

**PENGARUH EKSTRAK KASAR DAUN PURING (*Codiaeum variegatum*)
TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh :

**NADHIEN LEILA CHANDRIKA
NIM. 165080501111020**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2020**



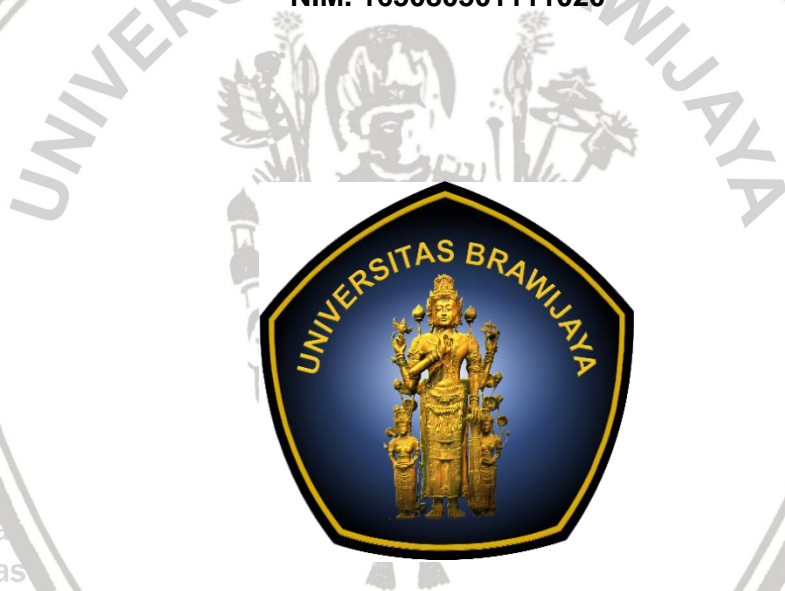
**PENGARUH EKSTRAK KASAR DAUN PURING (*Codiaeum variegatum*)
TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

**Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Meraih Gelar Sarjana Perikanan
Di Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya**

Oleh :

**NADHIEN LEILA CHANDRIKA
NIM. 165080501111020**



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2020**

SKRIPSI

PENGARUH EKSTRAK KASAR DAUN PURING (*Codiaeum variegatum*)
TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO

Oleh :

NADHIEN LEILA CHANDRIKA
NIM. 165080501111020

Telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 3 Juli 2020
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

Menyetujui,
Dosen Pembimbing II

(Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.)
NIP. 19550213 198403 1 001

Tanggal:

(Ir. Heny Suprastyani, MS.)
NIP. 19620904 198701 2 001

Tanggal:

Mengetahui,
Ketua Jurusan, Manajemen Sumberdaya Perairan

(Dr. Ir. Muhamad Firdaus, M.P.)
NIP. 19680919 200501 1001

Tanggal: 7/21/2020



Identitas Penguji

Judul : Pengaruh Ekstrak Kasar Daun Puring (*Codiaeum variegatum*) Terhadap Bakteri *Pseudomonas fluorescences* Secara In Vitro

Nama Mahasiswa : Nadhien Leila Chandrika

NIM : 165080501111020

Program Studi : Budidaya Perairan

PENGUJI PEMBIMBING :

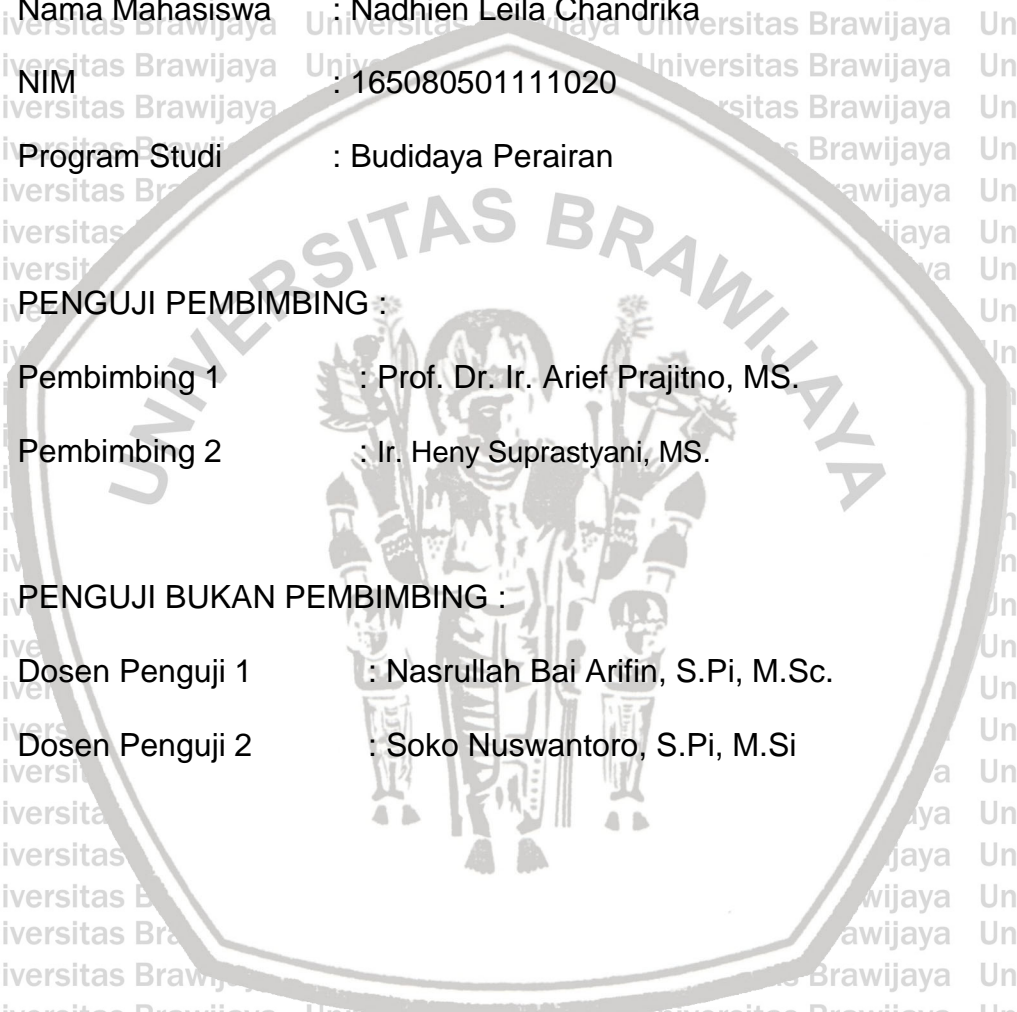
Pembimbing 1 : Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.

Pembimbing 2 : Ir. Heny Suprastyani, MS.

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING :

Dosen Penguji 1 : Nasrullah Bai Arifin, S.Pi, M.Sc.

Dosen Penguji 2 : Soko Nuswantoro, S.Pi, M.Si



UCAPAN TERIMA KASIH

Pada kesempatan ini, penulis mengucapkan puja dan puji syukur atas kehadiran Allah SWT. atas segala rahmat, hidayah dan karunianya sehingga laporan skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. tidak lupa pula penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku dosen pembimbing yang telah meluangkan waktu untuk memberikan bimbingan dan arahan.
2. Ir. Heny Suprastyani, MS. selaku dosen pembimbing ii yang telah memberikan arahan dan bimbingan.
3. Nasrullah Bai Arifin, S.Pi, M.Sc. dan Soko Nuswantoro, S.Pi, M.Si selaku dosen penguji yang telah memberikan masukan dan arahan
4. Kedua orang tua yang selalu memberikan do'a serta ridhonya yang menjadi motivasi saya dalam penyusunan laporan ini.

Malang, April 2020

Penulis

RINGKASAN

Nadhien Leila Chandrika. Pengaruh Ekstrak Kasar Daun Puring (*Codiaeum variegatum*) Terhadap Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara In Vitro (Dibawah Bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS dan Ir. Heny Suprastyani, MS.)

Sektor perikanan merupakan salah satu sumber daya yang penting bagi kehidupan masyarakat dan memiliki potensi untuk di jadikan sebagai penggerak utama (primer mover) ekonomi nasional. Namun terdapat beberapa permasalahan yang menghambat jalannya kegiatan budidaya. permasalahan yang menghambat tersebut salah satunya yakni adanya wabah penyakit ikan.

Untuk menghindari kegagalan dalam usaha budidaya perikanan dan meluasnya serangan penyakit maka sangat diperlukan langkah-langkah penanganan dengan pencegahan dan melalui pengendalian.

Salah satu contoh serangan penyakit yang disebabkan bakteri pada ikan air tawar ialah bakteri *P. fluorescens* menyebabkan bisul pada ikan. Aktivitas bakteri *P. fluorescens* dapat menyebabkan anemia dan kematian masal. Penyakit bisul yang disebabkan oleh bakteri ini juga sering disebut *hemorrhagic septicemia*

Penanganan penyakit jenis bakteri dapat diberi antibiotik, namun penggunaan antibiotik dapat menyebabkan resistensi pada bakteri dan residunya berbahaya untuk manusia. Oleh karena itu, berbagai bahan herbal digunakan dalam pencegahan penyakit jenis bakterial.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun puring terhadap daya hambat *P. fluorescences*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya pada bulan Desember 2019 – Februari 2020.

Penelitian ini menggunakan metode eksperimen dengan 2 kontrol yaitu kontrol negatif dan positif. Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) menggunakan 5 perlakuan dengan 3 kali ulangan. Dosis ekstrak daun puring (*C. variegatum*) yang digunakan yaitu 50 ppm (A), 100 ppm (B), 150 ppm (C), 200 ppm (D) dan 250 ppm (E). Rerata zona bening pada uji cakram yang didapat untuk perlakuan A (6,68 mm), B (7,27 mm), C (8,02 mm), D (8,57 mm), E (9,37 mm). Nilai rerata zona bening tertinggi didapatkan pada perlakuan E (250 ppm) sebesar 9,37 mm. Sedangkan nilai rerata zona bening terendah didapatkan pada perlakuan A (50 ppm) sebesar 6,68 mm. Zona bening yang dihasilkan pada masing-masing perlakuan menunjukkan peningkatan secara linear dengan persamaan $y = 5,973 + 0,0134x$ dan koefisien nilai determinasi $R^2 = 0,93$. Data tersebut menunjukkan bahwa pengaruh pemberian ekstrak kasar daun puring (*C. variegatum*) terhadap bakteri *P. flourescens* memiliki respon yang meningkat seiring dengan bertambahnya dosis ekstrak kasar daun puring (*C. variegatum*). Daun puring sendiri telah dilakukan uji fitokimia untuk mengetahui kandungan yang ada pada daun puring. Hasil yang didapatkan pada daun puring setelah dilakukan uji fitokimia yaitu mengandung flavonoid, fenol, alkaloid, tannin yang mana dari semua kandungan tersebut memiliki sifat antibakteri.

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT. yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-nya sehingga penulis dapat menyajikan laporan skripsi yang berjudul Pengaruh Ekstrak Kasar Daun Puring (*Codiaeum variegatum*) Terhadap Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara In Vitro dengan baik.

Laporan skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya dibawah bimbingan Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS. dan Ibu Ir. Heny Suprastyani, MS. Penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi kesempurnaan laporan skripsi ini dan semoga bermanfaat bagi pembaca.

Malang, April 2020

Penulis



DAFTAR ISI

HALAMAN JUDUL	I
LEMBAR PENGESAHAN	III
UCAPAN TERIMA KASIH	IV
RINGKASAN	VI
KATA PENGANTAR	VI
DAFTAR ISI	VIII
DAFTAR GAMBAR	X
DAFTAR TABEL	XI
DAFTAR LAMPIRAN	XII
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Hipotesis.....	4
1.5 Kegunaan.....	5
1.6 Tempat dan Waktu.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Biologi Daun Puring (<i>C. variegatum</i>).....	6
2.1.1 Klasifikasi Dan Morfologi.....	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran.....	7
2.1.3 Kandungan Senyawa Aktif.....	8
2.2 Biologi Bakteri <i>P. fluorescens</i>	9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri <i>P. fluorescens</i>	9
2.2.2 Habitat dan Penyebaran Bakteri <i>P. fluorescens</i>	10
2.2.3 Infeksi Bakteri <i>P. fluorescens</i>	10
2.2.4 Pertumbuhan Bakteri.....	10
2.3 Aktivitas Antimikroba.....	12
2.4 Uji Cakram.....	13
3. METODE PENELITIAN	15
3.1 Materi Penelitian.....	15
3.1.1 Alat-Alat Penelitian.....	15
3.1.2 Bahan-Bahan Penelitian.....	16
3.2 Metode Penelitian.....	18
3.3 Rancangan Penelitian.....	18
3.4 Prosedur Penelitian.....	20
3.4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Puring.....	20
3.4.2 Sterilisasi alat dan Bahan.....	21



3.4.3 Pembuatan Media Agar Miring	22
3.4.4 Pembuatan Media TSB	23
3.4.5 Pembuatan Media PSA	23
3.4.6 Pembuatan NaFis	24
3.4.7 Peremajaan Bakteri <i>P. fluorescens</i>	24
3.4.8 Kultur Bakteri <i>P. fluorescens</i>	25
3.4.9 Pembuatan Dosis	25
3.4.10 Pewarnaan Gram	26
3.5 Pelaksanaan Penelitian	26
3.5.1 Uji Cakram	26
3.5.2 Parameter Uji	27
3.5.3 Analisis Data	27
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	29
4.1 Identifikasi Bakteri <i>P. fluorescens</i>	29
4.2 Uji kertas Cakram	30
4.3 Parameter Penunjang	39
5. KESIMPULAN DAN SARAN	40
5.1 Kesimpulan	40
5.2 Saran	40
DAFTAR PUSTAKA	41
LAMPIRAN	45



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Tanaman Puring	6
2. Morfologi <i>P. fluorescens</i>	9
3. Denah Rancangan Percobaan.....	19
4. Hasil pewarnaan gram bakteri <i>P. fluorescens</i>	29
5. Hasil Uji Cakram.....	32
6. Hubungan antara dosis dengan zona hambat.....	36



