



**PENGARUH EKSTRAK DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*)  
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI  
*Pseudomonas aeruginosa* SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

Oleh:

**SANDHY ILYASA ASTAQH FIRNANDA  
NIM. 175080500111016**



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

**2021**



**PENGARUH EKSTRAK DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*)  
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI  
*Pseudomonas aeruginosa* SECARA *IN VITRO***

**SKRIPSI**

Oleh :

**SANDHY ILYASA ASTAQH FIRNANDA**  
NIM. 175080500111016



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN  
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN  
FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN  
UNIVERSITAS BRAWIJAYA  
MALANG  
2021**



**SKRIPSI**

**PENGARUH EKSTRAK DAUN TEH HIJAU (*Camellia sinensis*) TERHADAP  
DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa* SECARA *IN VITRO***

Oleh:

**SANDHY ILYASA ASTAQH FIRNANDA**

**NIM. 175080500111016**

Telah dipertahankan di depan penguji  
pada tanggal 30 Desember 2021  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

**Dosen Pembimbing 1**

**(Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS.)**

**NIP. 19611106 198602 2 001**

**Tanggal: 12 Januari 2022**

**Menyetujui,**

**Dosen Pembimbing 2**

**(Rani Yuwanita, S.Pi, MP.)**

**NIP. 20150686 0612 2 001**

**Tanggal: 12 Januari 2022**

**Mengetahui,  
Ketua Jurusan  
Manajemen Sumberdaya Perairan**



**(Dr. Ir. Muhamad Firdaus, MP)**

**NIP. 19680919 200501 1 001**

**Tanggal: 13 / 03 / 2022**



## PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Sandhy Ilyasa Astaqhfirmanda  
NIM : 175080500111016  
Judul Skripsi : Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*

Menyatakan bahwa penulisan skripsi ini berdasarkan hasil penelitian, pemikiran dan penulisan dari saya sendiri, baik tulisan, tabel, gambar maupun isi lainnya yang tercantum sebagai bagian dari Skripsi. Apabila terdapat karya / pendapat / penelitian dari orang lain, maka telah saya cantumkan sumber yang jelas dalam daftar pustaka.

Demikian pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar tanpa adanya paksaan dari pihak manapun, jika di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Brawijaya, Malang.

Malang, Desember 2021

Sandhy Ilyasa Astaqhfirmanda  
NIM. 175080500111016

**IDENTITAS TIM PENGUJI**

Judul : Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*)  
terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*  
secara *In Vitro*

Nama Mahasiswa : Sandhy Ilyasa Astaqhfiranda

NIM : 175080500111016

Program Studi : Budidaya Perairan

**PENGUJI PEMBIMBING:**

Pembimbing 1 : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS.

Pembimbing 2 : Rani Yuwanita, S.Pi, MP.

**PENGUJI BUKAN PEMBIMBING:**

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

Tanggal Ujian : 30 Desember 2021.



## UCAPAN TERIMAKASIH

Alhamdulillah penulis ucapkan atas karunia dan kesehatan yang diberikan Allah SWT sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik. Penulis menyampaikan terimakasih atas dukungan dari berbagai pihak kepada:

1. Ibu Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS. selaku pembimbing 1 dan Ibu Rani Yuwanita, S.Pi, MP. selaku dosen pembimbing 2 yang telah memberikan bimbingan serta arahan.
2. Bapak Nasrullah Bai Arifin, S.Pi, M.Sc. selaku dosen penguji yang telah bersedia untuk menguji serta membimbing.
3. Kedua orang tua saya yang selalu memberikan doa, semangat dan dukungan dalam menyelesaikan studi.
4. Tim Bakteri (Putriadji, Eka, Desy, Dita, dan Rendy), Yuli, Sugiarti, Arifan, Alfie, tim laboran, dan teman-teman Budidaya Perairan angkatan 2017 yang telah membantu dan memberikan dukungan sehingga dapat menyelesaikan studi ini dan semua pihak yang telah membantu dalam menyelesaikan studi ini.

Malang, 18 Desember 2021

Penulis

## RINGKASAN

**Sandhy Ilyasa Astaqhfirmanda.** Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*. Dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS** dan **Rani Yuwanita, S.Pi, MP.**

Intensifikasi budidaya meningkatkan peluang serangan penyakit pada ikan oleh bakteri hingga 33,9% dari penyebab penyakit lainnya. *Pseudomonas aeruginosa* merupakan bakteri yang bersifat patogen oportunistik, dan dapat menyebabkan infeksi pada individu dengan ketahanan tubuh yang menurun, serta cukup sering ditemukan pada perairan tawar. Kerugian kematian sekitar 173 ton ikan dan benih dan ekonomi yang mencapai 60% pembudidaya ikan tawar menjadikan alasan penelitian mencari alternatif pengobatan dan pencegahan sehingga tidak menimbulkan banyak residu atau limbah perairan. Ekstrak tanaman secara tradisional, salah satunya daun teh hijau (*Camellia sinensis*) telah banyak diteliti memiliki bahan aktif antibakteri sangat signifikan, meliputi alkaloid, flavonoid, tanin/fenol, dan saponin yang diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) terhadap daya hambat bakteri *P. aeruginosa* secara *in vitro* dan mengetahui dosis MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) yang digunakan untuk uji cakram bakteri. Penelitian dilaksanakan pada Juni 2021 di CV. Sumber Rejeki Bandaran, Pasuruan menggunakan metode eksperimen dengan RAL (Rancangan Acak Lengkap) pemberian dosis ekstrak daun teh hijau yang berbeda, yaitu A (110 ppm), B (120 ppm), C (130 ppm), D (140 ppm), dan E (150 ppm) dengan kontrol positif menggunakan antibiotik *tetracycline* 30 ppm, serta kontrol negatif tanpa pemberian ekstrak. Setiap perlakuan diulang sebanyak empat kali. Parameter uji yang digunakan berupa hasil pengamatan zona bening yang terbentuk sekitar kertas cakram yang telah ditumbuhi oleh bakteri *P. aeruginosa* dengan dosis ekstrak yang berbeda. Data yang didapat dianalisis dengan *Analysis of Variance* (ANOVA) sesuai rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ).

Data hasil yang didapatkan pada penelitian ini adalah sebagai berikut. Ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) terbukti dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* dengan dosis minimum 100 ppm melalui uji MIC terlebih dahulu. Hasil rata-rata zona bening yang didapatkan dari uji cakram pada penelitian adalah 110 ppm (7,63 mm), 120 ppm (7,86 mm), 130 ppm (8,48 mm), 140 ppm (9,38 mm), dan 150 ppm (10,27 mm). Hasil menunjukkan hubungan antara penambahan dosis perlakuan ekstrak daun teh terhadap diameter zona hambat berupa pola linier dengan persamaan  $y = -0,110 + 0,068x$  dan koefisien  $R^2 = 0,9366$ . Hubungan antara pemberian dosis ekstrak daun teh hijau dalam menghambat bakteri *P. aeruginosa* memiliki respon yang semakin tinggi dosis, maka akan semakin besar zona bening yang terbentuk. Hasil tertinggi pada penelitian yaitu pada dosis 150 ppm sebesar 10,27 mm dan hasil terendah pada dosis 110 ppm sebesar 7,63 mm.

## SUMMARY

**Sandhy Ilyasa Astaghfirnanda.** Effect of Green Tea's Leaf (*Camellia sinensis*) Extract on Inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* Bacteria *In Vitro*. Under the guidance of **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS** and **Rani Yuwanita, S.Pi, MP.**

Aquaculture developed rapidly in the era of industrialization. Intensification of cultivation is marked by an increase in stocking density, causing obstacles, one of which is the increased chance of disease attack on fish by bacteria up to 33.9%. *Pseudomonas aeruginosa* is an opportunistic pathogen, and can cause infection in individuals with decreased body resistance, and is quite often found in freshwater. The loss of mortality of around 173 tons of fish and seeds and the economy that reaches 60% of freshwater fish farmers are the reasons for research to found alternative treatment and prevention, so that it does not cause a lot of residue or aquatic waste. Extract of Traditional plant, green tea's leaf (*Camellia sinensis*) has been widely studied to have very significant antibacterial active ingredients, including alkaloids, flavonoids, tannins/phenols, and saponins which are thought to inhibit bacterial growth.

This study was determine the effect of green tea's leaf (*C. sinensis*) extract on the inhibition of *P. aeruginosa* bacteria in vitro and to determine the dose of MIC (Minimum Inhibiton Concetration) used for the bacterial disc test. The research was conducted in June 2021 at CV. Sumber Rejeki Bandaran, Pasuruan used an experimental method with RAL (Completely Randomized Design) giving different doses of green tea's leaf extract, A (110 ppm), B (120 ppm), C (130 ppm), D (140 ppm), and E (150 ppm) with four repetition in every treatment, also positive control using 30 ppm of *tetracycline* as antibiotic, and negative control without extract. The test parameters used were observations of the clear zone formed around the paper discs that had been overgrown with *P. aeruginosa* bacteria with different extract doses. The data obtained were analyzed by Analysis of Variance (ANOVA) according to the design used, namely Completely Randomized Design (CRD) at a confidence level 95% ( $\alpha=0,05$ ).

The data obtained in this study are as follows. Green tea's leaf (*C. sinensis*) extract can inhibit the growth of *P. aeruginosa* bacteria with a minimum dose of 100 ppm through the MIC test first. The average of the clear zone results obtained from the disc test in this study were 110 ppm (7,63 mm), 120 ppm (7,86 mm), 130 ppm (8,48 mm), 140 ppm (9,38 mm), and 150 ppm (10,27 mm). The results showed the relationship between the addition of tea leaf's extract treatment dose to the diameter of the inhibition zone in the form of a linear pattern with the equation  $y = 0,068x - 0,110$  and the coefficient  $R^2 = 0,9366$ . The relationship between the dose of green tea leaf extract in inhibiting *P. aeruginosa* bacteria has a response that the higher the dose, the greater the clear zone formed. The highest results in the study were at a dose of 150 ppm of 10,27 mm and the lowest result was at a dose of 110 ppm of 7,63 mm.



## KATA PENGANTAR

Alhamdulillah atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi yang berjudul "Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *In Vitro*" dengan baik. Laporan skripsi ini menyajikan proses dan hasil pembuatan bioaktif penghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* menggunakan ekstrak daun teh hijau dengan parameter utama yang diamati yaitu daya hambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*.

Penulis menyadari bahwa laporan skripsi ini masih banyak memiliki kekurangan yang mendasar. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran yang dapat membangun dari pembaca untuk menyempurnakan penulisan selanjutnya, agar tulisan ini tidak mengurangi nilai manfaat yang ingin disampaikan penulis kepada pembaca. Demikian penulis sampaikan terimakasih.

Malang, 18 Desember 2021

Sandhy Ilyasa Astaghfirnanda  
175080500111016



## DAFTAR ISI

	Halaman
<b>PERNYATAAN ORISINALITAS</b> .....	<b>iv</b>
<b>IDENTITAS TIM PENGUJI</b> .....	<b>v</b>
<b>UCAPAN TERIMAKASIH</b> .....	<b>vi</b>
<b>RINGKASAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>SUMMARY</b> .....	<b>viii</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xiii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xiv</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Hipotesis.....	4
1.5 Manfaat.....	5
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>6</b>
2.1 Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	6
2.1.2 Infeksi dan Tanda Penyerangan.....	7
2.2 Teh Hijau ( <i>Camellia sinensis</i> ).....	9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	9
2.2.2 Bahan Aktif.....	10
2.2.3 Aktivitas Antimikroba.....	12
2.3 Uji Efektivitas Antimikroba secara <i>In Vitro</i> .....	14
2.4 Ekstraksi dengan Metode Maserasi.....	15
<b>3. MATERI DAN METODE PENELITIAN</b> .....	<b>17</b>
3.1 Tempat, Waktu/ Jadwal Pelaksanaan.....	17
3.2 Materi Penelitian.....	17
3.2.1 Alat dan Bahan.....	17
3.3 Metode Penelitian.....	18
3.4 Rancangan Penelitian.....	19
3.5 Prosedur Penelitian.....	21
3.5.1 Persiapan Penelitian.....	21
3.5.2 Pelaksanaan Penelitian.....	29



3.6 Parameter Uji Penelitian.....	31
3.7 Analisis Data.....	31
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>33</b>
4.1 Uji MIC ( <i>Minimum Inhibiting Concentration</i> ).....	33
4.2 Uji Cakram.....	34
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>43</b>
5.1 Kesimpulan.....	43
5.2 Saran.....	43
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>44</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>50</b>



## DAFTAR GAMBAR

### Gambar

### Halaman

1. Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	7
2. a) Daun Teh Hijau Kering b) Daun Teh Hijau ( <i>C. sinensis</i> ) .....	10
3. Mekanisme Penghambatan Bakteri oleh Senyawa Antibakteri .....	13
4. Denah Penelitian .....	21
5. Hasil Uji MIC ( <i>Minimum Inhibiting Concentration</i> ) .....	33
6. Hasil Uji Cakram .....	36
7. Hubungan Antara Dosis dengan Diameter Zona Bening .....	39
8. Luasan Zona Bening Perlakuan .....	42



## DAFTAR TABEL

Tabel

Halaman

1. Kandungan Kimia Pucuk Teh Segar.....	11
2. Komposisi Substansi Polifenol pada Teh.....	11
3. Alat - Alat Penelitian.....	17
4. Bahan - Bahan Penelitian.....	18
5. Larutan Standar Mc. Farland.....	24
6. Hasil Uji MIC Menggunakan Spektrofotometer.....	34
7. Hasil Rerata Zona Bening Bakteri <i>P. aeruginosa</i> .....	36
8. Kategori Respon Daya Hambat Bakteri <i>P. aeruginosa</i> .....	37
9. Analisa Sidik Ragam Zona Hambat Bakteri <i>P. aeruginosa</i> .....	38
10. Uji BNT Zona Hambat Bakteri <i>P. aeruginosa</i> .....	38



## DAFTAR LAMPIRAN

## Lampiran

## Halaman

1. Alat Penelitian.....	50
2. Bahan Penelitian.....	54
3. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>P. aeruginosa</i> .....	57
4. Hasil Uji Fitokimia Daun Teh Hijau ( <i>C. sinensis</i> ).....	58
5. Perhitungan Ekstrak Daun Teh Hijau ( <i>C. sinensis</i> ).....	59
6. Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Teh Hijau ( <i>C. sinensis</i> ).....	60
7. Hasil Uji Cakram.....	61
8. Perhitungan Data Hasil Penelitian.....	62

# 1. PENDAHULUAN

## 1.1 Latar Belakang

Usaha perikanan budidaya berkembang pesat pada era industrialisasi, hal ini berkaitan dengan pemenuhan kebutuhan pangan dengan nilai gizi yang tinggi dan kebutuhan pasar terhadap komoditas perikanan terus mengalami peningkatan, sedangkan hasil tangkapan nelayan semakin menurun (Winarsih, *et al.*, 2011). Permintaan hasil perikanan yang semakin tinggi menjadikan masyarakat menerapkan sistem budidaya intensif bahkan super intensif. Intensifikasi budidaya ditandai dengan adanya peningkatan padat penebaran, sehingga menimbulkan kendala, salah satunya meningkatnya peluang terserangnya penyakit pada ikan. Perkembangan usaha budidaya hingga saat ini masih sering terkendala oleh berbagai sebab, salah satunya penyakit, sebanyak 33,9% disebabkan oleh bakteri, 20,7% protozoa, dan sisanya disebabkan oleh virus, jamur, cacing dan krustasea (Kamelia, *et al.*, 2018).

Penyakit pada ikan dapat disebabkan oleh parasit, jamur, bakteri, dan virus. Penyakit bakteri merupakan salah satu kendala pada budidaya ikan yang sering menyerang dan menyebabkan kematian ikan dengan kerugian ekonomi yang tidak sedikit. *Ulcerative disease* atau penyakit borok/penyakit merah merupakan salah satu penyakit yang mengakibatkan kematian hingga kurang lebih 173 ton jenis ikan mas, termasuk di dalamnya 30% ikan-ikan kecil/benih mati khususnya oleh bakteri *Pseudomonas* sp. dengan kerugian mencapai Rp. 126 juta (Lukistyowati dan Kurniasih, 2011; Nurjanah, *et al.*, 2014).

