

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

b. Dosis 400 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1,5 \text{ ml} \times 400 &= V_2 \times 5000 \\ V_2 &= 0,12 \text{ ml} \\ \text{DMSO 10 \%} &= 1,5 \text{ ml} - 0,06 \text{ ml} = 1,38 \text{ ml} \end{aligned}$$

c. Dosis 800 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1,5 \text{ ml} \times 800 &= V_2 \times 5000 \\ V_2 &= 0,24 \text{ ml} \\ \text{DMSO 10 \%} &= 1,5 \text{ ml} - 0,12 \text{ ml} = 1,26 \text{ ml} \end{aligned}$$

d. Dosis 1200 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1,5 \text{ ml} \times 1200 &= V_2 \times 5000 \\ V_2 &= 0,36 \text{ ml} \\ \text{DMSO 10 \%} &= 1,5 \text{ ml} - 0,18 \text{ ml} = 1,14 \text{ ml} \end{aligned}$$

e. Dosis 1600 ppm

$$\begin{aligned} V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\ 1,5 \text{ ml} \times 1600 &= V_2 \times 5000 \\ V_2 &= 0,48 \text{ ml} \\ \text{DMSO 10 \%} &= 1,5 \text{ ml} - 0,24 \text{ ml} = 1,02 \text{ ml} \end{aligned}$$

Lampiran 14. (Lanjutan)

f. Dosis 2000 ppm

$$\begin{aligned}V_1 \times N_1 &= V_2 \times N_2 \\1,5 \text{ ml} \times 2000 &= V_2 \times 5000 \\V_2 &= 0,60 \text{ ml} \\DMSO 10 \% &= 1,5 \text{ ml} - 0,30 \text{ ml} = 0,90 \text{ ml}\end{aligned}$$



Lampiran 15. Analisis Data Sensitivitas Ekstrak Daun Sendok (*P. major*) terhadap bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*

• Data Rata-Rata Diameter Hambatan (mm) Bakteri

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata+SD
	1	2	3		
A	8,04	7,54	7,26	22,84	7,61+0,40
B	7,41	7,61	7,89	22,91	7,64+0,24
C	8,26	8,02	7,92	24,2	8,07+0,17
D	8,12	8,3	7,94	24,36	8,12+0,18
E	8,15	8,18	8,32	24,65	8,22+0,09
Total				118,96	

Perhitungan :

$$\begin{aligned}
 1. \text{ Faktor Korelasi (FK)} &= \frac{G^2}{N} \\
 &= \frac{188^2}{15} \\
 &= 943,43 \\
 2. \text{ JK Total} &= \sum ij^2 - FK \\
 &= (A_1^2 + A_2^2 + A_3^2 + \dots + E_3^2) - FK \\
 &= (8,04^2 + 7,54^2 + 7,26^2 + \dots + 8,32^2) - 943,43 \\
 &= 1,541 \\
 3. \text{ JK Perlakuan} &= \frac{(\sum A)^2 + (\sum B)^2 + (\sum C)^2 + (\sum D)^2 + (\sum E)^2}{r} - FK \\
 &= \frac{(22,84)^2 + (22,91)^2 + (24,2)^2 + (24,36)^2 + (24,65)^2}{3} - 943,43 \\
 &= 0,970 \\
 4. \text{ JK Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\
 &= 1,541 - 0,970 \\
 &= 0,571 \\
 5. \text{ db Total} &= (n \times r) - 1 \\
 &= (5 \times 3) - 1 \\
 &= 14 \\
 6. \text{ db Perlakuan} &= n - 1 \\
 &= 5 - 1 \\
 &= 4
 \end{aligned}$$

Lampiran 15. (Lanjutan)

$$\begin{aligned}
 7. \text{ db Galat} &= \text{db Total} - \text{db Perlakuan} \\
 &= 14 - 4 \\
 &= 10
 \end{aligned}$$

- Tabel Analisa Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F <sub>hitung</sub>	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	0,970	0,242	4,247*	3,48	5,99
Acak	10	0,57087	0,057087			
Total	14					

Keterangan : (\*) berbeda Nyata

Karena diperoleh F<sub>hitung</sub> lebih besar dari F<sub>tabel</sub> 5% dan lebih kecil dari F<sub>tabel</sub> 1% maka hasil tersebut dinyatakan berbeda nyata. Perhitungan dilanjutkan dengan uji BNT.

- Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

$$\begin{aligned}
 \text{SED} &= \sqrt{\frac{2 \times \text{KT Acak}}{\pi (\text{Ulangan})}} \\
 &= \sqrt{\frac{2 \times 0,057087}{3}} \\
 &= 0,195
 \end{aligned}$$

$$\text{BNT 5\%} = T_{\text{tabel 5\%}} (\text{db}_{\text{acak}}) \times \text{SED} = 0,435$$

$$\text{BNT 1\%} = T_{\text{tabel 1\%}} (\text{db}_{\text{acak}}) \times \text{SED} = 0,618$$

- Tabel Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		7,61	7,64	8,07	8,12	8,22	
A	7,61	—					a
B	7,64	0,02 <sup>ns</sup>	—				a
C	8,07	0,45*	0,43 <sup>ns</sup>	—			b
D	8,12	0,51*	0,48*	0,05 <sup>ns</sup>	—		b
E	8,22	0,60*	0,58*	0,15 <sup>ns</sup>	0,10 <sup>ns</sup>	—	b

Keterangan :

ns : tidak berbeda nyata

\* : berbeda nyata

\*\* : berbeda sangat nyata

Lampiran 15. (Lanjutan)

Perlakuan terbaik dari uji BNT adalah E-D-C-B/A. Sehingga dilakukan uji polynomial orthogonal.

