

**PENGARUH EFEKTIFITAS ANTIBAKTERI LARUTAN DAUN SAMBILOTO
(*Andrographis paniculata*) TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa***

SECARA IN VITRO

SKRIPSI

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN

Oleh :

NURINA TRI HAYUDANTI

NIM. 0910853002



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

**PENGARUH EFEKTIFITAS ANTIBAKTERI LARUTAN DAUN SAMBILOTO
(*Andrographis paniculata*) TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa***

SECARA IN VITRO

SKRIPSI

PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN

JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERIKANAN

Sebagai Salah Satu Syarat untuk Meraih gelar Sarjana Perikanan
di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan

Universitas Brawijaya

Oleh :

NURINA TRI HAYUDANTI

NIM. 0910853002



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2014

SKRIPSI

PENGARUH EFEKTIFITAS ANTIBAKTERI LARUTAN DAUN SAMBILOTO
(*Andrographis paniculata*) TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas aeruginosa*
SECARA IN VITRO

Oleh:

NURINA TRI HAYUDANTI
NIM. 0910853002

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 18 Agustus 2014
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Penguji I

(Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS)
NIP.19611106 198602 2 001
Tanggal :

Dosen Penguji II

(M. Fakhri, S.Pi, MP, M. Sc)
NIK. 860717 08 1 1 0092
Tanggal :

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Maftuch, Msi)
NIP. 19660825 199203 1 001
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

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

Mengetahui,
Ketua Jurusan

Dr. Ir. Arning .W. Ekawati, MS
NIP.19620805 198603 2 001
Tanggal :

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 10 Juli 2014

Mahasiswa

Nurina Tri Hayudanti



UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Puji syukur yang sebesar-besarnya kepada Allah SWT.
- Sujud dan terima kasih yang dalam, penulis persembahkan kepadal bunda dan Ayahanda tercinta serta kakak dan adikku tersayang atas dorongan yang kuat, kebijaksanaan dan do'a.
- Dr. Ir. Maftuch, Msi dan Ir. Heny Suprastyani, MS selaku dosen pembimbing.
- Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS dan M. Fakhri, S.Pi, MP, M. Sc selaku dosen penguji.
- Teman-teman Budidaya Perairan 2009 a.k.a Saudara'09 untuk segala info, bantuan,dukungan dan do'anya. Bangga dan bahagia menjadi bagian dari keluarga BP 09.
- Sahabat-sahabatku tercinta, khususnya Pujiastiti Lestari SP dan Ayu Purnama S. S. Pi dan teman-teman yang tidak dapat disebutkan satu persatu telah banyak memberikan bantuan sehingga turut berperan dalam memperlancar penelitian dan penulisan ini.
- Teman-teman Penelitian di lab Parasit dan Penyakit Ikan juga para *laborant*. mbak Titin, Pak Yit dan Pak Udin yang selalu membantu dan memberikan banyak saran yang sangat bermanfaat. Serta semua pihak yang sudah membantu dan tidak bisa disebutkan satu per satu. Terima kasih banyak.

Malang, 10 Juli 2014

Penulis

RINGKASAN

NURINA TRI HAYUDANTI. Pengaruh Efektifitas Antibakteri Larutan Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*) Terhadap Bakteri *Pseudomonas aeruginosa* Secara In Vitro (di bawah bimbingan **DR. IR. MAFTUCH, MSI** dan **IR. HENY SUPRASTYANI, MS**)

Untuk memenuhi permintaan produk perikanan yang terus meningkat, penerapan intensifikasi budidaya tidak dapat dihindarkan. Namun, intensifikasi budi daya dapat menimbulkan berbagai dampak negatif antara lain penyakit. Hingga kini, metode yang banyak digunakan untuk menanggulangi penyakit pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Cara ini sangat berisiko karena dapat menimbulkan resistensi terhadap bakteri, memerlukan biaya yang cukup mahal, serta dapat mencemari lingkungan. Antibiotik biasanya diberikan melalui makanan, perendaman, atau penyuntikan, sehingga residu antibiotik dapat terakumulasi pada ikan. Untuk menghindari dampak negatif penggunaan antibiotik, penanggulangan penyakit ikan diupayakan melalui peningkatan kekebalan dengan vaksinasi. Namun, pemakaian vaksin tersebut masih belum memasyarakat di kalangan pembenih ikan.

Berkaitan dengan permasalahan tersebut, perlu ada alternatif bahan obat yang lebih aman yang dapat digunakan dalam pengendalian penyakit ikan. Salah satu alternatifnya adalah dengan menggunakan tumbuhan obat yang bersifat antiparasit, antijamur, antibakteri, dan atau antiviral. Beberapa keuntungan menggunakan tumbuhan obat antara lain relatif lebih aman, mudah diperoleh, murah, tidak menimbulkan resistensi, dan relatif tidak berbahaya terhadap lingkungan sekitarnya. Tumbuhan obat yang diketahui dapat dimanfaatkan dalam pengendalian berbagai agen penyebab penyakit ikan adalah sambiloto (*Andrographis paniculata*). Tanaman sambiloto bersifat anti bakteri, sedangkan daun jambu biji selain bersifat anti bakteri juga bersifat anti viral.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui peran larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dalam menghambat bakteri *P. aeruginosa* dan untuk mengetahui dosis terbaik dalam uji pemberian larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai antibakteri.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang digunakan yaitu perlakuan A (1,25 ppt), B (2,5 ppt), C (3,75 ppt), D (5 ppt), dan kontrol dan diujikan pada bakteri *P. aeruginosa* sebagai antibakteri dengan menggunakan metode cakram dan metode MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian larutan daun sambiloto (*A. paniculata*) dengan dosis yang berbeda memberikan hasil yang berbeda sangat nyata dalam membunuh pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*. Dengan rata-rata daya hambat sebagai berikut: A = 10,2 mm, B = 10,76 mm, C = 11,1 mm, D = 11,73 mm. Berdasarkan uji regresi diperoleh persamaan $Y = 0,411X + 9,306$ dengan nilai korelasi r sebesar 0,79 dengan grafik linier dimana semakin tinggi konsentrasi akan memberikan pengaruh daya hambat yang semakin besar. Dapat disimpulkan bahwa pemberian larutan daun sambiloto (*A. paniculata*) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*. Semakin tinggi konsentrasi larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) akan memberikan pengaruh berbeda sangat nyata dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa*. Dosis terbaik dalam penelitian ini yaitu pada perlakuan D (5 ppt) dengan daya hambat rata-rata 11,73 mm.

Hasil penelitian ini dapat disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) pada bakteri yang berbeda.



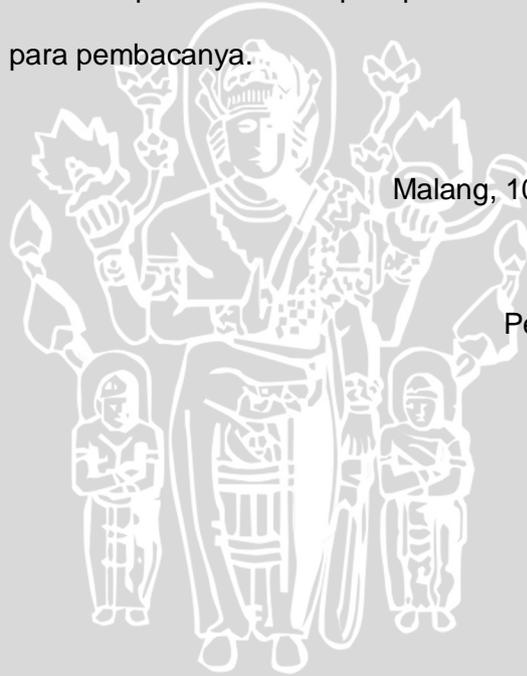
KATA PENGANTAR

Puji syukur kepada Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah serta karunia-Nya sehingga penyusunan skripsi dengan Judul “Pengaruh Efektifitas Antibakteri Larutan Daun Sambiloto (*Andrographis Paniculata*) Terhadap Bakteri *Pseudomonas Aeruginosa* Secara In Vitro” dapat diselesaikan dengan baik.

Penulis menyadari bahwa laporan hasil Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan. Oleh karena itu, penulis mengharapkan saran dan kritik dari semua pihak demi perbaikan laporan ini. Harapan penulis semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi para pembacanya.

Malang, 10 Juli 2014

Penulis



DAFTAR ISI

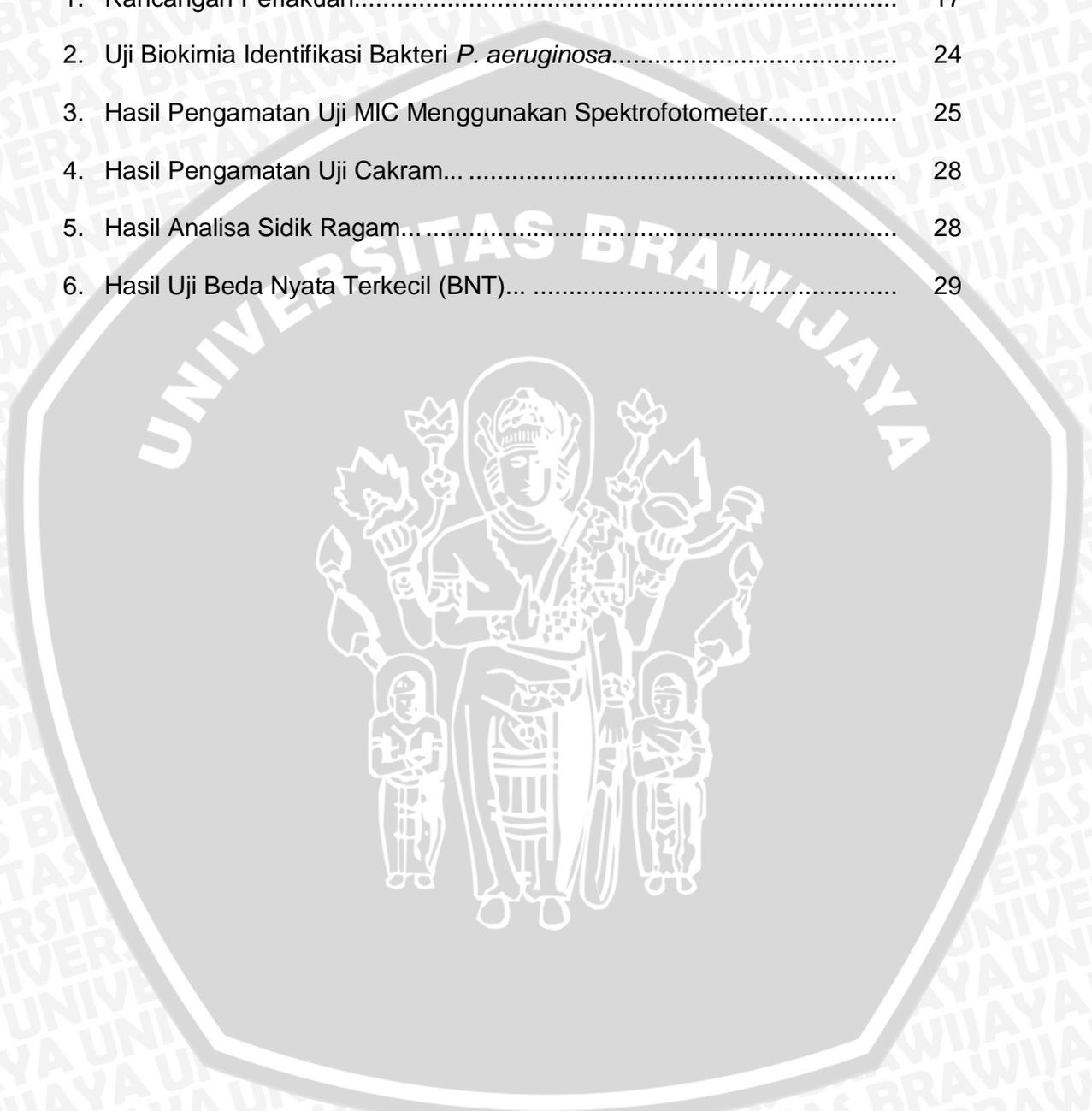
	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
1 PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Kegunaan Penelitian	4
1.5 Hipotesis	4
1.6 Tempat dan Waktu	4
2 TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 <i>Sambiloto (Andrographis paniculata)</i>	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	6
2.1.3 Manfaat dan kegunaan Daun Sambiloto	7
2.1.4 Komposisi Kimia pada Daun Sambiloto	7
2.2 <i>Bakteri Pseudomonas aeruginosa</i>	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	8
2.2.2 Habitat dan Penyebarannya	9
2.2.3 Perkembangbiakan Bakteri	10
2.2.4 Media Biakan Bakteri	11
2.3 Uji Aktivitas antimikroba (In-vitro)	12
2.3.1 Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>)	12
2.3.2 Metode Difusi (Metode Cakram)	12
2.3.3 Metode Dilusi (Metode Tabung)	13
3 METODOLOGI	15
3.1 Materi Penelitian	15
3.1.1 Alat-alat Penelitian	15
3.1.2 Bahan-bahan Penelitian	15
3.2 Metode Penelitian dan Rancangan Penelitian	15
3.2.1 Metode Penelitian	15
3.2.2 Rancangan Penelitian	16
3.3 Prosedur Penelitian	17
3.3.1 Alur Penelitian	17
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian	18
a. Sterilisasi Alat dan Bahan	18
b. Pembuatan Larutan Daun Sambiloto	19
c. Pemiakan Bakteri <i>Pseudomonas aruginosa</i>	19
1. Media padat	19

2. Media cair.....	19
d. Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>).....	19
e. Uji Cakram.....	20
3.4 Parameter Uji	21
3.5 Analisa Data.....	21
4 HASIL DAN PEMBAHASAN.....	23
4.1 Uji Patogenitas Bakteri <i>Pseudomonas aerinosa</i>	23
4.2 Uji MIC(<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>)	25
4.3 UjiCakram	26
5 KESIMPULAN DAN SARAN	33
DAFTAR PUSTAKA.....	34
LAMPIRAN	37