*Pseudomonas aeruginosa* cukup sering ditemukan pada perairan tawar, serta merupakan salah satu bangsa Pseudomonadales yang termasuk jenis bakteri gram negatif. *P. aeruginosa* merupakan bakteri yang bersifat patogen



oportunistik, dan dapat menyebabkan infeksi pada individu dengan ketahanan tubuh yang menurun (Lutpiatina, 2017). Gejala klinis akibat serangan bakteri *P. aeruginosa* meliputi luka pada bagian tubuh ikan, kembung, mata menonjol (*exophthalmia*), warna tubuh menjadi gelap, gerak lamban, sirip geripis, warna tubuh pucat, insang dan permukaan tubuh luka, produksi lendir berlebih, sisik lepas dan kasar serta diikuti *hemoragik* yang membentuk spot putih dikelilingi zona merah, dan pendarahan pada organ dalam.

Salah satu contoh kerugian yang disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas* adalah kematian ikan dan benih pada intensifikasi budidaya ikan mas (*Cyprinus carpio*) di Waduk Kedung Ombo dan Magelang, Jawa Tengah dengan kerugian ekonomi yang cukup besar (Kabata, 1985; Nurjanah, *et al.*, 2014). Bakteri *P. aeruginosa* berasosiasi dengan kematian nila dan ikan lain yang hidup di danau Kabupaten Magelang. Penelitian Sarjito, *et al.* (2021), menjelaskan bahwa *P. aeruginosa* menyebabkan ikan uji sakit (100%) dan mati (80%) lebih tinggi dibandingkan penelitian terdahulu, serta mengakibatkan kematian 30% dari ikan tawar dan 75% memiliki gejala mirip dengan ikan nila dari Kabupaten Magelang pada bulan Juni-September 2019 berdasarkan gejala klinisnya. Serangan bakteri patogen juga dijelaskan dalam penelitian Hatmanti, *et al.* (2008), dapat menurunkan tingkat produksi dan kualitas pada pembenihan, kematian, hingga gagal panen. Akibat serangan penyakit, hanya sekitar 40% dari seluruh areal pertambakan di Indonesia yang masih beroperasi, sehingga menimbulkan kerugian yang cukup besar. Kerugian sekurang-kurangnya 300 milyar rupiah telah hilang pertahunnya dari seluruh areal pertambakan di Indonesia.

Pengusaha budidaya umumnya akan memberikan perlakuan khusus untuk pencegahan hingga pengobatan untuk menjaga kualitas organisme budidayanya, baik melalui kontrol kualitas perairan hingga penggunaan antibiotik. Ilmu pengetahuan dan teknologi yang terus mengalami perkembangan menuntut





pembudidaya untuk lebih berhati-hati dalam penggunaan bahan pada berbagai kegiatan dalam budidaya. Penambahan antibakteri berbahan kimia baik pada pakan maupun tebar secara langsung pada kolam dapat menyebabkan timbunan residu, fluktuasi parameter kualitas perairan, hingga munculnya penyakit pada organisme budidaya. Solusi yang ditawarkan untuk mengatasi penggunaan bahan kimia berlebihan pada kegiatan budidaya adalah dengan kembali pada penggunaan bahan alami untuk mencari alternatif pengganti antibakteri kimia tanpa mengurangi efektifitasnya dengan mencari dosis yang optimal untuk kegiatan budidaya (Rustanti, *et al.*, 2013).

Ekstrak tanaman secara tradisional dibuktikan oleh Sutrisno, *et al.* (2019), dapat dimanfaatkan sebagai antimikrobia yang merupakan alternatif sebagai pengganti antibiotik kimia. Tanaman obat herbal saat ini banyak diteliti untuk terapi pencegahan dan pengobatan berbagai penyakit. Teh hijau (*Camellia sinensis*) menurut Prasetyaningrum, *et al.* (2018), merupakan salah satu obat tradisional dari tanaman obat herbal yang banyak digunakan karena memiliki banyak kandungan bahan aktif untuk pengobatan dan umumnya aman, tidak toksik serta tidak memiliki efek samping untuk digunakan sebagai antibiotik alami. Kebanyakan aksi biologiknya seperti obat penurun lemak darah, anti radang, antimikrobia, anticancer, dan antioksidan yang terkait dengan fraksi polifenol seperti *catechin* teh, serta sebagai antiprotozoa. Penggunaan pada konsentrasi rendah, *epigallocatechin gallate* dan *epicatechin gallate* dapat menekan faktor virulensi bakteri dan dapat membunuh *Staphylococcus aureus* patogen oportunistik yang resisten terhadap antibiotik  $\beta$ -lactam. Kemampuan aktivitas senyawa tersebut terbukti juga terhadap berbagai mikrobia patogen lain seperti virus hepatitis dan HIV, rotavirus, enterovirus dan influenza, fungi filamentous dan yeast. Berbagai survei epidemiologis menunjukkan konsumsi teh hijau terkait dengan rendahnya berbagai kejadian patologis. Pengujian ekstrak daun teh hijau secara *invitro*



menggunakan metode difusi terbukti menghambat pertumbuhan bakteri *Salmonella typhi*, *Escherichia coli*, dan *Staphylococcus aureus*, dengan penambahan dosis kelipatan sepuluh, ekstrak teh hijau pada media difusi memiliki aktivitas antibakteri sangat signifikan (Kumar, *et al.*, 2012). *P. aeruginosa* diuji karena memiliki beberapa kemiripan dengan bakteri yang diuji pada penelitian sebelumnya seperti *Salmonella* sp. terkait morfologi dan sifatnya yang termasuk katalase negatif dan berlipopolisakarida tinggi, serta berpeluang menyebabkan terjadinya penyakit pada suatu usaha budidaya.

Manfaat yang cukup beragam pada kandungan pada daun teh hijau yang telah disebutkan menjadi dasar peneliti untuk melakukan uji daya hambat ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) terhadap bakteri *P. aeruginosa* secara *in vitro*.

## 1.2 Perumusan Masalah

Kandungan antibakteri pada daun teh hijau (*C. Sinensis*) dalam latar belakang mendasari rumusan masalah dalam penelitian ini sebagai berikut:

- Apakah penggunaan ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) dapat berpengaruh terhadap daya hambat dari bakteri *P. aeruginosa*?

## 1.3 Tujuan

Tujuan yang ingin penulis capai dalam penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh dan daya hambat ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) terhadap bakteri *P. aeruginosa*.

## 1.4 Hipotesis

Kandungan pada daun teh hijau (*C. sinensis*) diduga dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* sehingga hipotesis penelitian ini yaitu sebagai berikut:

H<sub>0</sub> : Diduga pemberian ekstrak daun teh (*C. sinensis*) tidak mempengaruhi



daya hambat bakteri *P. aeruginosa*.

H1 : Diduga pemberian ekstrak daun teh (*C. sinensis*) mempengaruhi

daya hambat bakteri *P. aeruginosa*.

### 1.5 Manfaat

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi ilmiah kepada masyarakat dan petani budidaya perikanan tentang daun teh hijau (*C. sinensis*) yang dimanfaatkan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* dengan dosis yang efektif yang dapat digunakan. Manfaat selanjutnya yaitu agar dapat diaplikasikan oleh masyarakat terutama pembudidaya untuk pencegahan ataupun pengobatan dengan bahan alami.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Menurut Rollando (2019), klasifikasi bakteri *P. aeruginosa* yaitu:

Kerajaan : Monera

Divisi : Proteobacteria

Kelas : Gemma Proteobacteria

Bangsa : Pseudomonadales

Suku : Pseudomonadaceae

Marga : *Pseudomonas*

Jenis : *Pseudomonas aeruginosa*

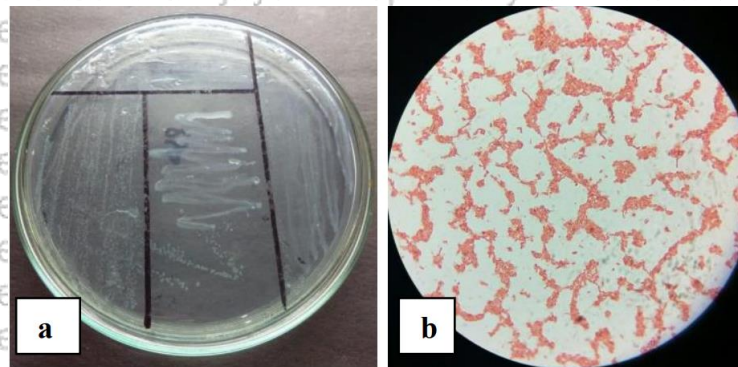
*P. aeruginosa* menurut Pang, *et al.* (2019), merupakan bakteri gram negatif yang termasuk dalam famili Pseudomonadaceae. Bakteri ini mampu bertahan hidup di berbagai lingkungan atau lebih dikenal sebagai patogen oportunistik.

Genom *P. aeruginosa* relatif lebih besar dibandingkan bakteri lainnya dan dapat menguraikan sebagian besar enzim penting pengatur metabolisme, transportasi, serta pemanfaatan senyawa organik. Kelebihan bakteri *P. aeruginosa* memungkinkan penyesuaian metabolisme fleksibel dan beradaptasi tinggi terhadap perubahan lingkungan.

Bakteri *P. aeruginosa* menurut Kurniawan (2012), memiliki ciri tidak fermentatif, bentuk batang dan pendek, motil dengan flagella polar, serta memiliki flagellum yang terletak pada ujung sel. Ukuran bakteri *P. aeruginosa* sekitar 0,6 x 2 µm. Bakteri ini terlihat sebagai bakteri tunggal, berpasangan, dan terkadang membentuk rantai yang pendek, serta memiliki flagel monotrika (flagel tunggal pada kutub) yang memungkinkan bakteri *P. aeruginosa* selalu bergerak.



Bakteri *P. aeruginosa* menurut Widowati, *et al.* (2014), bersifat aerob, katalase positif, oksidase positif, tidak berspora, dan tidak mempunyai selubung (*sheaf*). Bakteri *P. aeruginosa* tidak dapat memfermentasi namun dapat mengoksidasi glukosa/karbohidrat lain. Bakteri ini terkadang dapat mengkoloni dan menimbulkan infeksi apabila fungsi pertahanan inang abnormal (Saraswati dan Darmasesetiyawana, 2016). Penampakan bakteri *P. aeruginosa* tertera pada Gambar 1.



Gambar 1. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* a) bakteri pada media PSA b) pewarnaan Gram dengan perbesaran 1000x (Purwaningsih dan Wulandari, 2020).

### 2.1.2 Infeksi dan Tanda Penyerangan

Bakteri *P. aeruginosa* merupakan bakteri paling umum yang terkait dengan infeksi, bakteri ini menurut Pang, *et al.* (2019), jarang mempengaruhi individu yang sehat, namun lebih sering menyebabkan morbiditas dan mortalitas yang tinggi pada organisme dengan sistem imun yang rendah. *P. aeruginosa* cukup resisten terhadap berbagai antibiotik, umumnya mekanisme serangan bakteri *P. aeruginosa* melawan antibiotik dapat diklasifikasikan menjadi resistensi intrinsik, bawaan dan adaptif. Resistensi intrinsik diakibatkan permeabilitas membran luar yang rendah, antibiotik keluar dari sel dan terjadinya produksi enzim yang menginaktivasi antibiotik. Resistensi bawaan dari *P. aeruginosa* dapat terjadi dengan masuknya gen resistensi atau mutasi. Resistensi adaptif melibatkan



pembentukan biofilm yang berfungsi sebagai penghalang difusi untuk membatasi akses antibiotik ke sel bakteri di organ yang terinfeksi. Pengembangan antibiotik baru atau alternatif untuk pengobatan infeksi *P. aeruginosa* sangat diperlukan untuk yang infeksiya resisten terhadap antibiotik konvensional. Antibiotik baru telah diteliti dalam beberapa tahun terakhir terkait resistensi dan modifikasi enzim bakteri. Beberapa antibiotik baru menunjukkan aktivitas antibakteri *in vitro* yang sangat baik terhadap *P. aeruginosa* serta penghambatan minimum dengan konsentrasi daya hambat (MIC) yang lebih rendah dibandingkan dengan antibiotik konvensional.

*P. aeruginosa* dapat menginfeksi hampir semua jaringan dalam tubuh inang dengan jalan menyebar dari bagian lesi setempat melalui saluran darah mengakibatkan lesi pada jaringan lain. Bakteri ini tergolong kelompok bakteri perusak sirip (*bacterial fin rot*) dan merupakan patogen oportunistik yang menyerang ikan air tawar (Kurniawan, 2012). Tanda penyerangan *P. aeruginosa* dimulai dengan penempelan dan kolonisasi bakteri ini pada jaringan inang dengan menggunakan filii sehingga dapat menempelkan sel bakteri pada permukaan inang. *P. aeruginosa* memproduksi sejumlah endotoksin dan produk ekstraseluler sehingga dapat menunjang invasi lokal dan penyebaran mikroorganisme. Toksin dan produk ekstraseluler ini mencakup protease ekstraseluler, sitotoksin, hemolisin, dan piosianin (Rahmaningsih, *et al.*, 2012).

Infeksi oleh *Pseudomonas* bersifat invasif dan toksinogenik dalam 3 fase berbeda, yaitu (1) pelekatan bakteri dan kolonisasi; (2) invasi lokal (3) penyebaran penyakit sistemik. Faktor penentu patogenitas sangat berperan dalam fase-fase ini (Todar, 2012). Pernyataan terkait infeksi *P. aeruginosa* diperkuat oleh Brooks, *et al.* (2013), bahwa infeksi ditandakan dengan adanya gangguan atau kelainan dari sistem pertahanan tubuh normal. Bakteri ini menempel dan membentuk koloni



pada membran mukosa, menginvasi secara lokal, dan menyebabkan penyakit sistemik.

## 2.2 Teh Hijau (*Camellia sinensis*)

### 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Teh Jawa atau juga disebut sebagai teh hijau (*C. sinensis*) menurut Kumar, *et al.* (2012), merupakan tanaman daerah tropis dan sub tropis termasuk famili *Theaceae*. Ciri-ciri yang dimiliki oleh teh ini adalah pertumbuhannya lambat, jarak cabang dengan tanah sangat dekat, daunnya kecil, pendek, ujungnya agak tumpul dan berwarna hijau tua (Tuminah, 2004).

Klasifikasi teh hijau (*C. sinensis*) menurut Tuminah (2004), sebagai berikut:

Kingdom : Plantae  
Division : Spermatophyta  
Subdivison : Angiospermae  
Class : Dinocotyledoneae  
Order : Clusiale  
Family : Tehaceae  
Genus : *Camellia*  
Species : *Camellia sinensis*

Teh hijau menurut Fajar, *et al.* (2018), merupakan teh yang diproses tanpa fermentasi, teh oolong diproses setengah fermentasi, sedangkan the hitam adalah teh yang difermentasi sempurna. Manfaat teh terhadap kesehatan berhubungan dengan sifat antioksidan dan aktivitas penghambatan radikal bebas dari teh yang kaya akan kandungan fenolik dan flavonoid.

Tanaman teh dapat tumbuh dengan baik dengan produktifitas tinggi menurut Anggraini (2017), membutuhkan habitat sebagai berikut (1) Tumbuh baik

pada ketinggian diatas 700 meter dari permukaan laut; (2) Curah hujan 2500-3500 mm<sup>3</sup> per tahun, dengan curah hujan minimum 1100-1400 mm<sup>3</sup> per tahun; (3) Suhu tempat pertumbuhan tanaman teh sebesar 14-25°C; (4) Tanah yang baik dan sesuai dengan kebutuhan tanaman teh adalah tanah yang cukup subur dengan kandungan bahan organik tinggi, tidak bercadas serta mempunyai pH antara 4,5-6,0. Penampakan daun teh hijau disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Daun Teh a) Daun Teh Hijau Kering b) Daun Teh Hijau (*C. sinensis*) (Syah, 2006).

### 2.2.2 Bahan Aktif

Teh hijau (*C. sinensis*), merupakan salah satu obat tradisional dari tanaman obat herbal yang banyak digunakan karena memiliki banyak kandungan bahan aktif untuk pengobatan. Teh hijau (*C. Sinensis*) memiliki kandungan *polyphenolic* yang disebut katekin atau polifenol jenis *epigallocatechin gallate* (EGCG), *epigallocatechin* (EGC), *epicatechin gallate* (ECG), dan *epicatechin* (EC).

Kandungan zat katekin pada ekstrak daun teh hijau mencapai 30%-40% dengan EGCG sebagai jenis katekin terbanyak, yaitu 67% dari total zat katekin dalam ekstrak daun teh hijau. Daun teh kering memiliki senyawa aktif seperti saponin, glikosida, steroid, terpenoid, karotenoid, flavonoid, alkaloid, dan tanin (Prasetyaningrum, *et al.*, 2018). Kandungan kimia pada pucuk teh segar dan komposisi substansi polifenol (penentu rasa sepat) dalam teh menurut Anggraini (2017), tersaji pada Tabel 1 dan 2 berikut.