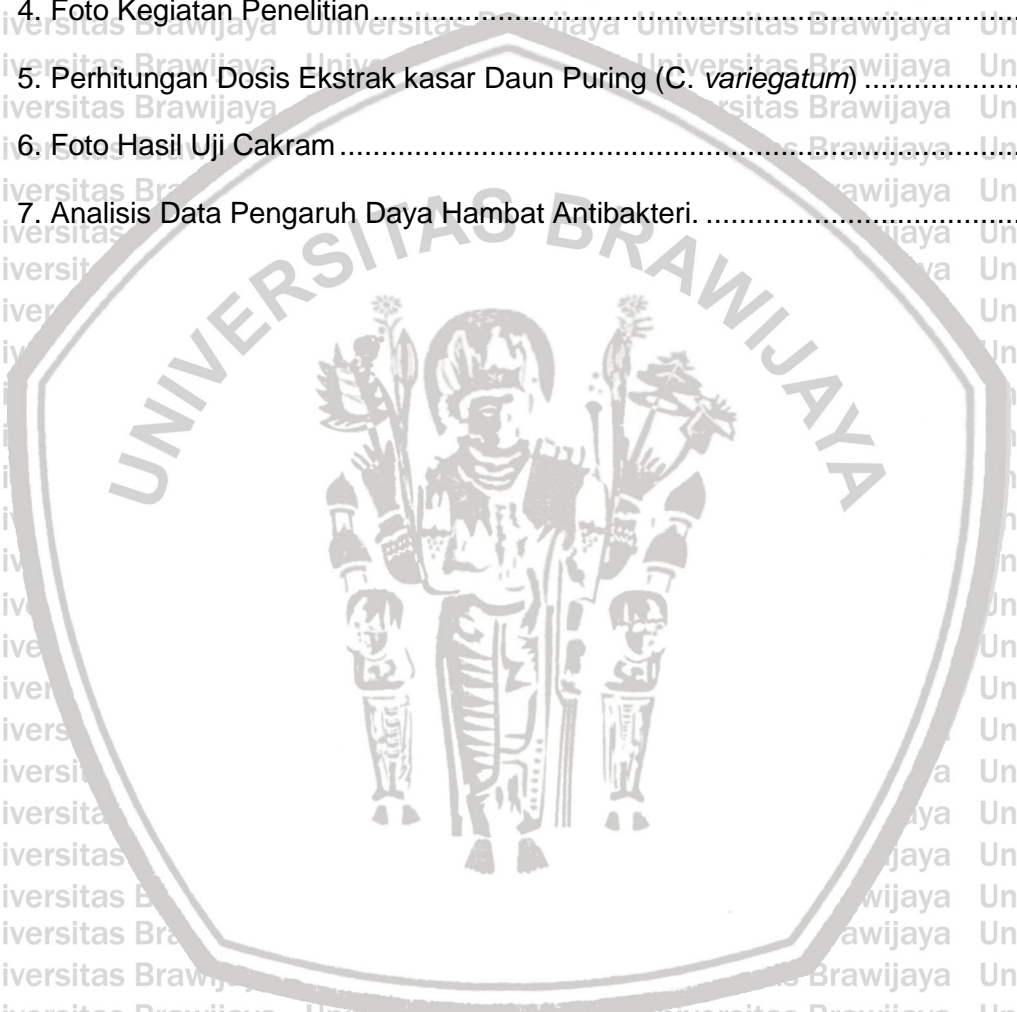
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat-alat Penelitian.....	15
2. Bahan-Bahan Penelitian.....	16
3. Klasifikasi dan respon hambatan pertumbuhan bakteri.....	33
4. Data Hasil Pengukuran Rerata Zona Hambat (mm).....	33
5. Hasil Sidik Ragam Zona Hambat.....	34
6 Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Uji Biokimia	45
2. Hasil Uji Fitokimia	46
3. Alat dan Bahan Penelitian	47
4. Foto Kegiatan Penelitian	51
5. Perhitungan Dosis Ekstrak kasar Daun Puring (<i>C. variegatum</i>)	58
6. Foto Hasil Uji Cakram	60
7. Analisis Data Pengaruh Daya Hambat Antibakteri	61



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Menurut Pursetyo, Tjahjaningsih dan Pramono (2013), Indonesia merupakan negara kepulauan yang mempunyai kekayaan alam yang luar biasa banyaknya.

Luas laut Indonesia dua pertiga dari daratannya. Total luas laut Indonesia adalah 3,544 juta km². Indonesia memiliki garis pantai terpanjang kedua didunia setelah Kanada dengan panjang 104 ribu km. Selain garis pantai yang panjang, Indonesia memiliki jumlah pulau terbanyak yaitu 17.504 pulau yang tersebar dari sabang sampai merauke. maka, dengan gambaran sumberdaya alam yang melimpah di laut dan pesisir sudah selayaknya pembangunan Indonesia berorientasi pada maritim salah satunya adalah di sektor perikanan.

Menurut Agustiani dan Syechalad (2016), Sektor perikanan merupakan salah satu sumber daya yang penting bagi kehidupan masyarakat dan memiliki potensi untuk di jadikan sebagai penggerak utama (primer mover) ekonomi nasional. Hal ini didasari pada kenyataan bahwa yaitu : (1) Indonesia memiliki sumber daya perikanan yang baik. (2) Industri di sektor perikanan memiliki keterkaitan dengan sektorsektor lainnya. (3) Industri perikanan berbasis sumber daya Nasional atau dikenal dengan (nasional resources based industries) dan (4) Indonesia memiliki keunggulan (comperative advantage) yang tinggi di sektor perikanan sebagaimana dicerminkan dari potensi sumber daya yang ada

Menurut Hermawan, Amanah dan Fatchiya (2017), akuakultur (budidaya perikanan) merupakan salah satu subsektor yang diharapkan dalam mewujudkan misi kesejahteraan masyarakat kelautan dan perikanan. Akuakultur di tingkat bawah

berkontribusi terhadap kesejahteraan pembudidaya ikan dalam menjamin ketersediaan pangan rumah tangga, gizi dan kesehatan, penyedia lapangan pekerjaan dan juga pendapatan di pedesaan. Akuakultur bahkan pada skala tradisional berkontribusi terhadap pengurangan kemiskinan dan peningkatan pendapatan di beberapa wilayah dunia, antara lain di China, Indonesia dan Vietnam.

Terdapat beberapa permasalahan yang menghambat jalannya kegiatan budidaya. Permasalahan yang menghambat tersebut salah satunya yakni adanya wabah penyakit ikan (Mulyani, Bachtiar dan Kurnia, 2013).

Menurut Kurniawan (2012), penyakit adalah salah satu faktor penyebab kegagalan dan menghambat perkembangan subsektor budidaya. Penyakit pada komoditas perikanan timbul sebagai akibat dari adanya interaksi inang atau organisme yang dibudidaya serta kondisi fisika dan kimia yang tidak seimbang di dalam lingkungan perairan. Ketidakseimbangan faktor-faktor fisika dan kimia perairan dapat mengakibatkan terjadinya penyakit non infeksi, sedangkan ketidakseimbangan faktor biologi khususnya melimpahnya organisme patogen dapat menyebabkan penyakit infeksi yang bisa terjadi transmisi penularan antara satu organisme inang dengan lainnya.

Menurut Gusrina (2008), penyakit dapat diartikan sebagai organisme yang hidup dan berkembang di dalam tubuh ikan sehingga organ tubuh ikan terganggu. Jika salah satu atau sebagian organ tubuh terganggu, akan terganggu pula seluruh jaringan tubuh ikan. Pada prinsipnya penyakit yang menyerang ikan tidak datang begitu saja, melainkan melalui proses hubungan antara tiga faktor, yaitu kondisi lingkungan (kondisi di dalam air), kondisi inang (ikan) dan kondisi jasad pathogen (agen penyakit).

Menurut Sianturi, Prajitno dan Sanoesi (2019), salah satu contoh serangan penyakit yang disebabkan bakteri pada ikan air tawar ialah bakteri *P. fluorescens* menyebabkan bisul pada ikan. Gejala yang dialami ialah mempunyai bisul pada kulit, sirip, rongga perut dan organ-organ dalam. Aktivitas bakteri *P. fluorescens* dapat menyebabkan anemia dan kematian masal. Penyakit bisul yang disebabkan oleh bakteri ini juga sering disebut *hemorrhagic septicemia*.

Menurut Wirawan, Suryani dan Arya (2017), untuk menghindari kegagalan dalam usaha budidaya perikanan dan meluasnya serangan penyakit maka sangat diperlukan langkah-langkah penanganan dengan pencegahan dan melalui pengendalian. Penanganan dan pengendalian penyakit ikan akan berhasil dengan baik apabila pembudidaya memiliki pengetahuan yang cukup untuk dapat mengenali tanda-tanda ikan yang terserang penyakit atau mendiagnosa dan mengidentifikasi suatu penyakit. Sehingga dapat diambil suatu tindakan pengendalian dan pengobatan yang tepat.

Menurut Fauzy, Tarsim dan Setyawan (2014), penanganan penyakit jenis bakteri dapat diberi antibiotik, namun penggunaan antibiotik dapat menyebabkan resistensi pada bakteri dan residunya berbahaya untuk manusia. Oleh karena itu, berbagai bahan herbal digunakan dalam pencegahan penyakit jenis bakterial.

Menurut Sumadewi dan Puspaningrum (2018), daun puring sangat dikenal memiliki corak berwarna-warni. Dibalik keindahan corak daun puring, ternyata menyimpan berbagai manfaat kesehatan. Masyarakat sudah mengenal dan menggunakan tanaman ini sebagai obat herbal guna penanggulangan masalah kesehatan dan sebagai penyembuh luka, jauh sebelum pelayanan kesehatan formal dan obat-obatan modern menyentuh masyarakat.

1.2 Rumusan Masalah

Salah satu penyebab terhambat dan gagalnya kegiatan budidaya ikan yakni adanya penyakit. Penyakit sendiri disebabkan oleh berbagai faktor yaitu kondisi lingkungan (kondisi di dalam air), kondisi inang (ikan) dan kondisi jasad pathogen (agen penyakit). Salah satu penyebab penyakit yang menyerang ikan adalah penyakit bakterial. Bakteri yang kerap menyerang perairan air tawar yakni *P. fluorescens* dan dikenal dengan penyakit bisul atau *Hemorrhagic septicemia*. Pengobatan atau penanganan yang biasa dilakukan yakni dengan menggunakan antibiotik. Namun pada penggunaan antibiotik sendiri memiliki beberapa kekurangan. Kekurangan pada penggunaan antibiotik yakni menimbulkan residu serta resistensi. Salah satu pengobatan alternatif dengan menggunakan bahan alami yaitu penggunaan ekstrak daun puring. Tanaman puring sendiri telah lama digunakan oleh masyarakat dalam pengobatan Berdasarkan uraian diatas rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

Bagaimana pengaruh ekstrak daun puring (*C. variegatum*) terhadap daya hambat *P. fluorescences* secara in vitro?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun puring (*C. variegatum*) terhadap daya hambat *P. fluorescences*.

1.4 Hipotesis

H₀ : diduga pemberian ekstrak daun puring (*C. variegatum*) dengan dosis berbeda tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.

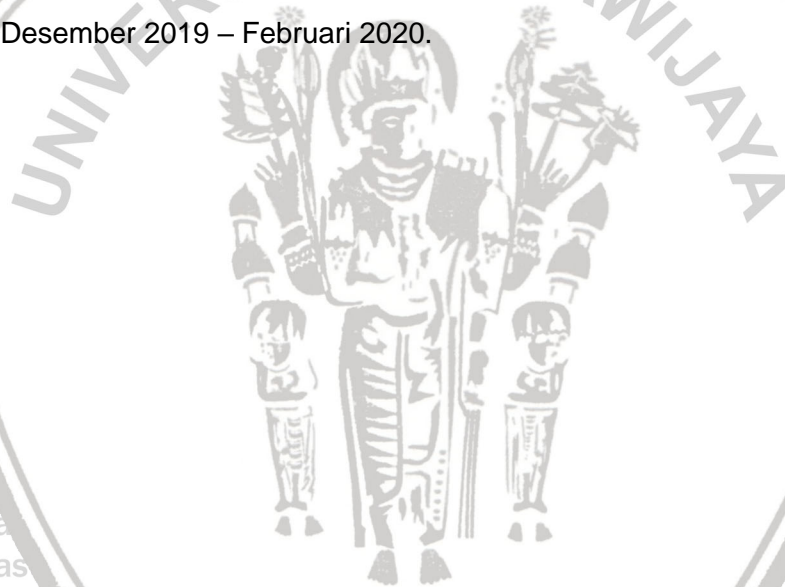
H1 : diduga pemberian ekstrak daun puring (*C. variegatum*) dengan dosis berbeda memberi pengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.

1.5 Kegunaan

Penelitian ini berguna untuk mengetahui manfaat ekstrak daun puring (*C. variegatum*) dengan dosis berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Budidaya Ikan Divisi Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya pada bulan Desember 2019 – Februari 2020.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Daun Puring (*C. variegatum*)

2.1.1 Klasifikasi Dan Morfologi

Menurut Purwanto dan Purwantoro (2007), klasifikasi tanaman daun puring adalah sebagai berikut:

Subdivisi : Angiospermae

Kelas : Dicotyledonae

Ordo : Euphorbiales

Famili : Euphorbiaceae

Genus : *Codiaeum*

Spesies : *Codiaeum variegatum*



Gambar 1. Tanaman Puring (Parlupi, Yudha dan Hermanus, 2019)

Puring merupakan tanaman berdaun hijau dengan kombinasi berbagai warna menarik. Daun puring memiliki corak warna seperti lukisan, ada yang bersemburat seperti ekstrak atau ekspresionis, ada yang bertotol-totol seperti pada puring macan atau puring polkadot, ada yang bergaris-garis seperti puring kobra. Bentuk daunnya

yang beragam memberi inspirasi orang unruk memberi nama. Batang puring adalah batang tunggal yang tidak terlalu banyak percabangannya sehingga cenderung meninggi setelah tanaman tua. Puring memiliki akar serabut. Kondisi akar sangat menentukan kesehatan tanaman, semakin banyak rambut akar, maka menandakan pertumbuhan tanaman semakin cepat. (Chandra dan Sitanggang., 2007)

Menurut Andreastuti, Purwanto dan Murti (2015), keanekaragaman puring dapat dilihat dari daunnya yang memiliki warna bermacam-macam dan bentuk yang sangat variatif. Selain dapat dimanfaatkan sebagai tanaman hias, puring juga memiliki kegunaan sebagai tanaman obat. Sejak puluhan tahun silam tanaman puring digunakan sebagai obat traditional di daerah Pasifik Selatan (kepulauan Fiji, Hawaii dan Papua Nugini) Morfologi daun puring (*C. variegatum*) disajikan pada Gambar 1

Menurut Dewi (2012), ciri khas tanaman puring adalah daunnya yang memiliki banyak warna dan bentuk. Orang dapat menemukan warna daunnya berkisar dari warna merah, oranye, kuning sampai hiau dengan semua kombinasi bercak warna. Bentuk daunnya bervariasi dari lebar dan lonjong hingga sempit dan memanjang

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Suryani (2008), puring mempunyai ribuan varietas yang tersebar di berbagai belahan dunia. Khususnya negara-negara yang bermandikan cahaya matahari, seperti di Indonesia, Sri Lanka, Malaysia, Kepulauan Fiji, Thailand, India dan Filipina, meski demikian, Kepulauan Maluku disebut-sebut sebagai habitat asal sebagian besar tanaman puring.

Menurut Toha, Diki, Utami dan Dwisatyadhani (2016), Tanaman puring dapat tumbuh sangat baik di sekitar sumur/sumber air, sehingga akar-akarnya akan

memperbaiki kualitas air dengan cara menyerap kelebihan unsur fosfor yang terkandung dalam air.