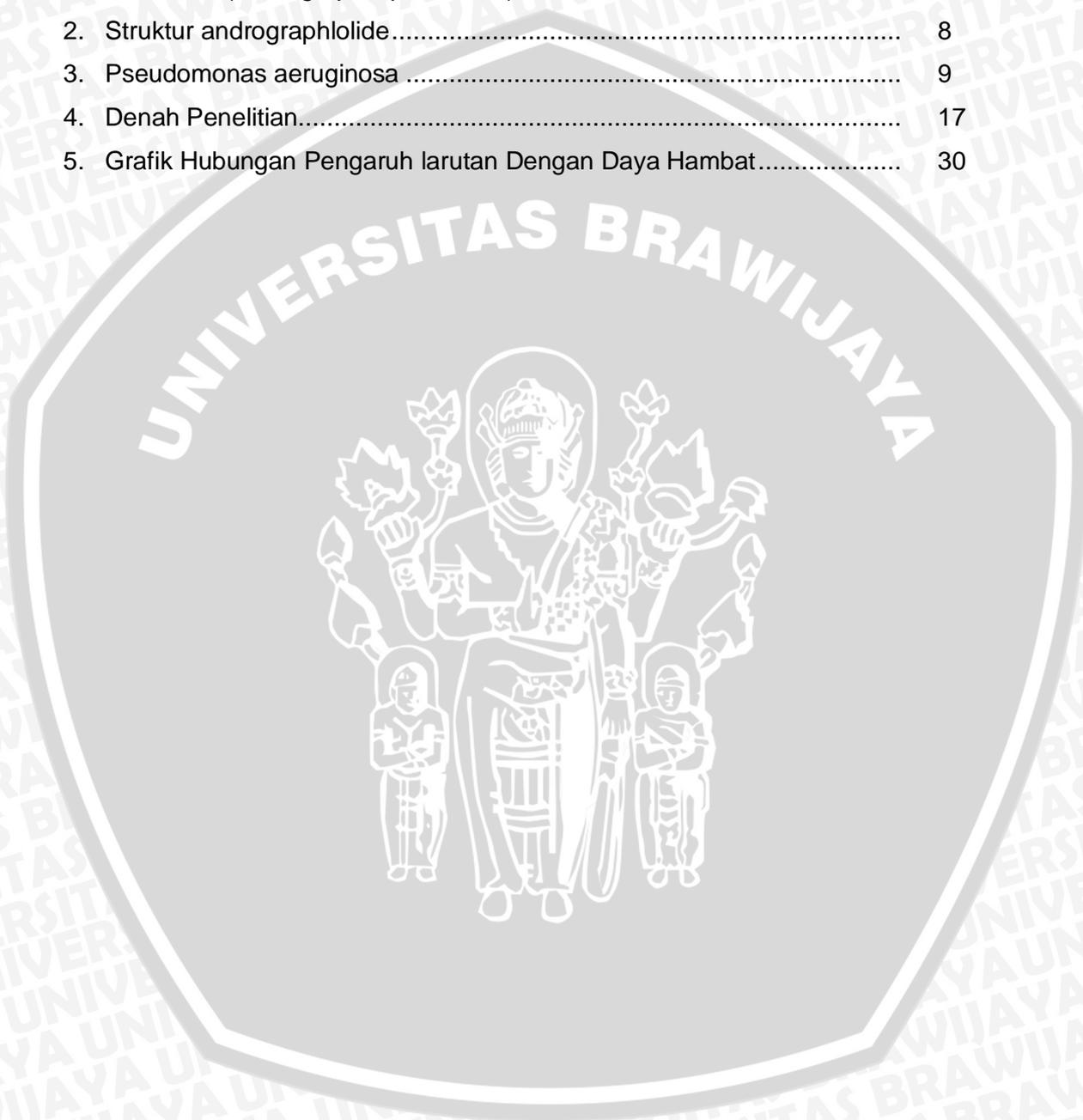
DAFTAR TABEL

No.		Halaman
1.	Rancangan Perlakuan.....	17
2.	Uji Biokimia Identifikasi Bakteri <i>P. aeruginosa</i>	24
3.	Hasil Pengamatan Uji MIC Menggunakan Spektrofotometer.....	25
4.	Hasil Pengamatan Uji Cakram.....	28
5.	Hasil Analisa Sidik Ragam.....	28
6.	Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT).....	29



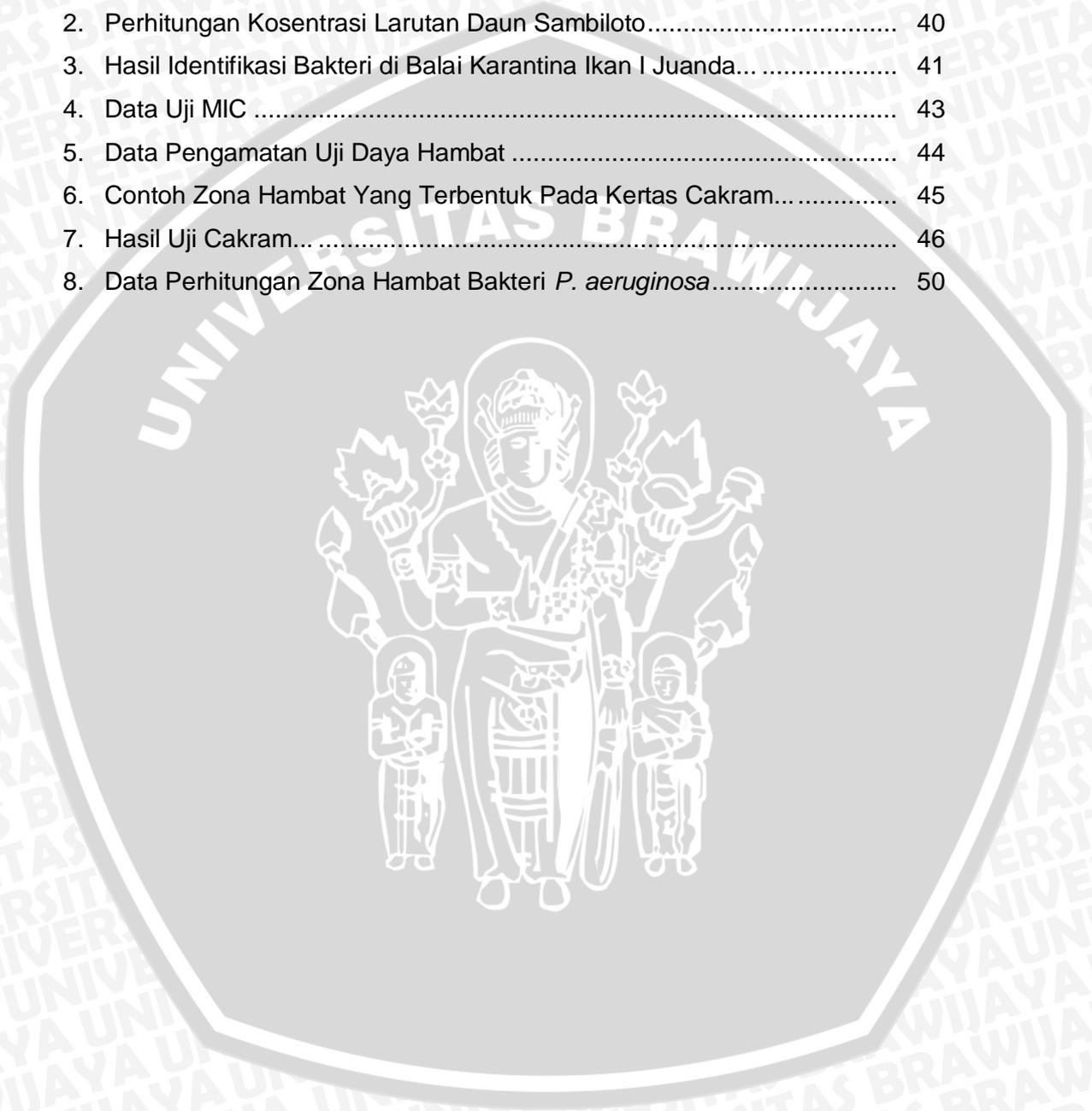
DAFTAR GAMBAR

No.		Halaman
1.	Sambiloto (<i>Andrographis paniculata</i>)	5
2.	Struktur andrographolide.....	8
3.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	9
4.	Denah Penelitian.....	17
5.	Grafik Hubungan Pengaruh larutan Dengan Daya Hambat.....	30



DAFTAR LAMPIRAN

No.	Halaman
1. Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian.....	37
2. Perhitungan Kosentrasi Larutan Daun Sambiloto.....	40
3. Hasil Identifikasi Bakteri di Balai Karantina Ikan I Juanda.....	41
4. Data Uji MIC	43
5. Data Pengamatan Uji Daya Hambat	44
6. Contoh Zona Hambat Yang Terbentuk Pada Kertas Cakram.....	45
7. Hasil Uji Cakram.....	46
8. Data Perhitungan Zona Hambat Bakteri <i>P. aeruginosa</i>	50



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Perairan umum adalah suatu genangan air yang relatif luas yang dimiliki dan dikuasai oleh negara serta dimanfaatkan untuk kepentingan dan kesejahteraan masyarakat. Perairan umum meliputi danau, waduk, rawa, dan sungai. Pada umumnya perairan umum dimanfaatkan oleh masyarakat untuk kegiatan transportasi, penangkapan ikan, dan sebagai sumber air untuk kehidupan rumah tangga, serta sebagai plasma nutfah perairan (Maskur, 2002).

Untuk memenuhi permintaan produk perikanan yang terus meningkat, penerapan intensifikasi budi daya tidak dapat dihindarkan. Namun, intensifikasi budidaya dapat menimbulkan berbagai dampak negatif antara lain penyakit. Hingga kini, metode yang banyak digunakan untuk menanggulangi penyakit pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Cara ini sangat berisiko karena dapat menimbulkan resistansi terhadap bakteri, memerlukan biaya yang cukup mahal, serta dapat mencemari lingkungan. Antibiotik biasanya diberikan melalui makanan, perendaman, atau penyuntikan, sehingga residu antibiotik dapat terakumulasi pada ikan. Untuk menghindari dampak negatif penggunaan antibiotik, penanggulangan penyakit ikan diupayakan melalui peningkatan kekebalan dengan vaksinasi. Namun, pemakaian vaksin tersebut masih belum memasyarakat di kalangan pembudidaya ikan (Mariyono dan Agus, 2002).

Berkaitan dengan permasalahan tersebut, perlu ada alternatif bahan obat yang lebih aman yang dapat digunakan dalam pengendalian penyakit ikan. Salah satu alternatifnya adalah dengan menggunakan tumbuhan obat yang bersifat antiparasit, antijamur, antibakteri, dan atau antiviral. Beberapa keuntungan menggunakan tumbuhan obat antara lain relatif lebih aman, mudah diperoleh, murah, tidak menimbulkan resistensi, dan relatif tidak berbahaya terhadap

lingkungan sekitarnya. Beberapa tumbuhan obat yang diketahui dapat dimanfaatkan dalam pengendalian berbagai agen penyebab penyakit ikan adalah sirih (*Piper betle* L.), daun jambu biji (*Psidium guajava* L.), sambiloto (*Andrographis paniculata*). Daun sirih diketahui berdaya antioksidasi, antiseptik, bakterisida, dan fungisida. Tanaman sambiloto bersifat anti bakteri, sedangkan daun jambu biji selain bersifat anti bakteri juga bersifat anti viral (Sugianti, 2005).

Menurut Widyawati (2007), bahwa penggunaan tanaman obat serta pengobatan telah lama dipraktekkan di seluruh dunia, baik di negara berkembang maupun negara maju. Sambiloto (*Andrographis panicula*) merupakan salah satu dari sembilan obat tradisional yang diunggulkan untuk dikaji sampai tahap uji klinis. Kandungan kimia terdiri dari flavonoid dan lakton. Khasiat sambiloto sebenarnya sudah dikenal luas sejak zaman dulu, baik oleh orang Indonesia maupun bangsa-bangsa di dunia. Berbagai studi telah dilakukan yang sebagian besar konsentrasinya untuk mengetahui komposisi, keamanan, khasiat dan mekanisme kerja sambiloto. Di Indonesia sendiri, sambiloto dipasarkan baik dalam sediaan tunggal atau gabungan dengan bahan alami lain dalam bentuk tablet, yang masih tergolong sediaan jamu. Zat aktif utama tanaman ini adalah andrographolide, yang berasal dari komponen lakton. Semua bagian tanaman sambiloto, seperti daun, batang, bunga, dan akar, terasa sangat pahit jika dimakan atau direbus untuk diminum. Diduga ini berasal dari andrographolide yang dikandungnya. Sebenarnya, semua bagian tanaman sambiloto bisa dimanfaatkan sebagai obat, termasuk bunga dan buahnya. Namun bagian yang paling sering digunakan sebagai bahan ramuan obat adalah daun dan batangnya.

1.2 Rumusan Masalah

Manusia memegang peranan penting dalam upaya mencegah terjadinya serangan penyakit pada ikan di kolam budidaya. Umumnya wabah penyakit yang menyerang ikan di kolam disebabkan oleh kesalahan manusia dalam mengelola lingkungan kolam. Jarang sekali dijumpai adanya serangan penyakit terhadap ikan yang dipelihara di kolam-kolam yang terawat baik (Afrianto dan Evi, 1992).

Beberapa upaya penanggulangan telah dilakukan. Salah satunya dengan penggunaan bahan kimia dan antibiotik lainnya. Tetapi penggunaan antibiotik secara terus menerus akan menimbulkan masalah, yaitu timbulnya patogen yang resisten, penimbunan residu antibiotik di dalam tubuh ikan, maupun pencemaran lingkungan yang akhirnya dapat mempengaruhi organisme perairan yang berguna. Apabila telah timbul patogen yang resisten maka dosis antibiotik harus ditingkatkan. Hal ini berarti menambah biaya, dan meningkatkan pengaruh sampingan (Kamiso. *et. al.*, 1996).