Tabel 1. Kandungan Kimia Pucuk Teh Segar

No	Senyawa Kimia	% Bahan Kering
1	Serat kasar, selulosa, lignin, dll	22
2	Protein	16
3	Klorofil dan pigmen	1,5
4	Pektin	4
5	Pati	0,5
<b>Jumlah senyawa tidak larut dalam air</b>		<b>52</b>
1	<i>Catechin</i> teroksidasi	20
2	<i>Catechin</i> lainnya	10
3	Kafein	4
4	Gula dan gum	3
5	Asam amino	7
6	Mineral (abu)	4
<b>Jumlah senyawa larut dalam air</b>		<b>48</b>

Tabel 2. Komposisi Substansi Polifenol pada Teh

No	Polifenol (mg)	Teh Hitam	Teh Hijau	Suplemen Teh Hijau
1	Asam galat	16	22,9	1,0
2	Catechin	14,7	42,1	14,1
3	Epigallocatechin	269,6	103,4	24,9
4	Epicatechin	76,5	39,8	38,3
5	Epigallocatechin galat	213,6	230,8	193,3
6	Epicatechin galat	119,3	122,5	130
7	Galocatechin galat	2,0	2,3	45,5
8	Catechin galat	1,4	5,6	15,8
9	Total theaflavin	-	36,2	-

Katekin (yaitu flavanol) adalah fungsi utama senyawa dalam teh hijau dengan presentase sebanyak 10,5%-11,2% (Zhang, *et al.*, 2019). Katekin dalam teh hijau terutama terdiri dari *epigallocatechin gallate* (EGCG), *epicatechin gallate* (ECG), *epigallocatechin* (EGC) dan *epicatechin* (EC), serta epimernya (non-*epicatechins*), yaitu *gallocatechin gallate* (GCG), *catechin gallate* (CG), *gallocatechin* (GC), dan *catechin* (C) (Xu, *et al.*, 2019). EGCG, ECG dan EGC adalah katekin kuat yang dominan sebagai senyawa antibiotik, dengan kandungan EGCG (32,77%-75,05%), ECG (5,75%-27,03%) dan EGC (2,34%-47,68%) yang merupakan 85% lebih dari total katekin yang terdapat dalam teh hijau (Xu, *et al.*, 2019; Xu, *et al.*, 2021).



Teh pada penelitian Mahmood, *et al.* (2010), memiliki lebih dari 4000 campuran bioaktif yang sepertiga bagiannya merupakan senyawa-senyawa polifenol. Polifenol merupakan cincin benzen yang terikat pada gugus-gugus hidroksil. Polifenol dapat berupa senyawa flavonoid ataupun non-flavonoid, namun polifenol yang ditemukan dalam teh hampir semuanya merupakan senyawa flavonoid yang merupakan hasil metabolisme sekunder dari tanaman. Jenis flavonoid yang terdapat pada teh cukup banyak, namun yang memiliki kandungan tertinggi adalah jenis katekin. Katekin merupakan kelompok besar senyawa kimia yang bermanfaat untuk kesehatan karena sebagai sumber antioksidan yang cepat diserap ke dalam tubuh. Mekanisme polifenol teh sebagai antioksidan yaitu menangkap oksigen, nitrogen reaktif dan senyawa khelat.

Teh hijau memiliki kandungan polifenol sebagai antioksidan tertinggi apabila dibandingkan dengan teh oolong, dan teh hitam. Manfaat teh terhadap kesehatan berhubungan dengan sifat antioksidan dan aktivitas penghambatan radikal bebas dari teh yang kaya akan kandungan fenolik dan flavonoid. Aktivitas antioksidan dipengaruhi oleh jumlah senyawa flavonoid yang ada pada ekstrak teh hijau, semakin banyak senyawa flavonoid maka aktivitas antioksidan akan semakin meningkat sehingga total flavonoid berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan (Fajar, *et al.*, 2018).

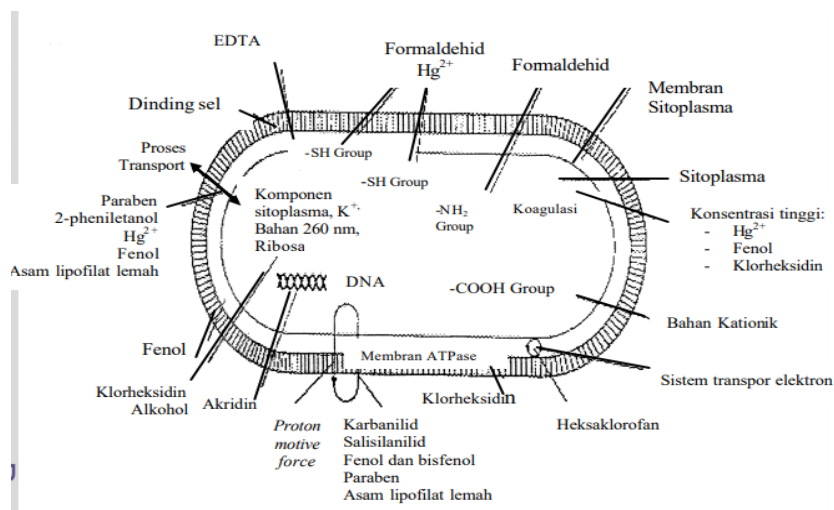
### 2.2.3 Aktivitas Antimikroba

Antibakteri menurut Arlofa (2015), dapat dibedakan berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu anti bakteri yang menghambat pertumbuhan dinding sel, anti bakteri yang mengakibatkan perubahan permeabilitas membran sel atau menghambat pengangkutan aktif melalui membran sel, antibakteri yang menghambat sintesis protein, dan antibakteri yang menghambat sintesis asam nukleat sel. Antibakteri merupakan senyawa yang dapat mencegah pertumbuhan

dan reproduksi bakteri, dapat mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan.

Mekanisme senyawa fenol sebagai zat antibakteri diantaranya adalah meracuni protoplasma pada konsentrasi rendah, menghambat sintesis enzim yang esensial. Saponin sebagai antibakteri mengganggu stabilitas membran sel bakteri sehingga menyebabkan sel bakteri lisis. Mekanisme kerja tanin sebagai antibakteri adalah menghambat enzim reverse transkriptase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk (Barodah, *et al.*, 2017).

Mekanisme kerja ekstrak daun teh hijau dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*, membran sel merupakan membran terluar dari sitoplasma yang letaknya terdapat dibawah dinding sel, tersusun oleh protein, lipid, serta asam nukleat. Membran sel berfungsi untuk mengatur keluar masuknya zat yang dibutuhkan oleh sel. Zat yang mengandung antibakteri menghambat pertumbuhan bakteri, dengan merusak susunan dan menyebabkan perubahan struktur dan kerja bakteri (Annita dan Panus, 2018).



Gambar 3. Mekanisme Penghambatan Bakteri oleh Senyawa Antibakteri (Madigan, *et al.*, 2003).



### 2.3 Uji Efektivitas Antimikroba secara *In Vitro*

Dasar dalam menentukan dosis antimikroba secara *in vitro* adalah dengan *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan *MBC (Minimum Bacterial Concentration)*. MIC merupakan konsentrasi terendah antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan hasil yang dilihat dari pertumbuhan koloni pada agar atau kekeruhan pada pembiakan cair. MIC sebuah antibiotika terhadap mikroba digunakan untuk mengetahui sensitivitas dari mikroba terhadap antibiotika. Nilai MIC berlawanan dengan sensitivitas mikroba yang diuji. Semakin rendah nilai MIC dari sebuah antibiotika, sensitivitas dari bakteri akan semakin besar (Milah, *et al.*, 2016). Secara umum penentuan MIC dengan pengenceran antimikroba dilakukan penurunan konsentrasi setengah dari sebelumnya. Konsentrasi terendah yang menunjukkan hambatan pertumbuhan dengan jelas baik dilihat secara visual atau alat semiotomatis dan otomatis, disebut dengan konsentrasi daya hambat minimum. Nilai MIC juga dapat dibandingkan dengan konsentrasi obat. MBC merupakan konsentrasi terendah antimikroba yang dapat membunuh 99,9% pada biakan selama waktu yang ditentukan, sederhananya MBC adalah ketika tidak terjadi lagi pertumbuhan pada agar. Penentuan konsentrasi minimum antibiotik yang dapat membunuh bakteri dilakukan dengan menanam bakteri pada perbenihan cair yang digunakan untuk MIC ke dalam agar kemudian diinkubasi semalam pada 37°C. Daya serap obat dan distribusi antimikroba akan mempengaruhi dosis, rute, dan frekuensi pemberian antimikroba untuk mendapatkan dosis efektif pada tempat terjadinya infeksi (Soleha, 2015). Uji MIC dapat dilakukan dengan metode serial dilusi, difusi, turbidimetri, dan spektrofotometri, serta uji kalibrasi untuk uji sifat bakteriosid.

Dilusi dilakukan dengan mengencerkan larutan obat sehingga diperoleh beberapa konsentrasi. Dilusi dibagi dua, yaitu (1) dilusi cair, pada masing-masing konsentrasi obat ditambah suspensi kuman dalam media dan adanya kekeruhan



pada larutan uji menandakan bukti tumbuhnya bakteri; (2) dilusi padat, setiap konsentrasi obat dicampur media agar dan ditanami kuman, daya kepekaan kuman dibandingkan melalui jumlah koloni bakteri yang tumbuh per mm dari larutan obat dengan larutan kontrol. Konsentrasi terkecil larutan obat yang dapat mencegah pertumbuhan bakteri disebut konsentrasi penghambat atau *Minimal Inhibition Concentration* (Soelama, *et al.*, 2015).

Metode difusi dilakukan pada permukaan medium padat. Mikroba ditumbuhkan pada permukaan medium dan kertas saring yang berbentuk cakram yang telah mengandung mikroba. Setelah inkubasi diameter zona penghambatan diukur. Metode difusi merupakan metode sederhana, mudah dilakukan dan murah sehingga sering digunakan. Kertas samir (*disk*) yang mengandung obat diletakkan pada media yang telah digores bakteri atau dengan cara sumuran dan kedalamnya ditetaskan obat dengan konsentrasi tertentu, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam (Wibawa, *et al.*, 2018). Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh antibiotik terlihat sebagai wilayah jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme.

Semakin tinggi ekstrak yang diujikan pada media, maka semakin banyak ekstrak yang berdifusi pada mikroorganisme, sehingga meningkatkan presentase daya hambat.

#### 2.4 Ekstraksi dengan Metode Maserasi

Tujuan ekstraksi dengan metode maserasi dijelaskan oleh Rustanti, *et al.* (2013), yaitu untuk mendapatkan ekstrak kasar senyawa katekin dari daun teh.

Proses ekstraksi merupakan penarikan komponen aktif menggunakan pelarut tertentu. Pemilihan metode maserasi dikarenakan senyawa katekin rentan terhadap panas sehingga kurang baik apabila menggunakan metode *soxhlet*. Penerapan metode *soxhlet* dirasa kurang baik karena konsentrasi senyawa katekin cenderung menurun.



Kelebihan dari metode maserasi menurut Savitri, *et al.* (2017), adalah mudah untuk dilakukan, unit alat yang digunakan sederhana, biaya operasional relatif rendah, tanpa pemanasan sehingga tidak merusak senyawa flavonoid, serta dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa lainnya yang bersifat termolabil.

Senyawa flavonoid bersifat polar sehingga dibutuhkan pelarut yang bersifat polar.

Flavonoid merupakan senyawa golongan polifenol yang terdistribusi luas pada tumbuhan dalam bentuk glikosida yang berikatan dengan suatu gula, karena itu flavonoid merupakan senyawa yang bersifat polar. Pelarut polar yang biasa digunakan untuk ekstraksi flavonoid adalah metanol, aseton, etanol, air dan isopropanol (Suryani, *et al.*, 2015).

Efektivitas ekstraksi suatu senyawa oleh pelarut menurut Kemit, *et al.* (2016), sangat tergantung kepada kelarutan senyawa tersebut dalam pelarut, sesuai dengan prinsip *like dissolve like* yaitu suatu senyawa akan terlarut pada pelarut dengan sifat yang sama. Penggunaan jenis pelarut atau kekuatan ion pelarut dapat memberikan pengaruh terhadap rendemen senyawa yang dihasilkan. Pelarut yang bersifat polar diantaranya adalah etanol, metanol, aseton dan air.

Etanol merupakan salah satu pelarut yang bersifat polar. Pelarut yang bersifat polar mampu melarutkan fenol lebih baik, dimana turunan fenol tertinggi adalah flavonoid. Kemungkinan tingkat kepolaran flavonoid dengan kepolaran etanol sama (Moein and Mahmood, 2010). Umumnya pelarut yang banyak digunakan adalah etanol karena mempunyai polaritas yang tinggi sehingga dapat mengekstrak bahan lebih banyak dibandingkan jenis pelarut lain. Etanol dapat mengekstrak senyawa aktif yang lebih banyak dibandingkan jenis pelarut organik lainnya (Nomer, *et al.*, 2019).



### 3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

#### 3.1 Tempat, Waktu/ Jadwal Pelaksanaan

Penelitian dilakukan di Laboratorium CV. Sumber Rejeki Bandaran, Pasuruan, Jawa Timur pada bulan Juni 2021

#### 3.2 Materi Penelitian

##### 3.2.1 Alat dan Bahan

##### a. Alat-Alat Penelitian

Alat-alat yang digunakan di dalam penelitian pengaruh ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) terhadap bakteri *P. aeruginosa* disajikan pada Tabel 3 dan Lampiran 1.

**Tabel 3.** Alat-Alat Penelitian

No	Nama Alat	Kegunaan
1	Autoklaf	Sebagai sterilisasi alat dan bahan
2	Tabung Reaksi	Sebagai wadah peremajaan bakteri
3	Rak Tabung Reaksi	Sebagai wadah tabung reaksi
4	Gelas Ukur	Sebagai wadah mengukur cairan
5	Jarum Ose	Sebagai alat mengambil bakteri
6	Inkubator	Sebagai wadah inkubasi bakteri
7	Beaker Glass	Sebagai wadah tabung reaksi ketika sterilisasi
8	Mikropipet	Sebagai alat mengambil cairan dalam ukuran mikronliter
9	Bluetip	Sebagai alat menuangkan bakteri atau cairan
10	Lemari Pendingin	Sebagai wadah menyimpan bahan dan bakteri
11	Timbangan Digital	Sebagai alat mengukur bahan yang akan digunakan dengan ketelitian $10^{-3}$
12	Hot plate	Sebagai alat pemanas
13	Laminary Air Flow (LAF)	Sebagai tempat menanam bakteri dalam kondisi steril terbebas dari mikroba
14	Corong	Sebagai alat bantu menuangkan bahan ketika maserasi
15	Rotary vacuum evaporator	Sebagai alat pemisah antara cairan dengan padatan untuk menjadi ekstrak
16	Spatula	Sebagai penghomogen larutan, dan mengambil bahan untuk ditimbang
17	Jangka sorong	Sebagai alat mengukur zona hambat
18	Vortex mixer	Sebagai alat penghomogen larutan
19	Toples plastik	Sebagai wadah ketika proses maserasi
20	Test tube 15ml	Sebagai wadah pengenceran ekstrak
21	Bunsen	Sebagai alat pembakaran dan pengkondisian steril



No	Nama Alat	Kegunaan
22	Cawan Petri	Sebagai meletakkan kertas cakram pada bakteri
23	Pinset	Sebagai alat bantu mengambil dan meletakkan kertas cakram
24	Sprayer	Sebagai wadah alcohol
25	Waterbath	Sebagai wadah akuades

#### b. Bahan-Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian pengaruh ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) terhadap *P. aeruginosa* disajikan pada Tabel 4 dan Lampiran 2.