2.1.3 Kandungan Senyawa Aktif

Menurut Sumadewi dan Puspaningrum (2018), tanaman puring mengandung senyawa kimia yakni saponin dan steroid. Beberapa saponin bekerja sebagai antimikroba, Saponin sendiri memiliki kemampuan sebagai pembersih dan antiseptik yang berfungsi membunuh kuman atau mencegah pertumbuhan mikroorganisme yang biasa timbul pada luka sehingga luka tidak mengalami infeksi yang berat.

Menurut Gayatri, Kriswiyanti dan Wahyuni (2015), Senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan puring saponin, flavonoid dan polifenol

Menurut Hariati, Wahjuningrum, Yuhana, Tarman, Effendi dan Saputra (2018), senyawa fenol dan turunannya dapat merusak membran sel sehingga terjadi perubahan permeabilitas sel yang dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel. Mekanisme penghambatan tersebut terjadi karena senyawa fenol dapat berikatan dengan gugus sulfidrin dari protein.

Menurut Susanti (2016), flavonoid merupakan senyawa fenol yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein yang dapat menyebabkan aktifitas metabolisme sel jamur berhenti, karena semua aktifitas metabolisme sel dikatalisis oleh suatu enzim yang merupakan protein. . Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antimikroba, dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel mikroba, sehingga lapisan dinding sel mikroba tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel

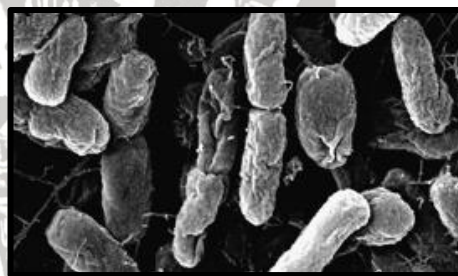
2.2 Biologi Bakteri *P. fluorescens*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri *P. fluorescens*

Menurut Scales, Dickson, Lipuma dan Huffnagle (2014), klasifikasi bakteri

P. fluorescens adalah sebagai berikut:

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



Gambar 2. Morfologi *P. fluorescens* (de sousa, de araujo torres, de azerado Figueredo, da silva vasckncekos. de souza., 2013).

Menurut Astriani (2017), pseudomonas merupakan kelompok bakteri sel batang dalam bentuk tunggal atau berkelompok. Berukuran 0,5-1,0 x 1,5-5,0 bakteri gram negatif yang bersifat aerob, motil dengan letak flagella yang berlawanan, katalase positif, biasa ditemui pada tanah, air dan laut. Ciri genus Pseudomonas yaitu berbentuk sel tunggal, batang lurus, motil, gram negatif, dapat menggunakan H₂ atau CO sebagai sumber energi. Aerobik sejati, katalase positif.

2.2.2. Habitat Bakteri *P. fluorescens*

Menurut Donnarumma, Buommino, Fusco, Paoletti, Auricchio dan Tufano (2010), *P. fluorescens* merupakan bakteri motil. Bakteri ini juga termasuk golongan bakteri gram negatif. Bakteri *P. fluorescens* umumnya biasa ditemukan di tanah, air dan tumbuhan, tetapi juga biasanya terdapat di manusia. Morfologi bakteri *P. fluorescens* disajikan pada Gambar 2.

2.2.3. Infeksi Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

Menurut Hardi, Pebrianto, Saptiani (2014), bakteri *P. fluorescens* lebih dominan menginfeksi ikan air tawar. *P. fluorescens* merupakan agen penyebab septicemia dan munculnya ulkus pada beberapa ikan. organ ikan mas yang terinfeksi *P. fluorescens* mengalami perdarahan pada organ hati, ginjal dan usus. Gejala yang ditimbulkan oleh *P. fluorescens* pendarahan, kulit rusak, sisik lepas dan adanya memar dan luka serta produksi lendir berlebih. Menurut Cahyono (2001), bakteri *P. fluorescens* menyerang ikan yang masih muda dan ikan yang sudah dewasa. Hampir semua bagian tubuh ikan dapat terserang oleh bakteri ini. Serangannya sangat ganas hingga dapat menimbulkan kematian. kerugian yang ditimbulkan oleh serangan bakteri ini sangat besar. Penularannya dapat melalui air, alat-alat, bagian tubuh ikan yang telah terinfeksi, melalui hewan lain dan melalui tumbuhan air. Gejala yang tampak pada ikan yang terinfeksi *P. fluorescens* adalah ikan berwarna gelap, napsu makan berkurang atau sama sekali tidak ada napsu makan, ikan bergerombol di dekat pintu pengeluaran air, luka pada kulit, sirip dan sisik rusak, pendarahan pada tubuh ikan, perut busung, ingsang rusak berwarna keputih-putihan hingga kebiru-biruan, ikan lemah dan timbul luka borok.

2.2.4 Pertumbuhan Bakteri

Menurut Nurhajati, Soepranionondo, Lokapinasari (2016), pertumbuhan bertahap suatu mikroorganisme dimulai dari awal pertumbuhan sampai dengan berakhirnya aktivitas, terdiri atas empat fase utama yaitu: lag, eksponensial, stasioner, dan kematian. Fase *lag* atau fase adaptasi merupakan fase paling awal atau merupakan fase penyesuaian/ pengaturan suatu aktivitas mikroba dalam lingkungan barunya. Pada fase ini penambahan massa atau penambahan jumlah sel belum begitu terjadi, sehingga kurva pertumbuhan pada fase ini pada umumnya mendatar. Selang waktu fase *lag* tergantung kepada kesesuaian pengaturan aktivitas dan lingkungannya. Fase *lag* ini terjadi pada dua jam pertama masa awal pertumbuhannya, setelah itu pada dua jam berikutnya telah terjadi fase eksponensial. Fase eksponensial atau logaritmik merupakan fase peningkatan aktivitas perubahan bentuk maupun penambahan jumlah mencapai kecepatan maksimum sehingga kurvanya dalam bentuk eksponensial. peningkatan aktivitas tersebut harus diimbangi oleh banyak faktor, antara lain faktor biologi dan non biologi. Termasuk faktor biologi seperti bentuk dan sifat mikroorganisme terhadap lingkungan yang ada, asosiasi kehidupan di antara organisme yang bersangkutan, sedangkan yang termasuk faktor non-biologi seperti kandungan nutrisi di dalam medium pertumbuhan, suhu, dan ph. Fase stasioner merupakan fase terjadinya keseimbangan penambahan aktivitas dan penurunan aktivitas, atau dalam pertumbuhan koloni terjadi keseimbangan antara yang mati dengan penambahan individu. Oleh karena itu fase ini membentuk kurva datar. Fase ini juga diakibatkan karena sumber nutrisi yang semakin berkurang, terbentuknya senyawa penghambat, dan faktor lingkungan yang mulai tidak menguntungkan. Fase stasioner terjadi

setelah jam ke-12 masa inkubasi. Fase kematian merupakan fase mulai terhentinya aktivitas atau dalam pertumbuhan koloni terjadi kematian yang mulai melebihi bertambahnya individu.

Menurut Sumarni, Sumarno dan Suharjono (2013), pertumbuhan mikrobia terjadi pada suhu dengan kisaran kira-kira 30°C. Kecepatan pertumbuhan mikrobia meningkat lambat dengan naiknya suhu mencapai kecepatan pertumbuhan maksimum. Diatas suhu maksimum kecepatan pertumbuhan mikrobia menurun dengan cepat dengan naiknya suhu.

2.3 Aktivitas Antimikroba

Menurut Dewi, Ratnawati dan Sukmanengsih (2015), aktivitas antimikroba dipengaruhi oleh beberapa faktor antara lain, konsentrasi ekstrak, kandungan metabolit senyawa antimikroba pada bahan uji, dan jenis bakteri yang dihambatnya. Konsentrasi ekstrak yang semakin tinggi membentuk zona bening yang semakin besar.

Menurut Susanti (2016), flavonoid merupakan senyawa fenol yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein yang dapat menyebabkan aktifitas metabolisme sel jamur berhenti, karena semua aktifitas metabolisme sel dikatalisis oleh suatu enzim yang merupakan protein. Aktivitas antimikroba dari flavonoid terjadi karena kemampuannya untuk berikatan dengan adhesin, polipeptida dinding sel dan *membrane-bound enzymes*, karena flavonoid memiliki kemampuan untuk membentuk kompleks dengan protein ekstraseluler terlarut dan dengan dinding sel, sehingga mikroorganismenya tidak dapat melekat dan menginvasi sel. Tanin merupakan senyawa metabolit sekunder pada tumbuhan yang bersifat sebagai antimikroba dengan membentuk ikatan yang stabil dengan protein sehingga terjadi koagulasi

protoplasma mikroba. Daya antimikroba tannin sangat toksik terhadap filamentous fungi dan bakteri. Alkaloid memiliki kemampuan sebagai antimikroba, dengan cara mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel mikroba, sehingga lapisan dinding sel mikroba tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel.

Menurut Septiani, Wijaya dan Dewi (2017), antibakteri adalah suatu senyawa yang digunakan untuk mengambat bakteri. Antibakteri biasanya terdapat dalam suatu organisme sebagai metabolit sekunder. Mekanisme senyawa anti bakteri secara umum dilakukan dengan cara merusak sintesis protein, dan menghambat kerja enzim. senyawa yang berperan dalam merusak dinding sel antara lain fenol, flavonoid, dan alkaloid. Senyawa fitokimia tersebut berpotensi sebagai antibakteri alami pada bakteri pathogen.

2.4 Uji Cakram

Menurut Ikrom, Asih, Wira, Perkasa, Tiara dan Wasito (2014), uji *in vitro* merupakan suatu metode uji pada media buatan yang sesuai dengan lingkungan optimal yang diperlukan oleh mikroba untuk tumbuh dan berkembangbiak. metode yang digunakan pada pengujian *in vitro* adalah metode difusi atau metode cakram kertas antibiogram kirby-bauer dan menggunakan metode dilusi. pada metode difusi parameter yang diamati adalah zona hambat yang terbentuk, yaitu dengan mengukur diameter zona jernih di sekitar sumur dengan penggaris.

Menurut Mulyadi, Wuryanti dan Purbowatinigrum (2013), metode yang digunakan dalam uji antibakteri ini yaitu metode difusi cakram kertas. Metode ini dilakukan dengan meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Pencelupan cakram pada larutan uji hingga seluruh permukaan cakram basah. Pengamatan dilakukan setelah bakteri

diinokulasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat zona bening disekitar cakram. Pemilihan metode ini karena mudah dan sederhana untuk menentukan aktivitas antibakteri sampel yang di uji.



3. METODE PENELITIAN

3.1. Materi Penelitian

3.1.1 Alat-Alat Penelitian

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

Gambarnya disajikan pada Lampiran 2.

Tabel 1. Alat-alat Penelitian

No	Alat	Kegunaan
1	Timbangan Analitik	untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-3}
2	Timbangan Digital	untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-2}
3	<i>Hot Plate</i>	untuk memanaskan media
4	Tabung Reaksi	untuk wadah peremajaan bakteri
5	Bunsen	untuk mencegah kontaminasi pada saat perlakuan dan penanaman
6	Gelas Ukur 100ml	untuk mengukur larutan
7	Erlenmeyer 500ml	untuk wadah pembuatn media
8	<i>Beaker Glass</i> 1.000ml	untuk wadah sterilisasi
9	Cawan Petri	untuk wadah media penanaman bakteri dan uji cakram
10	Kulkas	untuk menyimpan bahan dan bakteri pada suhu dingin
11	Autoklaf	untuk mensterilisasi alat dan bahan
12	<i>Vortex Mixer</i>	untuk menghomogenkan larutan
13	Mikropipet 10-100 μ l	untuk membantu mengambil bahan berbentuk cairan
14	Mikropipet 100-1.000 μ l	untuk membantu mengambil bahan berbentuk cairan
15	Nampan	untuk tempat menyimpan alat dan bahan
16	Sprayer	untuk wadah penyimpanan alcohol
17	Pipet	untuk mengambil larutan kristal violet, safranin dan iodin
18	Blender	untuk menghaluskan daun puring menjadi bubuk
19	Botol Film	untuk wadah larutan ekstrak
20	LAF (<i>Laminary Air Flow</i>)	untuk tempat dilakukannya perlakuan dan penanaman
21	Inkubator	untuk inkubasi bakteri

No	Alat	Kegunaan
22	Sendok Bahan	untuk alat mengambil bahan
23	Kamera	untuk mendokumentasikan
24	Rak Tabung Reaksi	untuk wadah meletakkan tabung reaksi
25	Jarum Ose	untuk mengambill bakteri
26	<i>Bluetip</i>	untuk alat bantu mikropipet 100-1.000µl
27	<i>Yellowtip</i>	untuk alat bantu mikropipet 10-100µl
28	Pipet Volume	untuk mengambil larutan dalam volume besar
29	Bola Hisap	untuk alat bantu pipet volume menghisap larutan
30	<i>Destructor</i>	untuk membersihkan alat-alat yang bersentuhan dengan bakteri
31	Spatula	untuk mengaduk larutan
32	Evaporator	untuk evaporasi daun puring menjadi ekstrak
33	Mikroskop	untuk pengamatan bakteri saat pewarnan gram
34	<i>Object Glass</i>	untuk tempat bakteri saat pewarnaan gram
35	<i>Washing Bottle</i>	untuk tempat akuades saat pewarnaan gram
36	<i>Triangle</i>	untuk meratakan bakteri saat penanaman bakteri
37	Corong	untuk adah kertas saring saat penyaringan agar larutan mudah masuk ke dalam Erlenmeyer
38	Pinset	untuk mengambil kertas cakram
39	Korek Api	Untuk menyalakan bunsen
40	Jangka Sorong	Untuk menghitung zona bening

3.1.2 Bahan-Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2

Tabel 2. Bahan-Bahan Penelitian

No	Bahan	Kegunaan
1	Daun Puring	sebagai bahan yang akan digunakan menjadi ekstrak



Lanjutan Tabel 2.

No	Bahan	Kegunaan
2	Akuades	sebagai bahan pelarut
3	Etanol 96%	sebagai larutan untuk maserasi daun puring
4	Alkohol 70 %	sebagai bahan untuk keadaan steril
5	Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i>	sebagai bakteri yang digunakan untuk perlakuan
6	TSA (<i>Triple Soy Agar</i>)	sebagai media agar saat peremajaan bakteri
7	PSA	sebagai media tanam bakteri
8	Kristal Violet	sebagai bahan pewarna biru atau ungu saat pewarnaan gra,
9	<i>Iodine</i>	sebagai bahan pewarna oranye saat pewarnaan gram
10	Kapas	sebagai bahan alas atau penutup ketika sterilisasi
11	DMSO 10%	sebagai pelarut ekstrak
12	Tisu	sebagai pembersih alat-alat yang digunakan
13	Alumunium Foil	sebagai penutup atau pelapis
14	Kertas Label	sebagai penanda
15	Plastik Klip	sebagai pembungkus
16	Kertas Bekas	sebagai pembungkus alat saat sterilisasi
17	Kertas Cakram	sebagai bahan untuk mengetahui zona hambat ekstrak
18	Kertas Saring Whattman No.41	sebagai penyaring larutan maserasi daun puring
19	Karet Gelang	sebagai pengikat saat sterilisasi atau penyimpanan bakteri
20	Spritus	sebagai bahan bakar bunsen
21	Plastik Wrap	sebagai pebungkus alat-alat
22	Safranin	sebagai bahan pewarna merah saat pewarnaan gram
23	Ekstrak Daun Puring	sebagai bahan yang digunakan untuk di uji efektivitasnya
24	Masker	sebagai penghindar atau pencegah kontaminasi
25	Sarung tangan	sebagai penghindar atau pencegah kontaminasi

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode esperimental. metode eksperimental adalah metode yang bertujuan untuk menguji pengaruh suatu variabel terhadap variabel lain atau menguji bagaimana hubungan sebab akibat antara variabel yang satu dengan variabel yang lainnya. Metode penelitian eksperimental memiliki perbedaan yang jelas dibanding dengan metode penelitian yang lainnya, yaitu adanya pengontrolan terhadap variabel penelitian dan adanya pemberian perlakuan terhadap kelompok eksperimen (Sukmadinata dan Syaodih, 2008).