Hingga kini, metode yang banyak digunakan untuk menanggulangi penyakit pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Cara ini sangat berisiko karena dapat menimbulkan resistansi terhadap bakteri, memerlukan biaya yang cukup mahal, serta dapat mencemari lingkungan. Antibiotik biasanya diberikan melalui makanan, perendaman, atau penyuntikan, sehingga residu antibiotik dapat terakumulasi pada ikan (Mariyono dan Sundana, 2002). Berkaitan dengan hal tersebut, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- a. Apakah penggunaan larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) mampu menghambat bakteri *P. aeruginosa*?
- b. Berapa dosis terbaik dalam penggunaan larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai antibakteri *P. aeruginosa*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini yaitu untuk mengetahui apakah larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) dapat menghambat bakteri *P. aeruginosa* dan untuk mengetahui dosis terbaik dalam uji pemberian larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai antibakteri.

1.4 Hipotesa

H_0 : Diduga penggunaan larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai antibakteri tidak berpengaruh dalam menghambat bakteri *P. aeruginosa*.

H_1 : Diduga penggunaan larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai antibakteri memberikan pengaruh dalam menghambat bakteri *P. aeruginosa*.

1.5 Kegunaan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang pemanfaatan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai antibakteri dalam menghambat bakteri *P. aeruginosa* dan mudah diaplikasikan oleh masyarakat dalam menunjang usaha budidaya.

1.6 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang pada bulan Juli hingga Bulan Agustus pada tahun 2013.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Prapanza dan Lukito (2003), klasifikasi tanaman sambiloto (Gambar 1) adalah sebagai berikut:

Divisi	: Spermatophyta
Kelas	: Dicotyledoneae
Ordo	: Personales
Famili	: Acanthaceae
Genus	: <i>Andrographis</i>
Spesies	: <i>Andrographis paniculata</i>



Gambar 1. Sambiloto (*A. paniculata*) (Pujiasmanto et al., 2007)

Sambiloto (*A. paniculata*) ialah tumbuhan semusim yang termasuk dalam suku *Acanthaceae*. Tinggi sambiloto apabila diukur dari pangkal batang hingga ujung tajuk adalah kurang lebih 30–100 cm. Sambiloto memiliki banyak cabang dan bunganya berwarna putih keunguan. Daun sambiloto berukuran kecil, berbentuk lancet (pedang), ujung runcing, tepi rata, tangkai pendek, letaknya saling berhadapan, panjang daun 2 – 8 cm dan lebar 1 – 3 cm, permukaan atas

daun berwarna hijau tua dan permukaan bawahnya berwarna hijau muda. Buah sambiloto berbentuk jorong, pangkal dan ujungnya tajam dengan panjang buah sekitar 2 cm. Buah sambiloto terdiri dari dua rongga, tiap rongga berisi 3–7 biji kecil berwarna cokelat muda yang berbentuk gepeng (Prapanza dan Lukito, 2003).

Sambiloto merupakan tanaman yang memiliki tinggi sekitar 40-90 cm. Batangnya berbentuk segi empat dengan nodus yang membesar dengan percabangan banyak. Daunnya berupa daun tunggal yang berhadapan silang. Warna daun hijau tua dengan permukaan bawah lebih muda. Bentuk daun ramping agak memanjang dengan bagian pangkal dan ujung runcing. Panjang daun sekitar 2-8 cm, sedangkan lebarnya 1-3 cm. Tangkai daun sangat pendek dan memiliki rasa pahit. Bunga sambiloto berukuran kecil, berwarna putih keunguan dan keluar dari ujung batang atau ketiak daun. Buahnya berbentuk memanjang sampai jorong. Panjang buah sekitar 1,5 cm dan lebar 0,5 cm. Pangkal dan daun ujung buah tajam. Setelah masak, buah akan menjadi 4 keping. Biji buah berbentuk gepeng dan berwarna cokelat muda (Muhlisah, 2008).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Sambiloto ialah tumbuhan yang tumbuh secara alami di daerah dataran rendah hingga ketinggian \pm 1.600 dpl. Habitat sambiloto ialah di tempat terbuka seperti ladang, pinggir jalan, tebing, saluran atau sungai, semak belukar, di bawah tegakan pohon jati atau bambu. (Winarto, 2003).

Tumbuhan sambiloto memiliki daya adaptasi pada lingkungan ekologi setempat. Tumbuhan tersebut terdapat di seluruh Nusantara karena dapat tumbuh dan berkembang baik pada berbagai topografi dan jenis tanah. Tumbuh baik pada curah hujan 2.000 – 3.000 mm /tahun, suhu udara 25 – 32°C serta

kelembaban yang dibutuhkan antara 70 – 90%. Tumbuhan sambiloto dapat tumbuh pada semua jenis tanah, ialah yang subur, mengandung banyak humus, tata udara dan pengairan yang baik. Sambiloto tumbuh optimal pada pH tanah 6 – 7 (netral). Pada tingkat kemasaman tersebut, unsur hara yang dibutuhkan tanaman cukup tersedia dan mudah diserap oleh tanaman. Kedalaman perakaran sambiloto dapat mencapai 25 cm dari permukaan tanah (Pujiasmanto *et al.*, 2007).

2.1.3 Manfaat dan kegunaan Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Ekstrak *Andrographis paniculata* dapat menjadi anti-typhoid, aktivitas antifungal, antioksidan, anti-inflamasi, antibisa ular dan antipyretic. Selain itu dapat digunakan sebagai agen stimulan. Seluruh bagian tanaman dapat bermanfaat dalam pengobatan seperti luka, borok, kusta, sakit tenggorokan, hipertensi dan lain-lain (Sharma dan Joshi, 2011).

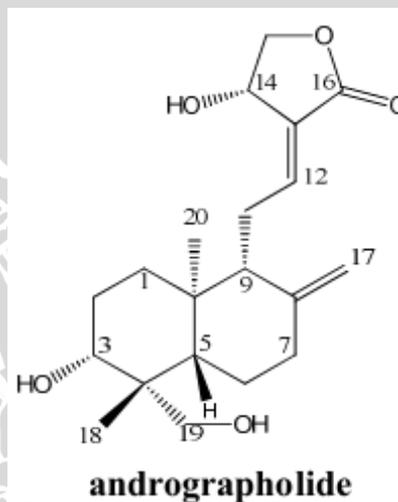
Andrographis paniculata telah ditemukan sebagai antibiotik yang efektif, antivirus, anti-parasit dan sebagai stimulan sistem imun. Dari ilmuan lain ditemukan adanya manfaat *A. paniculata* sebagai agen immunostimulan. Kandungan kimia andrographolide dapat bermanfaat sebagai antikanker dan aktivitas imunomodular (Bobbarala *et al.*, 2009).

2.1.4 Komposisi Kimia pada Daun Sambiloto (*Andrographis paniculata*)

Tanaman sambiloto mengandung laktone (*deoxyandrographolide*, *andrographolide*, *14-deoxy-11*, *neoandrographolide*, *12-didehydroandrographolide* dan *moandrographolide*) dan flavonoid (*alkane*, *katone*, dan aldehyd). Daunnya terutama mengandung saponin, flavonoid dan tannin. Sementara itu, akarnya mengandung flavonoid, seperti *polymethoxyflavone*, *andrographin*, *panicolin*, *mono-o-metyl/within* dan apigen-7,4-dimetil eter (Muhlisah, 2008).

Kandungan kimia utama dari *A.paniculata* adalah andrographolide (3-(2-(decahydro-6-hydroxyl-5-(hydroxymethyl)-5, 8a-dimetyl-2- methylenenaphythyl) ethylidene) dihydro-4-hydroxyfuran-2(3H)-satu), neoandrographolide. Selain itu terdapat kandungan bahan aktif meliputi andrographanin (Anju *et al.*, 2012).

Menurut Chao dan Lin (2010), andrographolide ($C_{20}H_{30}O_5$) (Gambar 2) merupakan diterpenoid utama dalam *A. paniculata* sekitar 4%, 0,8-1,2% dan 0,5-6% terkandung dalam tanaman pada ekstrak akar dan daun. Selain diterpenoid yaitu deoxyandrographolide, neoandrographolide, 14-deoxy-11,12-didehydro-andrographolide dan isoandrographolide.



Gambar 2. Struktur andrographolide (Chao dan Lin, 2010).

2.2 Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *Pseudomonas aeruginosa* menurut Zoetmulder (2011) yaitu sebagai berikut :

- Kingdom : Bacteria
- Filum : Proteobacteria
- Kelas : Gamma Proteobacteria
- Ordo : Pseudomonadales
- Famili : Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Spesies : *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa merupakan bakteri gram negatif aerob obligat, berkapsul, mempunyai flagella polar sehingga bakteri ini bersifat motil, berukuran sekitar 0,5-1,0 μm . Bakteri aerob ini mensekresikan beberapa jenis pigmen, di antaranya pyocyanin (hijau-biru), fluorescein (kuning-hijau) dan pyorubin (merah-cokelat). Bakteri ini dapat tumbuh tanpa oksigen jika tersedia NO_3 sebagai akseptor elektron. *P. aeruginosa* mampu tumbuh di lingkungan yang mengandung oli dan bahan bakar minyak lainnya. Bakteri ini terlihat sebagai bakteri tunggal, berpasangan, dan terkadang membentuk rantai yang pendek. Suhu optimum untuk pertumbuhan *P. aeruginosa* adalah 42°C . *P. aeruginosa* mudah tumbuh pada berbagai media pembiakan karena kebutuhan nutrisinya sangat sederhana (Gambar *P. aeruginosa* terdapat pada Gambar 3) (Zoetmulder, 2011).



Gambar 3. *Pseudomonas aeruginosa* (Zoetmulder, 2011)

2.2.1 Habitat dan Penyebaran

P. aeruginosa umumnya ditemukan di tanah dan air. Bakteri ini secara teratur berada pada permukaan tanaman dan kadang-kadang pada permukaan hewan. *Pseudomonas* lebih dikenal secara mikrobiologis sebagai patogen dari

tanaman maupun hewan, namun beberapa spesies merupakan patogen dari manusia (Todar, 2004).

P. aeruginosa merupakan bakteri patogen yang umum menginfeksi ikan. *Pseudomonas* spp. ditemukan di tanah, air tawar, sedimen dan air laut yang diketahui berkolonisasi di akar tanaman (Hossain *et al.*, 2006).

Bakteri ini dapat hidup pada suhu optimum yaitu 37°C dan dapat tumbuh pada suhu tinggi yaitu 42°C. Bakteri *P. aeruginosa* memiliki kemampuan untuk tumbuh pada suhu 42°C, hal ini yang membedakan dari spesies *Pseudomonas* yang lain. Namun pada suhu 5°C bakteri tidak dapat tumbuh (Krieg dan Holt, 2001).

2.2.3 Perkembangbiakan Bakteri

P. aeruginosa dikenal memiliki fleksibilitas untuk metabolisme. Bakteri ini dapat tumbuh sekitar delapan puluh senyawa organik tetapi dapat tumbuh pada media minimal dengan hanya asetat, karbon, ammonium sulfat dan nitrogen. Tidak memerlukan faktor pertumbuhan organik (Krieg dan Holt, 2001).

Sebagian besar bakteri patogen pada ikan telah diketahui dapat ditumbuhkan pada medium buatan di luar tubuh inang. Hal utama yang harus disediakan yaitu media sintesis untuk pertumbuhan bakteri. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk mengisolasi bakteri patogenik ikan secara umum. Media pertumbuhan disesuaikan dengan bakteri perairan yang akan diisolasi dari bakteri perairan tawar yaitu media TSA (*Trypticase Soya Agar* atau *Tryptone Soya Agar*). Faktor lain yang perlu diperhatikan dalam isolasi bakteri patogen ikan yaitu suhu inkubasi, suhu inkubasi untuk *Pseudomonas* sp. yaitu berkisar 15-25°C (Irianto, 2005).

2.2.4 Media Biakan Bakteri

Menurut Hidayat dan Sutarma (1999), bahwa media adalah suatu substansi yang terdiri dari campuran zat-zat makanan (nutrisi) yang diperlukan untuk pertumbuhan dan perkembangan biakan jasad renik (mikroorganisme). Media dapat berbentuk padat, cair dan semi padat (semi solid). Zat makanan yang dibutuhkan bakteri pada umumnya sangat bervariasi, dapat berbentuk senyawa-senyawa organik sederhana atau senyawa-senyawa organik kompleks (majemuk). Lebih dari 200 macam media tersedia dan dikenal untuk pembiakan, pemeliharaan dan identifikasi bakteri. Ada bakteri tertentu yang memerlukan media spesifik/khusus untuk pertumbuhannya.

Menurut Rais (2013), bahwa media biakan adalah media steril yang digunakan untuk menumbuhkan mikroorganisme. Media biakan terdiri dari garam organik, sumber energi (karbon), vitamin dan zat pengatur tumbuh (ZPT). Selain itu dapat pula ditambahkan komponen lain seperti senyawa organik dan senyawa kompleks lainnya. Keragaman yang luas dalam hal tipe nutrisi diantara bakteri, diimbangi oleh tersedianya berbagai macam media yang banyak macamnya. Macam media tersebut dapat dibagi berdasarkan bentuknya dan susunannya. Berdasarkan bentuknya, media dibagi atas media cair, semi cair dan padat. Sedangkan menurut susunannya, media dapat dibagi atas media kompleks dan media sintetik. Media biakan ada yang berbentuk padat, cair dan semi padat. Media padat adalah media biakan yang dipadatkan dengan agar, ada yang bersifat *reversible* (dapat dibalik) seperti agar nutrisi dan ada yang bersifat *irreversible* (tidak dapat dibalik) seperti serum darah terkoagulasi. Dalam kedokteran, media padat yang bersifat *irreversible* paling sering digunakan. Sedangkan agar nutrisi banyak digunakan dalam media lain. Bentuk media lain berupa cair adalah campuran komponen-komponen zat kimia tertentu dengan air

suling, sedang media yang secara fisik merupakan intermediate antara media cair dan padat, seperti agar lunak.

2.3 UJI Aktivitas antimikroba (In-vitro)

2.3.1 UJI MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Menurut Wardani *et al.*, (2012), bahwa MIC adalah konsentrasi hambat minimum dari suatu bahan yang mengandung zat atau senyawa antimikroorganisme. MIC bertujuan untuk melihat efektifitas suatu bahan antimikroba dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Pengamatan hasil uji *Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Test* dilakukan dengan cara melihat kekeruhan secara visual pada semua tabung reaksi namun memiliki kelemahan yaitu sulit untuk membedakan tingkat kekeruhan secara pasti, sehingga perlu dilakukan pengamatan berikutnya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 615 nm. Tujuan pengamatan dengan spektrofotometer yaitu untuk mengetahui nilai kekeruhan atau nilai *optical density (OD)* dari berbagai konsentrasi pengenceran berseri.