**Tabel 4.** Bahan-Bahan Penelitian

No.	Nama Bahan	Kegunaan
1	Daun Teh ( <i>Camellia sinensis</i> )	Sebagai bahan daya hambat yang akan diujikan
2	Bakteri <i>P. aeruginosa</i>	Sebagai bahan penelitian
3	MHA ( <i>Media Mueller Hinton Agar</i> )	Sebagai media hidup bakteri <i>P. aeruginosa</i>
4	PSA ( <i>Pseudomonas Selective Agar</i> )	Sebagai media peremajaan bakteri
5	TSB ( <i>Tryptitone Soy Broth</i> )	Sebagai media pengenceran bakteri
6	Alkohol 70%	Sebagai bahan antiseptis
7	DMSO 10%	Sebagai pelarut ekstrak
8	Etanol 70%	Sebagai pelarut ekstrak saat proses maserasi
9	Akuades	Sebagai pelarut media
10	Spirtus	Sebagai bahan bakar Bunsen
11	Kertas Saring	Sebagai penyaring saat maserasi
12	Benang Kasur	Sebagai pengikat alat ketika sterilisasi
13	<i>Aluminium foil</i>	Sebagai penutup alat ketika sterilisasi
14	Kertas Bekas	Sebagai pembungkus alat saat proses sterilisasi
15	Kertas cakram 6 mm	Sebagai bahan untuk mengetahui besar zona bening setelah pemberian ekstrak daun teh hijau
16	Kertas label	Sebagai pemberi tanda pada sampel
17	Kapas	Sebagai bahan penutup alat
18	Tisu	Sebagai pembersih alat dan bahan

### 3.3 Metode Penelitian

Metode penelitian eksperimen merupakan salah satu metode dalam penelitian kuantitatif yang bertujuan untuk mengetahui hubungan sebab akibat dengan memanipulasikan satu atau lebih variabel pada satu (atau lebih) kelompok eksperimental. Data akan dibandingkan hasilnya dengan kelompok kontrol yang



tidak dimanipulasi. Manipulasi adalah mengubah secara sistematis sifat-sifat (nilai-nilai) variabel bebas. Setelah dimanipulasi, variabel bebas disebut sebagai garapan (*treatment*). Penelitian eksperimen menurut Payadnya dan Jayantika (2018), merupakan penelitian yang dilakukan untuk mengetahui akibat suatu perlakuan yang diberikan sengaja oleh peneliti dan digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap yang lain dalam kondisi terkendali.

Metode eksperimen merupakan pengadaan percobaan untuk mendapatkan suatu hasil yang menegaskan kedudukan hubungan variabel-variabel yang diselidiki. Metode eksperimen digunakan untuk menguji hipotesa tertentu dan dimaksudkan untuk mengetahui hubungan sebab akibat variabel penelitian. Pelaksanaan memerlukan konsep dan variabel yang jelas dengan pengukuran yang cermat (Yuniarti, *et al.*, 2013).

### **3.4 Rancangan Penelitian**

Rancangan pada penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang merupakan suatu eksperimen dengan faktor yang nilainya berubah-ubah. Rancangan acak lengkap adalah desain yang perlakuannya dikenakan sepenuhnya secara acak kepada unit-unit eksperimen, atau sebaliknya tanpa batasan pengacakan. Desain ini banyak digunakan karena bentuknya sederhana, namun hanya dapat digunakan apabila persoalan yang dibahas mempunyai unit-unit eksperimen yang bersifat homogen. Faktor dapat memiliki sejumlah taraf dengan nilai yang bisa kuantitatif, kualitatif, bersifat tetap ataupun acak. Pengacakan mengenai eksperimen tidak terbatas, sehingga diperoleh desain yang diacak secara lengkap (Siska dan Salam, 2012).

Aplikasi RAL terdiri dari pengacakan dan perhitungan untuk membuat tabel anova. Pengacakan dalam penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan hasil analisis yang tepat dari setiap perlakuan yang diuji cobakan. Hasil pengacakan



perlakuan yang dilakukan pada tahap sebelumnya akan di hitung untuk membuat tabel anova. Nilai-nilai dari hasil perhitungan akan di lihat apakah gagal tolak atau tolak  $H_0$ . Jika hasil analisis yang didapat adalah tolak  $H_0$  maka analisis akan dilanjutkan dengan pengujian beda nilai rata-rata (pengujian lanjut). Adapun rumus dari RAL yaitu sebagai berikut:

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

Keterangan :

$Y_{ij}$  : Nilai pengamatan pada perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

$\mu_i$  : Nilai tengah umum

$\tau_i$  : Pengaruh perlakuan ke-i

$\varepsilon_{ij}$  : Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Desain rancangan pada penelitian ini terdiri dari lima perlakuan dan dua kontrol yaitu kontrol positif dan negatif dengan empat kali ulangan. Perlakuan dilakukan dengan empat kali ulangan yang meliputi pemberian ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) dengan dosis berbeda sebagai variabel bebas untuk menguji daya hambat bakteri *P. aeruginosa*. Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat yang optimal dalam penggunaan ekstrak daun teh hijau. Dasar dari pengambilan dosis perlakuan didapatkan dari hasil uji MIC dengan hasil 100 ppm yang mendekati nilai absorbansi serta warna yang cocok dengan kontrol positif. Penelitian ini dilakukan untuk mengetahui daya hambat ekstrak kasar daun teh (*C. sinensis*) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* dan dosis maksimal ekstrak untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Perlakuan yang digunakan adalah pemberian ekstrak daun teh (*C. sinensis*) dengan dosis yang berbeda sebagai daya hambat terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut:

Perlakuan A : Perlakuan ekstrak kasar daun teh sebesar 110 ppm.

Perlakuan B : Perlakuan ekstrak kasar daun teh sebesar 120 ppm.

Perlakuan C : Perlakuan ekstrak kasar daun teh sebesar 130 ppm.



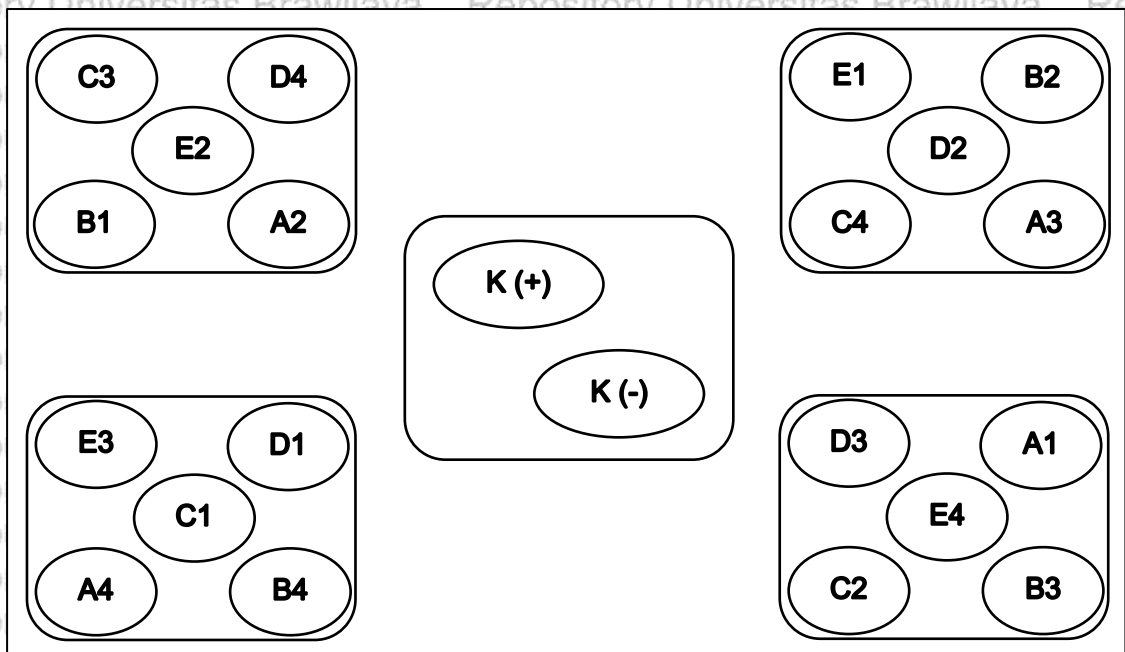
Perlakuan D : Perlakuan ekstrak kasar daun teh sebesar 140 ppm.

Perlakuan E : Perlakuan ekstrak kasar daun teh sebesar 150 ppm.

Kontrol (+) : Perlakuan menggunakan antibiotik *tetracycline* 30 ppm.

Kontrol (-) : Perlakuan tanpa pemberian ekstrak kasar daun teh hijau.

Denah pengujian yang akan dilakukan selama penelitian disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Denah Penelitian

Keterangan:

A, B, C, D, E : Perlakuan

K+ : Kontrol positif

K- : Kontrol negatif

1,2,3,4 : Ulangan

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Persiapan Penelitian

##### a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Proses sterilisasi alat dan bahan yang akan digunakan pada penelitian menggunakan autoklaf dengan prosedur sebagai berikut:



- 1) Peralatan dicuci dengan sabun, kemudian dikeringkan dan dibungkus menggunakan kertas bekas dan diikat menggunakan benang kasur.

Tabung reaksi dan erlenmeyer ditutup dengan kapas sebelum dibungkus.

- 2) Akuades ditambahkan hingga menutupi batas pemanas dalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus dimasukkan ke dalam keranjang autoklaf dan ditutup rapat dengan mengencangkan sekrup. Klep uap dipastikan pada posisi tegak.

- 3) Saklar dinyalakan, pemanas diatur sampai batas maksimal (lampu indikator berwarna hijau) kemudian klep ditutup ketika sudah mulai keluar uap air.

- 4) Suhu diturunkan hingga lampu indikator kuning sterilization menyala, diatur waktu dan ditunggu selama 15 menit setelah suhu mencapai 121°C alarm akan berbunyi kemudian dimatikan.

- 5) Ditunggu beberapa saat hingga *thermometer* dan *manometer* menunjukkan angka 0 (nol) kemudian dibuka tutup autoklaf.

- 6) Diambil alat yang sudah disterilisasikan lalu disimpan, bahan yang telah disterilisasi disimpan dalam lemari pendingin.

Sterilisasi menurut Raule (2018), merupakan rangkaian proses dengan tujuan menghilangkan seluruh bentuk kehidupan mikroorganisme (bakteri, jamur, parasit, dan virus termasuk spora). Alat dan bahan disterilkan dengan menutup alat-alat menggunakan kertas dan bahan yang disiapkan menggunakan aluminium foil serta kapas. Alat dan bahan yang sudah dibungkus dimasukkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 15 psi (*per square inch*) dengan waktu 15 menit (Rustanti, *et al.*, 2013). Sterilisasi juga dijelaskan secara singkat oleh Handayani, *et al.* (2021), bahwa sterilisasi merupakan tahap awal yang menjadi kunci keberhasilan penelitian dengan metode kultur secara *in vitro*.

#### **b. Sterilisasi Tempat Perlakuan**



Sterilisasi tempat perlakuan dilakukan dengan menyemprotkan alkohol 70% disekitar tempat perlakuan kemudian dilakukan penyinaran dengan *Ultraviolet* (UV) selama 15 menit sebelum menggunakan *Laminary Air Flow* (LAF) untuk mematikan semua bakteri dan meghindari adanya kontaminasi. Perlakuan ini sesuai dengan Sari, *et al.* (2013), bahwa tempat perlakuan seperti LAF perlu disterilisasi dengan penyemprotan alkohol 96% dan dilap. Penyinaran dengan menggunakan lampu UV dilakukan setiap LAF akan digunakan, untuk menghindari adanya kontaminasi dari apapun yang dapat mempengaruhi hasil dari kegiatan didalam LAF.

### c. **Persiapan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa***

Bakteri *P. aeruginosa* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, Jawa Tengah yang sudah melalui tahap uji biokimia Lampiran 3. Bakteri diperoleh dengan kepadatan  $9 \times 10^8$  CFU/ml hasil pengukuran pada media TSB (*Tryptic Soy Broth*) yang sudah dicocokkan dengan metode Mc. Farland.

Perhitungan jumlah bakteri yang ada pada media TSB dapat dilakukan menggunakan metode Mc. Farland dengan cara:

- 1) 11 tabung reaksi yang bersih disediakan.
- 2) Dibuat larutan  $H_2SO_4$  murni dalam 1% dan larutan  $BaCl_2$  dalam 1%.
- 3) Kedua jenis larutan tersebut dicampurkan ke dalam tabung berdasarkan perbandingan pada ketentuan metode Mc. Farland. Sehingga isi dari satu tabung tersebut menjadi 10 ml larutan. Kemudian tabung-tabung tersebut ditutup.
- 4) Cocokkan warna suspensi bakteri pada media cair dengan tabung larutan standar Mc. Farland (tabel 5).



Tabel 5. Larutan Standar Mc. Farland

Nomor Larutan Mc. Farland	CFU ( $\times 10^8$ /ml)	1% BaCl (ml)	1% H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (ml)
0,5	<3	0,05	9,95
1	3	0,1	9,9
2	6	0,2	9,8
3	9	0,3	9,7
4	12	0,4	9,6
5	15	0,5	9,5
6	18	0,6	9,4
7	21	0,7	9,3
8	24	0,8	9,2
9	27	0,9	9,1
10	30	1,0	9,0

Mc. Farland sering digunakan untuk standarisasi dengan memperkirakan jumlah bakteri dalam suatu cairan suspensi yang dimaksudkan menggantikan perhitungan bakteri secara satu per satu dan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada prosedur pengujian antimikroba dengan membandingkan kekeruhan biakan bakteri dalam medium cair. Larutan Mc. Farland biasa digunakan sebagai acuan, hasil kepadatan ditemukan antara  $1 \times 10^7$  CFU/ml- $1 \times 10^8$  CFU/ml. Standard Mc. farland digunakan karena menurut Aviany dan Pujiyanto (2020), merupakan standar paling umum digunakan di laboratorium mikrobiologi yang melakukan percobaan kerentanan antimikroba dan percobaan hasil biakan bakteri dengan alasan cukup mudah, murah, dan efektif untuk dilakukan.

#### d. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Teh (*Camellia sinensis*)

Pembuatan ekstrak diawali dengan mempersiapkan simplisia daun teh hijau (*C. sinensis*) dalam bentuk serbuk yang diperoleh dari UPT Materia Medika, Batu ditimbang menggunakan neraca digital sesuai perbandingan, yakni 1 : 7, sebanyak 20 gram dan dilarutkan dengan etanol 70% sebanyak 140 ml untuk direndam dalam erlenmeyer. Erlenmeyer ditutup dengan alumunium foil lalu



dimasukkan dalam *shaker water bath* dan didiamkan selama 24 jam. Hasil ekstrak disaring dengan *vacuum buchner* dan dievaporasi pada suhu 60°C. Ekstrak dikeringkan dalam oven pada suhu 60°C. Ekstrak yang telah kering dilarutkan kembali dengan pelarut hingga diperoleh ekstrak cair menjadi 1 gr/10 ml (Asyarkia, *et al.*, 2019).

Pembuatan ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) melalui beberapa tahapan dan proses yang mengacu pada ekstraksi yang dilakukan pada UPT Materia Medika, Batu seperti yang dijelaskan di atas, yaitu sebagai berikut:

- 1) Daun teh hijau diperoleh dari daerah Batu, Jawa timur, selanjutnya ditimbang sebanyak 5 kg untuk dikeringkan selama dua hari hingga didapatkan berat kering daun teh hijau sebesar 2,5 kg dan menghasilkan presentase berat kering yaitu 50%.
- 2) Setelah kering, daun teh hijau dihaluskan menggunakan blender dan didapatkan hasil berupa serbuk.
- 3) Ekstrak dihasilkan dengan menggunakan metode maserasi. Perbandingan yang digunakan adalah 1 : 7, 500 gram serbuk daun teh hijau direndam menggunakan etanol 70% sebanyak 3500 ml selama 24 jam pada suhu ruang.
- 4) Larutan yang diperoleh dari maserasi disaring dan dievaporasi menggunakan *rotary vacuum evaporator* dengan suhu 60°C untuk menguapkan etanol, ketika sudah terbentuk pasta ekstrak sebanyak 45 g, maka rendemen yang didapat sebesar 45%. Rumus serta cara perhitungan ekstrak dapat dilihat pada Lampiran 5.
- 5) Hasil dari ekstraksi disimpan dalam lemari pendingin dengan wadah botol film suhu 4°C untuk mencegah kerusakan pada ekstrak. Kandungan bahan aktif dalam daun teh hijau dapat diketahui dengan uji fotokimia ekstrak yang dapat dilihat pada Lampiran 4.