Teknik pengambilan data yang dilakukan dengan cara mengamati obyek secara langsung disebut dengan observasi. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Hasannah (2016), bahwa observasi merupakan langkah awal menuju fokus perhatian lebih luas yaitu observasi partisipan, hingga observasi hasil praktis sebagai sebuah metode dalam kapasitasnya sendiri-sendiri. Observasi ini dapat dilacak pada kemapanan akar teoretis metode interaksionis-simbolik, karena dalam mengumpulkan data, peneliti sekaligus dapat berinteraksi dengan subjek penelitiannya.

3.3 Rancangan Penelitian

Menurut Persulesy, Lembang dan Djidin (2016), RAL adalah jenis rancangan percobaan yang paling sederhana dan paling mudah jika di dibandingkan dengan jenis rancangan percobaan yang lain. RAL hanya bisa digunakan pada percobaan dengan jumlah perlakuan yang terbatas dan satuan percobaan harus homogen atau faktor luar yang dapat mempengaruhi percobaan harus dapat di kontrol. RAL atau *completely randomized design* merupakan salah satu model rancangan dalam

rancangan percobaan. RAL digunakan bila unit percobaan homogen. Rancangan ini disebut rancangan acak lengkap, karena pengacakan perlakuan dilakukan pada seluruh unit percobaan. RAL digunakan bila faktor yang akan diteliti satu faktor atau lebih dari satu faktor

Menurut Harsojuwono, Arnata dan Puspawati (2011), secara umum model aditif linier dari rancangan acak lengkap sebagai berikut

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

Keterangan :

- Y_i : Pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j
- μ : Nilai rata-rata umum
- T_i : Pengaruh perlakuan ke-i
- ϵ_{ij} : Pengaruh acak pada perlakuan ke-i dan ulangan ke -j

Penelitian ini menggunakan variabel bebas berupa ekstrak daun puring dan bakteri *P. fluorescens* sebagai variabel terikatnya. Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui pengaruh penggunaan konsentrasi ekstrak daun puring (*C. variegatum*) yang berbeda-beda pada masing-masing perlakuan terhadap aktivitas antibakteri *P. fluorescens* yang diamati melalui daya hambat atau zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram. Adapun penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dengan 3 kali ulangan dan 2 variabel kontrol terdiri dari kontrol positif dan kontrol negatif.

Berikut disajikan denah penelitian pada Gambar 3.

Gambar 3. Denah Rancangan Percobaan

A3	D2	K-1	B1	K+2	C3	E2
K+1	B3	A2	D3	C2	E3	K-3
D1	E1	K+3	A1	B2	K-2	C1

Keterangan:

K+ : Kontrol positif.

K- : Kontrol negatif.

A : Ekstrak daun puring dosis 50 ppm.

B : Ekstrak daun puring dosis 100 ppm.

C : Ekstrak daun puring dosis 150 ppm.

D : Ekstrak daun puring dosis 200 ppm.

E : Ekstrak daun puring dosis 250 ppm.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Pembuatan Ekstrak Daun Puring (*C. variegatum*)

Daun puring didapatkan dari tanaman puring yang tumbuh di daerah batu. kemudian daun tersebut dikeringkan di bawah sinar matahari selama 7 hari dari 7000 gram daun puring basah menjadi 5000 gram setelah dikeringkan dan diblender hingga menjadi serbuk. Serbuk daun puring kering dicampur dengan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:10. Serbuk daun puring kering ditimbang sebanyak 250 gram untuk satu toples dan dimasukkan kedalam toples ukuran 2l. dan ditambahkan etanol 96% sebanyak 2.5 L dan dicampurkan kedalam serbuk daun puring. Lalu dihomogenkan untuk proses maserasi. penggunaan ethanol 96% berfungsi sebagai pengikat senyawa polar. Toples ditutup aluminium foil agar etanol tidak menguap. Proses maserasi ini dilakukan dengan mendinginkan campuran serbuk dengan etanol 96% dalam toples selama 2 hari di tempat gelap. setelah 2 hari. Hasil maserasi disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan larutan dengan endapannya. Hasil larutannya dievaporasi atau diuapkan selama kurang lebih 2 jam untuk mendapatkan ekstrak murni dari daun puring. Proses penguapan

ini menggunakan alat yang disebut *rotary evaporator*. Setelah diuapkan, maka dihasilkan ekstrak murni berupa pasta berwarna hijau kehitaman. Hasil ekstrak kasar yang telah didapat dimasukkan dalam botol film dan ditimbang menggunakan timbangan digital, kemudian dibungkus dengan aluminium foil, dilapisi plastik wrap dan disimpan didalam kulkas. Menurut Basito (2011), etanol adalah sejenis cairan yang mudah menguap, tak berwarna, dan merupakan alkohol yang paling sering digunakan dalam kehidupan sehari-hari etanol lebih ramah lingkungan. Menurut Sa'adah dan Nurhasnawati (2015), etanol dipertimbangkan sebagai cairan penyari karena lebih efektif, kapang dan kuman sulit tumbuh. tidak beracun, netral, absorpsinya baik. Menurut Kiswandono (2011), Kelebihan metode maserasi diantaranya adalah tidak memerlukan peralatan yang rumit, relatif murah, dapat menghindari penguapan komponen senyawa karena tidak menggunakan panas, sedangkan kelemahannya adalah memerlukan waktu

$$\text{Randemen} = \frac{14 \text{ gram ekstrak (pasta)}}{500 \text{ gram serbuk daun puring}} \times 100\% = 2,8\%$$

$$\text{Berat Kering} = \frac{5000 \text{ gram (Serbuk)}}{7000 \text{ gram (Berat Basa)}} \times 100\% = 71,4\%$$

3.4.2 Sterilisasi alat dan Bahan

Adapun proses sterilisasi alat dan bahan adalah sebagai berikut:

- Bahan dan peralatan yang akan disterilkan dibungkus dengan kertas koran atau kertas bekas dan diikat dengan karet. pada erlenmayer dan tabung reaksi ditambahkan kapas di bagian atas untuk menyerap uap air.
- Akuades dituang secukupnya ke dalam autoklaf, kemudian alat dan bahan dimasukkan ke dalam autoklaf dan autoklaf ditutup rapat secara diagonal.
- Saklar dinyalakan kemudian diputar tombol sirine berwarna merah pada

autoklaf dan diputar hingga batas lampu berwarna merah.

- Ditunggu selama 15 menit hingga suhu 121°C , alarm akan berbunyi lalu autoklaf dimatikan. ditunggu beberapa saat hingga termometer dan manometer menunjukkan angka 0.
- Saklar listrik dimatikan, dibuka autoklaf dan dikeluarkan peralatan dan bahan yang telah steril. selanjutnya bahan disimpan dalam lemari pendingin

3.4.3 Pembuatan Media Agar Miring

Media agar miring berfungsi sebagai media peremajaan bakteri. adapun proses pembuatan media agar miring adalah sebagai berikut:

- Media PSA ditimbang sebanyak 0,44 gr dengan timbangan digital.
- Media dimasukkan ke dalam erlenmayer ukuran 100 ml.
- Media dilarutkan dengan akuades 9 ml dan dihomogenkan dengan cara digoyang goyangkan.
- Media dipanaskan hingga mendidih diatas *hot plate* sambil diaduk agar tercampur dengan merata dan tidak lengket.
- Media dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 9 ml.
- Tabung reaksi ditutup dengan kapas pada bagian atas kemudian dibungkus dengan aluminium foil.
- Tabung reaksi dimasukkan kedalam beaker glass yang pada bagian bawah sudah diberi kapas dan pada bagian atas dibungkus dengan aluminium foil.
- Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
- Tabung reaksi dimiringkan berisi media steril dengan kemiringan 30° .
- Media ditunggu hingga menjadi padat.

3.4.4 Pembuatan Media TSB

Media TSB (*tryptic soy broth*) adalah media cair yang digunakan untuk kultur bakteri. Adapun pembuatan media tsb adalah sebagai berikut:

- Media ditimbang sebanyak 0,3 gr menggunakan timbangan digital.
- Media dimasukkan kedalam erlenmayer 100 ml.
- Media dilarutkan dengan akuades sebanyak 10 ml lalu dihomogenkan dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Tabung reaksi berisi media TSB ditutup dengan kapas pada bagian atas dan dibungkus aluminium foil.
- Tabung reaksi berisi media TSB dimasukkan kedalam *beaker glass* yang pada bagian bawah sudah diberi kapas dan pada bagian atas dibungkus dengan aluminium foil.
- Media disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

3.4.5 Pembuatan Media PSA

Media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) digunakan sebagai media agar dalam melakukan uji cakram. Adapun pembuatan media ini adalah sebagai berikut:

- Media PSA ditimbang sebanyak 6,78 gr dengan timbangan digital.
- Media PSA dimasukkan dalam erlenmeyer.
- Media PSA dilarutkan dengan akuades sebanyak 70 ml dan dihomogenkan dengan cara digoyang-goyangkan.
- Media PSA dipanaskan di atas hotplate hingga mendidih.
- Media PSA diberi kapas pada bagian atas erlenmayer dan dibungkus dengan menggunakan aluminium foil.

- Media PSA disterilkan media dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
- Media PSA dibiarkan sampai suhu ruang lalu dituang di cawan petri.

3.4.6 Pembuatan NaFis

Adapun prosedur pembuatan natrium fisiologis adalah sebagai berikut :

- Garam NaCl ditimbang sebanyak 0,27 gr dengan timbangan digital dan dimasukkan dalam erlenmayer.
- Garam NaCl dilarutkan dengan akuades sebanyak 30 ml dan dihomogenkan.
- Garam NaCl yang telah dilarutkan dengan akuades dimasukkan kedalam 3 tabung reaksi sebanyak 10 ml tiap tabungnya.
- Tabung reaksi ditutup dan diberi kapas pada bagian atas serta ditutup dengan aluminium foil dan dimasukkan dalam beaker glass serta dibungkus dengan aluminium foil.
- Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

3.4.7 Peremajaan Bakteri *P. fluorescens*

Bakteri *P. fluorescens* didapatkan dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara. Adapun prosedur peremajaan bakteri *P. fluorescens* adalah sebagai berikut:

- Media agar miring yang akan digunakan disiapkan untuk peremajaan dan media agar miring yang berisi bakteri murni.
- Jarum ose dipanaskan diatas bunsen hingga berpijar dan goreskan pada media agar yang tidak ditumbuhi bakteri, hal tersebut bertujuan untuk menurunkan suhu pada jarum ose agar bakteri tidak mati.

- Jarum ose digoreskan pada biakan bakteri murni sebanyak 1 ose.
- Jarum ose digoreskan pada media agar miring dengan metode gores.
- Media agar miring dimasukkan dalam inkubator selama 24-48 jam dengan suhu 32°C.

3.4.8 Kultur Bakteri *P. fluorescens*

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

- Media TSB disiapkan yang sudah disterilkan yang akan digunakan untuk melakukan kultur bakteri.
- Bakteri diambil dari media agar miring yang telah diremajakan dengan jarum ose steril sebanyak 1 ose.
- Jarum ose dicelupkan pada media TSB yang sudah disterilkan kemudian divortex agar tercampur merata.
- Tabung reaksi ditutup dengan kapas dan aluminium foil.
- Larutan TSB dibiarkan selama 24-48 jam dalam inkubator pada suhu 32°C.

3.4.9 Pembuatan Dosis

Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dosis yang berbeda yaitu 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm. Dosis diperoleh dari pengenceran larutan *stock*. Adapun proses pembuatan dosis adalah sebagai berikut:

- Menimbang ekstrak daun puring sebanyak 0.0025 mg menggunakan timbangan analitik dan dimasukkan ke dalam botol film untuk larutan *stock*.
- Menambahkan pelarut DMSO 10% sebanyak 5ml ke dalam botol film dan divortex.
- Diperoleh larutan *stock* dengan dosis 5000 ppm sebanyak 5ml.
- Dosis 50 ppm diambil 15 µl larutan *stock* dan ditambahkan 1,485 µl pelarut

DMSO 10%.

- Dosis 100 ppm diperoleh dari 30 μ l larutan *stock* dan 1,470 μ l DMSO 10%.
- Dosis 150 ppm diperoleh dari 45 μ l larutan *stock* dan 1,455 μ l DMSO 10%.
- Dosis 200 ppm diperoleh dari 60 μ l larutan *stock* dan 1,440 μ l DMSO 10%.
- Dosis 250 ppm diperoleh dari 75 μ l larutan *stock* dan 1,425 μ l DMSO 10%.

3.4.10 Pewarnaan Gram

- *Object glass* ditetesi dengan akuades.
- Bakteri 1 ose diambil dari media agar miring.
- Bakteri 1 ose digoreskan pada *object glass*.
- *Object glass* difiksasi di atas bunsen.
- *Object glass* ditetesi kristal violet direndam selama 1 menit.
- *Object glass* dibilas dengan akuades secara mengalir dan difiksasi kembali.
- *Object glass* ditetesi iodine 2 tetes direndam selama 1 menit.
- *Object glass* dicuci dengan alkohol 96% direndam selama 30 detik, dibilas kemudian dikeringkan.
- *Object glass* ditetesi safranin direndam selama 30 detik, dibilas kemudian dikeringkan.
- *Object glass* diamati dimikroskop dengan perbesaran 1000x.

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Uji Cakram

Adapun tahapan pelaksanaan uji cakram adalah sebagai berikut:

- Disiapkan cawan petri yang telah disterilisasi.
- Disiapkan Media PSA steril dan tuangkan ke dalam cawan petri tunggu hingga membentuk gel.