Menurut Lay (1994), bahan antimicrobial bersifat menghambat bila digunakan dalam konsentrasi kecil, namun bila digunakan dalam konsentrasi tinggi dapat mematikan, oleh karena itu perlu diketahui MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) dan MKC (*Minimum Killing Concentration*) bahan antimicrobial terhadap mikroorganisme. MIC didefinisikan sebagai konsentrasi terendah bahan antimicrobial yang mematikan.

2.3.2 Metode Difusi (Metode Cakram)

Metode cakram adalah cara yang mudah untuk menetapkan kerentanan organisme terhadap antibiotik adalah dengan menginokulasi pelat agar dengan biakan dan membiarkan antibiotik berdifusi ke media agar. Cakram yang telah mengandung antibiotik diletakkan di permukaan pelat agar yang

mengandung organisme yang diuji. Konsentrasi menurun sebanding dengan luas bidang difusi. Pada jarak tertentu pada masing-masing cakram, antibiotik berdifusi sampai pada titik antibiotik tertentu tidak lagi menghambat pertumbuhan mikroba. Efektivitas antibiotik ditunjukkan oleh zona hambatan. Zona hambatan tampak sebagai area jernih atau bersih yang mengelilingi cakram tempat zat dengan aktivitas mikroba terdifusi. Diameter zona dapat diukur dengan penggaris dan hasil eksperimen ini merupakan satu antibiogram. Metode difusi agar telah digunakan secara luas dengan menggunakan kertas cakram yang tersedia secara komersial, kemasan menunjukkan konsentrasi antibiotik tertentu juga tersedia. Efektivitas relatif antibiotik yang berbeda menjadi dasar bagi spektrum sensitivitas suatu organisme (Harmita dan Maksun Radji, 2008).

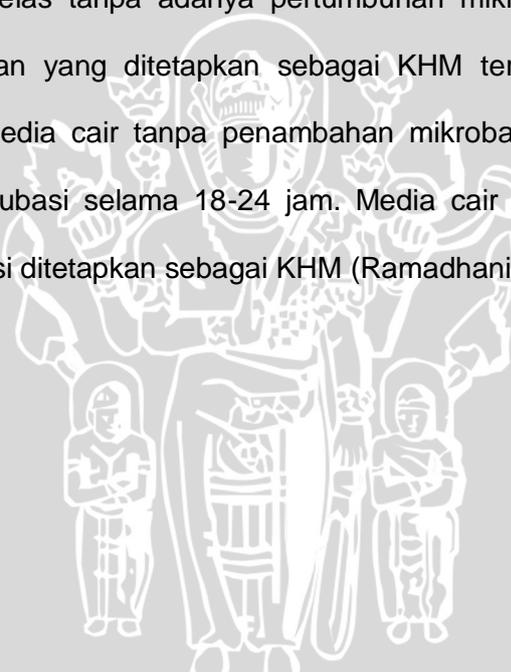
Uji kepekaan antibiotika yang paling sering dilakukan adalah metode difusi. Pada metode ini, obat yang telah diresapkan ke dalam kertas cakram ditempelkan pada MHA yang telah diinokulasikan suspensi bakteri. Setelah inkubasi, diameter zona hambatan sekitar cakram dipergunakan untuk mengukur kekuatan hambatan obat terhadap bakteri uji. Salah satu faktor yang mempengaruhi terbentuknya zona hambatan antibiotika adalah waktu peresapan bakteri dalam media agar (Farida, 2006).

2.3.3 Metode Dilusi (Metode Tabung)

Metode dilusi digunakan untuk menentukan kadar hambat minimum (KHM) dan kadar bunuh minimal (KBM) dari obat anti mikroba. Prinsip dari metode dilusi ini adalah menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Setelah itu masing-masing diuji dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Seri tabung diinkubasi pada suhu $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ selama 18-24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan

yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM dari obat. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dan obat terhadap bakteri uji (Malik, 2013).

Metode dilusi dibedakan menjadi dua yaitu dilusi cair (*broth dilution*) dan dilusi padat (*solid dilution*). Metode dilusi cair mengukur kadar hambat minimum (KHM/MIC) dan kadar bunuh bakteri (KBM/MBC). Cara yang dilakukan adalah dengan membuat seri pengenceran agen antimikrobia pada medium cair yang ditambahkan dengan mikroba uji. Larutan uji agen antimikrobia pada kadar terkecil yang terlihat jelas tanpa adanya pertumbuhan mikroba uji ditetapkan sebagai KHM. Larutan yang ditetapkan sebagai KHM tersebut selanjutnya dikultur ulang pada media cair tanpa penambahan mikroba uji ataupun agen antimikroba, dan diinkubasi selama 18-24 jam. Media cair yang tetap terlihat jernih setelah diinkubasi ditetapkan sebagai KHM (Ramadhani, 2013).



3. METODOLOGI

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat-Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah autoklaf, oven, kulkas, petridisk, erlenmeyer, beaker glass, gelas ukur, Bunsen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, hot plate, pipet tetes, timbangan digital, timbangan Sartorius, vortex, jurigen, mikropipet, pipet tetes, nampan, spektrofotometer, washing bottle, masker, sarung tangan, dan pipet volum.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah daun sambiloto (*Andrographis paniculata*), aquadest, tissue, aluminium foil, alkohol 70%, kapas, kertas label, bakteri *P. aeruginosa*, media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*), media TSB (*Tryptone Soya Broth*), media NA, gliserol, plastik, koran, benang kasur, dan kertas cakram. Gambar alat dan bahan terdapat pada Lampiran 1.

3.2 Metode Penelitian dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen, metode ini merupakan metode penelitian yang memungkinkan peneliti memanipulasi terhadap objek penelitian serta adanya kontrol. Metode eksperimental ini bertujuan untuk mencari hubungan sebab akibat dengan memanipulasi satu atau lebih variabel pada satu atau lebih kelompok eksperimental dan membandingkan hasilnya dengan kelompok kontrol yang tidak mengalami manipulasi (Nazir, 2005).

Teknik pengumpulan data penelitian ini adalah observasi langsung. Observasi langsung yaitu memungkinkan peneliti mengumpulkan data mengenai perilaku dan kejadian secara detil. Hasil penelitian dengan observasi langsung akan lebih akurat (Sangadji dan Sopiah, 2010).

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Menurut Sastrosupadi (2000), RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium, rumah kaca dan peternakan. Karena media homogen, maka media atau tempat percobaan tidak mempengaruhi pada respon yang diamati.

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

Model untuk RAL adalah sebagai berikut :

Keterangan:

Y_{ij} = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ = nilai rata-rata

τ_i = pengaruh perlakuan ke-i

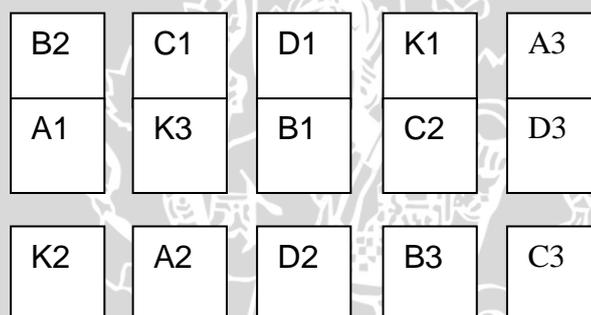
ε_{ij} = pengaruh kesalahan (galat) percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Rancangan Percobaan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang terdiri dari 4 perlakuan dan 1 kontrol untuk mengetahui pengaruh dosis larutan daun sambiloto sebagai antibakteri terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan kontrol serta 3 ulangan. Terdapat tabel rancangan perlakuan pada Tabel 1 dan denah penelitian pada Gambar 4 adalah sebagai berikut :

Tabel 1. Rancangan Perlakuan

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A1	A2	A3
B	B1	B2	B3
C	C1	C2	C3
D	D1	D2	D3
K	K1	K2	K3

Penempatan perlakuan dilakukan secara acak dengan denah penelitian seperti Gambar 4.



Gambar 4. Denah Penelitian (Hasil Pengacakan)

Keterangan :

- A : Perlakuan Dosis 1,25 ppt
- B : Perlakuan Dosis 2,5 ppt
- C : Perlakuan Dosis 3,75 ppt
- D : Perlakuan Dosis 5 ppt
- K : Kontrol Bakteri
- 1,2,3 : Ulangan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Alur Penelitian

Alur penelitian ini dilakukan dengan cara menyiapkan daun sambiloto yang dipetik beberapa lembar daun sampai sebanyak 20 gr, kemudian dicuci bersih dan daun diangin-anginkan lalu dioven selama 5 hari pada suhu 50°C. Hasil pengovenan akan didapatkan daun yang kering dan kemudian ditumbuk,

kemudian daun dihaluskan menggunakan blender sehingga didapatkan serbuk sambilan, kemudian dilarutkan dalam aquadest. Kemudian Bakteri *P. aeruginosa* ditanam pada media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) dengan metode streak yang bertujuan agar meratanya bakteri pada media yang terletak pada cawan petri. Kemudian kertas cakram (*Blank disk*) direndam pada serbuk daun sambilan yang sudah dilarutkan dengan aquadest. Kertas cakram yang sudah direndam ditanam pada media yang sudah ditumbuhi bakteri dan kemudian diamati zona hambat yang lebih baik (besar). Dan didapatkan hasilnya.

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum digunakan, alat dan bahan harus disterilisasi terlebih dahulu. Proses sterilisasi alat dan bahan menggunakan autoklaf adalah sebagai berikut yaitu alat dan bahan yang digunakan dibungkus menggunakan plastik dan diikat bagian ujung plastic, kemudian air dituang secukupnya ke dalam ruang sterilisasi, sampai menutup sistem pemanas. Hal ini bertujuan untuk mencegah penimbunan kapur pada elemen pemanas. Keranjang yang berisi bahan dan alat dimasukkan ke dalam autoklave lalu ditutup, kemudian dinyalakan power dan klep tetap terbuka, diatur suhu sampai batas maksimal, kemudian ditutup klep setelah keluar uap air dan ditunggu hingga suhu mencapai 121⁰C. Kemudian diturunkan suhu hingga lampu berwarna kuning dan diatur waktu 15 menit. Setelah alarm berbunyi, matikan power dan klep dibuka perlahan hingga jarum menunjukkan angka 0, kemudian dibuka tutup autoklaf secara perlahan. Alat dan bahan dikeluarkan dari autoklaf siap digunakan.

b. Pembuatan Larutan Daun Sambiloto (*A. paniculata*)

Misalkan untuk pembuatan dosis 1,25 ppt (gram/liter) dalam 1 liter, kemudian serbuk ditimbang sebanyak 1,25 gr (1,25 gr x 1) dengan timbangan digital dan dilarutkan aquadest steril sebanyak 1 liter. Dosis 2,5 ppt, 3,75 ppt, serta 5 ppt dilakukan dengan cara yang sama. Untuk perhitungan dosis yang lebih jelas terdapat pada Lampiran 2.

c. Pembiakan Bakteri *Pseudomonas aeruginosa***1. Media Padat**

PSA sebanyak 4,84 gram dilarutkan ke dalam 100 ml, ditambahkan 1 ml gliserol lalu dipanaskan menggunakan hot plate hingga mendidih, kemudian media dituang ke tabung reaksi sebanyak 10-12 ml. Media disterilisasi dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit, kemudian media dimiringkan dan ditunggu hingga padat. Biakan murni *Pseudomonas aeruginosa* diambil sebanyak 10^7 sel/ml kemudian digoreskan ke dalam media agar miring secara zig-zag, kemudian diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 24 jam.

2. Media Cair

NB sebanyak 1,3 gram dilarutkan ke dalam 100 ml aquades, kemudian dipanaskan di atas hot plate hingga mendidih, kemudian media disterilisasi dengan suhu 121°C, tekanan 1 atm selama 15 menit, kemudian media cair steril ditunggu hingga dingin. Biakan bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ditanam sebanyak 10^7 sel /ml ke dalam media cair NB dan diinkubasi suhu 30°C selama 24 jam.

d. Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil obat yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Uji MIC

(*Minimum Inhibiting Concentration*) ini pada dasarnya adalah untuk menentukan secara kualitatif konsentrasi terkecil suatu obat yang dapat menghambat pertumbuhan kuman/bakteri.

Adapun pelaksanaan dari uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) ini adalah sebagai berikut yaitu disiapkan 11 tabung reaksi (9 perlakuan, 2 Kontrol) yang sudah disterilkan. Ke-11 tabung reaksi tersebut diisi dengan larutan TSB masing-masing 5 ml. Larutan daun sambiloto dibuat dengan konsentrasi 20 ppt dimasukkan pada erlenmeyer sebagai stok. Dan diambil larutan daun sambiloto sebanyak 5 ml dan dimasukkan pada tabung pertama dan dihomogenkan menggunakan vortex, kemudian dilakukan pengenceran larutan daun sambiloto pada tabung pertama hingga berikutnya hingga didapatkan dosis pada uji pendahuluan 0,25 ppt; 0,5 ppt; 0,75 ppt; 1 ppt; 1,25 ppt; 1,5 ppt; 1,75 ppt ; 2 ppt; 2,25 ppt dan dimasukkan pada 10 tabung dan dihomogenkan menggunakan vortex. Kemudian masing-masing tabung reaksi sebanyak 9 tabung diberi bakteri *P. aeruginosa* 10^7 sel/ml dan 2 tabung reaksi sebagai kontrol positif dimana diberi bakteri *P. aeruginosa*. Dan kontrol negatif dimana hanya diberi larutan daun sambiloto saja. Setelah itu di inkubasi semua tabung reaksi selama 24 jam pada inkubator dengan suhu 35 °C. Setelah 24 jam dilakukan pengamatan keseluruhan tabung dengan spektrofotometer dan didapatkan hasil.

e. Uji Cakram

Uji cakram digunakan untuk mengetahui lebarnya diameter daerah hambatan pada masing-masing konsentrasi dan pada konsentrasi berapa yang bersifat bakteriostatik maupun bakteriosidal. Kertas cakram yang berisi zat anti mikroba diletakkan di atas lempengan agar yang telah ditumbuhkan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat

antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme.