## e. Pembuatan Media

### - Media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) untuk Agar Miring

Media yang digunakan untuk peremajaan bakteri pada penelitian ini adalah PSA (*Pseudomonas Selective Agar*), hal ini dikarenakan bakteri yang digunakan adalah *P. aeruginosa*. Media PSA merupakan media yang selektif sehingga sesuai untuk pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*. Proses pembuatan agar miring adalah sebagai berikut:

- 1) Ditimbang media PSA sebanyak 0,48 gram dengan menggunakan timbangan digital.
- 2) Media PSA dilarutkan dengan akuades sebanyak 10 ml dalam erlenmeyer.
- 3) PSA diaduk dengan menggunakan spatula hingga larut secara homogen.
- 4) Media yang telah dihomogenkan ditutup kapas dan aluminium foil, kemudian di *hot plate* hingga mendidih.
- 5) Media yang sudah di *hot plate* kemudian disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
- 6) Media ditunggu hingga hangat kemudian dituang ke dalam tabung reaksi dalam kondisi steril.
- 7) Tabung reaksi dimiringkan dengan kemiringan 30° dan ditunggu hingga padat.
- 8) Dilakukan *streak* bakteri secara zig-zag dan dalam keadaan steril.

### - Media TSB (*Tryptic Soy Broth*) untuk Kultur Bakteri

Media TSB merupakan media yang digunakan untuk kultur bakteri.

Prosedur pembuatan media TSB (*Tryptic Soy Broth*) adalah sebagai berikut:

- 1) Media TSB ditimbang sebanyak 0,3 gram dengan menggunakan timbangan digital.
- 2) Media TSB dilarutkan dengan akuades 10 ml dengan bantuan spatula dalam erlenmeyer.





- 3) Media yang sudah dihomogenkan dimasukkan kedalam tabung reaksi, ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*.
- 4) Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
- 5) Media dibiarkan dingin, sehingga bakteri tidak mati akibat diinokulasikan pada keadaan media masih panas.

#### - **Media TSB (*Tryptic Soy Broth*) untuk uji MIC**

Media TSB (*Tryptic Soy Broth*) digunakan sebagai media untuk uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*). Prosedur pembuatan media TSB untuk uji MIC adalah sebagai berikut:

- 1) Media TSB ditimbang sebanyak 2,4 gram menggunakan timbangan digital.
- 2) Media dilarutkan dengan 80 ml akuades pada Erlenmeyer.
- 3) Media pada Erlenmeyer dituang kedalam 8 tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*.
- 4) Media disterilisasi menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

#### - **MHA (*Mueller Hinton Agar*) untuk Uji Cakram**

Media MHA (*Mueller Hinton Agar*) digunakan sebagai media untuk uji cakram. Prosedur pembuatan media MHA adalah sebagai berikut:

- 1) Ditimbang media MHA sebanyak 3,8 gram dengan timbangan digital.
- 2) MHA dilarutkan dengan akuades 100 ml dalam erlenmeyer dengan bantuan spatula hingga larut secara homogen.
- 3) Setelah larut sempurna, erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas dan *aluminium foil*.
- 4) Media yang sudah terhomogen di *hot plate* hingga mendidih.
- 5) Media yang sudah di *hot plate* kemudian disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.



6) Media ditunggu hingga hangat kemudian dituang ke dalam 5 cawan petri masing-masing diisi  $\pm 20$  ml pada setiap cawan dan dilakukan dalam LAF (*Laminary Air Flow*) untuk menghindari kontaminasi, dan ditunggu hingga padat.

**f. Peremajaan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa***

Bakteri *P. aeruginosa* diambil dari isolat murni untuk dilakukan peremajaan dengan menginokulasikan pada media agar miring. Peremajaan bakteri dilakukan dalam keadaan steril menggunakan jarum ose yang telah dipanaskan di atas bunsen, kemudian isolat digores pada media PSA secara zig-zag. Tujuan dari penggoresan adalah untuk menumbuhkan/membiakkan bakteri pada media (Lubis, *et al.*, 2014). Media berisi isolat kemudian diinkubasi pada suhu  $32^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Peremajaan bakteri bertujuan menumbuhkan bakteri dan memulai metabolisme kembali pada media yang baru dengan kebutuhan nutrisi yang cukup, serta menjaga isolat murni dari kontaminasi (Yulianti dan Herawati, 2020).

**g. Kultur Bakteri**

Penanaman bakteri *P. aeruginosa* meliputi beberapa prosedur. Biakan bakteri yang sudah diremajakan pada media agar miring diambil sebanyak satu ose dalam keadaan steril. Jarum ose yang telah berisi bakteri kemudian dicelupkan dan dihomogenkan pada media TSB yang sudah dipersiapkan. Media disimpan pada inkubator dengan suhu  $32^{\circ}\text{C}$  selama 24 jam. Proses kultur bakteri menurut Ibrahim, *et al.* (2015), dapat dilakukan dengan mengambil satu koloni bakteri murni dengan menggunakan jarum ose kemudian dilakukan kultur pada media TSA dan diinkubasi ke dalam inkubator selama 24 jam. Kemudian dilanjutkan dengan kegiatan pemanenan bakteri dan pengukuran bakteri.

**h. Pembuatan Dosis Ekstrak Daun Teh Hijau (*C. sinensis*)**

Ekstrak kasar daun teh hijau dalam bentuk 1000 mg pasta diencerkan dengan pelarut DMSO 10% dan akuades. Dosis ekstrak kasar ditentukan dalam



satuan ppm atau mg/L. Satuan ppm adalah mg ekstrak dibandingkan dengan liter DMSO 10%, satuan liter dikonversikan menjadi mililiter. Dosis ekstrak tertinggi sebanyak 10 ml sebagai stok. Selanjutnya dosis yang lebih dibuat dengan cara pengenceran ekstrak. Ekstrak disimpan pada lemari pendingin. Hasil serta perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 6. Rumus pengenceran sebagai berikut:

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan:

V1 = Volume larutan stok (ml)

N1 = Konsentrasi larutan stok (ppm)

V2 = Volume larutan yang diinginkan (ml)

N2 = Konsentrasi larutan yang diinginkan (ppm)

### 3.5.2 Pelaksanaan Penelitian

#### a. Uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*)

MIC dilakukan dengan beberapa tahapan. TSB steril dimasukkan kedalam tabung reaksi sebanyak 8 ml. Ekstrak daun teh hijau ditambahkan dalam tabung reaksi yang berisi TSB dengan dosis yang berbeda pada setiap tabungnya. Dosis yang digunakan pada uji MIC berdasarkan uji deret ukur (penelitian pendahuluan) yang dilakukan terlebih dahulu untuk penentuan dosis awal yaitu menggunakan pengenceran yang dimulai dari dosis 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 0,1 ppm, 0,01 ppm. Hasil uji yang didapat akan dibuat *range* lebih kecil untuk dilakukan uji MIC yang menggunakan kontrol positif yaitu dengan pemberian antibakteri sintesis (*tetracycline*) 30 ppm dan kontrol negatif tanpa pemberian ekstrak.

*Tetracycline* digunakan sebagai antibakteri dan kontrol positif karena *tetracycline* merupakan salah satu antibiotik yang paling sering digunakan dalam budidaya ikan yang bertujuan untuk mengontrol penyakit yang disebabkan bakteri (Nurhasnawati, *et al.*, 2016). *Tetracycline* mengandung antibakteri yang sangat kuat karena sifat antibakteri bakteriostatiknya dan spektrumnya luas yaitu menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan negatif yang peka (Hafsari, *et*

al., 2015). Mekanisme kerja *tetracycline* menghambat sintesis protein dengan menghalangi terikatnya RNA pada ribosomnya selama pemanjangan rantai peptide, paling sedikit terjadi 2 proses masuknya antibiotik ke dalam ribosom bakteri gram negatif, (1) difusi pasif melalui kanal hidrofilik (2) sistem transpor aktif, setelah masuk maka antibiotik berikatan dengan ribosom dan menghalangi masuknya kompleks tRNA asam amino pada lokasi asam amino. Setiap tabung reaksi diberi isolat bakteri dengan kepadatan  $9 \times 10^8$  CFU/ml hasil pengukuran pada media TSB (*Tryptic Soy Broth*) yang sudah dicocokkan dengan metode Mc Farland, lalu diinkubasi pada suhu  $32^\circ\text{C}$  selama 24 jam. Media diperiksa kekeruhannya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 620 nm, kemudian ditulis nilai absorbansi yang tertera pada monitor spektrofotometer.

Uji MIC juga didasarkan pada indikator kekeruhan pada media TSB yang telah ditanam bakteri beserta ekstrak dengan dosis yang berbeda dan diinkubasi selama 24 jam. Dosis uji MIC dapat didasarkan pada tabung yang memunculkan warna bening pertama kali dan memiliki nilai absorbansi yang mendekati kontrol positif.

### **b. Uji Cakram**

Uji Cakram pada penelitian ini dilakukan untuk mengukur daya hambat ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*. Cawan petri berisi media MHA sebanyak 25 ml disiapkan. Kertas cakram steril direndam dengan larutan ekstrak daun teh hijau dengan dosis yang berbeda. Perlakuan dosis berdasarkan dari uji MIC yang dilakukan terlebih dahulu dan mendapatkan dosis yang sesuai untuk perlakuan. Penanaman dilakukan pada LAF untuk menghindari kontaminasi.

Bakteri diambil sebanyak 1 ml dengan menggunakan mikropipet dengan kepadatan yang ditentukan dan disebar pada seluruh permukaan MHA dengan menggunakan *triangle*. Setelah 10-15 menit kertas cakram direndam kemudian diambil dengan hati-hati dan diletakkan pada media agar bagian tengah. Media yang telah ditanam bakteri dan diberi kertas cakram diinkubasi dalam suhu  $30^\circ\text{C}$



selama 18-24 jam. Media diamati dengan cara mengukur diameter zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong.

Daerah pada sekitaran cakram menunjukkan kepekaan mikroba terhadap antibiotik atau bahan antimikroba yang digunakan sebagai bahan uji yang dinyatakan dengan diameter zona bening dalam satuan millimeter (mm) menggunakan jangka sorong dengan cara diukur diameter zona bening horizontal ditambahkan dengan diameter zona bening vertikal lalu dibagi dua. Kemudian zona bening yang telah diukur, dibandingkan berdasarkan pedoman Davis dan Stout (1971).

### 3.6 Parameter Uji Penelitian

Parameter uji yang digunakan dalam penelitian ini adalah hasil pengamatan zona bening yang terlihat pada sekitar kertas cakram yang sudah ditumbuhi oleh bakteri *P. aeruginosa*. Hal ini dapat dilakukan dengan cara mengukur diameter zona bening di sekeliling kertas cakram dari masing-masing perlakuan yaitu konsentrasi maksimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

### 3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh akan dianalisis secara statistik menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) sesuai rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ). 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) yaitu untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Untuk mengetahui hubungan antar perlakuan dengan diameter zona hambat (zona bening) digunakan uji *polynomial orthogonal* yang memberikan keterangan mengenai pengaruh keterangan terbaik.





## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Hasil yang diperoleh pada uji MIC didapatkan dari nilai absorbansi dan warna yang mendekati kontrol positif yaitu 100 ppm, alat yang digunakan untuk uji MIC yaitu spektrofotometer. Hasil uji MIC menurut Andayani, *et al.* (2021), dapat dilihat berdasarkan warna dengan memperhatikan tingkat kekeruhan (Gambar 5).

Warna pada setiap tabung dibandingkan dengan kontrol positif. Warna tabung yang mendekati kontrol positif merupakan perlakuan yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, nilai yang diperoleh dari uji MIC dapat dilihat pada Tabel 6.



**Gambar 5.** Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Keterangan: Tabung 1: Kontrol (-), Tabung 2: Kontrol (+), Tabung 3: 0,01 ppm, Tabung 4: 0,1 ppm, Tabung 5: 1 ppm, Tabung 6: 10 ppm, Tabung 7: 100 ppm dan Tabung 8: 1000 ppm.



**Tabel 6.** Hasil Uji MIC Menggunakan Spektrofotometer

No.	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Warna
1	K (-)	0,716	Keruh
2	K (+)	0,210	Bening
3	0,01	0,710	Keruh
4	0,1	0,593	Keruh
5	1	0,524	Keruh
6	10	0,391	Bening
7	100	0,213	Bening
8	1000	0,178	Bening

Keterangan:

Tabung 7 : Konsentrasi 100 ppm yang dapat menghambat bakteri *Pseudomonas aeruginosa*.

Kontrol (+) : Perlakuan dengan antibiotik *tetracycline* 30 ppm.

Kontrol (-) : Perlakuan tanpa pemberian ekstrak.

Berdasarkan tabel diatas menunjukkan bahwa dosis 100 ppm dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*, hal ini dikarenakan nilai absorbansi dengan spektrofotometer menghasilkan warna kekeruhan yang mendekati kontrol positif. Hal tersebut dikarenakan ekstrak daun teh (*C. sinensis*) memiliki senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan hasil uji fitokimia pada Lampiran 4 ekstrak daun teh (*C. sinensis*) mengandung saponin, flavonoid, tanin, dan alkaloid, yang dapat memecah membran dari bakteri. Kandungan kimia yang bersifat antibakteri menurut Fajar, *et al.* (2018), yaitu alkaloid, saponin, tannin, dan fenol. Teh hijau memiliki kandungan fenolik berupa polifenol dan flavonoid sebagai antioksidan yang cukup tinggi pada ekstrak daun teh hijau, semakin banyak senyawa flavonoid maka aktivitas antioksidan akan semakin meningkat sehingga total flavonoid berbanding lurus dengan aktivitas antioksidan.

#### 4.2 Uji Cakram

Uji Cakram dilakukan untuk mengukur daya hambat ekstrak terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*. Uji cakram dilakukan didalam wadah cawan





petri yang berisikan media, bakteri, dan ekstrak yang akan diujikan dengan dosis yang berbeda-beda. Metode difusi dilakukan pada permukaan media padat.

Mikroba ditumbuhkan pada permukaan media kemudian diinkubasi. Kertas cakram yang mengandung obat dengan konsentrasi tertentu diletakkan pada media yang telah digores bakteri, diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam.

Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh antibiotik terlihat sebagai wilayah jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme (Wibawa, *et al.*, 2018).

Uji cakram dilakukan dengan menggunakan kertas cakram. Kertas cakram direndam menggunakan ekstrak dengan dosis tertentu dan diletakkan di permukaan media. Cawan petri yang telah berisikan media steril, ditambahkan bakteri *P. aeruginosa* dan diratakan dengan menggunakan bantuan *triangle*,

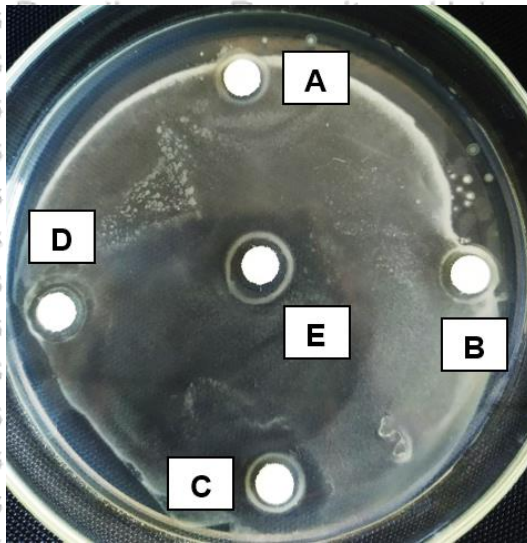
ekstrak daun teh hijau (*C. sinensis*) berisikan kertas cakram yang telah direndam selama 15 menit diinkubasi selama 24 jam. Setelah diinkubasi, dilakukan

pengamatan zona hambat yang terjadi di sekitar kertas cakram dan diukur menggunakan jangka sorong. Dosis yang digunakan untuk uji cakram yaitu 110

ppm, 120 ppm, 130 ppm, 140 ppm, dan 150 ppm, serta kontrol positif menggunakan *tetracycline* 30 ppm sebagai antibakteri karena dapat mengontrol penyakit yang disebabkan bakteri dengan mekanisme kerja menghambat sintesis protein pada ribosomnya, paling sedikit terjadi 2 proses masuknya antibiotik ke

dalam ribosom bakteri gram negatif, (1) difusi pasif melalui kanal hidrofilik (2) sistem transpor aktif, setelah masuk maka antibiotik berikatan dengan ribosom dan menghalangi masuknya kompleks tRNA asam amino pada lokasi asam amino.

Kontrol negatif pada penelitian ini yaitu tanpa perlakuan untuk mengetahui hasil zona bening dapat dilihat pada Gambar 6 dan Lampiran 7.