- Bakteri disiapkan yang sudah diencerkan hingga kepadatan 10^7 selanjutnya diambil bakteri sebanyak 100 μ l dan dimasukkan kedalam cawan petri kemudian diratakan dengan triangel lalu ditunggu selama 15 menit.
- Diberikan beberapa perlakuan pada cakram steril dengan cara perendaman pada ekstrak daun puring dengan konsentrasi 50 ppm, 100ppm, 150ppm, 200 ppm dan 250 ppm selama 15 menit.
- Kertas cakram diletakkan yang telah direndam ekstrak daun puringke dalam media agar yang telah ditanami bakteri *Pseudomonas fluorescens*.
- Media agar dibiarkan di dalam inkubator selama 24-48 jam dengan suhu inkubasi sebesar 32°C.
- Setelah diinkubasi, diamati zona bening yang telah terbentuk di sekitar kertas cakram dan diukur luas zona bening menggunakan jangka sorong.

3.5.2 Parameter Uji

Parameter uji dalam penelitian ini ada dua yaitu parameter utama dan parameter penunjang. Adapun parameter utama adalah hasil pengamatan zona bening atau zona hambat yang terlihat disekitar kertas cakram pada media yang telah ditumbuhi oleh bakteri *P. fluorescens* selama inkubasi dalam kurun waktu 24 jam. Sedangkan parameter penunjang adalah suhu inkubator yang optimal guna menumbuhkan bakteri *P. fluorescens*

3.5.3 Analisis Data

Data yang diperoleh maka dilakukan analisis data secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Uji ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon zona hambat (zona bening) yang diukur

atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.

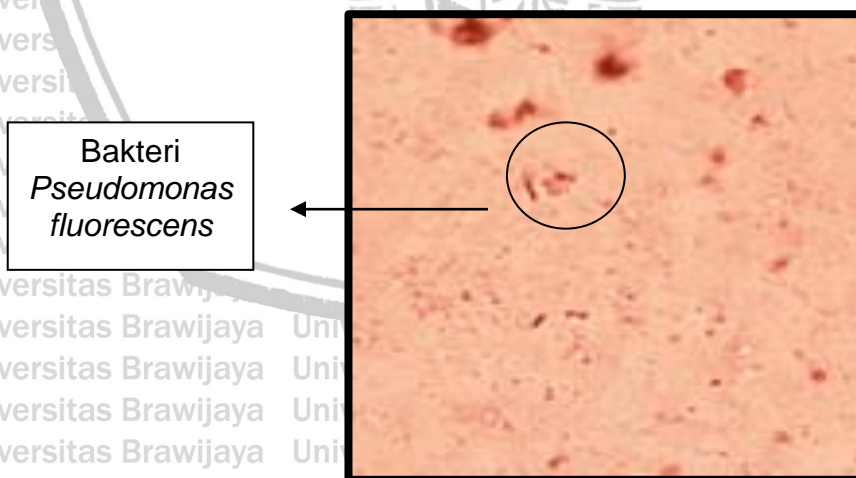


4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi Bakteri *P. fluorescens*

Berdasarkan penelitian yang dilakukan guna mengidentifikasi bakteri menggunakan metode pewarnaan gram didapatkan hasil yakni bakteri *P. fluorescens*. Bakteri tersebut termasuk dalam golongan bakteri gram negatif. Pada bakteri gram negatif apabila dilakukan pengamatan pewarnaan gram di bawah mikroskop akan berwarna merah. Menurut Nurhidayati, Faturrahman dan Ghazali (2015), bakteri gram negatif berwarna merah sebab kompleks tersebut larut pada saat pemberian larutan alkohol sehingga mengambil warna merah safranin sedangkan pada bakteri gram positif pada pewarnaan Gram berwarna ungu disebabkan kompleks zat warna kristal violet-yodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan alkohol. Hasil pewarnaan bakteri *P. fluorescens* disajikan pada

Gambar 4



Gambar 4. Hasil pewarnaan gram bakteri *P. fluorescens* dengan perbesaran 1000x menggunakan mikroskop.

Berdasarkan hasil uji biokimia bakteri *P. fluorescens* di laboratorium Uji Balai Besar

Perikanan Budidaya Air Payau Jepara diketahui bahwa bakteri *P. fluorescens*

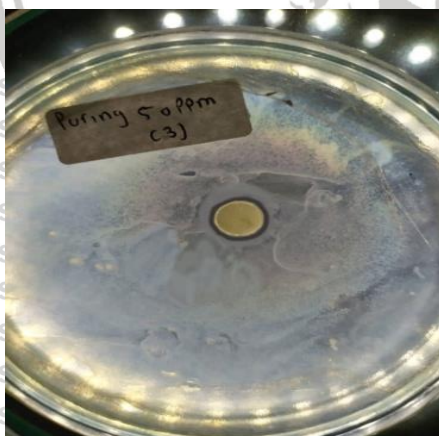
merupakan bakteri yang bersifat gram negatif dan didapatkan hasil uji oksidase dan katalase positif, fermentatif dan indol positif. Adapun hasil uji biokimia bakteri *P. fluorescens* disajikan pada Lampiran 1. Uji pewarnaan dan uji biokimia dilakukan untuk mengetahui ciri-ciri pada bakteri *P. fluorescens* itu sendiri. Perbedaan bakteri gram negatif dan positif terdapat pada dinding sel dan kandungan lipid. Bakteri gram negative memiliki dinding sel peptidoglikan yang lebih tipis dibandingkan dengan bakteri gram positif namun memiliki kandungan lipid yang lebih tinggi sedangkan pada bakteri gram positif memiliki kandungan lipid yang rendah dan dinding sel peptidoglikan yang lebih tebal dibandingkan dengan bakteri gram negative. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Hamidah, Rianingsih dan Romadhon (2019), struktur dinding sel bakteri gram negatif memiliki lapisan peptidoglikan yang lebih tipis dari dinding sel bakteri gram positif dengan beberapa ikatan silang peptide. Bagian luar dari lapisan peptidoglikan tersusun atas lapisan lipoprotein, fosfolipid dan polimer unik untuk dinding sel gram negative yang disebut lipopolisakarida. Sedangkan pada bakteri gram positif menurut Safrida, Yulvizar dan Devira (2012), bakteri gram positif terlihat berwarna ungu karena asam-asam ribonukleat pada sitoplasma sel-sel gram positif membentuk ikatan yang lebih kuat dengan kompleks ungu kristal violet sehingga ikatan kimiawi tersebut tidak mudah dipecahkan oleh pemucat warna. Reaksi tersebut didasarkan atas perbedaan komposisi kimiawi dinding sel. Sel gram positif mempunyai dinding dengan lapisan peptidoglikan yang tebal.

4.2 Uji kertas Cakram

Pada tahapan selanjutnya dalam penelitian ini yaitu melakukan uji cakram untuk mengetahui antibakteri yang terkandung dalam ekstrak kasar daun puring ini

dapat memberikan pengaruh atau tidak terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Kertas cakram direndam ke dalam ekstrak kasar daun puring dengan dosis yang berbeda-beda dengan masing-masing perlakuan dilakukan perendaman selama 15 menit. Uji cakram pada penelitian ini menggunakan perlakuan dosis 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm serta kontrol positif dan negatif.

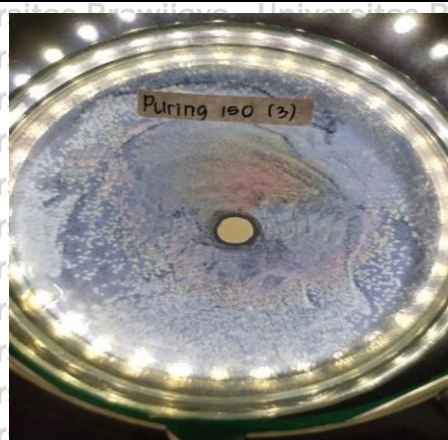
Menurut Mawan, Indriwati dan Suhadi (2018), zona bening terbentuk karena ekstrak yang ada pada paper disk berdifusi ke agar dan mencegah pertumbuhan bakteri. Menurut Kusmiyati dan Agustini (2007), Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram. Hasil dari zona bening setelah di inkubasi disajikan pada lampiran dan pada Gambar 5.



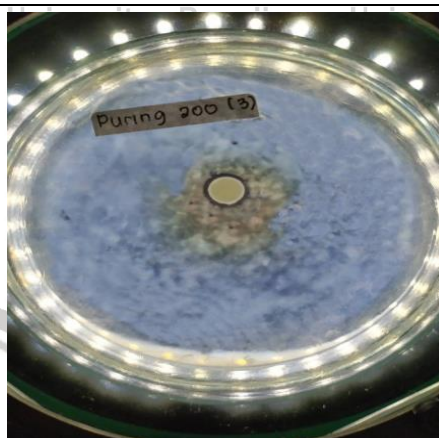
Perlakuan A (50 ppm)



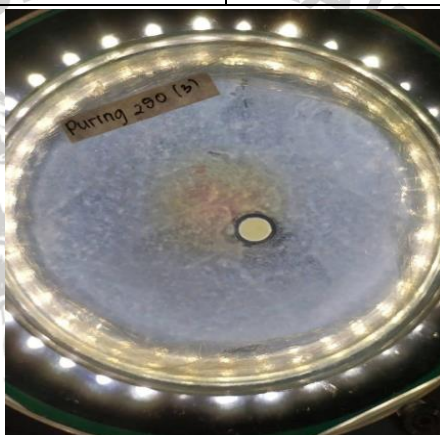
Perlakuan B (100 ppm)



Perlakuan C (150 ppm)



Perlakuan D (200 ppm)



Perlakuan E (250 ppm)

Gambar 5. Hasil Uji Cakram

Uji cakram pada penelitian ini menggunakan perlakuan dosis 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm serta kontrol positif dan negatif. Kontrol positif menggunakan antibiotic tetracycline sedangkan control negative hanya menggunakan kertas cakram saja tidak di rendam menggunakan ekstrak atau antibiotic, dikarenakan untuk memastikan bahwa kertas cakram yang digunakan tidak mengandung senyawa antibiotic yang mana dapat mempengaruhi hasil Pengaruh ekstrak daun puring terhadap bakteri *P. fluorescens* dapat diketahui dari hasil uji kertas cakram. Apabila pada kertas cakram yang telah direndam di ekstrak

daun puring dan ditanam di bakteri *P. fluorescens* memiliki zona bening maka dapat disimpulkan ekstrak tersebut memiliki sifat antibakteri. Menurut Mulyadi, Wuryanti dan Sarjono (2017), Respon hambatan pertumbuhan bakteri dapat diklasifikasikan sebagai berikut pada Tabel 3.

Tabel 3. Klasifikasi dan respon hambatan pertumbuhan bakteri

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

Berdasarkan gambar hasil pengukuran zona bening menunjukkan mengenai zona hambat terbesar ditunjukkan pada perlakuan E dengan konsentrasi 250 sedangkan zona hambat terkecil didapatkan pada perlakuan A dengan konsentrasi 50 ppm yang memiliki zona hambat terkecil. Pada perlakuan A, B, C dan E dengan masing-masing konsentrasi 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm menunjukkan kategori sedang, dikarenakan memiliki hasil diameter pada rentang 5-10mm. Analisis data pengukuran hasil uji dengan menggunakan kertas cakram dari ekstrak kasar daun puring dengan 5 perlakuan dan 3 kali ulangan didapatkan rata-rata zona hambat setelah dilakukan pengamatan selama 24 jam disajikan pada lampiran dan pada Tabel 4.

Tabel 4. Data Hasil Pengukuran Rerata Zona Hambat (mm)

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata ± SD
	1	2	3		
A	6,42	6,77	6,84	20,03	6,68 ± 0,23
B	7,1	7,45	7,25	21,8	7,27 ± 0,18
C	8,18	8,29	7,6	24,07	8,02 ± 0,37
D	8,52	8,71	8,48	25,71	8,57 ± 0,12
E	9,17	9,06	9,89	28,12	9,37 ± 0,45

Pada Tabel 4 dapat diketahui bahwa perlakuan E dengan konsentrasi 250 ppm memiliki rerata tertinggi zona sebesar 9,37 mm dan pada perlakuan A dengan konsentrasi 50 ppm memiliki hasil rerata terendah sebesar 6,68 mm. Kemudian dilakukan uji analisis sidik ragam unntuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan.

Tabel Analisis sidik ragam dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Sidik Ragam Zona Hambat

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	13,49	3.37	38.58**	3.48	5.99
Acak	10	0,87	0.08			
Total	14					

Keterangan :

**) Berbeda Sangat Nyata

Pada hasil perhitungan sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian dosis ekstrak kasar daun puring (*C. variegatum*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescenes* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata. Hal tersebut dikarenakan nilai F hitung (38,58) lebih besar dari nilai F tabel 5% (3,48) dan nilai F tabel 1% (5,99). Maka H_0 ditolak dan H_1 diterima yang berarti perlakuan tersebut memberikan pengaruh sangat nyata. Perbedaan masing-masing perlakuan terhadap zona hambat bakteri didukung dengan perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf $p > 5\%$ (kepercayaan 95%) maupun taraf nyata 1% (Kepercayaan 99%).

Dikarenakan F hitung yang didapatkan lebih besar dari F tabel 5% dan F tabel 1% dan H_1 diterima maka dapat dilakukan perhtungan selanjutnya yakni pehitungan uji BNT atau uji beda nyata terkecil.

Hasil uji beda nyata terkecil (BNT) didapatkan untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar perlakuan dan disajikan pada Tabel 6.



Tabel 6 Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		6,68	7,27	8,02	8,57	9,37	
A	6,68						a
B	7,27	0,59**	-				b
C	8,02	1,34**	0,75**	-			c
D	8,57	1,89**	1,30**	0,55**	-		d
E	9,37	2,69**	2,11**	1,35**	0,80**	-	e

Keterangan :

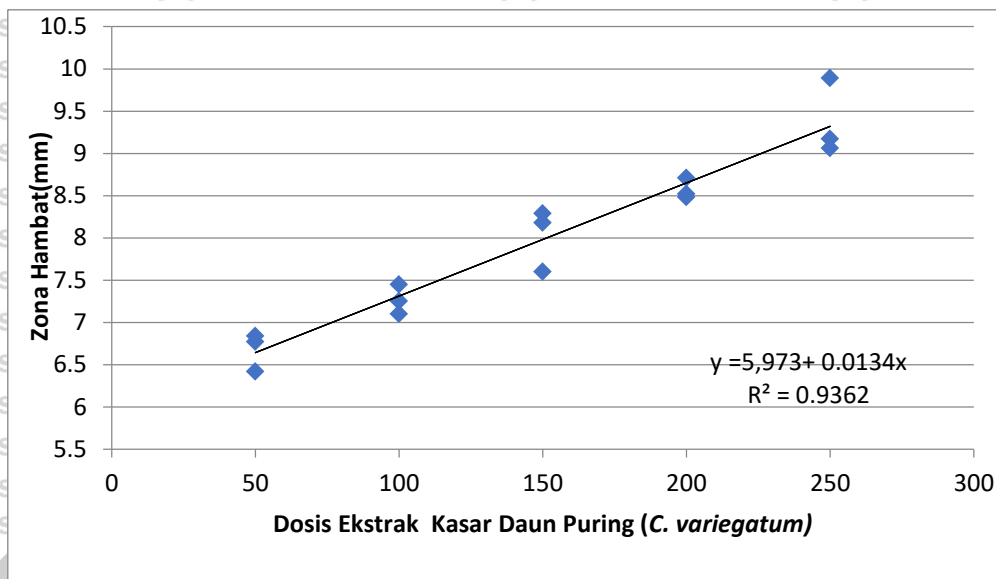
(**) Berbeda Sangat Nyata

(*) Berbeda Nyata

(^{ns}) Tidak Berbeda Nyata

Pada hasil uji BNT Tabel 6. didapatkan hasil dari perlakuan E (250 ppm) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A (50 ppm), B (100 ppm), C (150 ppm) dan D (200 ppm). Hasil tersebut didapatkan berdasarkan pada perlakuan A (50 ppm) yang tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap semua perlakuan sehingga diberi notasi a. Perlakuan B (100 ppm) didapatkan hasil berbeda sangat nyata dengan perlakuan A sehingga diberi notasi b. Perlakuan C (150 ppm) memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap perlakuan B sehingga diberi notasi c. Perlakuan D (200 ppm) memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap perlakuan C sehingga diberikan notasi d, sedangkan perlakuan E (250 ppm) didapatkan hasil berbeda sangat nyata dengan perlakuan A, B, C, D sehingga diberi notasi e. Dari data diatas dapat dianalisis bahwa perlakuan E (250 ppm) merupakan dosis efektif dan terbaik untuk menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescenes*. Kemudian berdasarkan hasil penelitian di dapatkan grafik regresi diameter zona bening yang dihasilkan dengan perlakuan yang berbeda yang disajikan pada Gambar 6.