Proses pelaksanaan dari uji cakram adalah sebagai berikut yaitu disiapkan media PSA steril dan cawan petri steril, kemudian media PSA dituangkan pada cawan petri dan ditunggu hingga dingin. Selanjutnya bakteri *P. aeruginosa* disamakan kekeruhannya dengan larutan standart Mc Farland (10^7 sel/ml) dimana larutan tersebut campuran 9,7ml H_2SO_4 1% di campur dengan 0,3 ml $BaCl_2$ aquosa 1% (kekeruhan setara dengan konsentrasi bakteri 10^7 sel/ml). Selanjutnya bakteri *P. aeruginosa* dengan kepadatan 10^7 sel/ml dan diratakan seluruh permukaan media PSA dalam cawan petri menggunakan streak, kemudian diinkubasi selam 24 jam bertujuan agar menumbuhkan bakteri pada media merata. Selanjutnya kertas cakram steril yang sudah direndam dalam larutan daun sambiloto dengan dosis tertentu diletakkan pada media yang sudah ditumbuhi dengan bakteri, kemudian diinkubasi selama 24 jam. Diamati zona hambat di sekitar kertas cakram dan dihitung besar zona daya hambat dalam satuan millimeter (mm). Didapatkan hasil.

3.4 Parameter Uji

Parameter dalam penelitian ini adalah parameter utama, yaitu data yang diperoleh dari hasil pengukuran diameter daerah hambatan yang terlihat disekitar kertas cakram dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* dan parameter penunjangnya adalah lama perendaman kertas cakram terhadap bakteri *Psudomonas aeruginosa*.

3.5 Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur, maka digunakan analisis keragaman atau uji F dan jika didapat hasil yang

berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji Patogenitas Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Dilakukan uji patogenitas untuk mengetahui apakah kandidat bakteri tersebut patogen atau tidak. Dalam pengujian identifikasi bakteri *P. aeruginosa* dilakukan perendaman bakteri *P. aeruginosa* selama 4 jam pada ikan mas (*C. carpio*), kemudian Ikan mas (*C. carpio*) yang terinfeksi bakteri *P. aeruginosa* dibiarkan dalam akuarium selama 24 jam hingga ikan benar-benar sakit. Kemudian ikan tersebut dibawa ke Balai Karantina Ikan Juanda untuk diidentifikasi bakteri *P. aeruginosa*. Pada ikan yang diidentifikasi dibedah dan diambil organ hati dan organ insang dan kemudian di kultur dan dilakukan isolasi bakteri. Isolasi bakteri merupakan salah satu cara untuk memindahkan suatu biakan tertentu dari medium yang lama ke medium yang baru dengan tujuan untuk mendapatkan suatu biakan yang murni tanpa adanya kontaminasi dari mikroba yang lain yang tidak diinginkan (Firebiology, 2009).

Sebagian besar bakteri patogen pada ikan telah diketahui dapat ditumbuhkan pada medium buatan di luar tubuh inang. Hal utama yang harus disediakan yaitu media sintesis untuk pertumbuhan bakteri. Salah satu teknik yang dapat digunakan untuk mengisolasi bakteri patogenik ikan secara umum. Media pertumbuhan disesuaikan dengan bakteri perairan yang akan diisolasi dari bakteri perairan tawar (Irianto, 2005).

Pada saat dilakukan identifikasi bakteri *P. aeruginosa* dilakukan uji biokimia dengan metode Jean F. Mac Faddin, yang dilakukan di Laboratorium Mikrobiologi Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I dan didapatkan hasil sebagai berikut pada Tabel 2

Tabel 2. Uji Biokimia Identifikasi Bakteri *P. aeruginosa*

Karakteristik	Organ Hati (Hati)	Organ insang (Insang)
Warna	Krem	Krem
Uji gram, Morf. Sel	Batang	Batang
Oksidase	+	v
Katalase	+	+
O/F	O	O
TSIA, Gas, H ₂ S (S/B)	Alk/As	As/As
LIA (S/B)	-	+
Motilitas	+	+
Gelatin	V	v
MR	-	+
Arginin	+	v
Simmons Citrate	+	+
Urease	V	-
Salmonella-Shigella agar	G	-
Mac Konkey	G	G
Glukosa	+	+
Laktosa	-	+
Sukrosa	-	v
Arabinosa	-	+
Manitol	V	+
Inositol	-	+
Maltosa	-	v
Trehalose	-	+
Xylose	-	+
Hasil Identifikasi	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>

P. aeruginosa umumnya ditemukan di tanah dan air. Bakteri ini secara teratur berada pada permukaan tanaman dan kadang-kadang pada permukaan hewan. *Pseudomonas* lebih dikenal secara mikrobiologis sebagai patogen dari tanaman maupun hewan, namun beberapa spesies merupakan patogen dari manusia (Todar, 2004).

P. aeruginosa merupakan bakteri patogen yang umum menginfeksi ikan. *Pseudomonas* spp. ditemukan di tanah, air tawar, sedimen dan air laut yang diketahui berkolonisasi di akar tanaman (Hossain *et al.*, 2006).

Hasil identifikasi bakteri *P. aeruginosa* yang diidentifikasi di Balai Karantina Ikan I Juanda terdapat pada lampiran 3.

4.2 Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Dalam pengujian MIC dilakukan berbagai dosis yang bertujuan untuk mencari dosis minimum dalam membunuh bakteri *P. aeruginosa*. Dosis yang digunakan dalam penelitian pendahuluan diurut dari dosis terkecil 0,25 ppt; 0,5 ppt; 0,75 ppt; 1 ppt; 1,25 ppt; 1,5 ppt; 1,75 ppt ; 2 ppt; 2,25 ppt. Hasil Pengamatan Uji MIC dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Uji MIC menggunakan spektrofotometer

Konsentrasi (ppt)	Pertumbuhan bakteri	Indikator warna
0,25	2,582	Keruh
0,5	2,578	Keruh
0,75	2,562	Keruh
1	2,556	Keruh
1,25	2,515	Jernih
1,5	2,463	Jernih
1,75	2,447	Jernih
2	2,424	Jernih
2,25	2,415	Jernih
Kontrol +	2,547	Keruh
Kontrol -	0,808	

Keretakan suatu mikroorganisme terhadap zat antibiotik dapat ditentukan dengan teknik “pengenceran tabung (*tube dilution*)” atau dengan cawan “piringan kertas (*paper disk plate*). Teknik pengenceran tabung menetapkan jumlah terkecil ekstrak yang dibutuhkan dalam menghambat pertumbuhan organisme secara *in vitro*. Jumlah tersebut sebagai KHM (Konsentrasi Hambat Minimum atau *Minimal Inhibiton Concentration*) (Pelczar dan Chan, 1981).

Pengamatan Uji MIC menggunakan spektrofotometer dilakukan di laboratorium Hidrologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang. Pengamatan uji MIC didapatkan hasil dimana Kontrol – (negatif) tidak adanya pertumbuhan bakteri karena tidak diberi bakteri, sedangkan pada Kontrol + adanya pertumbuhan bakteri karena hanya diberi bakteri saja dan tidak diberi larutan daun sambiloto. Pada dosis 1,25 ppt menunjukkan indikator warna jernih dan menghambat pertumbuhan bakteri. Data uji MIC dan alat yang digunakan terdapat pada Lampiran 4.

4.3 Uji Cakram

Uji cakram merupakan pengujian untuk antimikrobia dengan mengukur daerah hambat yang terjadi di sekitar kertas cakram yang mengandung ekstrak bahan antibakteri sesuai dosis dalam perlakuan (Pelczar dan Chan, 1986). Uji cakram ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh dari larutan daun sambiloto sebagai antibakteri *P. aeruginosa* dengan cara mengukur besar daya hambat yang ditampakkan pada kertas cakram.

Uji cakram dilakukan menggunakan dosis 1,25 ppt; 2,5 ppt; 3,75 ppt; 5 ppt dan kontrol. Dosis yang digunakan mengacu pada penelitian pendahuluan dengan uji MIC dimana dosis 1,25 ppt mampu menghambat pertumbuhan bakteri, yang kemudian dosis tersebut digunakan dalam uji cakram. Pengamatan uji cakram, digunakan dosis 1,25 ppt; 2,5 ppt; 3,75 ppt; 5 ppt dan kontrol, serta

setiap perlakuan diberi ulangan 3 kali. Hasil pengamatan uji cakram dapat dilihat pada Tabel 4 dan Lampiran 5.

Untuk melihat lebih jelas contoh zona bening yang ditampakkan oleh kertas cakram yang mengandung larutan daun sambiloto sebagai antibakteri *P.aeruginosa* dapat dilihat pada Lampiran 6.

Pengamatan dilakukan dalam waktu 24 jam untuk menentukan sifat larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap bakteri *P.aeruginosa*, apakah bersifat bakteristatik (menghambat) atau bakteriosidal (membunuh). Dalam pengamatan 24 jam adanya daya hambat (zona bening) di sekeliling kertas cakram pada setiap dosisnya (1,25 ppt; 2,5 ppt; 3,75 ppt; 5 ppt) kecuali kontrol. Zona hambat yang terbentuk, disebabkan karena pada kertas cakram yang mengandung larutan daun sambiloto yang kemudian diletakkan di permukaan media PSA yang sudah ditumbuhi dengan bakteri terdapat senyawa yang mampu menghambat bakteri yang terdapat di sekitar kertas cakram tersebut, sehingga akan terbentuk zona hambat yang ditandai dengan beningnya daerah sekitar kertas cakram dalam setiap dosisnya terdapat pada Lampiran 7.

Semakin tinggi konsentrasi yang digunakan, maka semakin cepat sel bakteri akan terbunuh. Tetapi tidak efektif menggunakan konsentrasi yang terlalu tinggi dalam pengobatan karena penggunaan dosis yang terlalu tinggi kurang ekonomis dalam pemakaiannya dan dapat menimbulkan pencemaran lingkungan. Pada konsentrasi yang tinggi juga dapat menyebabkan terjadinya immunosupresi yaitu sistem imun inang melemah akibat gangguan pada saat proliferasi yang menyebabkan sistem imun inang melemah dan mudah terinfeksi bakteri. Immunosupresi dapat terjadi dengan cara berikut : akibat sekunder dari pengaturan sistem imun, akibat sekunder dari penyakit yang mendasari atau sebagai akibat dari immunoregulasi yang terganggu (Bellanti, 1993).

Tabel 4. Hasil pengamatan uji cakram larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) terhadap bakteri *P. aeruginosa*

Dosis Perlakuan	Ulangan	Daya Hambat(mm)			Rata-rata	Rerata	SD
		Cakram 1	Cakram 2	Cakram 3			
1,25 ppt	1	10	11	10	10,3	10,2	0,17
	2	11	10	10	10,3		
	3	10	9	11	10		
2,5 ppt	1	10	11	10	10,3	10,76	0,40
	2	10	11	12	11		
	3	11	12	10	11		
3,75 ppt	1	12	12	10	11,3	11,1	0,17
	2	11	11	11	11		
	3	11	10	12	11		
5 ppt	1	13	12	12	12,3	11,73	0,51
	2	12	11	11	11,3		
	3	11	12	12	11,6		
Kontrol	1	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-		
	3	-	-	-	-		

Keterangan :

- : Tidak ada daya hambat

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan larutan daun sambiloto dengan dosis yang berbeda terhadap bakteri *P. aeruginosa* maka dilakukan analisa keragaman (sidik ragam) yang disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Analisa Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	3,69	1,23	10,13**	4,07	7,59
Acak	8	0,97	0,12			
Total	11	4,67				

Keterangan ** = Berbeda Sangat Nyata

Dari analisa sidik ragam pada Tabel 4, dapat diketahui bahwa pemberian larutan daun sambiloto dengan konsentrasi yang berbeda memberikan hasil pengaruh berbeda sangat nyata terhadap bakteri *P. aeruginosa*. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing perlakuan, dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) dengan taraf nyata 5% (selang kepercayaan 95%) maupun

taraf nyata 1% (selang kepercayaan 99%). Dari hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) didapatkan notasi untuk mengetahui perlakuan yang terbaik, dengan nilai SED= 0,284. Maka didapatkan nilai BNT 5% sebesar 0,654 dan BNT 1% sebesar 0,952. Perhitungan secara lengkap disajikan pada Lampiran 8 dan hasil Uji BNT disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

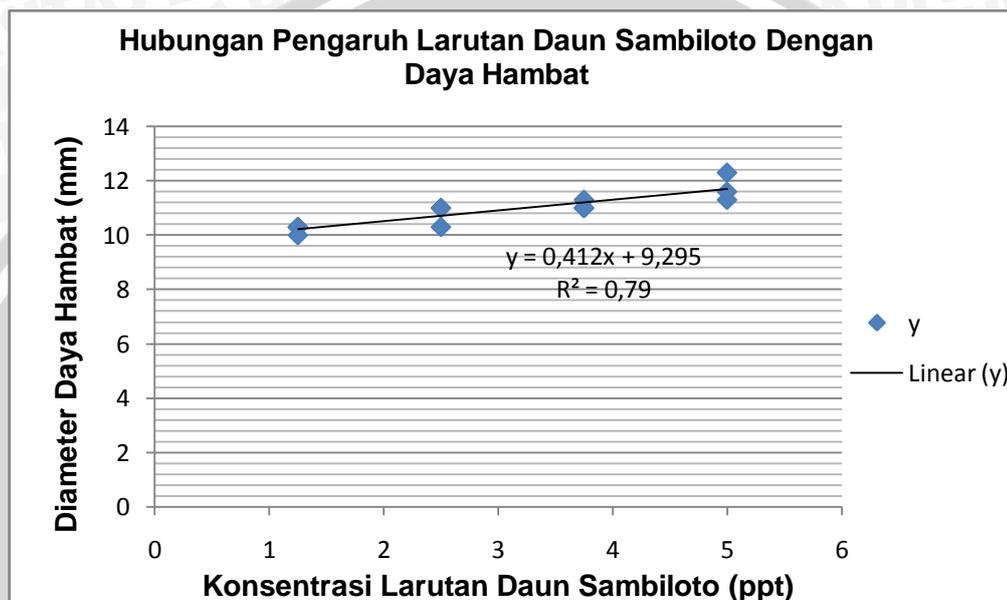
Rataan	A= 10,2	B= 10,76	C= 11,1	D= 11,73	Notasi
A= 10,2	-	-	-	-	a
B= 10,76	0,56 ^{ns}	-	-	-	a
C= 11,1	0,9 ^{ns}	0,34 ^{ns}	-	-	ab
D= 11,73	1,53 ^{**}	0,97 ^{**}	0,63 ^{ns}	-	b

Keterangan: ** = berbeda sangat nyata
ns = tidak berbeda nyata

Dari Hasil Uji BNT, didapatkan hasil bahwa setiap perlakuan A, B, C, D memberikan pengaruh yang berbeda nyata hal ini dapat dilihat pada nilai F hitung yang lebih besar dari F tabel 5% dan F tabel 1%. Untuk perlakuan yang terbaik dimulai dari perlakuan D (5 ppt) selanjutnya C (3,75 ppt), B (2,5 ppt), A (1,25 ppt), dimana semakin tinggi dosis memberikan pengaruh yang baik sebagai antibakteri *P.seruginosa*. Namun dalam penerapannya pemberian larutan daun sambiloto tidak boleh berlebihan, pemberian larutan daun sambiloto harus secara tepat dengan mempertimbangkan efek biologis terhadap lingkungannya. Selain itu pemberian larutan daun sambiloto sesuai tingkat resistensi bakteri serta pertimbangan ekonomis.