Gambar 6. Hasil Uji Cakram

Keterangan:

- A: Dosis ekstrak daun teh hijau 110 ppm, B: Dosis ekstrak daun teh hijau 120 ppm, C: Dosis ekstrak daun teh hijau 130 ppm, D: Dosis ekstrak daun teh hijau 140 ppm, E: Dosis ekstrak daun teh hijau 150 ppm

Zona bening yang terbentuk pada uji cakram dengan cawan petri yang sudah berisikan media, bakteri dan ekstrak dengan dosis yang berbeda-beda akan diamati selama 24 jam, disimpan pada inkubator untuk menghindari terjadinya kontaminasi dari organisme lain, untuk melihat luasan zona bening yang terbentuk dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Rerata Zona Bening Bakteri *P. aeruginosa*

Perlakuan	Ulangan (mm)				Jumlah	Rerata ± SD
	1	2	3	4		
<b>A (110 ppm)</b>	7,98	7,68	7,58	7,28	30,52	7,63 ± 0,29
<b>B (120 ppm)</b>	7,36	8,12	7,83	8,11	31,42	7,86 ± 0,36
<b>C (130 ppm)</b>	8,42	8,79	8,34	8,35	33,90	8,48 ± 0,21
<b>D (140 ppm)</b>	9,00	9,60	9,43	9,48	37,51	9,38 ± 0,26
<b>E (150 ppm)</b>	10,67	10,32	9,99	10,08	41,06	10,27 ± 0,30
<b>Total</b>					174,41	

Zona bening yang dihasilkan dipengaruhi oleh besarnya dosis yang diberikan dan daya serap kertas cakram pada saat proses perendaman, luas zona bening berbanding lurus dengan dosis yang digunakan pada saat uji cakram karena semakin tinggi konsentrasi dosis ekstrak yang diberikan maka semakin



banyak kandungan antimikroba sehingga zona bening yang terbentuk akan semakin besar, hal tersebut didukung oleh Wibawa, *et al.* (2018), semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diujikan pada media, maka semakin banyak ekstrak yang berdifusi pada mikroorganismenya, sehingga meningkatkan presentase daya hambat.

Hal ini dikarenakan senyawa bahan aktif yang ada pada ekstrak semakin besar sehingga dapat menghambat pertumbuhan bakteri semakin baik. Berdasarkan hasil uji cakram ekstrak daun teh hijau terhadap *P. aeruginosa* selanjutnya dilakukan analisis sumber ragam untuk mengetahui pengaruh perlakuan ekstrak daun teh hijau terhadap daya hambat bakteri *P. aeruginosa*. Data analisis sumber ragam dapat dilihat pada Tabel 9.

Adapun kategori untuk mengetahui besaran daya hambat yang dihasilkan disajikan pada Tabel 8 (Anita, *et al.*, 2014)

**Tabel 8.** Kategori Respon Daya Hambat Bakteri *P. aeruginosa*

Diameter zona hambat	Respon hambatan pertumbuhan
≥20 mm	Sangat Kuat
10-20 mm	Kuat
5-10 mm	Sedang
<5 mm	Lemah

Berdasarkan hasil yang didapat dari uji cakram menggunakan ekstrak daun teh hijau pada bakteri *P. aeruginosa* menggunakan 5 dosis yang berbeda-beda menghasilkan zona bening yang berbeda pula, pada perlakuan A diperoleh hasil rerata 7,63 mm, perlakuan B 7,86 mm, perlakuan C 8,48 mm, dan perlakuan D 9,38 mm tergolong sedang karena diameter zona hambat berkisar 5-10 mm sedangkan perlakuan E 10,27 mm tergolong kategori kuat karena diameter zona hambat berkisar 10-20 mm.

Luasan daya hambat dapat dipengaruhi oleh berbagai faktor seperti besarnya dosis dari kandungan yang ada pada ekstrak daun teh yang diberikan pada perlakuan, seperti katekin, fenol, dan antibakteri terkandung lainnya. Faktor

lain seperti lamanya waktu penyimpanan atau inkubasi, media yang digunakan, bakteri (organisme yang digunakan), lamanya media untuk memadat dapat dipengaruhi oleh jumlah media yang digunakan dan suhu penyimpanan. Faktor yang memungkinkan dalam penelitian ini telah dibatasi agar perlakuan dalam kondisi yang homogen untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak terhadap bakteri dengan mengukur zona hambat selama penelitian.

**Tabel 9.** Analisa Sidik Ragam Zona Hambat Bakteri *P. aeruginosa*

Sumber Keragaman	Db	JK	Kt	Fhitung	F5%
<b>Perlakuan</b>	4	19,26	4,82	57,83*	3,06
<b>Acak</b>	15	1,25	0,08		
<b>Total</b>	19	20,51			

Keterangan: (\*) = berbeda nyata

Hasil yang diperoleh dari sidik ragam pada tabel 9. dapat dilihat nilai F hitung lebih besar dari F5% yaitu 57.83. Dapat disimpulkan dari data diatas bahwasannya pemberian ekstrak daun teh hijau berpengaruh nyata terhadap bakteri *P. aeruginosa*, untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan dengan dosis yang berbeda, melakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang disajikan pada Tabel 10.

**Tabel 10.** Uji BNT Zona Hambat Bakteri *P. aeruginosa*

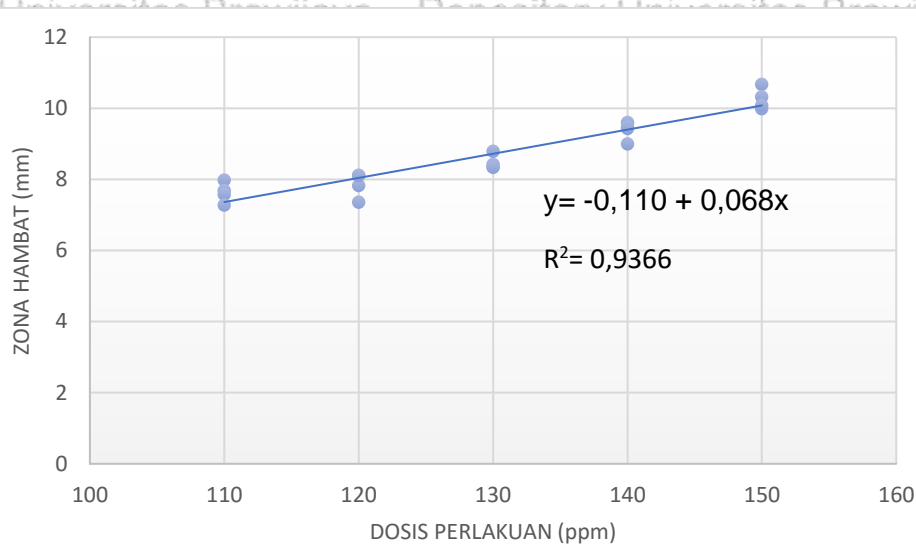
Perlakuan	A	B	C	D	E	Notasi
	7,63	7,86	8,48	9,38	10,27	
<b>A (7,63)</b>	-	-	-	-	-	a
<b>B (7,86)</b>	0,225 <sup>ns</sup>	-	-	-	-	a
<b>C (8,48)</b>	0,845*	0,62*	-	-	-	b
<b>D (9,38)</b>	1,7475*	1,5225*	0,9025*	-	-	c
<b>E (10,27)</b>	2,635*	2,41*	1,79*	0,8875*	-	d

Keterangan: (\*) = berbeda nyata

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari data diatas, nilai uji BNT berpengaruh atau berbeda nyata terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*.

Data diatas menunjukkan pada perlakuan E dengan dosis 150 ppm merupakan dosis yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* dengan luasan

diameter daya hambat yang paling tinggi, hal tersebut dikarenakan bahan aktif yang terkandung didalam ekstrak daun teh hijau, oleh karena itu untuk mengetahui hubungan dari besaran zona hambat dengan perlakuan yang digunakan, adapun hasil yang didapatkan dari grafik regresi yang diperoleh disajikan pada Gambar 7.



**Gambar 7.** Hubungan Antara Dosis dengan Diameter Zona Bening

Hasil yang diperoleh dari Gambar 7, sudah menjelaskan keterkaitan hubungan antara ekstrak daun teh hijau dengan zona hambat bakteri menunjukkan pola linier dengan persamaan  $y = -0,110 + 0,068x$  dan koefisien  $R^2 = 0,9366$  (hasil perhitungan uji statistik disajikan pada Lampiran 8). Nilai  $R^2 = 0,9366$  merupakan nilai koefisien determinasi yang menunjukkan bahwa pengaruh perlakuan terhadap respon sebesar 93,66%. Hubungan antara pemberian ekstrak daun teh hijau dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* menunjukkan bahwa respon meningkat seiring dengan penambahan dosis ekstrak dari 110 ppm dengan hasil daya hambat 7,36 mm, 120 ppm dengan hasil daya hambat 8,04 mm, 130 ppm dengan hasil daya hambat 8,72 mm, 140 ppm dengan hasil daya hambat 9,40 mm, dan 150 ppm dengan hasil daya hambat 10,08 mm. Hasil tersebut menunjukkan setiap kenaikan dosis sebanyak 10 ppm akan menghasilkan besar daya hambat 0,68 mm. Semakin tinggi dosis yang diberikan



jumlah luasan dari zona bening pun semakin besar hal ini dikarenakan kandungan antimikroba semakin besar sehingga zona bening yang dihasilkan semakin besar hal tersebut sesuai dengan Rahmawati, *et al.* (2014), semakin tinggi konsentrasi suatu antibakteri yang diberikan maka akan semakin besar daya antibakteri yang dihasilkan. Lamanya waktu bakteri terbunuh dipengaruhi oleh tingginya konsentrasi zat antibakteri yang digunakan. Semakin banyak konsentrasi ekstrak yang mengandung flavonoid, akan semakin banyak bakteri yang akan dihambat pertumbuhannya, karena konsentrasi ekstrak yang diberikan bersifat antibakteri juga tinggi (Karim, *et al.*, 2018). Adapun hasil perhitungan data hasil penelitian dapat dilihat pada Lampiran 8.

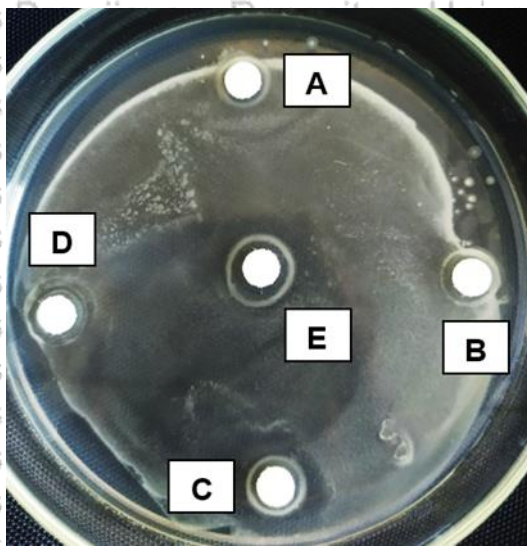
Khasiat utama daun teh hijau terletak pada komponen bioaktifnya, yaitu polifenol seperti flavonoid sebagai antioksidan alami yang bekerja dengan mendonasikan proton atau atom hidrogennya (Syah, 2006). Mekanisme antibakteri dari flavonoid yaitu dengan menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi.

Sitoplasma dalam sel dibatasi membran yang berperan sebagai barrier permeabilitas selektif dengan fungsi transport aktif, kemudian mengontrol komposisi internal sel. Makromolekul dan ion akan keluar dari sel, kemudian sel rusak atau terjadi kematian apabila fungsi integritas sel membran sitoplasma dirusak. Senyawa fenolik mendenaturasi dan menginaktifkan protein seperti enzim, serta mengubah permeabilitas membran sitoplasma dan menyebabkan kebocoran bahan-bahan intraseluler. Mekanisme alkaloid menghambat pertumbuhan bakteri dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel. Bakteri mempunyai lapisan luar yaitu dinding sel yang berfungsi mempertahankan bentuk mikroorganisme dan pelindung sel bakteri, yang mempunyai tekanan osmotik internal yang tinggi, tiga hingga lima kali lebih

besar pada bakteri gram positif dari pada gram negatif. Trauma pada dinding sel atau penghambatan pembentukannya, menimbulkan lisis pada sel (Hafsari, *et al.*, 2015). Saponin sebagai antibakteri berdifusi melalui membran luar dan dinding sel yang rentan, lalu mengikat membran sitoplasma dan mengganggu dan mengurangi kestabilan, hingga mengakibatkan senyawa intraseluler keluar (Ngajow, *et al.*, 2013). Saponin berinteraksi dengan kolesterol pada membran sel dan menyebabkan modifikasi lipid yang akan mengganggu kemampuan bakteri untuk berinteraksi dengan membran yang sudah mengalami modifikasi tersebut, sehingga menyebabkan kemampuan bakteri untuk merusak atau berinteraksi dengan host akan terganggu dan zat antibakteri akan dapat dengan mudah masuk ke dalam sel dan akan mengganggu metabolisme hingga akhirnya terjadilah kematian bakteri (Karlina, *et al.*, 2013). Kemampuan saponin sebagai antibakteri didukung oleh pernyataan Pendit, *et al.* (2016), bahwa saponin menyebabkan kebocoran protein dan enzim dari dalam sel yang mengakibatkan kematian sel, dengan kata lain bersifat bakterisidal. Tanin memiliki aktivitas antibakteri ketika dinding bakteri lisis akibat senyawa saponin dan flavonoid, tanin masuk dengan mudah ke dalam sel bakteri dan mengkoagulasi protoplasma sel bakteri. Tanin menghambat pertumbuhan bakteri dengan menginaktivasi adhesin mikroba, enzim, dan protein transport pada membran sel.

Waktu pengamatan yang dilakukan yaitu 1x24 jam untuk mengetahui sifat dari bakteri *P. aeruginosa* setelah diberi ekstrak daun teh hijau, akan terbentuk zona bening di sekitar kertas cakram. Zona bening yang dihasilkan memunculkan hasil terkecil pada perlakuan A dan luasan semakin meningkat setiap perlakuan selanjutnya hingga perlakuan E. Luasan zona bening dapat diamati pada dokumentasi Gambar 8 berikut. Pengamatan dilakukan hingga 1x24 jam saja dikarenakan penelitian bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak daun teh hijau pada bakteri *P. aeruginosa*, sehingga apabila dilanjutkan pada pengamatan

2x24 jam, maka akan menunjukkan hasil dengan bentuk sifat bakteriostatik yang dimiliki ekstrak daun teh hijau terhadap bakteri.



Gambar 8. Luasan Zona Bening Perlakuan

Bakteri dapat tumbuh dalam penelitian ini dengan suhu 32°C ditandai dengan perubahan warna pada permukaan media agar. Bakteri *P. aeruginosa* menurut Widowati, *et al.* (2014), dapat tumbuh dengan baik dengan adanya unsur N dan C dengan suhu 30°C-42°C. Hasil penelitian diperkuat oleh pernyataan Sine dan Fallo (2016), bahwasannya bakteri yang tidak tumbuh disekitar kertas cakram karena kertas cakram mengandung antimikroba yang berfungsi sebagai antibiotik dimana bakteri pertumbuhannya terhambat oleh kertas cakram yang mengandung antimikroba.





## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau (*C. sinensis*) terhadap Daya Hambat Bakteri *P. aeruginosa* secara *In Vitro* yang dilakukan dapat disimpulkan bahwa ekstrak daun teh hijau berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *P. aeruginosa*, dimana semakin tinggi konsentrasi ekstrak yang diberikan maka semakin besar pula zona hambat yang terbentuk.

### 5.2 Saran

Berdasarkan penelitian Pengaruh Ekstrak Daun Teh Hijau (*C. sinensis*) terhadap Daya Hambat Bakteri *P. aeruginosa* secara *In Vitro*, disarankan menggunakan ekstrak daun teh hijau sebagai alternatif pengobatan dengan dosis 100 ppm. Penggunaan dosis 100 ppm dinilai efisien, karena sebagai dosis terendah sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* pada sekitar cakram. Diharapkan adanya penelitian lanjutan dengan metode *In Vivo* untuk mengetahui keefektifan dosis terhadap biota budidaya perairan tawar seperti ikan mas dan koi (*Cyprinus carpio*), nila (*Oreochromis niloticus*), gurami (*Osphronemus goramy*) dan ikan tawar bernilai jual tinggi lainnya. Pengamatan sebaiknya lebih dari 1x24 jam untuk mengetahui sifat yang ditimbulkan dari ekstrak daun teh hijau terhadap bakteri.