Gambar 6. Hubungan antara dosis dengan zona hambat

Berdasarkan grafik terlihat bahwa penambahan dosis pada perlakuan ekstrak daun puring (*C. variegatum*) terhadap zona hambat menunjukkan pola linier dengan Koefesien $R^2 = 0,9362$. Nilai R^2 ini menunjukkan bahwa 93% penggunaan ekstrak daun puring (*C. variegatum*) dengan dosis berbeda berpengaruh terhadap daya hambat yang terbentuk, sedangkan 7% nya merupakan faktor error. Pada dosis 50 ppm hingga 250 ppm grafik mengalami peningkatan pada hasil zona hambat (bening). Peningkatan zona bening ini dipengaruhi oleh bertambahnya dosis yang diberikan pada perlakuan.

Menurut Lingga, Pato dan Ross (2015), penambahan konsentrasi senyawa antibakteri diduga dapat meningkatkan penetrasi senyawa antibakteri ke bagian dalam sel mikroba yang akan merusak sistem metabolisme sel dan dapat mengakibatkan kematian sel pertumbuhan bakteri sebagian besar akan semakin menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi antibakteri yang ditambahkan.

Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka jumlah senyawa antibakteri yang

dilepaskan semakin besar, sehingga mempermudah penetrasi senyawa tersebut ke dalam sel.

Berdasarkan hasil uji fitokimia daun puring (*C. variegatum*) di UPT Laboratorium Herbal Materia Medica diketahui bahwa daun puring (*C. variegatum*) memiliki kandungan senyawa aktif berupa flavonoid, alkaloid, tanin dan fenol.

Adapun hasil uji fitokimia daun puring disajikan pada Lampiran 2.

Dalam uji fitokimia untuk mengetahui positif atau tidaknya kandungan flavonoid dapat diketahui dengan adanya perubahan warna kemerahan. Menurut Hassan dan Laily. (2012) sebanyak 200 mg sampel tumbuhan yang telah diekstrak dengan 5 ml etanol dan dipanaskan selama 5 menit di dalam tabung reaksi (membuat larutan uji Selanjutnya ditambah beberapa tetes HCl pekat. Kemudian ditambahkan 0,2 g bubuk Mg. Menurut Ergina, Nuryanti dan Pursitasari (2014) menyatakan bahwa tujuan penambahan logam Mg dan HCl pekat pada pengujian ini adalah untuk mereduksi inti benzopiron yang terdapat dalam struktur flavonoid sehingga terjadi perubahan warna menjadi jingga atau merah.

Menurut Lantah, Lita, Montolalu dan Reo (2017), uji alkaloid positif ditandai dengan adanya endapan berwarna kemerahan dan endapan kecokelatan. Pada reaksi ini terjadi penggantian ligan dimana nitrogen yang mempunyai pasangan elektron bebas pada alkaloid membentuk ikatan kovalen koordinat dengan ion K^+ dari kalium tetraiodobismutat menghasilkan kompleks kalium-alkaloid yang mengendap (Ergina, Nuryanti dan Pursitasari., (2014)

Terdapatnya gugus fenol ditunjukkan dengan warna hijau kehitaman atau biru tua setelah ditambahkan dengan $FeCl_3$, sehingga apabila uji fitokimia dengan $FeCl_3$ memberikan hasil positif dimungkinkan dalam sampel terdapat senyawa fenol

dan dimungkinkan salah satunya adalah tanin karena tanin merupakan senyawa polifenol. Untuk mendeteksi senyawa fenol secara sederhana yaitu menambahkan ekstrak dengan larutan FeCl_3 1 % dalam air, yang menimbulkan warna hijau, merah, ungu, biru atau hitam yang kuat. Terbentuknya warna hijau kehitaman atau biru tinta pada ekstrak setelah ditambahkan dengan FeCl_3 karena tanin akan membentuk senyawa kompleks dengan ion Fe (Putra, Dharmayudha, Sudimartini, 2016),

Menurut Septiani, Dewi dan Wijayanti (2017) mekanisme senyawa antibakteri secara umum dilakukan dengan cara merusak dinding sel, mengubah permeabilitas membran, mengganggu sintesis protein dan menghambat kerja enzim. Senyawa yang berperan dalam merusak dinding sel antara lain fenol, flavonoid, dan alkaloid.

Menurut Hariati, Wahjuningrum, Yuhana, Tarman, Effendi dan Saputra (2018), senyawa fenol dan turunannya dapat merusak membran sel sehingga terjadi perubahan permeabilitas sel yang dapat mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel. Mekanisme penghambatan tersebut terjadi karena senyawa fenol dapat berikatan dengan gugus sulfidrin dari protein. Hal tersebut menyebabkan perubahan konformasi protein membran sel target. Ketidakstabilan pada struktur protein tersebut akan menyebabkan terganggunya fungsi permeabilitas selektif, fungsi pengangkutan aktif, pengendalian susunan protein dan sel bakteri sehingga sel kehilangan bentuk dan lisis.

Menurut Oktaviana, Mursiti, dan Wijayati (2019), kemampuan alkaloid sebagai antibakteri dikarenakan alkaloid dapat menghambat kerja enzim dalam mensintesis protein bakteri, sehingga metabolisme bakteri terganggu. Alkaloid juga dapat menyebabkan kematian pada sel bakteri dengan merusak komponen penyusun peptidoglikan.

Terdapatnya senyawa flavanoid, fenol dan alkaloid dalam daun puring (*C.variegatum*) dapat menghambat bakteri *P. fluorescenes* dengan cara merusak membran bakteri dan terjadi kebocoran sel dan akan mengalami non fungsi sehingga dapat menghambat pertumbuhan hingga mematikan sel bakteri yang diuji.

4.3 Parameter Penunjang

Pada penelitian ini parameter penunjang yang digunakan yaitu suhu inkubator selama inkubasi dengan menggunakan suhu sebesar 32°C. Menggunakan suhu inkubasi sebesar 32°C pada penelitian, maka hasil pembiakan bakteri *P. fluorescenes* sudah dapat tumbuh dengan baik setelah diinkubasi selama 24 jam. Menurut Soesanto, Mugiastuti, Rahayuniati, dan Manan (2011), suhu optimum untuk perkembangan *P. fluorescens* yaitu sekitar 25–35°C. Tanda – tanda bahwa bakteri *P. fluorescenes* sudah tumbuh yaitu pada media agar berwarna hijau kebiruan.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian Pengaruh Ekstrak kasar Daun Puring (*C. variegatum*) terhadap bakteri *P. fluorescenes* secara *In Vitro* dapat disimpulkan bahwa Ekstrak kasar Daun Puring (*C. variegatum*) berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescenes*. Dosis ekstrak kasar daun puring (*C. variegatum*) yang efektif dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescenes* yaitu sebesar 250 ppm dengan rerata zona bening sebesar 9,37

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian dapat disimpulkan bahwa Ekstrak kasar daun Puring (*C. variegatum*) berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescenes* sehingga dapat disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut dengan menggunakan dosis lebih tinggi agar mendapatkan dosis optimum.

DAFTAR PUSTAKA

- Agustiani, Y. R., M. N. Syechalad. 2016. Analisis Faktor – Faktor Yang Mempengaruhi Kontribusi Sektor Perikanan Terhadap Pdrd Di Aceh. Jurnal Ilmiah Mahasiswa (Jim) Ekonomi Pembangunan Fakultas Ekonomi Dan Bisnis Wisyiah. **1**(2):494-503.
- Astriani, M., 2017. Skrining Bakteri Selulolitik Asal Tanah Kebun Pisang (Musa Paradisiaca). Jurnal Biota. **3**(1):1-5.
- Basito, B. 2011. Efektivitas penambahan etanol 95% dengan variasi asam dalam proses ekstraksi pigmen antosianin kulit manggis (*Garcinia mangostana* L.). *Jurnal Teknologi Hasil Pertanian*. **4**(2) : 84-92.
- Cahyono, B., 2001. Budidaya Ikan di Perairan Umum. Yogyakarta. Kanisius.
- Chandra, L dan M. Sitanggang. 2007. Pesona Puring Mengenai Ragam Dan Corak Daun Puring Nan Cantik. Agromedia: Jakarta. 75 hlm.
- De sousa, A. J. P., G. A. R. de araujo torres b, De azerado G.A C. R.C B. Q. Figueredo d, Da silva vasckncekos. M.A A. De souza E. L. 2013. Cadvacrol and 1,8-cineole alone or in combination at sublethal concentrations induce changes in the cell morphology and membrane permeability of pseudomonas fluorescenes in a vegetable based broth. *International Journal of Food Microbiology* **158**: 9–13.
- Dewi, M. A., J. Ratnawati, F. Sukmanengsih. 2015. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Etanol dan Fraksi Pelepah Aren (*Arenga Pinnata* Merr) Terhadap *Propionibacterium Acnes* Dan *Staphylococcus Aureus*. Jurnal Ilmiah Farmasi. **3** (1) 43-48.
- Dewi. Y. S., 2012. Kajian Efektivitas Daun Puring (*C. variegatum*) dan Lidah Mertua (*S. trispasciata*) dalam Menyerap Timbal di Udara Ambien. Jurnal Ilmiah Universitas Satya Negara Indonesia. **5**(2):1-7.
- Donnarumma, G., E.Buommino, A.Fusco, I.Paoletti, L.Auricchio and, M.A.Tufano. 2010. Effect of temperature on the shift of *Pseudomonas fluorescens* from an environmental microorganism to apotential human pathogen. *International journal of immunopathology and pharmacology*vol. **23**(1): 227-234.
- Ergina, S. Nuryanti dan I. D.2014. Pursitasari. Uji kualitatif senyawa metabolit sekunder pada daun palado (*agave angustifolia*) yang diekstraksi dengan pelarut air dan etanol. *J. Akad. Kim.* **3**(3): 165-172.

Fauzy, A., Tarsim dan A. Setyawan. 2014. histopatologiorgan kakap putih (*Lates calcarifer*) dengan infeksi *Vibrio alginolyticus* dan jintan hitam (*Nigella sativa*) sebagai imunostimulan. *Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan*. 3(1) : 320-325.

Gayatri, A. A. I. R., E. Kriswiyanti Dan I. G. A. S. Wahyuni. 2015 Jenis - Jenis Tumbuhan Yang Digunakan Sebagai Bahan Perawatan Kecantikan Di Puri Damai Desa Singakerta, Kecamatan Ubud, Kabupaten Gianyar. *Jurnal Simbiosis Iii* (1): 281- 290.

Gusrina, 2008. Budidaya Ikan Jilid 3. Direktorat Pembinaan Sekolah Menengah Kejuruan. 138 hlm.

Hamidah, M. N., L. Rianingsih dan Romadhon. 2019. Aktivitas antibakteri isolat bakteri asam laktat dari peda dengan jenis ikan berbeda terhadap *E. coli* dan *S. aureus*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Perikanan*. 1(2):11-21.

Hardi, E. H., C. A. Pebrianto Dan G. Saptiani. 2014. Toksisitas Produk Ekstraseluler Dan Intraseluler Bakteri *Pseudomonas Sp.* Pada Ikan Nila (*Oreochromis Niloticus*). *Jurnal Veteriner*. 15(3): 312-322.

Harsojuwono, B. A., I W. Arnata dan G. A. K. D. Puspawati. 2011. Rancangan Percobaan : Teori, Aplikasi SPSS dan Excel. Lintas Kata Publishing. 79 hlm.

Hassan, M. N., A. N. Laily. 2014. Uji Kandungan Flavonoid dan Perbandingan Aktivitas Antioksidan Pada Ekstrak Etanol Simplisia Bunga Pepaya Gantung Saat Kuncup dan Meakar. *Biologi Saintek UIN Maliki Malang J. SB* 1 (1): 1-15

Hariati, S., D. Wahjuningrum, M. Yuhana, K. Tarman, I. Effendi, F. Saputra. 2018. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kapang Laut *Nodulisporium Sp. Kt29* Terhadap *Vibrio Harveyi*. *JPHPI*. 21(2):250-257.

Hermawan, A., S. Amanah dan A. Fatchiya. 2017. Partisipasi pembudidaya ikan dalam kelompok usaha akuakultur di Kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat. 13(1): 1-13.

Ikrom, D. Asih T.R, R. Wira , B. Perkasa , R. Tiara , Wasito. 2014. studi in vitro ekstrak etanol daun kamboja (*plumeria alba*) sebagai anti aeromonas hydrophila. *Jsv*. 32(1): 105-116.

Kiswandono. A. A., 2011. Perbandingan Dua Ekstraksi Yang Berbeda Pada Daun Kelor (*Moringa Oleifera*, Lamk) Terhadap Rendemen Ekstrak Dan Senyawa Bioaktif Yang Dihasilkan. *Jurnal Sains Natural Universitas Nusa Bangsa*. 1(1): 45 – 51.

Kurniawan, 2012. Penyakit Akuatik. Bangka Belitung. UBB Press: 239 hlm

Kusmiyati dan N. W. S. Agustini., 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodeversitas*. 8(1): 48-53.