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	22,84	-2	2	-1	1
B	22,91	-1	-1	2	-4
C	24,2	0	-2	0	6
D	24,36	1	-1	-2	-4
E	24,65	2	2	1	1
<b>Q= Σci*Ti</b>		5,07	-0,69	-1,09	3,61
<b>Hasil Kuadrat</b>		10	14	10	70
<b>Kr= (Σci^2)*r</b>		30	42	30	210
<b>JK=Q^2/Kr</b>		0,85683	0,011336	0,039603	0,062058
<b>JK REGRESI</b>		0,868			

• Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F <sub>Hitung</sub>	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	0,868			3,48	5,99
Linier	1	0,85683	0,85683	15,00928**	**	
Kuadratik	1	0,011336	0,011336	0,1986 <sup>ns</sup>	ns	
Kubik	1	0,039603	0,039603	0,6937 <sup>ns</sup>	ns	
Kuartik	1	0,062058	0,062058	1,0871 <sup>ns</sup>	ns	
Acak	10	0,57087	0,057087	1 <sup>ns</sup>	ns	
Total	14					

Keterangan :

ns : tidak berbeda nyata

\*\* : berbeda sangat nyata

$$\begin{aligned}
 1. \text{ KT Linier} &= \frac{\text{JK Linier}}{\text{db linier}} \\
 &= \frac{0,85683}{1} \\
 &= 0,85683
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \text{ KT Kuadratik} &= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{db Kuadratik}} \\
 &= \frac{0,011336}{1} \\
 &= 0,011336
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 3. \text{ KT Kubik} &= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{db Kubik}} \\
 &= \frac{0,039603}{1} \\
 &= 0,039603
 \end{aligned}$$

Lampiran 15. (Lanjutan)

$$\begin{aligned}
 4. F_{hitung} \text{ Linier} &= \frac{KT \text{ Linier}}{KT \text{ Acak}} \\
 &= \frac{0,85683}{0,057087} \\
 &= 15,0093 \\
 5. F_{hitung} \text{ Kuadratik} &= \frac{KT \text{ Kuadratik}}{KT \text{ Acak}} \\
 &= \frac{0,011336}{0,057087} \\
 &= 0,1986 \\
 6. F_{hitung} \text{ Kubik} &= \frac{KT \text{ Kubik}}{KT \text{ Acak}} \\
 &= \frac{0,039603}{0,057087} \\
 &= 0,6937
 \end{aligned}$$

Hasil sidik ragam polinomial orthogonal diatas menunjukkan bahwa nilai  $F_{hitung}$  linier berbeda sangat nyata terhadap nilai  $F_{tabel}$  5% dan  $F_{tabel}$  1% yaitu 15,0093.

- Tabel persamaan linier  $y=b_0+b_1x$

x	y	XY	X <sup>2</sup>
400	8,04	3216	160000
400	7,54	3016	160000
400	7,26	2904	160000
800	7,41	5928	640000
800	7,61	6088	640000
800	7,89	6312	640000
1200	8,26	9912	1440000
1200	8,02	9624	1440000
1200	7,92	9504	1440000
1600	8,12	12992	2560000
1600	8,3	13280	2560000
1600	7,94	12704	2560000
2000	8,15	16300	4000000
2000	8,18	16360	4000000
2000	8,32	16640	4000000
18000	118,96	144780	26400000
1200	7,930667		

Lampiran 15. (Lanjutan)

$$\begin{aligned}
 b_1 &= \frac{(\sum xy) - \frac{(\sum x \cdot \sum y)}{n}}{(\sum x^2) - \frac{(\sum x)^2}{n}} \\
 &= \frac{(144780) - \frac{(18000 \times 118,96)}{15}}{(26400000) - \frac{(18000)^2}{15}} \\
 &= \frac{144780 - 142752}{26400000 - 21600000} \\
 &= \frac{2028}{4800000} \\
 &= 0,000423
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 b_0 &= \frac{(\sum y)}{n} - (b_1 \cdot \frac{(\sum x)}{n}) \\
 &= 7,930667 - (0,000423 \times 1200) \\
 &= 7,866667 - 0,507 \\
 &= 7,423667
 \end{aligned}$$

Pers. Linier :  $y = b_0 + b_1 x$

$$= 7,423667 + 0,000423x$$

X(400) =  $7,423667 + 0,000423 (400)$

$$= 7,423667 + 0,169$$

$$= 7,592667$$

X(800) =  $7,423667 + 0,000423 (800)$

$$= 7,423667 + 0,338$$

$$= 7,761667$$

X(1200) =  $7,423667 + 0,000423 (1200)$

$$= 7,423667 + 0,507$$

$$= 7,930667$$

X(1600) =  $7,423667 + 0,000423 (1600)$

$$= 7,423667 + 0,676$$

$$= 8,099667$$

Lampiran 15. (Lanjutan)

$$\begin{aligned}
 X (2000) &= 7,423667 + 0,000423 (2000) \\
 &= 7,423667 + 0,845 \\
 &= 8,268667
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 &= \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}} \\
 &= \frac{0,85683}{0,85683 + 0,57087} \\
 &= 0,603298
 \end{aligned}$$

Berdasarkan perhitungan  $b_0$  dan  $b_1$ , diperoleh persamaan linier sebagai berikut:  $y = 7,423667 + 0,000423x$

- Grafik Hubungan Daya Hambat antar Dosis Perlakuan Ekstrak Daun Sendok (*P. major*) terhadap Bakteri *P. fluorescens*