## DAFTAR PUSTAKA

Andayani, S., H. Suprastyani dan Miraleyana. 2021. Uji daya hambat ekstrak kasar daun johar (*Cassia siamea* L.) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* secara *in vitro*. *Journal of Fisheries and Marine Research*. **5**(1): 8-14.

Anggraini, T. 2017. *Proses dan Manfaat Teh*. Rumahkayu Pustaka Utama. Bukittinggi, Padang.

Anita, A., S. Khotimah dan A. Yanti. 2014. Aktivitas antibakteri ekstrak daun benalu jambu air (*Dendrophloe pentandra* (L.) Miq) terhadap pertumbuhan salmonella typh. *Protobiont*. **3**(2): 268-272.

Annita., H. dan Panus. 2018. Daya Hambat Ekstrak Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*) Terhadap Bakteri *Streptococcus Mutans*. *Jurnal Kesehatan Sainitika Meditory*. **1**(1): 1-9.

Arlofa, N. 2015. Uji kandungan senyawa fitokimia kulit durian sebagai bahan aktif pembuatan sabun. *Jurnal Chemtech*. **1**(1): 18-22.

Asyarkia, N. L., R. Hakim dan E. Sulistyowati. 2019. Efek antibakteri kombinasi daun teh hijau (*Camellia sinensis* L.) dan kloramfenikol pada bakteri *Escherichia coli* atau *Staphylococcus aureus* secara *In Vitro*. *Jurnal Bio Komplementer Medicine*. **6**(3): 1-8.

Aviany, H. B. dan S. Pujiyanto. 2020. Analisis efektivitas probiotik di dalam produk kecantikan sebagai antibakteri terhadap bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *Berkala Bioteknologi*. **3**(2): 25-31.

Barodah, L. L., Sumardianto dan E. Susanto. 2017. Efektivitas serbuk *sargassum polycystum* sebagai antibakteri pada ikan lele (*Clarias* sp.) selama penyimpanan dingin. *J. Peng. & Biotek. Hasil Pi*. **6**(1): 10-20.

Brooks, G. F., Carroll K. C., Butel J. S., Morse and all. 2013. *Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg Edisi 25*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta.

Fajar, R. I., L. P. Wrsiati dan L. Suhendra. 2018. Kandungan senyawa flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak teh hijau pada perlakuan suhu awal dan lama penyeduhan. *Jurnal Rekayasa dan Manajemen Agroindustri*. **6**(3): 196-202.

Hafsari, A. R., T. Cahyanto, T. Sujarwo dan R. I. Lestari. 2015. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun beluntas (*Pluchea indica* (L.) LESS.) terhadap *Propionibacterium acnes* penyebab jerawat. **9**(1): 141-161.

Handayani, E., M. B. Irsyadi, I. Aris, R. L. M. N. Alawiyah, N. Ayuningtias, F. Permatasari dan I. A. Rineksane. 2021. Optimasi sterilisasi endosperma kepel (*Stelethocarpus burahol* [BI] Hook F. & Th) secara *In Vitro*. *Jurnal Pendidikan Biologi*. **6**(2): 113-121.



Hatmanti, A., R. Nuchsin dan Y. Darmayanti. 2008. Studi penyakit bakterial pada budidaya ikan kerapu dan bakteri penghambatnya di perairan Teluk Lampung. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **7**(1): 51-58.

Ibrahim, A., I. W. Utami dan R. Agustina. 2015. Aktivitas sediaan gel antiseptik tangan berbahan aktif ekstrak fraksi etanol daun sungkai (*Peronema canencens* jack.) terhadap beberapa bakteri patogen. *Journal of Tropical Pharmacy and Chemistry*. **3**(2): 94-100.

Kabata, Z. 1985. *Parasites and Diseases of Fish Cultured in the Tropics*. Taylor and Francis. London and Philadelphia. 318p.

Kamelia, M., N. Widiani dan N. Adistyningrum. 2018. Analisis perbedaan jumlah bakteri pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) budidaya. *Biospecies*. **11**(2): 76-82.

Karim, N., I. Khan, A. Abdelhalim, A. Khan and S. A. Halim. 2018. Antidepressant potential of novel flavonoids derivatives from sweet violet (*Viola odorata* L): Pharmacological, biochemical and computational evidences for possible involvement of serotonergic mechanism. *Filoterapia*. **128**: 148-161.

Karlina, C. Y., M. Ibrahim dan G. Trimulyono. 2013. Aktivitas antibakteri ekstrak herba krokot (*Portulaca oleracea* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Lentera Bio*. **2**(1): 87-93.

Kemit, N., I. W. R. Widarta dan K. A. Nocianitri. 2016. Pengaruh jenis pelarut dan waktu maserasiterhadap kandungan senyawa flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak daun alpukat (*Persea americana* Mill). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan (ITEPA)*. **5**(2): 130-141.

Kumar, A., Kumar, A., Thakur, P., Patil, S., Payal, C., Kumar, A. and Sharma, P. 2012. Antibacterial activity of green tea (*Camellia sinensis*) extracts against various bacteria isolated from environmental sources. *Recent Research in Science and Technology*. **4**(1): 19-23.

Kurniawan, A. 2012. Penyakit Akuatik. *UBB Press*. 225hlm.

Lubis, Y. P. P., Yunasfi, dan R. Leidonald. 2014. Jenis-jenis bakteri pada luka ikan patin (*Pangasius djambal*). *Jurnal Aquacostmarine*. **2**(1): 66-77.

Lukistyowati, I. dan Kurniasih. 2011. Kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio* L) yang diberi pakan ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) dan diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **16**(1): 144-160.

Lutpiatina, L. 2017. Cemaran *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Teknologi Laboratorium*. **6**(2): 61-66.

Madigan, M. T., P. J. Martinko and J. Parker. 2003. *Brock Biologi of microorganisms*. Prentice Hall International Inc., Englewood Cliff. New York.



Mahmood, T., N. Akhtar and B. A. Khan. 2010. The Morphology, Characteristics, and Medicinal Properties of *Camellia sinensis* Tea. *Journal of Medicinal Plants Research*. **4**(19): 2028-2033.

Milah, N., S. H. Bintari dan D. Mustikaningtyas. 2016. Pengaruh konsentrasi antibakteri propolis terhadap pertumbuhan bakteri *Streptococcus pyogenes* secara *In Vitro*. *Life Science*. **5**(2): 95-99.

Moein S. and R.M. Mahmood. 2010. Relationship between antioxidant properties and phenolics in *Zhumeria majdae*. *Journal of Medicinal Plants Research*. (7): 517-521.

Ngajow, M., J. Abidjulu dan V. S. Kamu. 2013. Pengaruh antibakteri ekstrak kulit batang matoa (*Pometia pinnata*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* secara *In vitro*. *Jurnal MIPA UNSRAT Online*. **2**(2): 128-132.

Nomer, N. M.G. R., A. S. Duniaji dan K. A. Nocianitri. 2019. Kandungan senyawa flavonoid dan antosianin ekstrak kayu secang (*Caesalpinia sappan* L.) serta aktivitas antibakteri terhadap *Vibrio cholerae*. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan*. **8**(2): 216-225.

Nurhasnawati, H., S. Jubaidah dan N. Elfia. 2016. Penentuan kadar residu tetrasiklin HCl pada ikan air tawar yang beredar di Pasar Segiri menggunakan metode spektrofotometri *ultra violet*. *Jurnal Ilmiah Manuntung*. **2**(2): 173-178.

Nurjanah, S., S. B. Prayitno dan Sarjito. 2014. Sensitivitas bakteri *Aeromonas* sp. dan *Pseudomonas* sp. yang diisolasi pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) sakit terhadap berbagai macam obat beredar. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3**(4): 308-316.

Pang, Z., R. Raudonis, B. R. Glick, T. Lin and Z. Cheng. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnology Advances*. **37**: 177-192.

Payadnya, I. P. A. A. dan I. G. A. N. T. Jayantika. 2018. Panduan Penelitian Eksperimen Beserta Analisis Statistik dengan SPSS. Deepublish. Yogyakarta. 175 hlm.

Pendit, P. A. C. D., E. Zubaidah dan F. H. Sriherfyna. 2016. Karakteristik fisik-kimia dan aktivitas antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **4**(1): 400-409.

Prasetyaningrum, N., Soemardini dan M. N. Fadillah. 2018. Efek ekstrak daun teh hijau (*Camellia sinensis*) terhadap sel osteoklas. *E-Prodenta Journal*. **2**(1): 130-139.

Purwaningsih, D. dan D. Wulandari. 2020. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun suruhan (*Peperomia pellucida* L. Kunth) terhadap bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853. *Jurnal Ilmiah Ilmu-ilmu Hayati*. **5**(1): 1-7.



Rahmaningsih, S., S. Wilis dan A. Mulyana. 2012. Bakteri patogen dari perairan pantai dan kawasan tambak di Kecamatan Jenu Kabupaten Tuban. *Jurnal Ilmiah Ilmu Dasar dan Lingkungan Hidup*. **12**(1): 1-5.

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.

Raule, J. H. 2018. Pengetahuan perawat gigi tentang metode sterilisasi dengan pencegahan infeksi silang di Poli Gigi Puskesmas Ranotana Weru di Kota Manado. *JIGIM*. **1** (1): 44-51.

Rollando. 2019. Senyawa Antibakteri Dari Fungi Endofit. *Seribu Bintang*: Malang. 95hlm.

Rustanti, E., A. Jannah, dan A. G. Fasya. 2013. Uji aktivitas antibakteri senyawa katekin dari daun teh (*Camellia sinensis* L. var *assamica*) terhadap bakteri *Micrococcus luteus*. *Alchemy*. **2**(2): 138-149.

Saraswati, S. A. dan I. M. S. Darmasetiyawana. 2016. Identifikasi Bakteri pada Rumput Laut *Euchema spinosum* yang terserang penyakit ice-ice di Perairan Pantai Kutuh. *Journal of Marine and Aquatic Sciences*. **2**(1): 11-15.

Sari, N., E. Ratnasari dan Isnawati. 2013. Pengaruh Penambahan Berbagai Kombinasi Konsentrasi 2,4-Diklorofenoksiasetat (2,4-D) dan 6-Bensil Aminopurin (BAP) pada Media MS terhadap Tekstur dan Warna Kalus Eksplan Batang Jati (*Tectona grandis* Linn. F.) "JUL". *Lentera Bio*. **2**(1): 69-73.

Sarjito, M. Nanda, Sulisyaningrum, A. H. C. Haditomo, Desrina dan S. B. Prayitno. 2021. Bacterial selective associated with tilapia (*Oreochromis niloticus*) mortality in Magelang Regency. *Saintek Perikanan: Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*. **17**(1): 15-24.

Savitri, I., L. Suhendra dan N. M. Wartini. 2017. Pengaruh jenis pelarut pada metode maserasi terhadap karakteristik ekstrak *Sargassum polycystum*. *Jurnal Rekayasa Dan Manajemen Agroindustri*. **5**(3): 93-101.

Sine, Y. dan G. Fallo. 2016. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun teh ketapang (*Terminalia catappa* L.) dan daun jambu biji (*Psidium guajava* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Pendidikan*. **1**(1): 54-58.

Siska, M. dan R. Salam. 2012. Desain eksperimen pengaruh zeolit terhadap penurunan limbah kadmium (Cd). *Jurnal Ilmiah Teknik Industri*. **11**(2): 173-184.

Soelama, H. J. J., B. J. Kepel dan K. V. Siagian. 2015. Uji *minimum inhibitory concentration* (MIC) ekstrak rumput laut (*Eucheuma cottonii*) sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. *e-GiGi*. **3**(2): 374-379.



Soleha, T. U. 2015. Uji kepekaan terhadap antibiotik. *Jurnal Kedokteran Unila*. **5(9)**: 119-123.

Suryani, N. C., D.G. M. Permana dan A. A. G. N. A. Jambe. 2015. Pengaruh jenis pelarut terhadap kandungan total flavonoid dan aktivitas antioksidan ekstrak daun matao (*Pometia pinnata*). *Jurnal Ilmu dan Teknologi Pangan (ITEPA)*. **5(1)**: 1-10.

Sutrisno, B., R. Wasito, Kurniasih, S. Widyarani, Y. P. Kristianingrum, dan Sugiyono. 2019. In-vivo study of green tea leaf extract (*Camellia sinensis*) as an alternative anti-*Eschericia coli*. *Jurnal Sain Veteriner*. **37(2)**: 172-179.

Syah, A. N. A. 2006. Taklukan Penyakit dengan Teh Hijau. AgroMedia Pustaka: Jakarta. 124hlm.

Todar, K. 2021. *Pseudomonas page 3*. Online Textbook of Bacteriology. [http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas\\_3.html](http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas_3.html).

Tuminah, S. 2004. Teh (*Camellia sinensis* O. K. var. *assamica*. (Mast)) sebagai salah satu sumber antioksidan. *Jurnal cermin dunia kedokteran*. **144**: 52-54.

Wibawa, I. G. K. S., D. N. Suprpta dan K. Khalimi. 2018. Uji aktivitas antijamur ekstrak biji keben (*Barringtonia asiatica* (L.) Kurz) terhadap *Curvularia verruculosa* penyebab penyakit bercak *Curvularia* pada tanaman padi (*Oryza sativa* L.). *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. **7(3)**: 414-427.

Widowati, I., S. Efiyati dan S. Wahyuningtyas. 2014. Uji aktivitas antibakteri ekstrak daun kelor (*Moringa oleifera*) terhadap bakteri pembusuk ikan segar (*Pseudomonas aeruginosa*). *Jurnal Penelitian Mahasiswa UNY*. **9(2)**: 146-157.

Winarsih, W. H., Priyambodo, T. Rahardjo dan A. Husein. 2011. Pengembangan budidaya dan teknologi pengolahan bandeng serta distribusinya sebagai sumber ekonomi masyarakat di Jawa Timur. *Jurnal Cakrawala*. **5(2)**: 188-204.

Xu, Y., P. Yu and W. Zhou. 2019. Combined effect of pH and temperature on the stability and antioxidant capacity of epigallocatechin gallate (EGCG) in aqueous system. *Journal of Food Engineering*. **250**: 46-54.

Xu, Y., Y. Gao and D. Granato. 2021. Effects of epigallocatechin gallate, epigallocatechin and epicatechin gallate on the chemical and cell-based antioxidant activity, sensory properties, and cytotoxicity of a catechin-free model beverage. *Food Chemistry*. **339**: 1-11.

Yulianti, D. dan M. M. Herawati. 2020. Produksi enzim pektinase dari limbah kulit pisang oleh kapang *Aspergillus niger* dan aplikasinya terhadap klarifikasi minuman fungsional jahe lemon. *Jurnal Teknologi dan Industri Pertanian Indonesia*. **12(2)**: 86-92.



Yuniarti, D. W., T. D. Sulistiyati dan E. Suprayitno. 2013. Pengaruh suhu pengeringan vakum terhadap kualitas serbuk albumin ikan gabus (*Ophiocephalus striatus*). *THPi STUDENT JOURNAL*. 1(1): 1-9.

Zhang, L., C. Ho, J. Zhou, J. S. Santos, L. Armstrong and D. Granato. 2019. Chemistry and Biological Activities of Processed *Camellia sinensis* Tea's. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 18(5): 1474-1495.

## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Alat Penelitian



Tabung Reaksi



Rak Tabung Reaksi



Erlenmeyer



Pinset



Gelas Ukur



Beaker Glass





Inkubator



Jarum Ose



Mikropipet



Autoclave



Lemari Pendingin



Blender



Timbangan Digital



Laminary Air Flow (LAF)



Bunsen



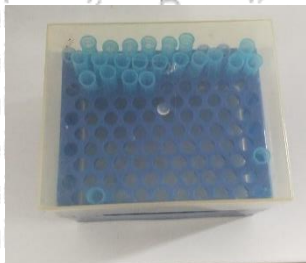
Corong



Sprayer



Rotary Vacum Evaporator



Blue tip



Spatula



Nampan



Jangka Sorong



Vortex mixer



Hot plate



Gunting



Baskom



Botol film



Cawan Petri



Lampiran 2. Bahan Penelitian



Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*)



*Pseudomonas aeruginosa*



Media



Alkohol 70%



DMSO 10%



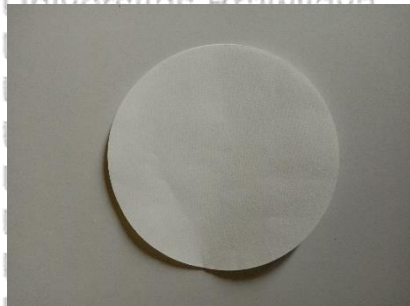
Etanol 96%



Aquades



Spirtus



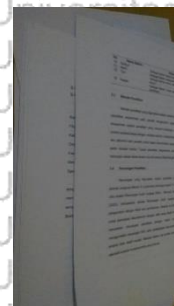
Kertas Saring



Plastik warp



Aluminium foil



Koran/Kertas Bekas



Kertas Cakram



Kertas Label



Kapas



Tisu

Lampiran 3. Hasil Uji Biokimia Bakteri *P. aeruginosa*



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN  
 DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA  
 BALAI BESAR PERIKANAN BUDIDAYA AIR PAYAU  
**LABORATORIUM UJI BBPBAP JEPARA**  
 Alamat surat: PO Box 1 Jepara, Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418  
 Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724  
[www.bbpbapjepara.djpb.kkp.go.id](http://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 aeruginosa</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>o</sup> C	+

Lab. Mikrobiologi BBPBAP Jepara

Penyelia  
  
 Sri Murti Astuti, SP.