- Lantah, P. L., A.D.Y Lita, Montolalu, A. R. Reo. 2017. Kandungan fitokimia dan aktivitas antioksidan ekstrak metanol rumput laut kappaphycus alvarezii. *Jurnal Media Teknologi Hasil Perikanan*. **5(3)**:167.
- Lingga, A. R., U. Pato and E. Rossi. 2016. Ekstrak batang kecombrang (*nicolaia speciosa* horan) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jom Faperta*. **3 (1)**:1-15.
- Mawan, A. R., S. E. Indriwati, Suhadi., 2018. Aktivitas antibakteri ekstrak metanol buah *syzygium polyanthum* terhadap pertumbuhan bakteri *Escherichia coli*. *Bioeksperimen*. **4(1)**:64-68.
- Mulyadi, M, Wuryanti, P. R. Sarjono., 2017. Konsentrasi hambat minimum (k_{hm}) kadar sampel alang-alang (*Imperata cylindrica*) dalam etanol melalui metode difusi cakram. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. **20 (3)**:130 – 135.
- Mulyani, Y., E, Bachtiar Dan M. U. Kurnia. 2013. Peranan senyawa metabolit sekunder tumbuhan mangrove terhadap infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas *Cyprinus carpio*. *Jurnal Akuatika*. **4(1)**:1-9.
- Nurhajati, T, K. Sepranianondo, W. P. Lokapirnasari. 2016. Uji aktivitas pertumbuhan *Enterobacter cloacae selulolitik aerob rumen-1* isolat asal limbah cairan rumen sapi peranakan ongole. *Jurnal Veteriner*. **17(3)**: 383-388.
- Nurhidayati, S, Faturrahman, M. Ghazali. 2015. Deteksi Bakteri Patogen Yang Berasosiasi Dengan *Kappaphycus Alvarezii* (Doty) Bergejala Penyakit Ice-Ice. *Jurnal Sains Teknologi & Lingkungan*. **1(2)**:24-30.
- Oktaviana, S., S. Mursiti, dan N. Wijayati. 2019. Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak biji mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) dan sediaan gel hand sanitizer. *Indonesian Journal of Chemical Science*. **8 (2)** 105-110.
- Parlupi, B., R. C. Yudha, Hermanus. 2019. Koleksi Tanaman Kebun Sekolah SDN Tahai Baru 2. WWF. Indonesia- ESD unit.
- Persulesy, E. R., F. Kondolembang, H. Djidin. 2016. Penilaian cara mengajar menggunakan rancangan acak lengkap (studi kasus: jurusan matematika FMIPA UNPATTI). *Jurnal Ilmu Matematika dan Terapan*. **10(1)**: 9 –169.
- Pursetyo, K.T., W. Tjahjaningsih dan H. Pramono. 2015. Perbandingan morfologi kerang darah di Perairan Kenjeran dan Perairan Sedate. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **7(1)**: 31-33.
- Putra, I. W. D. P., A. A. G. O. Dharmayudha, L. M. Sudimartini. 2016. Identifikasi Senyawa Kimia Ekstrak Etanol Daun Kelor (*Moringa oleifera* L) di Bali. *Indonesia Medicus Veterinus*. **5(5)**: 464-473.
- Purwanto, A.W., dan A. Purwanto. 2007. Puring, Yogyakarta. Kanisius: 104 hlm.

Sa'Adah, H., H. Nurhasnawati. 2015. Akademi Farmasi Samarinda Perbandingan Pelarut Etanol Dan Air Pada Pembuatan Ekstrak Umbi Bawang Tiwai (*Eleutherine Americana Merr*) Menggunakan Metode Maserasi. *Jurnal Ilmiah Manuntung*, **1**(2):149-153.

Scales, B. S., R. P. Dickson, J. J. Lipuma Dan G. B. Huffnagle. 2014. Microbiology, Genomics, And Clinical Significance Of The *Pseudomonas Fluorescens* Species Complex, An Unappreciated Colonizer Of Humans *Clinical Microbiology Reviews*. **27**(4): 927–948.

Safrida, Y.D., C. Yulvizar, Dan C.N. Devira. 2012. Isolasi Dan Karakterisasi Bakteri Berpotensi Probiotik Pada Ikan Kembung (*Rastrelliger Sp.*). *Depik*, **1**(3): 200-203.

Septiani, E. N. Dewi dan I. Wijayanti. 2017. Efektivitas antibakteri ekstrak lamun (*Cymodocea rotundata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Journal Of Fisheries Science and Technology*.**13**(1): 1-6.

Sianturi, I. T., A. Prajitno, dan E. Sanoesi . 2019. Uji sensitivitas ekstrak kasar batang ciplukan (*physalis angulata*) terhadap bakteri *Pseudomonas fluorescens* secara in vitro. *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan* **10**(1): 24-30.

Soesanto, L., E. Mugiastuti, R. F. Rahayuniati, Dan A. Manan. 2011. Uji Lapangan Formula Cair *Pseudomonas Fluorescens* P60 Terhadap Layu Fusarium Pada Tanaman Tomat. *Jurnal Perlindungan Tanaman Indonesia*. **17**(2): 82–90.

Sukmadinata dan N. Syaodih. 2008. Metode Penelitian Pendidikan. Bandung: Pt Remaja Rosdakarya. 94 hlm.

Sumadewi, N. L. U. dan D. H. D. Puspaningrum. 2018. Ekstraksi dan identifikasi senyawa kimia pada daun puring (*Codiaeum variegatum*) dengan pelarut air, etanol, etil asetat dan n-heksana *Jurnal Kimia*. **12** (1): 70 -73.

Suryani, T. V. 2008. Galeri 104 Pilihan Puring. Denpasar. Niaga swadaya: 114 hlm.

Susanti, N. 2016. Aktivitas Antimikroba Ekstrak Rimpang Jeringau (*Acorus Calamus*) Terhadap Pertumbuhan *Candida Albicans*. *Jurnal Biodjati*. **1**(1):55-58.

Toha, M., Diki, S. Utami, M. Dwisatyadani. 2016. Peran Matematika, Sains Dan Teknologi Dalam Mendukung Gaya Hidup Perkotaan Yang Berkualitas. *Universitas Terbuka*. Hal 291.

Wirawan, I. K. A. W., S. A. M. P. Suryani, I W. Arya. 2017. Diagnosa, analisis dan identifikasi parasit yang menyerang ikan nila (*Oreochromis niloticus*) pada kawasan budidaya ikan di subak "baru" Tabanan. *Gema Agro*. **23**(2): 63-78.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Biokimia



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
 DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA
 BALAI BESAR PERIKANAN BUDIDAYA AIR PAYAU
 LABORATORIUM UJI BBPBAP JEPARA
 Alamat surat: PO Box 1 Jepara, Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59416
 Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724
www.bbpbapjepara.djpb.kkp.go.id ; Email: bbpbapjpr@gmail.com

HASIL UJI BIOKIMIA

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

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

Lab. Mikrobiologi BBPBAP Jepara


Penyelia



Sri-Murni Astuti, SP.



Lampiran 2. Hasil Uji Fitokimia



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

65313

Nomor : 074 / 15D / 102.7 / 2020
 Sifat : Biasa
 Perihal : **Surat Keterangan Analisa Kualitatif**

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

1. Identitas Pemohon







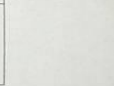
Nama	NIM	Instansi
Annisa Isti F.	165080501111018	Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan,
M. Yusuf	165080501111016	Universitas Brawijaya, Malang

2. Identitas Sampel
 Nama daerah sampel : Puring
 Nama latin : *Codiaeum variegatum (L.) Rumph.*
 Bagian sampel : Daun
 Bentuk sampel : Serbuk
 Tanggal penerimaan : 27 Januari 2020
 Tanggal pemeriksaan : 28 Januari 2020

3. Hasil

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

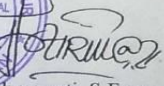
4. Lampiran

Nama Sampel	Flavonoid	Alkaloid		
		Meyer	Dragendrof	Bouchardat
Serbuk Daun Puring (<i>Codiaeum variegatum (L.) Rumph.</i>)				
Nama Sampel	Tanin	Saponin		Fenol
		Saponin		
Serbuk Daun Puring (<i>Codiaeum variegatum (L.) Rumph.</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, 29 Januari 2020
 An. Ka. UPT Laboratorium Herbal Materia Medica Batu
 Kepala Seksi Pelayanan Laboratorium Herbal

 Fitri Rahmawati, S.Farm., Apt.
 NIP. 19900430 201403 2 002



Lampiran 3. Alat dan Bahan- Penelitian










a. Alat-alat

		
<p>Inkubator</p>	<p>Corong</p>	<p>Autoclave</p>
		
<p>Rak Tabung Reaksi</p>	<p>Botol Film</p>	<p>Bunsen</p>
		
<p>Bola Hisap</p>	<p>Cawan Petri</p>	<p>Erlenmeyer</p>

Lampiran 3. Alat dan Bahan Penelitian (lanjutan)





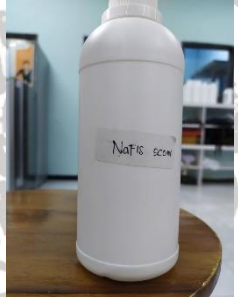






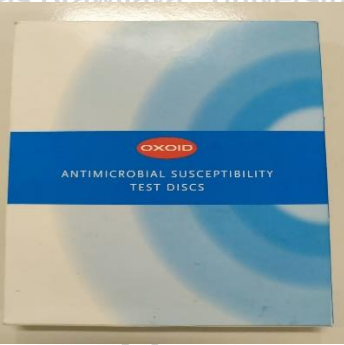
		
<p>Hot Mixer</p>	<p>Lemari Pendingin</p>	<p>Gelas Ukur</p>
		
<p>Pinset</p>	<p>Triangel</p>	<p>Spatula</p>
		
<p>Jarum Ose</p>	<p>Destruktor</p>	<p>Blender</p>

Lampiran 3. Alat dan Bahan Penelitian (lanjutan)

		
<p>Rotary Vacuum Evaporator</p>	<p>Blue Tip</p>	<p>Mikroskop</p>
		
<p>Laminary Air Flow</p>	<p>Objek Gelas</p>	<p>Cover Gelas</p>
		
<p>Jangka Sorong</p>	<p>Timbangan Digital</p>	<p>Korek Api</p>

Lampiran 3. Alat dan Bahan Penelitian







b. Bahan-bahan Penelian







		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Larutan Lugol	Aquadest
		
Sarung tangan lateks	Larutan NaFis	Larutan Kristal Violet
		
Larutan Safranin	Masker	Antibiotik Tetracycline
		

Ethanol 96%	TSB	Kertas Cakram
		
Wrap	PSA	Alumunium Foil
		
Serbuk daun puring		

Lampiran 4. Foto Kegiatan Penelitian
a. Pembuatan Ekstrak Daun Puring (*C. variegatum*)









<p>1</p> 	<p>2</p> 
<p>Daun puring segar dipetik</p>	<p>Daun puring dikeringkan</p>
<p>3</p> 	<p>4</p> 
<p>Dilakukan penghancuran daun dengan blender hingga menjadi serbuk</p>	<p>5 Ditimbang serbuk daun puring sebanyak 250 gram</p>
<p>5</p> 	<p>6</p> 
<p>Dimasukan ke dalam toples</p>	<p>Ditambahkan etanol 96%</p>

<p>7</p> 	<p>8</p> 
<p>Toples dibungkus dengan aluminium foil dan plastik warp</p>	<p>Dilakukan maserasi selama 2 hari (setiap 24 jam digoyang)</p>
<p>9</p> 	<p>10</p> 
<p>Dilakukan penyaringan</p>	<p>Larutan maserasi dievaporasi dengan Rotary Vacum Evaporator, suhu 50°C, kecepatan 80 rpm hingga menjadi pasta (±7 jam)</p>
<p>11</p> 	<p>12</p> 
<p>Hasil pasta dimasukkan kedalam botol film (dibungkus aluminium foil)</p>	<p>Dimasukkan kedalam lemari pendingin</p>

Lampiran 4. Foto Kegiatan Penelitian (Lanjutan)

b. Peremajaan Bakteri *P. fluorescens*

	
<p>1</p> <p>Ditimbang media PSA</p>	<p>2</p> <p>Ditambahkan aquades dan dihomogenkan</p>
	
<p>3</p> <p>Dimasukkan media ke dalam tabung reaksi</p>	<p>4</p> <p>Dimasukkan kedalam autoclave</p>
	
<p>5</p> <p>Dimiringkan dengan sudut 30°C</p>	<p>6</p> <p>Diambil satu gores bakteri isolat</p>

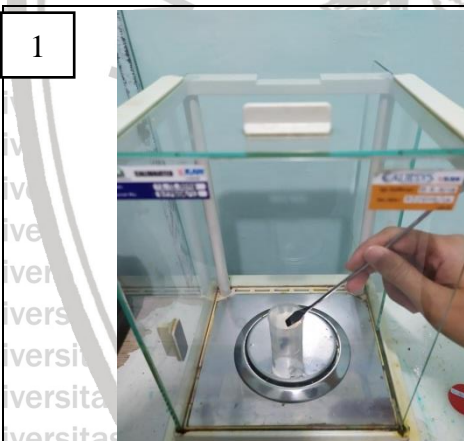


(Lanjutan)



Terakhir dilakukan inkubasi selama 24-48 jam

c. . Pembuatan Dosis Penelitian



Penimbangan ekstrak dosis starter 0.0025 gr



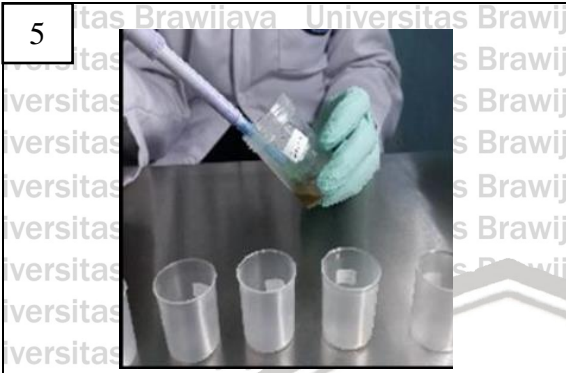
Penambahan dosis DMSO 100%



Vortex campuran ekstrak dan DMSO



Ditambahkan aquades steril



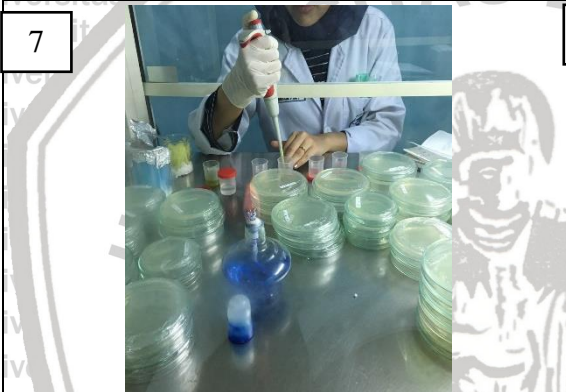
5

Dilakukan pembuatan dosis sesuai kebutuhan



6

Dilakukan vortex kembali



7

Dosis ekstrak yang telah diambil ditambahkan DMSO 10%



8







Dilakukan vortex



9

Terakhir dilakukan perendaman kertas cakram

Uji Cakram

<p>1</p> 	<p>2</p> 
<p>Penuangan media PSA</p>	<p>Pengenceran bakteri</p>
<p>3</p> 	<p>4</p> 
<p>Bakteri <i>P. fluorescens</i> di tanam pada media dan diratakan menggunakan triangle</p>	<p>Peletakan kertas cakram</p>
<p>5</p> 	<p>6</p> 
<p>Media dibungkus menggunakan wrap</p>	<p>Di inkubasi selama 24-48 jam</p>