Untuk mengetahui hubungan antara konsentrasi larutan daun sambiloto terhadap daya hambat yang terbentuk maka dilakukan analisa regresi dimana perhitungan secara lengkap disajikan pada Lampiran 4. Pada analisa regresi

didapatkan hasil dimana hubungan kosentrasi larutan daun sambiloto dengan daya hambat yang terbentuk diperoleh bentuk regresi linier dengan persamaan $Y = 0,411X + 9,306$ dengan nilai kefisien korelasi r sebesar 0,79. Grafik hubungan antara kosentrasi larutan daun sambiloto dengan daya hambat yang terbentuk disajikan pada Gambar 5.



Gambar 5. Grafik Hubungan Pengaruh larutan Dengan Daya Hambat

Dari hasil grafik tersebut dapat diketahui bahwa semakin tinggi kosentrasi larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*), maka daerah hambat yang terbentuk akan semakin lebar atau daya hambat akan semakin tinggi. Hal ini disebabkan tinggi kosentrasi dari perlakuan maka jumlah senyawa antibakterinya semakin banyak. Menurut Dwijoseputro (1988), besar kecilnya daerah kosong sekitar kepingan kertas sesuai dengan kosentrasi antibiotik yang terkandung didalamnya. Lay (1994), juga menjelaskan bahwa, menambahnya luas wilayah jernih merupakan petunjuk kepekaan organisme terhadap antibiotik. Selain itu, luasnya daerah hambat juga berkaitan dengan kecepatan berdifusi antibiotik dalam media. Lebih lanjut dijelaskan oleh Bonang dan Koeswardono

(1982), lebar daerah hambat di sekitar kertas cakram tergantung pada daya serap obat ke dalam agar dan kecepatan kuman/bakteri terhadap obat yang digunakan.

Berdasarkan hasil uji MIC dan uji cakram didapatkan hasil dimana larutan daun sambiloto mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P.aeruginosa*, hal ini dipengaruhi oleh peningkatan konsentrasi dari berbagai zat yang terkandung dalam sambiloto. Pertumbuhan bakteri tersebut terhambat disebabkan oleh konsentrasi zat toksik. Terhambatnya pertumbuhan bakteri dapat disebabkan karena merusak dinding sel, perubahan permeabilitas sel, perubahan molekul protein, asam nukleat penghambatan kerja enzim dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein (Pelczar dan Chan, 1981).

Hal ini sesuai dengan pendapat Kadar (2009) yang menyatakan bahwa tumbuhan sambiloto mengandung zat *andrographolide* yang berfungsi sebagai anti viral, bakteristatik dan anti jamur, sedang minyak atsiri pada sambiloto juga dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Selain itu *andrographolide* pada sambiloto dapat meningkatkan daya fagositosis sel darah putih dan meningkatkan kekebalan tubuh dan bersifat bakteristatik yang berperan dalam sistem imun (Sembiring, 2009).

Senyawa *andrographolide*, *dehydro andrographolide*, *deoxy andrographolide*, *neon andrographolide* dan *nina andrographolide* pada sambiloto semuanya adalah senyawa diterpen turunan phenol yang diketahui memiliki kemampuan sebagai anti mikroba pathogen dan juga terbukti mampu berperan sebagai antimikroba. Mekanisme kerja senyawa turunan phenol membunuh bakteri dengan cara merusak membran sel sehingga berakibat terjadinya kebocoran sel yang ditandai dengan keluarnya makro molekul seperti protein dan asam nukleat dari dalam sel sehingga berakibat terhambatnya aktivitas dan biosintesa enzim-enzim spesifik yang diperlukan dalam reaksi

metabolisme sehingga mempengaruhi aktifitas pertumbuhan bakteri (Black, 1993).

Zat aktif yang terkandung pada sambiloto bermanfaat bagi kesehatan, seperti andrografolid, minyak atsiri dan flavonoid yang berfungsi untuk mencegah penggumpalan darah, menghambat dan menghancurkan inti kanker, anti bakteri, anti racun, serta anti infeksi, dapat juga digunakan sebagai antibiotik untuk melawan serangan bakteri dan virus (Sudewo, 2004).

Menurut Nababan (2008), *Flavonoid* dan *bioflavonoid* merupakan senyawa kimia yang bekerja sebagai antioksidan, memperbaiki kerja dari vitamin C, menghambat pembentukan tumor. Andrographolid dan lakton yang terdapat pada sambiloto merupakan bahan aktif yang berfungsi sebagai obat. Kadar andrografolid berkisar antara 2,5-4,6 % dari berat kering. Dalam tumbuhan sendiri flavonoid ini berfungsi sebagai pengatur tumbuh, pengatur fotosintesis, kerja anti mikroba, antivirus. Flavonoid merupakan senyawa pereduksi yang baik, yang dapat menghambat banyak reaksi oksidasi, baik secara enzim maupun non enzim. Flavonoid dapat menghambat perkembangan parasit dengan bertindak sebagai inhibitor enzim, mekanisme penghambatannya yaitu: dengan cara menghambat produksi energi dan sintesis asam-asam nukleat atau protein.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Pada penelitian tentang Pengaruh larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) sebagai Antibakteri *P. aeruginosa* didapatkan kesimpulan sebagai berikut :

- Pemberian larutan daun sambiloto dengan dosis 1,25 ppt sudah dapat menghambat bakteri dan semakin tinggi dosis dalam perlakuan semakin tinggi pula daya hambatnya dengan persamaan $Y = 0,411X + 9,306$
- Dosis terbaik dalam penelitian ini yaitu pada perlakuan D (5 ppt) dengan daya hambat rata-rata 11,73 mm.

5.2 Saran

Pada penelitian tersebut belum mendapatkan dosis yang optimal, maka dari itu perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang dosis yang optimal dalam pemberian larutan daun sambiloto pada bakteri *P. aeruginosa* dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh pemberian larutan daun sambiloto (*Andrographis paniculata*) pada bakteri yang berbeda.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E. dan E. Liviawaty. 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Kanisius. Yogyakarta. 91 hlm.
- Anju, D., G. Jugnu, S. Kavita, N. Arun and D. Sandeep. 2012. A review on medical prospectives of *Andrographis paniculata* Nees. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation* 1(1):1-4.
- Bellanti, J. A. 1993. Imunologi III. Penerjemah : A. S. Wahab. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 179 hlm.
- Black, J.G. 1993. Microbiology Principle and Applications. Englewood Cliffs. New Jersey. 360 hlm.
- Bobbarala, K. R., S. Rao., D. Aryamithra. 2009. Bioactivity of *Andrographis paniculata* Againsts Selected Phytopathogens. *Journal of Pharmacy Research*. 2 (3):480-482.
- Bonang, G. dan E. S. Koeswardono. 1982. Mikrobiologi Kedokteran Untuk Laboratorium dan Klinik. PT. Gramedia. Jakarta. 199 hlm.
- Chao, W. dan B. Lin. 2010. Isolation and identification of bioactive compounds in *Andrographis paniculata* (*Chuanxinlian*). <http://www.cmjournal.org/content/5/1/17>. Diakses Maret 2013.
- Dwidjoseputro, D. 1998. Dasar-dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan. Jakarta. 214 hlm.
- Farida. 2006. Pengaruh Peresapan Bakteri Staphylococcus Aureus Dalam Media Agar Terhadap Diameter Zona Hambatan Antibiotika Gentamisin Metode Difusi Cakram Kirby Bauer. Artikel Pendidikan: hlm. 73-75.
- Firebiology. 2009. Teknik Isolasi Mikroorganisme. <http://firebiology07.wordpress.com/2009/04/19/teknik-isolasi-mikroorganisme>. Diakses pada tanggal 1 Desember 2013.
- Harmita dan M. Radji. 2008. Buku Ajar Analisis Hayati. Anggota IKAPI. Jakarta. 167 hlm.
- Hidayat, Y. dan Sutarma. 1999. Teknik Pembuatan Media Kultur Bakteri. Lokakarya Fungsional Non Peneliti. 7 hlm.
- Hossain, M.I., F.A. Neela, M.A. Hussain., M.H. Rahman and S. Suzuki. 2006. Distribution of *Pseudomonas aeruginosa* in swap and it's infection to *Oreochromis niloticus*. *J.Bio-Sci.* 14: 77-81.
- Irianto, A. 2005. Patolgi Ikan Teleostei. UGM Press. Yogyakarta. 256 hlm.

- Kadar, V. R. 2009. Peningkatan Kadar Andrografolid dari Kultur Sel *Andrographis paniculata* (Burm.f.) Wallich ex Ness Melalui Teknik Amobilisasi Sel Dalam Bioreaktor. Bandung : Program Studi Magister Bioteknologi SITH. Tesis.
- Kamiso, H.N., Triyanto, Hartati, S. 1996. Uji Kosentrasi Penghambatan Minimal, Resistensi dan Penggunaan Antibiotik Untuk Menanggulangi penyakit Motil Aeromonas Septisemia (MAS) Pada Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*). 5 hlm.
- Krieg, N.R. and J.G. Holt. 2001. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2. Williams and Wilkins Publisers. Baltimore.
- Lay, B. W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafino Persada. Jakarta. 168 hlm.
- Malik, A. 2013. Uji Potensi Antimikrobal Menggunakan Metode Dilusi. <http://abbmal.wordpress.com/tag/metode-/dilusi>. Diakses pada tanggal 1 Desember 2013.
- Mariyono dan A. Sundana. 2002. Teknik Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Bercak Merah Pada Ikan Air Tawar yang Disebabkan Oleh Bakteri *Aeromonas Hydrophila*. *Buletin Teknik Pertanian*. **7** (1) : 33-36.
- Maskur. 2002. Program Pelestarian Plasma Nutfah Ikan-Ikan Perairan Umum : Program for Fish Germ Plasm Conservation in Inland Waters. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **1** (3): 139–144.
- Muhammad. 2010. Uji MIC (Minimum inhibitory concentration). <http://muhammadcank.wordpress.com/2010/03/19/uji-micminimum-inhibitory-/concentration>. Diakses pada tanggal 1 Desember 2013.
- Muhlisah, F. 2008. Tanaman Obat Keluarga (TOGA). Penebar Swadaya. Jakarta. 83 hlm.
- Nababan, B.M. 2008. Pengaruh Pemberian Ekstrak Sambiloto (*Andrographis Paniculata* Nees) Dengan Pelarut Etanol Dosis Bertingkat, Diberikan Sebelum Dan Sesudah Infeksi *Eimeria Tenella* Terhadap Produksi Ookista Pada Tinja Ayam. 68 hlm.
- Nazir, M. 2005. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Bogor. 544 hlm.
- Pelczar, M.J. and E. C. S. chan. 1981. Elements of Microbiology. McGraw-Hill Book Company. USA. 698 p.
- Pujiasmanto, B., J. Moenandir., Syamsulbahri., Kuswanto. 2007. Kajian Agroekologi dan Morfologi Sambiloto (*Andrographis Panculata* Ness.) Pada Berbagai Habitat. *Biodiversitas*. **8** (4): 326-329.
- Prapanza dan Lukito. 2003. Khasiat dan Manfaat Sambiloto. Pustaka Agromedia. Jakarta. 60 hlm.
- Hidayat, Y. dan Sutarma. 1999. Teknik Pembuatan Kultur Media Bakteri. Lokakarya Fungsional Non Peneliti. 1-7 hlm.