Lampiran 4. Hasil Uji Fitokimia Daun Teh Hijau (*Camellia sinensis*)



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

65313

Nomor : 074 / 037 / 102.7-D / 2021  
 Sifat : Biasa  
 Perihal : Surat Keterangan Analisa Kualitatif

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

1. Identitas Pemohon

Nama	NIM	Instansi
Putriadiji Syabaningrum	175080507111016	Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang
Dita Nur Aeni	175080507111006	
Sandhy Iryasa Astaqhfirmanda	175080500111016	




2. Identitas Sampel


Nama sampel : Teh Hijau  
 Nama latin : *Camellia sinensis*  
 Bagian sampel : Daun  
 Bentuk sampel : Ekstrak  
 Pelarut : Etanol 70%  
 Tanggal penerimaan : 1 Februari 2021  
 Tanggal pemeriksaan : 1 Februari 2021

3. Hasil

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

4. Lampiran

Nama Sampel	Alkaloid		
	Meyer	Dragendrof	Bouchardat
Ekstrak Daun Teh Hijau			

Nama Sampel	Flavonoid	Tanin / Fenol	Saponin
	Ekstrak Daun Teh Hijau		





## Lampiran 5. Perhitungan Ekstrak Daun Teh Hijau (*C. sinensis*)

### • Perhitungan Presentase Berat Kering

$$\text{Presentase Berat Kering} = \frac{\text{Berat Kering Daun}}{\text{Berat Basah Daun}} \times 100\%$$

$$= \frac{2,5 \text{ Kg}}{5 \text{ Kg}} \times 100\%$$

$$= 50\%$$

### • Perhitungan Presentase Rendemen

$$\text{Presentase Rendemen} = \frac{\text{Berat Ekstrak}}{\text{Berat Kering Daun}} \times 100\%$$

$$= \frac{45}{100} \times 100\%$$

$$= 45\%$$



### Lampiran 6. Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Teh Hijau (*C. sinensis*)

- Perhitungan Stok Larutan Ekstrak

Ekstrak Larutan 1000 ppm = 1000 mg/L

$$= \frac{1000 \text{mg (ekstrak)}}{1000 \text{ml (Larutan Pengencer)}}$$

$$= \frac{0,1 \text{ (Ekstrak)}}{100 \text{ ml (Larutan Pengencer)}}$$

- Pengenceran Larutan

Pengenceran Larutan dengan dosis 1000 ppm ke larutan 110 ppm, 120 ppm, 130 ppm, 140 ppm, 150 ppm.

a) 110 ppm

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 1000 = 2 \cdot 110$$

$$V_1 = 0,22 \text{ ml}$$

0,22 ml larutan stok 1000 ppm + 1,78 ml larutan pengencer

b) 120 ppm

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 1000 = 2 \cdot 120$$

$$V_1 = 0,24 \text{ ml}$$

0,24 ml larutan stok 1000 ppm + 1,76 ml larutan pengencer

c) 130 ppm

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 1000 = 2 \cdot 130$$

$$V_1 = 0,26 \text{ ml}$$

0,26 ml larutan stok 1000 ppm + 1,74 ml larutan pengencer

d) 140 ppm

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

$$V_1 \cdot 1000 = 2 \cdot 140$$

$$V_1 = 0,28 \text{ ml}$$

0,28 ml larutan stok 1000 ppm + 1,72 ml larutan pengencer

e) 150 ppm

$$V_1 \cdot N_1 = V_2 \cdot N_2$$

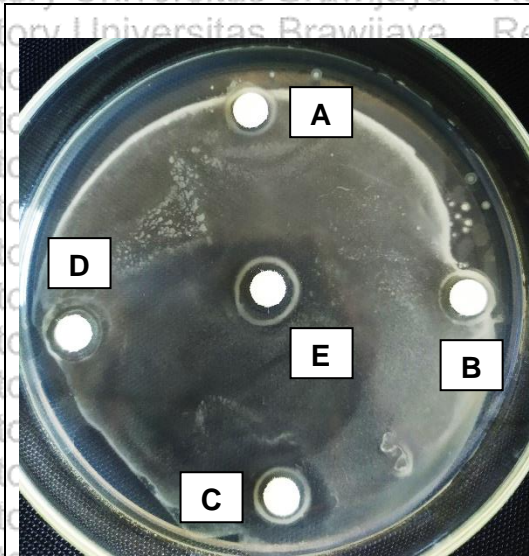
$$V_1 \cdot 1000 = 2 \cdot 150$$

$$V_1 = 0,30 \text{ ml}$$

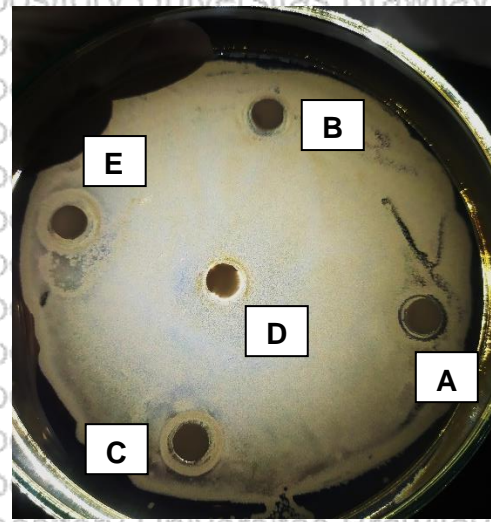
0,30 ml larutan stok 1000 ppm + 1,70 ml larutan pengencer



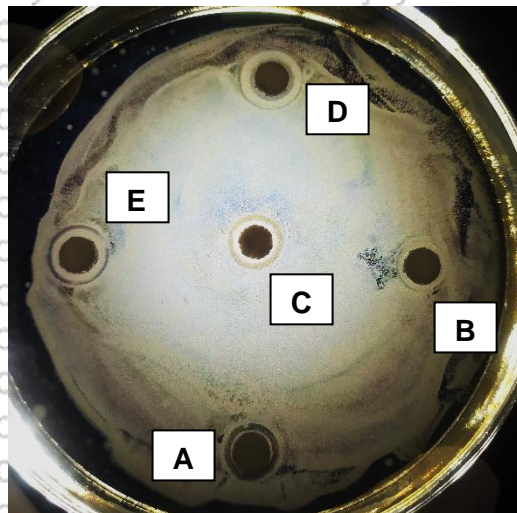
Lampiran 7. Hasil Uji Cakram



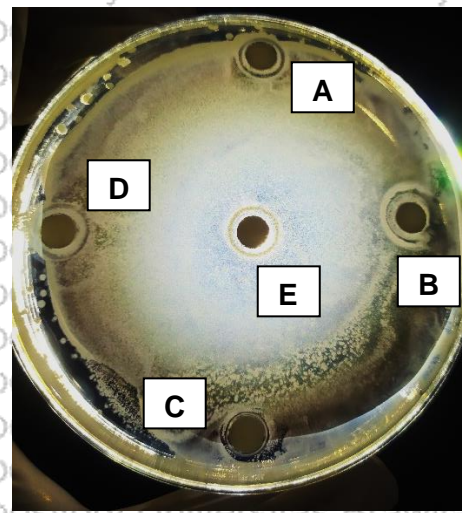
Ulangan Pertama



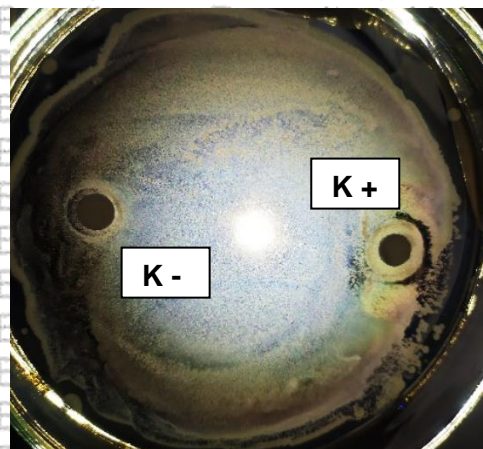
Ulangan Kedua



Ulangan Ketiga



Ulangan Keempat



Kontrol positif dan negatif



### Lampiran 8. Perhitungan Data Hasil Penelitian

Perlakuan	Ulangan				Jumlah	Rerata	stdv
	1	2	3	4			
A	7,98	7,68	7,58	7,28	30,52	7,63	0,29
B	7,36	8,12	7,83	8,11	31,42	7,86	0,36
C	8,42	8,79	8,34	8,35	33,90	8,48	0,21
D	9,00	9,60	9,43	9,48	37,51	9,38	0,26
E	10,67	10,32	9,99	10,08	41,06	10,27	0,30
				Total	174,41		

#### • Perhitungan Sidik Ragam

$$\begin{aligned} \checkmark \text{ Faktor Koreksi (FK)} &= \frac{G^2}{N} \\ &= \frac{174,41^2}{20} \\ &= 1520,94 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \checkmark \text{ JK Total} &= (A^2 + A^2 + \dots + E^2) - \text{FK} \\ &= (7,98^2 + 7,68^2 + \dots + 10,08^2) - 1520,94 \\ &= 20,51 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \checkmark \text{ JK Perlakuan} &= \frac{\sum(\sum x_i)^2}{r} - \text{FK} \\ &= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2}{4} - \text{FK} \\ &= \frac{30,52^2 + 31,42^2 + 33,90^2 + 37,51^2 + 41,06^2}{4} - 1520,94 \\ &= 19,26 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \checkmark \text{ JK Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 20,51 - 19,26 \\ &= 1,25 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \checkmark \text{ Derajat Bebas (db) Total} &= (n \times r) - 1 \\ &= (5 \times 4) - 1 \\ &= 19 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \checkmark \text{ Derajat Bebas (db) Perlakuan} &= n - 1 \\ &= 5 - 1 \\ &= 4 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \checkmark \text{ Derajat Bebas (db) Acak} &= 5 \times (r - 1) \\ &= 5 \times (4 - 1) \\ &= 15 \end{aligned}$$



Lampiran 8 (Lanjutan)

$$\begin{aligned} \checkmark \text{ Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan} &= \frac{JK \text{ Perlakuan}}{db \text{ Perlakuan}} \\ &= \frac{19,26}{4} \\ &= 4,82 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \checkmark \text{ Kuadrat Tengah (KT) Acak} &= \frac{JK \text{ Acak}}{db \text{ Acak}} \\ &= \frac{1,25}{15} \\ &= 0,08 \end{aligned}$$

$$\checkmark F \text{ hitung} = \frac{KT \text{ Perlakuan}}{KT \text{ Acak}} = \frac{4,82}{0,08} = 57,83$$

- Analisa Sidik Ragam
- Perhitungan Uji BNT

$$SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{r}} = \sqrt{\frac{2 \times 0,08}{4}} = 0,20406$$

$$\begin{aligned} \text{BNT } 5\% &= T \text{ table } 5\% (db \text{ acak}) \times SED \\ &= 2,131 \times 0,20406 \\ &= 0,435 \end{aligned}$$

• **Tabel Uji BNT**

Rerata Perlakuan	Perlakuan	A	B	C	D	E	Notasi
		7,63	7,86	8,48	9,38	10,27	
A	7,63	-	-	-	-	-	a
B	7,86	0,225 <sup>ns</sup>	-	-	-	-	a
C	8,48	0,845*	0,62*	-	-	-	b
D	9,38	1,7475*	1,5225*	0,9025*	-	-	c
E	10,27	2,635*	2,41*	1,79*	0,8875*	-	d

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata

(\*) = berbeda nyata

Berdasarkan hasil data diatas perhitungan Uji Berbeda Nyata (BNT)

diketahui yang mana hasil terbaik diperoleh pada perlakuan E yang kemudian diikuti oleh D, C, B, dan A.

Lampiran 8 (Lanjutan)

• **Tabel Polynomial Orthogonal**

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	30,52	-2	2	-1	1
B	31,42	-1	-1	2	-4
C	33,90	0	-2	0	6
D	37,51	1	-1	-2	-4
E	41,06	2	2	1	1
$Q = \sum C_i \cdot T_i$		27,17	6,43	-1,64	-0,74
$kr = (\sum C_i^2) \cdot r$		40	56	40	280
$JK = Q^2 / Kr$		18,46	0,74	0,07	0,001956

o  $JK \text{ Regresi Total} = JK \text{ Linier} + JK \text{ Kuadratik} + JK \text{ Kubik}$   
 $= 18,46 + 0,74 + 0,07 = 19,26$

• **Analisis Sidik Ragam Regresi**

sumber keragaman	Db	JK	kt	f. hitung	f5%
perlakuan	4	19,26			3,06
linier	1	18,46	18,46	221,61	*
kuadratik	1	0,74	0,74	8,87	*
kubik	1	0,07	0,07	0,81	ns
kuartik	1	0,001956	0,001956	0,02	ns
acak	15	1,25	0,08		
total	19	20,51			

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata  
 (\*) = berbeda nyata

Berdasarkan hasil data sidikragam regresi diatas diperoleh nilai F5% dari regresi linear dan kuadratik yaitu berbeda nyata maka dapat menghitung R<sup>2</sup> dari setiap regresi seperti dibawah ini:

➤  $R^2 \text{ Linier} = \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}}$   
 $= \frac{18,46}{18,46 + 1,25}$   
 $= 0,93658$



Lampiran 8 (Lanjutan)

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

$$= \frac{0,74}{0,74 + 1,25} = 0,371477$$

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

$$= \frac{0,07}{0,07 + 1,25} = 0,051078$$

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

$$= \frac{0,001956}{0,001956 + 1,25} = 0,001563$$

Hasil Perhitungan R<sup>2</sup> menunjukkan bahwa nilai dar R<sup>2</sup> linier lebih besar daripada nilai R<sup>2</sup> kuadrat, kubik serta kuartik, sehingga menunjukkan bahwa kurva yang digunakan yaitu kurva linier yang kemudian dicari persamaan regresi liniernya. Dosis yang digunakan yaitu sebagai sumbu X dan nilai rerata skoring sebagai sumbu y sehingga diperoleh garis linier sebagai berikut.

• **Tabel Sumbu X dan Y**

Perlakuan	Dosis yang diberikan (X)	Daya Hambat (Y)	XY	X <sup>2</sup>
A1	110	7,98	877,80	12100
A2	110	7,68	844,80	12100
A3	110	7,58	833,80	12100
A4	110	7,28	800,80	12100
B1	120	7,36	883,20	14400
B2	120	8,12	974,40	14400
B3	120	7,83	939,60	14400
B4	120	8,11	973,20	14400
C1	130	8,42	1094,60	16900
C2	130	8,79	1142,70	16900
C3	130	8,34	1084,20	16900
C4	130	8,35	1085,50	16900
D1	140	9,00	1260,00	19600
D2	140	9,60	1344,00	19600
D3	140	9,43	1320,20	19600
D4	140	9,48	1327,20	19600
E1	150	10,67	1600,50	22500



Lampiran 8 (Lanjutan)

Perlakuan	Dosis yang diberikan (X)	Daya Hambat (Y)	XY	X <sup>2</sup>
E2	150	10,32	1548,00	22500
E3	150	9,99	1498,50	22500
E4	150	10,08	1512,00	22500
Jumlah	2600	174,41	22945	342000

$$B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$= 0,06793$$

$$B0 = \frac{(\sum y) (\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$$

$$= -0,10975$$

Berdasarkan data diatas diperoleh persamaan linier dari B0 dan B1 yaitu  
 $y = -0,110 + 0,68x$ .