Hasil yang didapatkan diukur menggunakan jangka sorong

Lampiran 5. Perhitungan Dosis Ekstrak kasar Daun Puring (*Codiaeum variegatum*)

Pelarut yang digunakan dalam pembuatan ekstrak kasar dosis uji yaitu

DMSO 10%, adapun perhitungan dosis yang digunakan sebagai berikut:

a. Dosis 5000 ppm

Pembuatan dosis 5000 ppm merupakan dosis stok ekstrak kasar daun puring tertinggi yang digunakan dalam pembuatan dosis 50 – 250 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 50 ppm

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

$$1,5 \text{ ml} \times 50 = V2 \times 5000$$

$$V2 = 0,015 \text{ ml}$$

$$\text{DMSO 10 \%} = 1,5 \text{ ml} - 0,015 \text{ ml} = 1,485 \text{ ml}$$

c. Dosis 100 ppm





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

$$1,5 \text{ ml} \times 100 = V_2 \times 5000$$

$$V_2 = 0,03 \text{ ml}$$

$$\text{DMSO } 10\% = 1,5 \text{ ml} - 0,03 \text{ ml} = 1,470 \text{ ml}$$

d. Dosis 150 ppm

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

$$1,5 \text{ ml} \times 150 = V_2 \times 5000$$

$$V_2 = 0,045 \text{ ml}$$

$$\text{DMSO } 10\% = 1,5 \text{ ml} - 0,045 \text{ ml} = 1,455 \text{ ml}$$

e. Dosis 200 ppm

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

$$1,5 \text{ ml} \times 200 = V_2 \times 5000$$

$$V_2 = 0,06 \text{ ml}$$

$$\text{DMSO } 10\% = 1,5 \text{ ml} - 0,06 \text{ ml} = 1,440 \text{ ml}$$

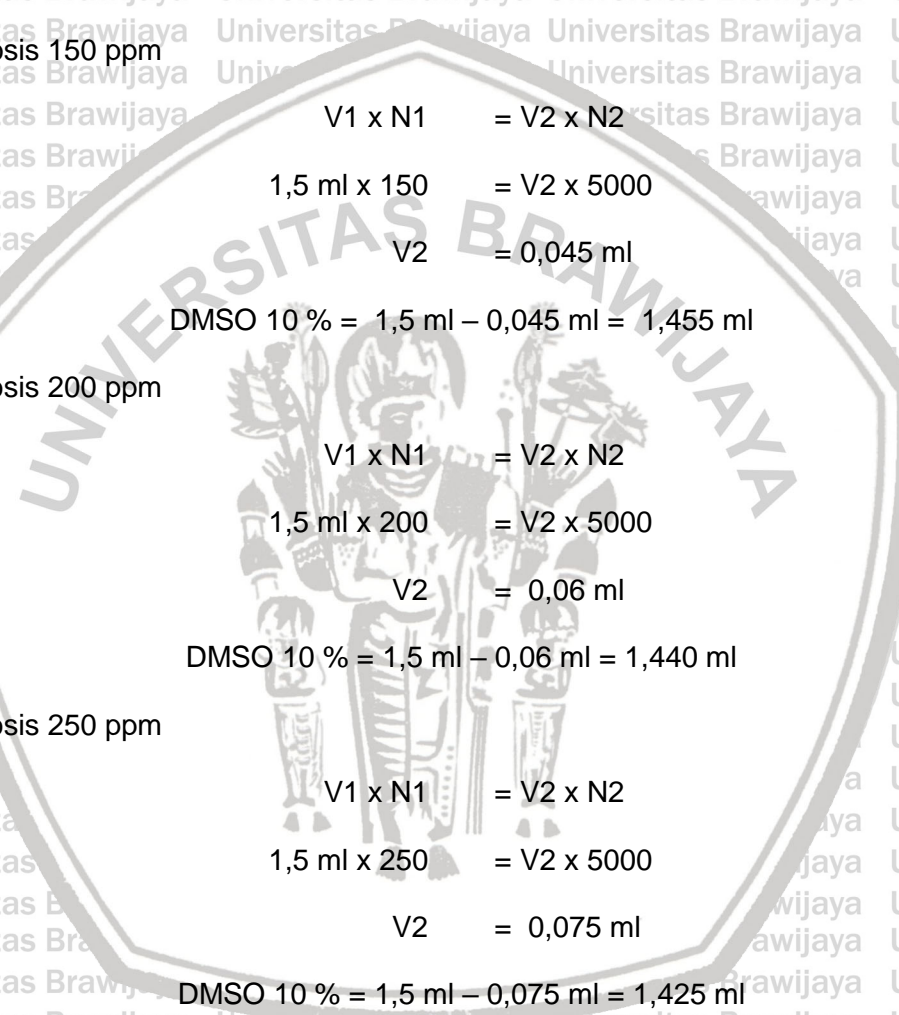
f. Dosis 250 ppm

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













$$1,5 \text{ ml} \times 250 = V_2 \times 5000$$

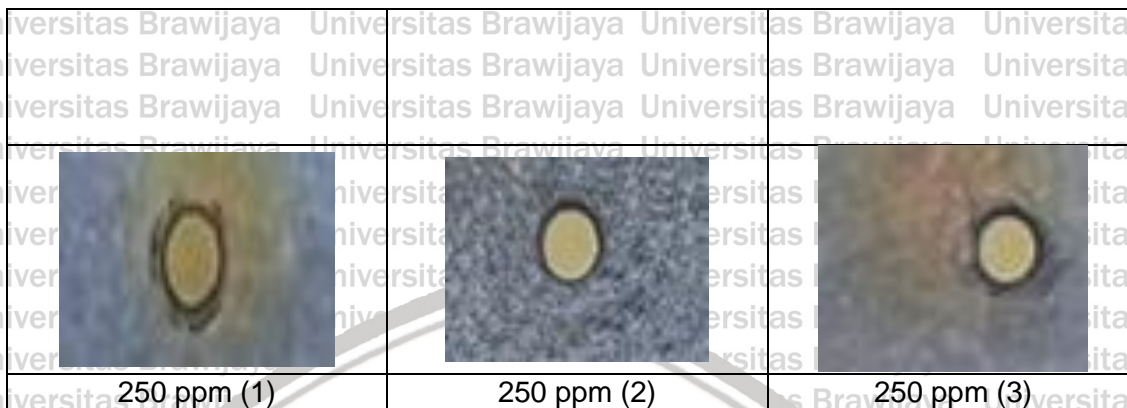
$$V_2 = 0,075 \text{ ml}$$

$$\text{DMSO } 10\% = 1,5 \text{ ml} - 0,075 \text{ ml} = 1,425 \text{ ml}$$



Lampiran 6. Foto Hasil Uji Cakram

		
50 ppm (1)	50 ppm (2)	50 ppm (3)
		
100 ppm (1)	100 ppm (2)	100 ppm (3)
		
150 ppm (1)	150 ppm (2)	150 ppm (3)
		
200 ppm (1)	200 ppm (2)	200 ppm (3)



Lampiran 7. Analisis Data Pengaruh Daya Hambat Antibakteri.

1. Data Rerata Zona Hambat

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata ± STDEV
	1	2	3		
A (50 ppm)	6,42	6,77	6,84	20,03	6,68 ± 0,23
B (100 ppm)	7,1	7,45	7,25	21,8	7,27 ± 0,18
C (150 ppm)	8,18	8,29	7,6	24,07	8,02 ± 0,37
D (200 ppm)	8,52	8,71	8,48	25,71	8,57 ± 0,12
E (250 ppm)	9,17	9,06	9,89	28,12	9,37 ± 0,45
Total				119,73	

Faktor Koreksi (FK)	955,68
JK total	14,37
JK Perlakuan	13,49
JK Acak	0,87

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

$$= \frac{119,73^2}{15}$$

$$= 955,68$$

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

$$= (A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + D3^2) - FK$$

$$= (6,42^2 + 6,77^2 + 6,84^2 + \dots + 9,89^2) - 955,68$$

$$= 14,37$$



$$\begin{aligned}
 \text{c. JK Perlakuan} &= \frac{\sum (\sum x_i)^2}{r} - FK \\
 &= \frac{(TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2)}{r} - FK \\
 &= \frac{20,03^2 + 21,8^2 + 24,07^2 + 25,71^2 + 28,12^2}{3} - 955,68 \\
 &= 13,49
 \end{aligned}$$

Lampiran 7. Analisis Data Pengaruh Daya Hambat Antibakteri (Lanjutan)

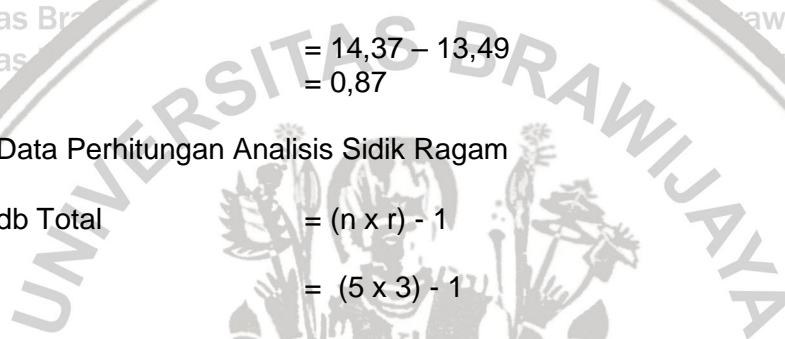
$$\begin{aligned}
 \text{d. JK Acak} &= JK \text{ Total} - JK \text{ Perlakuan} \\
 &= 14,37 - 13,49 \\
 &= 0,87
 \end{aligned}$$

2. Data Perhitungan Analisis Sidik Ragam

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

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

$$\begin{aligned}
 \text{c. db Galat} &= db \text{ Total} - db \text{ Perlakuan} \\
 &= 15 - 5 \\
 &= 10
 \end{aligned}$$



➤ **Tabel Analisis Sidik Ragam**

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	13,49	3,37	38,58	3,48	5,99
Acak	10	0,87	0,08			
Total	14					

Keterangan : * : Berbeda Sangat Nyata

Berdasarkan hasil analisis sidik ragam di atas menunjukkan bahwa nilai F hitung (38,58) lebih besar dari F tabel 5% yaitu 3,48 maupun F tabel 1% sebesar 5,99 maka H_0 ditolak, hal ini berarti bahwa perbedaan perlakuan berpengaruh sangat nyata. Setelah H_0 ditolak, selanjutnya dilakukan uji nilai tengah (rata-rata) antar perlakuan atau disebut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Lampiran 7. Analisis Data Pengaruh Daya Hambat Antibakteri (Lanjutan)

3. Data Uji Beda Nyata Terkecil

a. $SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ acak}}{\text{ulangan} (r)}} = \sqrt{\frac{2 \times 0,08}{3}} = 0,03$

b. $BNT \ 5\% = t_{(0,05;dbG)} SED = 2,288 \times 0,24 = 0,06$

c. $BNT \ 1\% = t_{(0,01;dbG)} SED = 3,169 \times 0,24 = 0,09$

➤ **Tabel Anova Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)**

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		6,68	7,27	8,02	8,57	9,37	
A	6,68	-					a
B	7,27	0,59**	-				b
C	8,02	1,34**	0,75**	-			c
D	8,57	1,89**	1,30**	0,55**	-		d
E	9,37	2,69**	2,11**	1,35**	0,80**	-	e

Keterangan :

ns : Tidak berbeda nyata

* : Berbeda nyata

** : Berbeda sangat nyata



➤ **Tabel Uji Polinomial Orthogonal**

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan Ci			
		Linear	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	20,03	-2	2	-1	1
B	21,8	-1	-1	2	-4
C	24,07	0	-2	0	6
D	25,71	1	-1	-2	-4
E	28,12	2	2	1	1
Q=∑Ci*Ti		20,09	0,65	0,27	2,53
Hasil Kuadrat		10	14	10	70
Kr=(∑Ci^2)*r		30	42	30	210
JK=Q^2/Kr		13,4536033	0,010059524	0,00243	0,03048
Total JK regresi	13,49657				

Lampiran 7. Analisis Data Pengaruh Daya Hambat Antibakteri (Lanjutan)

➤ **Tabel Sidik Ragam Regresi**

Sbr. Keragaman	Db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	13,497			3,48	5,99
Linear	1	13,454	13,454	153,85**		
Kuadratik	1	0,010	0,010	0,115 ^{ns}		
Kubik	1	0,002	0,002	0,028 ^{ns}		
Kuartik	1	0,030	0,030	0,349*		
Acak	10	0,874	0,087			
Total	14	27,868				

Keterangan :

** = Berbeda sangat nyata

ns = Tidak berbeda nyata

R Linier = $\frac{JK \text{ reg. Linier}}{(Jk \text{ linier} + Jk \text{ acak})} = 0,93$

R kuadrat = $\frac{JK \text{ reg. kuad}}{(Jk \text{ kuadrat} + Jk \text{ acak})} = 0,011$

R kubik = $\frac{JK \text{ reg. Kubik}}{(Jk \text{ kubik} + Jk \text{ acak})} = 0,002$



Dari hasil sidik ragam terlihat bahwa regresi linear berbeda sangat nyata, berarti regresi yang sesuai untuk kurva respon ini adalah regresi linier, karena regresi linear memiliki nilai F hitung lebih besar jika dibandingkan dengan F hitung pada regresi kuadratik, dan regresi kubik.

Lampiran 7. Analisis Data Pengaruh Daya Hambat Antibakteri (Lanjutan)

X	Y	Xy	x ²
X	Y	XY	X kuadrat
50	6,42	342	2500
50	6,77	321	2500
50	6,84	338,5	2500
100	7,1	710	10000
100	7,45	745	10000
100	7,25	725	10000
150	8,18	1227	22500
150	8,29	1243,5	22500
150	7,6	1140	22500
200	8,52	1704	40000
200	8,48	1696	40000
200	8,71	1742	40000
250	9,17	2292,5	62500
250	9,06	2265	62500
250	9,89	2472,5	62500
Σx= 2250	Σx = 19,73	Σx = 18964	Σx = 412500
Rerata = 150	7,98		

$$B_0 = \frac{(\Sigma Y) - (\Sigma x^*) - (\Sigma x)(\Sigma xy)}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

$$= 5,973$$

$$B_1 = \frac{n(\Sigma xy) - (\Sigma x)(\Sigma y)}{n \Sigma x^2 - (\Sigma x)^2}$$

$$= 0,0134x$$

Persamaan linier : $y = 5,973 + 0,0134x$



Lampiran 7. Analisis Data Pengaruh Daya Hambat Antibakteri (Lanjutan).

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

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

$$= \frac{13,497 + 0,874}{13,497 + 14,371}$$

$$= 0,93$$

➤ Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Puring (*C. variegatum*)

Terhadap Daya Hambat Bakteri *P. fluorescenes* Secara *In Vitro*