- Rais, M. 2013. *Pembuatan Media Biakan*.
<http://wahyuaskari.wordpress.com/umum/pembuatan-media-biakan>.
Diakses pada tanggal 1 Desember 2013.
- Ramadhani, N. F. 2013. Uji Potensi Antimikrobal Menggunakan Metode Dilusi.
<http://nurulfitriRamadhani.blogspot.com/2013/01/uji-potensi-antimikrobal>.
Diakses pada tanggal 1 Desember 2013.
- Sangadji, A. M. dan Sopiah. 2010. *Metodologi Penelitian Pendekatan Praktis dalam Penelitian*. Andi. Yogyakarta. 225 hlm.
- Sastrosupadi, A. 2000. *Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi*. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.
- Sembiring, B. Br. 2009. Status Teknologi Pasca Panen Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). *Bul. Litro*. **20** (2) : 134-144.
- Sharma and S. Joshi. 2011. Comparison of Anti-Oxidant Activity of *Andrographis paniculata* and *Tinospora cardifolia* Leaves. *J. Curr. Chem. Pharm. Sc.* **1** (1):1-8.
- Sudewo, B. 2004. *Tanaman Obat Populer Penggempur Aneka Penyakit*. Jakarta: Agromedia Pustaka. 142 hlm.
- Sugianti, B. 2005. *Pemanfaatan Tumbuhan Obat Tradisional dalam Pengendalian Penyakit Ikan*. Bogor. 37 hlm.
- Todar, K. 2004. *Pseudomonas and Related Bacteria*. Todar's Online Textbook of Bacteriology. <http://textbookofbacteriology.net/pseudomonas.html>. Diakses tanggal 1 Desember 2013.
- Wardani, R. K., W. Tjahjaningsih., B. S. Rahardja. 2012. Uji Efektifitas Ekstrak Daun Sirih Merah (*Piper Rocatum*) Terhadap Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Secara *In Vitro*. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **4** (1) : 59-64.
- Widyawati, T. 2007. Aspek Farmakologi Sambiloto (*Andrographis paniculata* Nees). *Majalah Kedokteran Nusantara Volume*. **40** (3) : 216-222.
- Winarto. 2003. *Sambiloto: Budidaya dan Pemanfaatan Untuk Obat*. Penebar Swadaya. Jakarta. 71 hlm.
- Zoetmulder, V. 2011. *klasifikasi pseudomonas aeruginosa*.
<http://ventyshy.wordpress.com/2011/12/28/klasifikasi-pseudomonas-aeruginosa>. Diakses pada tanggal 1 Desember 2013.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan bahan yang digunakan pada penelitian

a. Alat-alat yang digunakan pada penelitian



Inkubator



Spektrofotometer



Timbangan Sartorius



Vortex



Hot Plate



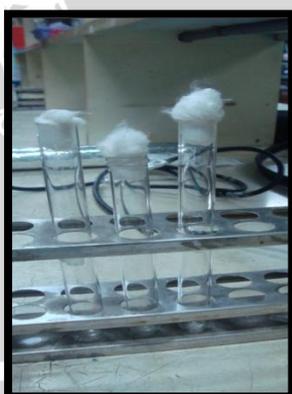
Timbangan Digital



Laminary flow



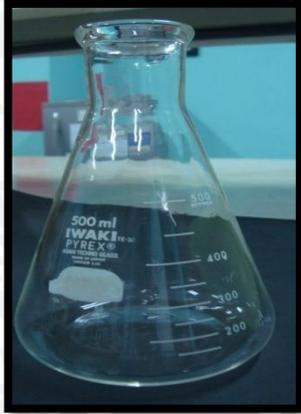
Refrigerator



Tabung Reaksi

Lampiran 1. (Lanjutan)

a. Alat-alat yang digunakan pada penelitian

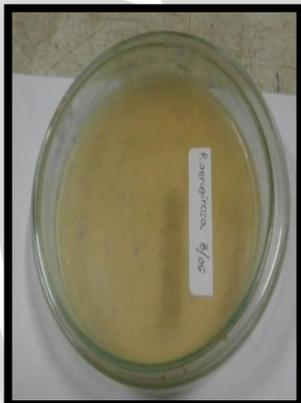


Erlenmeyer



Petridisk

b. Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian



Isolat *P.aeruginosa*



Serbuk Sambiloto



Plastik



Aluminium foil



Gliserol



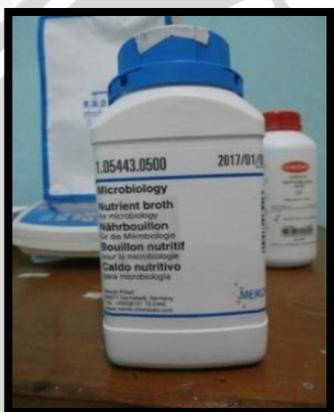
Alkohol



PSA (*Pseudomonas selective agar*)



TSB (Tryptone Soya Broth)



NB (Nutrient Broth)



Aquades



Lampiran 2. Perhitungan Kosentrasi Larutan Daun Sambiloto

Untuk Menghitung kosentrasi setiap perlakuan dilakukan pengenceran menggunakan rumus : $N_1 * V_1 = N_2 * V_2$, Dimana N_1 = Kosentrasi yang digunakan, V_1 = Volume larutan daun sambiloto yang diperlukan, N_2 = Kosentrasi yang diinginkan, V_2 = Volume yang digunakan.

1. Kosentrasi 1,25 ppt

$$1,25 * 10 \text{ ml} = 1000 \text{ ml} * N_2$$

$$N_2 = \frac{1,25 * 10}{1000} = 0,0125 \text{ gr}$$

2. Kosentrasi 2,5 ppt

$$2,5 * 10 = 1000 \text{ ml} * N_2$$

$$N_2 = \frac{2,5 * 10}{1000} = 0,025 \text{ gr}$$

3. Kosentrasi 3,75 ppt

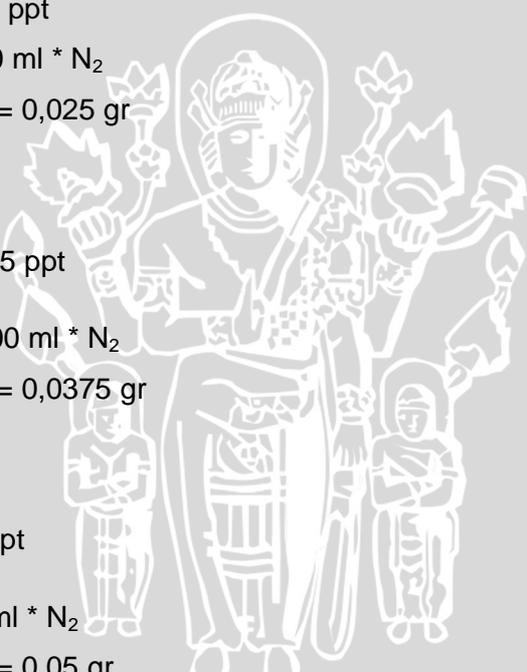
$$3,75 * 10 = 1000 \text{ ml} * N_2$$

$$N_2 = \frac{3,75 * 10}{1000} = 0,0375 \text{ gr}$$

4. Kosentrasi 5 ppt

$$5 * 10 = 1000 \text{ ml} * N_2$$

$$N_2 = \frac{5 * 10}{1000} = 0,05 \text{ gr}$$



repository.ub.ac.id

41

Lampiran 3. Hasil Identifikasi Bakteri di Balai Karantina Ikan I Juanda



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
BADAN KARANTINA IKAN, PENGENDALIAN MUTU,
DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN
BALAI KARANTINA IKAN, PENGENDALIAN MUTU
DAN KEAMANAN HASIL PERIKANAN KELAS I SURABAYA I
Jl. Raya Bandara Ir.H.Juanda No. 23 - Sidoarjo, 61254 - Jawa Timur
Telp. / Faks: 031 - 8688099 / 8688118 / 8678471 e-mail : juanda@bkipm.kkp.go.id

SURAT KETERANGAN

Yang bertanda tangan dibawah ini :

NAMA : Ir. Abdul Wahid, M.P
NIP : 19661015 199401 1 004
Gol./Ruang : Pembina, IV.a
Jabatan : Kasie. Tata Pelayanan
Unit Kerja : Balai KIPM Kelas I Surabaya I

Dengan ini menerangkan :

NAMA : Aristya Rachmadani P.
NIM : 0910850043
Fakultas : Perikanan dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya - Malang

Adalah benar telah melaksanakan kegiatan pemeriksaan/identifikasi bakteri sampel Ikan Mas, tanggal 08 s/d 11 Juli 2013 dengan menggunakan Metode Konvensional di Laboratorium Mikrobiologi Balai Karantina Ikan Pengendalian Mutu dan Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I.

Demikian surat keterangan ini dibuat untuk digunakan sesuai keperluannya.

Kepala
Balai Karantina Ikan, Pengendalian Mutu dan
Keamanan Hasil Perikanan Kelas I Surabaya I
Kasie. Tata Pelayanan

Ir. Abdul Wahid, M.P.
NIP. 19661015 199401 1 004



Lampiran 3 (lanjutan)

Protokol Uji Biokimia Bakteri
Metode : Mikroskopis dan Konvensional

Inang Target : Benih Ikan Mas
 Tanggal Pengujian : 08 - 11 Juli 2013

Karakteristik	Organ Target (Hati)	Organ Target (Insang)
Morfologi		
· Warna	Krem	Krem
· Bentuk		
· Tepi		
· Elevasi		
· Struktur dalam		
Uji gram, Morf. Sel	-, Batang	-, Batang
Oksidase	+	v
Katalase	+	+
O/F	O	O
TSIA, Gas, H ₂ S(S/B)	Alk/As	As/As
L I A (S/B)	-	+
Motilitas	+	+
Gelatin	v	v
Indole	-	-
Ornithine	-	-
MR	-	+
Vp	-	-
Arginin	+	v
Simmons Citrate	+	+
Urease	v	-
Salmonella-Shigella agar	G	.
Mac Konkey	G	G
ONPG	-	-
* Glukosa	+	+
* Laktosa	-	+
* Sukrosa	.	v
* Arabinosa	.	+
* Manitol	v	+
* Inositol	.	+
* Maltosa	-	v
* Trehalose	-	+
* Xylose	v	v
CBBA	.	.
RS-A	.	.
TSA 0%, 3%, 7%	.	.
HASIL IDENTIFIKASI	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas sp.</i>

Hasil Identifikasi Berdasarkan : Jean F. Mac Faddin, Biochemical Tests dor Identification of Medical Bacteria (Second Edition)

Lampiran 4. Data Uji MIC

Konsentrasi (ppt)	Pertumbuhan bakteri	Indikator warna
0,25	2,582	Keruh
0,5	2,578	Keruh
0,75	2,562	Keruh
1	2,556	Keruh
1,25	2,515	Jernih
1,5	2,463	Jernih
1,75	2,447	Jernih
2	2,424	Jernih
2,25	2,415	Jernih
Kontrol +	2,547	Keruh
Kontrol -	0,808	

Keterangan : Kontrol - : larutan daun sambiloto saja
Kontrol + : Bakteri *P.aeruginosa*

- **Alat dan Bahan Pada Uji MIC**

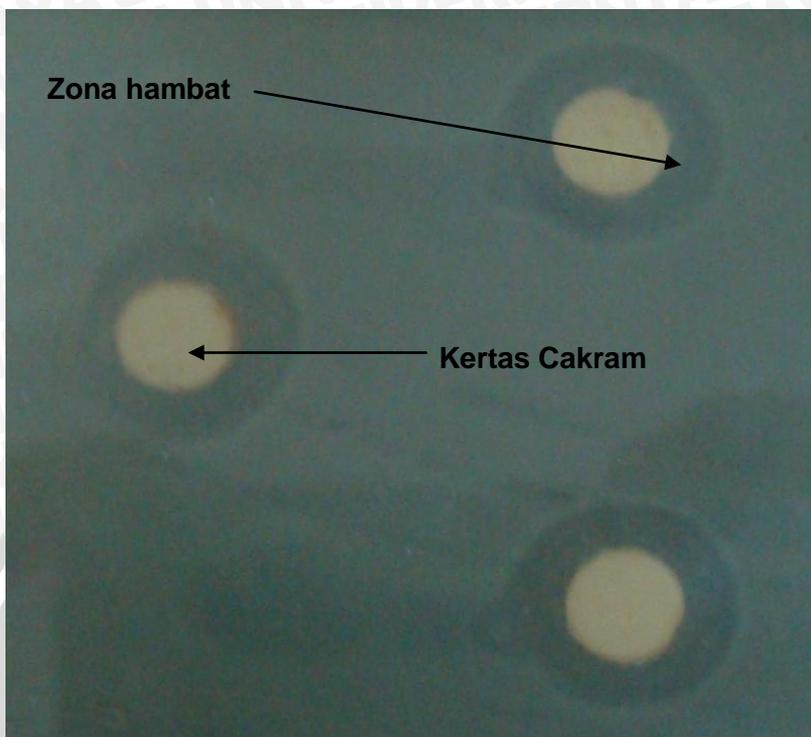


Lampiran 5. Data Pengamatan Uji Daya Hambat

Dosis Perlakuan	Ulangan	Daya Hambat		
		Cakram 1	Cakram 2	Cakram 3
1,25 ppt	1	10 mm	11 mm	10 mm
	2	11 mm	10 mm	10 mm
	3	10 mm	9 mm	11 mm
2,5 ppt	1	10 mm	11 mm	10 mm
	2	10 mm	11 mm	12 mm
	3	11 mm	12 mm	10 mm
3,75 ppt	1	12 mm	12 mm	10 mm
	2	11 mm	11 mm	11 mm
	3	11 mm	10 mm	12 mm
5 ppt	1	13 mm	12 mm	12 mm
	2	12 mm	11 mm	11 mm
	3	11 mm	12 mm	12 mm
Kontrol	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	-	-	-

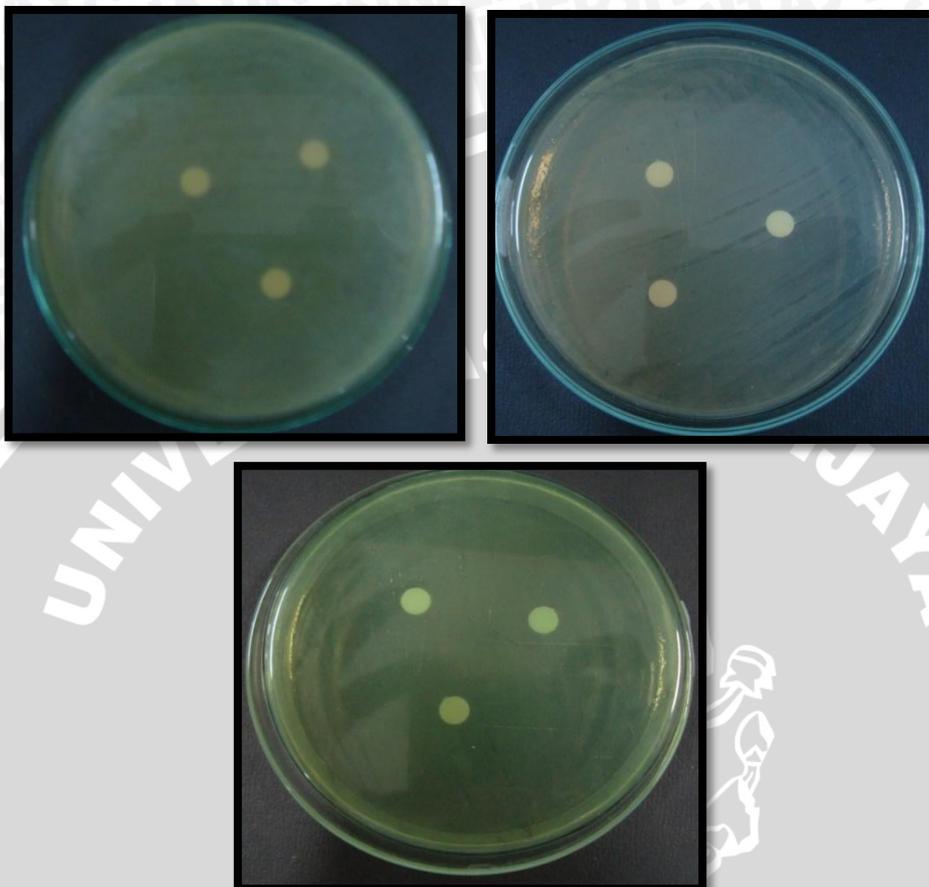
Keterangan : - → Tidak ada daya hambat

Lampiran 6. Contoh Zona Hambat Yang Terbentuk Pada Kertas Cakram

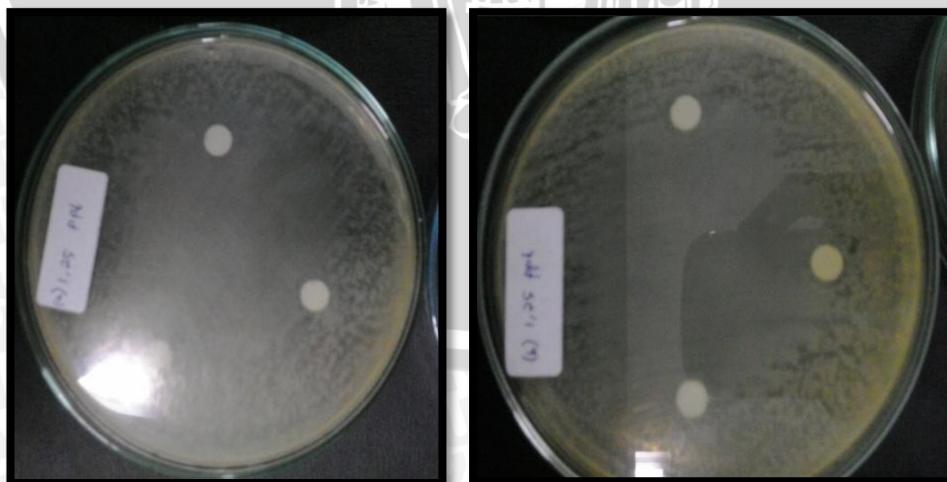


Lampiran 7. Hasil Uji Cakram

- Perlakuan Kontrol

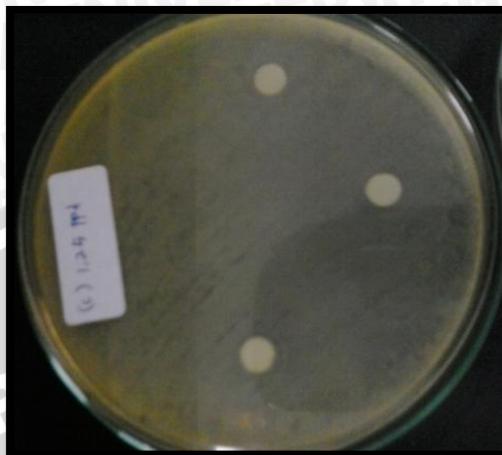


- Perlakuan 1,25 ppt

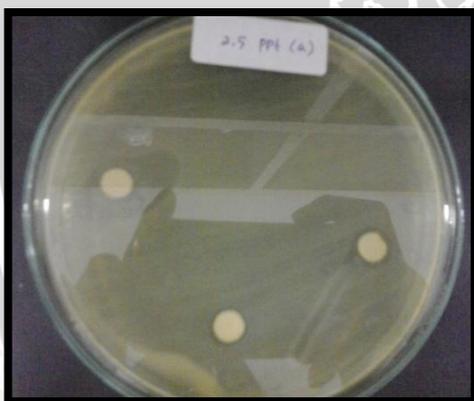


Lampiran 7. (Lanjutan)

- Perlakuan 1,25 ppt

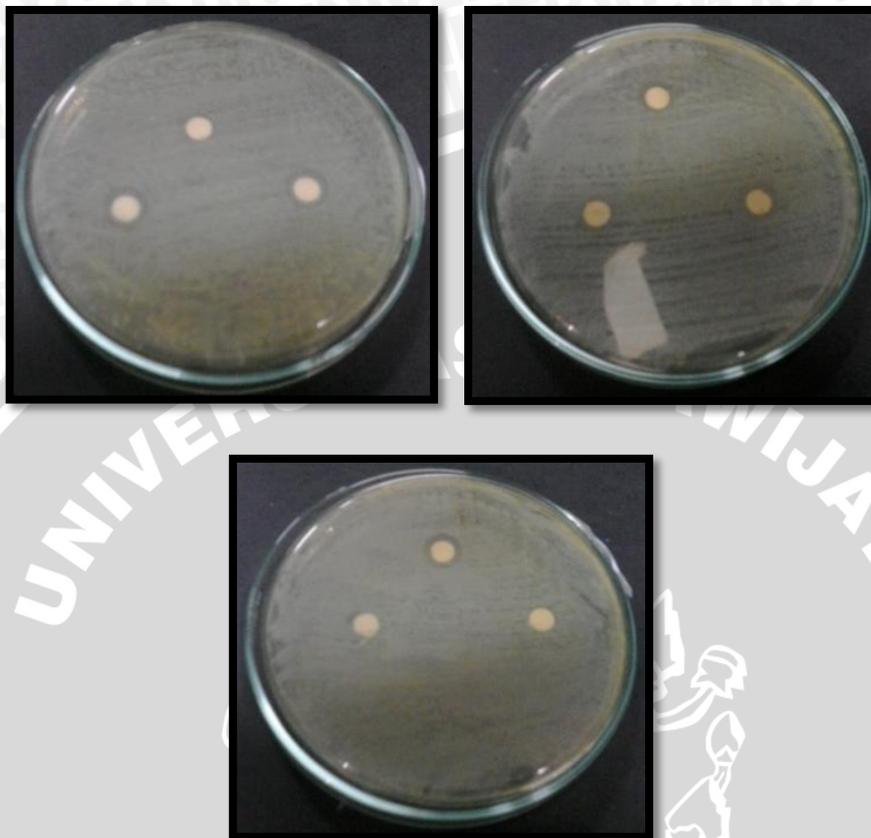


- Perlakuan 2,5 ppt

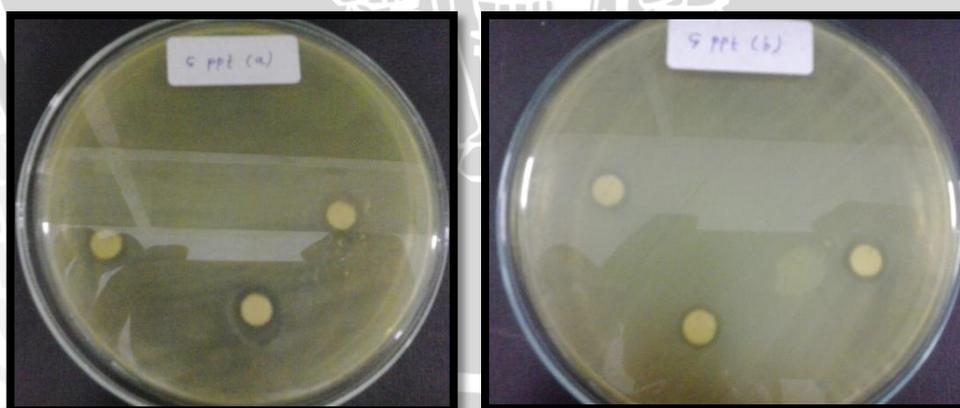


Lampiran 7. (Lanjutan)

- Perlakuan 3,75 ppt

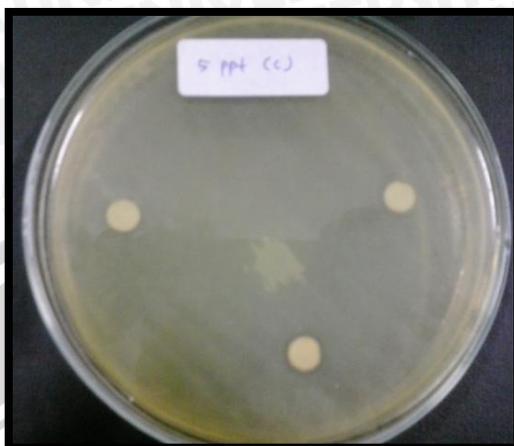


- Perlakuan 5 ppt



Lampiran 7. (Lanjutan)

- Perlakuan 5 ppt



Lampiran 8. Data Perhitungan Zona Hambat Bakteri *P. aeruginosa*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A	10,3	10,3	10	30,6	10,2
B	10,3	11	11	32	10,76
C	11,3	11	11	32,9	11,1
D	12,3	11,3	11,6	34,2	11,73
				131,4	

Perhitungan JK :

- $FK = \frac{G^2}{N} = \frac{131,4^2}{12} = \frac{17265,96}{12} = 1438,83$
- JK Total = $(10,3^2 + 10,3^2 + 10^2 + 10,3^2 + 11^2 + 11^2 + 11,3^2 + 11^2 + 11^2 + 12,3^2 + 11,3^2 + 11,6^2) - FK$
 $= (106,09 + 106,09 + 100 + 106,09 + 121 + 121 + 127,69 + 121 + 121 + 151,29 + 127,69 + 134,56) - 1438,83$
 $= 1443,50 - 1438,83$
 $= 4,67$
- Jk Perlakuan = $\frac{30,6^2 + 32,3^2 + 33,3^2 + 35,2^2}{3} - FK$
 $= 1442,52 - 1438,83$
 $= 3,69$
- Jk Acak = JK Total – JK Perlakuan
 $= 4,67 - 3,69$
 $= 0,97$

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	3,69	1,23	10,13**	4,07	7,59
Acak	8	0,97	0,12			
Total	11	4,67				

Keterangan ** = Berbeda Sangat Nyata

- Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

$$SED = \frac{\sqrt{2 \times KT_{acak}}}{r}$$

$$= 0,28$$

$$BNT 5\% = t_{5\%} (db_8) \times SED = 2,30 \times 0,28 = 0,65$$

$$BNT 1\% = t_{1\%} (db_8) \times SED = 3,35 \times 0,28 = 0,95$$

Lampiran 8. (Lanjutan)

- Tabel uji Beda Nyata Terkecil

Rataan	A= 10,2	B= 10,76	C= 11,1	D= 11,73	Notasi
A= 10,2	-	-	-	-	a
B= 10,76	0,56 ^{ns}	-	-	-	a
C= 11,1	0,9 ^{ns}	0,34 ^{ns}	-	-	ab
D= 11,73	1,53 ^{**}	0,97 ^{**}	0,63 ^{ns}	-	b

Keterangan: ** = berbeda sangat nyata
ns = tidak berbeda nyata

- Tabel Analisa Regresi

Perlakuan (X)	Data (Ti)	Perbandingan Ci			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A = 1,25 ppt	30,6	-3	+1	-1	-3
B = 2,5 ppt	32,3	-1	-1	+3	+2
C = 3,75 ppt	33,3	+1	-1	-3	-3
D = 5 ppt	35,2	+3	+1	+1	+4
Q = $\sum Ci.Ti$		14,8	0,2	1,6	13,7
Kr = $(\sum Ci^2).r$		60	12	60	114
JK = Q^2/Kr		3,65	0,003	0,042	1,64

- JK perlakuan Regresi = 3,65 + 0,003 + 0,042 + 1,64 = 5,34

Sumber keragaman	db	JK	KT	F hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	5,34	1,78			
Linier	1	3,65	3,65	33,79 ^{**}	4,07	7,59
Kuadratik	1	0,003	0,003	0,027 ^{ns}	4,07	7,59
Kubik	1	0,042	0,042		4,07	7,59
Kuartik	1	1,64	1,64		4,07	7,59
Acak	9	0,97	0,10			
Total	11	11,65				

Lampiran 8. (Lanjutan)

- Perhitungan R^2

$$R^2 \text{ linier} = \frac{\text{JK linier}}{\text{JK linier} + \text{JK Acak}} = \frac{3,65}{3,65 + 0,973} = \frac{3,65}{4,623} = 0,79$$

$$R^2 \text{ kuadratik} = \frac{\text{JK kuadratik}}{\text{JK kuadratik} + \text{JK Acak}} = \frac{0,003}{0,003 + 0,973} = \frac{0,003}{0,976} = 0,003$$

Perlakuan	Konsentrasi	Rata-rata	X * Y	X ²
	X	Y		
A	1,25	10,20	12,75	1,25
B	2,5	10,76	26,91	6,25
C	3,75	11,1	41,62	14,06
D	5	11,73	58,66	25
Total	12,5	43,8	139,95	46,56
Rata-Rata	3,12	10,95		

$$b_1 = \frac{\sum xy - \frac{\sum x \sum y}{n}}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}$$

$$b_1 = \frac{139,95 - \frac{12,5 * 43,8}{4}}{46,56 - \frac{(12,5)^2}{4}}$$

$$b_1 = \frac{139,95 - 136,87}{46,56 - 39,06}$$

$$b_1 = \frac{3,08}{7,49}$$

$$b_1 = 0,411$$

$$\begin{aligned} b_0 &= Y - b_1X \\ &= 10,95 - (0,411 * 4) \\ &= 10,95 - 1,644 \\ &= 9,306 \end{aligned}$$

$$Y = b_0 + b_1X$$

$$Y = 9,306 + 0,411X$$

$$Y = 0,411X + 9,306$$

Maka, untuk perlakuan :

$$A (1,25 \text{ ppt}) \longrightarrow Y = 0,411(1,25) + 9,306 = 9,81$$

$$B (2,5 \text{ ppt}) \longrightarrow Y = 0,411(2,5) + 9,306 = 10,33$$

$$C (3,75 \text{ ppt}) \longrightarrow Y = 0,411(3,75) + 9,306 = 10,84$$

$$D (5 \text{ ppt}) \longrightarrow Y = 0,411(5) + 9,306 = 11,36$$