

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN MENGGUDU (*Morinda citrifolia*) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA *IN VITRO*

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :

**FAJAR RUDY HARTONO
NIM. 115080501111024**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN MENGGUDU (*Morinda citrifolia*) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA *IN VITRO*

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

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

Oleh :

**FAJAR RUDY HARTONO
NIM. 115080501111024**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2015

PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN MENGKUDU (*Morinda citrifolia*) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA *IN VITRO*

Oleh :
FAJAR RUDY HARTONO
NIM. 115080501111024

Telah dipertahankan di depan penguji
Pada tanggal 21 April 2015
Dan dinyatakan memenuhi syarat

DOSEN PENGUJI I

Dr. Ir. Maftuch, M.Si
NIP. 19660825 199203 1 001
Tanggal :

DOSEN PENGUJI II

Ir. Ellana Sanoesi, MP
NIP. 19630924 199803 2 002
Tanggal :

MENYETUJUI,

DOSEN PEMBIMBING I

Prof.Dr.Ir. Arief Prajitno, MS
NIP. 19550213 198403 1 001
Tanggal :

DOSEN PEMBIMBING II

Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, M.Si
NIP. 19671010 199702 1 001
Tanggal :

MENGETAHUI,
KETUA JURUSAN MSP

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

PERNYATAAN ORISINALITAS

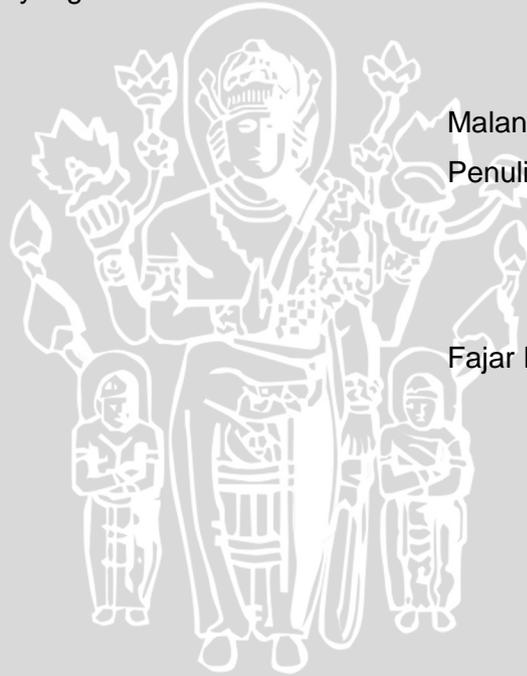
Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan (plagiasi), maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut, sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, Maret 2015

Penulis

Fajar Rudy Hartono



UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis ucapkan atas terselesainya laporan skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih sebesar besarnya kepada:

1. Allah SWT yang telah memberikan kelancaran dan berbagai kemudahan pada penulis dalam menyelesaikan laporan skripsi ini.
2. Keluarga yang selalu memberikan dukungan moril dan materiil kepada penulis hingga terselesainya skripsi ini.
3. Untuk partner terbaikku yang selalu memberikan semangat yang tiada henti-hentinya kepada penulis.
4. Seluruh rekan-rekan tim parasiters yang telah banyak membantu penulis dan selalu memberikan dukungan dan motivasi untuk terselesainya laporan skripsi ini.
5. Seluruh rekan-rekan budidaya perairan 2011 yang banyak membantu penulis dalam penyelesaian skripsi ini.
6. Guru spiritual yang telah banyak membimbing penulis dalam menempuh kehidupan dalam menjalani kuliah dan telah banyak memberikan motivasi, ceramah serta ilmu yang bermanfaat kepada penulis.
7. Seluruh pihak yang sudah membantu penulis selama penelitian.

Malang, Maret 2015

Penulis

RINGKASAN

FAJAR RUDY HARTONO. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara *In Vitro*. Dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. ARIEF PRAJITNO, MS** dan **Dr. Ir. ABD. RAHEM FAQIH, M.Si.**

Dunia perikanan di Indonesia dalam bidang budidaya dikejutkan oleh terjadinya wabah penyakit yang disebabkan karena kondisi lingkungan budidaya yang kurang menunjang (Suprastyani,1989). Salah satu penyakit yang dapat timbul akibat kondisi lingkungan yang kurang menunjang adalah *Pseudomonas fluorescens*. Upaya pengobatan banyak dilakukan dengan menggunakan antibiotik. Namun pengobatan dengan cara ini membawa efek samping dan dapat mengganggu keseimbangan ekosistem perairan (Prajitno,2005). Oleh sebab itu, dibutuhkan adanya antibakteri alternatif yang dapat digunakan untuk menghambat atau membunuh bakteri, salah satunya adalah dengan penggunaan daun mengkudu (*Morinda citrifolia*).

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, FPIK UB bulan Februari 2015 dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan 3 ulangan yaitu dengan menggunakan konsentrasi 20% (perlakuan A), 40% (perlakuan B), 60% (perlakuan C), dan 80% (perlakuan D). Parameter utama dalam penelitian ini adalah melihat atau mengukur diameter zona bening yang dihasilkan di sekitar kertas cakram yang dihasilkan dari berbagai dosis yang digunakan. Kemudian parameter penunjang dalam penelitian ini adalah lama waktu perendaman yang dilakukan yaitu dengan waktu perendaman kertas cakram selama 15 menit.

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini adalah pada perlakuan A, ekstrak kasar daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) telah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* dengan rata-rata diameter zona bening yaitu 9,08 mm. Perlakuan B diperoleh rata-rata diameter zona bening sebesar 12.83 mm, perlakuan C diperoleh rata-rata diameter zona bening sebesar 16,25 mm, dan pada perlakuan D diperoleh rata-rata diameter zona bening sebesar 14,92 mm. Hubungan antara konsentrasi ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) terhadap diameter zona hambat (bening) menunjukkan pola kuadratik dengan persamaan $y = -0.0032x^2 + 0.4223x + 1.6875$ dan koefisien $R^2 = 0.9667$. Ekstrak kasar daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) merupakan antibakteri yang bersifat bakteriosidal, karena juga bisa membunuh pertumbuhan bakteri.

Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* menggunakan dosis 60% dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak kasar daun mengkudu secara *In vivo* pada ikan air tawar yang terinfeksi bakteri *P. fluorescens*.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, yang mana telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, serta shalawat serta salam tetap tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*) terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara *In Vitro*”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana (S-1) Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang. Dalam tulisan ini disajikan pokok-pokok bahasan yang secara umum meliputi pemberian ekstrak kasar dengan konsentrasi yang berbeda terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

Pada kesempatan ini penulis juga mengucapkan terima kasih kepada :

1. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku pembimbing I, yang selalu sabar dalam membimbing dan memberi motivasi kepada penulis,
2. Bapak Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, M.Si selaku pembimbing II, yang senantiasa selalu memberi saran, motivasi dan dukungan kepada penulis,
3. Bapak Dr. Ir. Mafuch, M.Si selaku penguji I, yang telah banyak memberikan saran dan dukungan kepada penulis.
4. Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku penguji II, yang telah banyak memberikan saran, semangat dan dukungan kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih banyak kekurangan dan jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun untuk menyempurnakan skripsi ini. Dengan adanya skripsi ini penulis berharap agar bermanfaat dalam ilmu pengetahuan dan memberikan informasi bagi semua pihak yang membutuhkan.

Malang, Maret 2015

Penulis

DAFTAR ISI

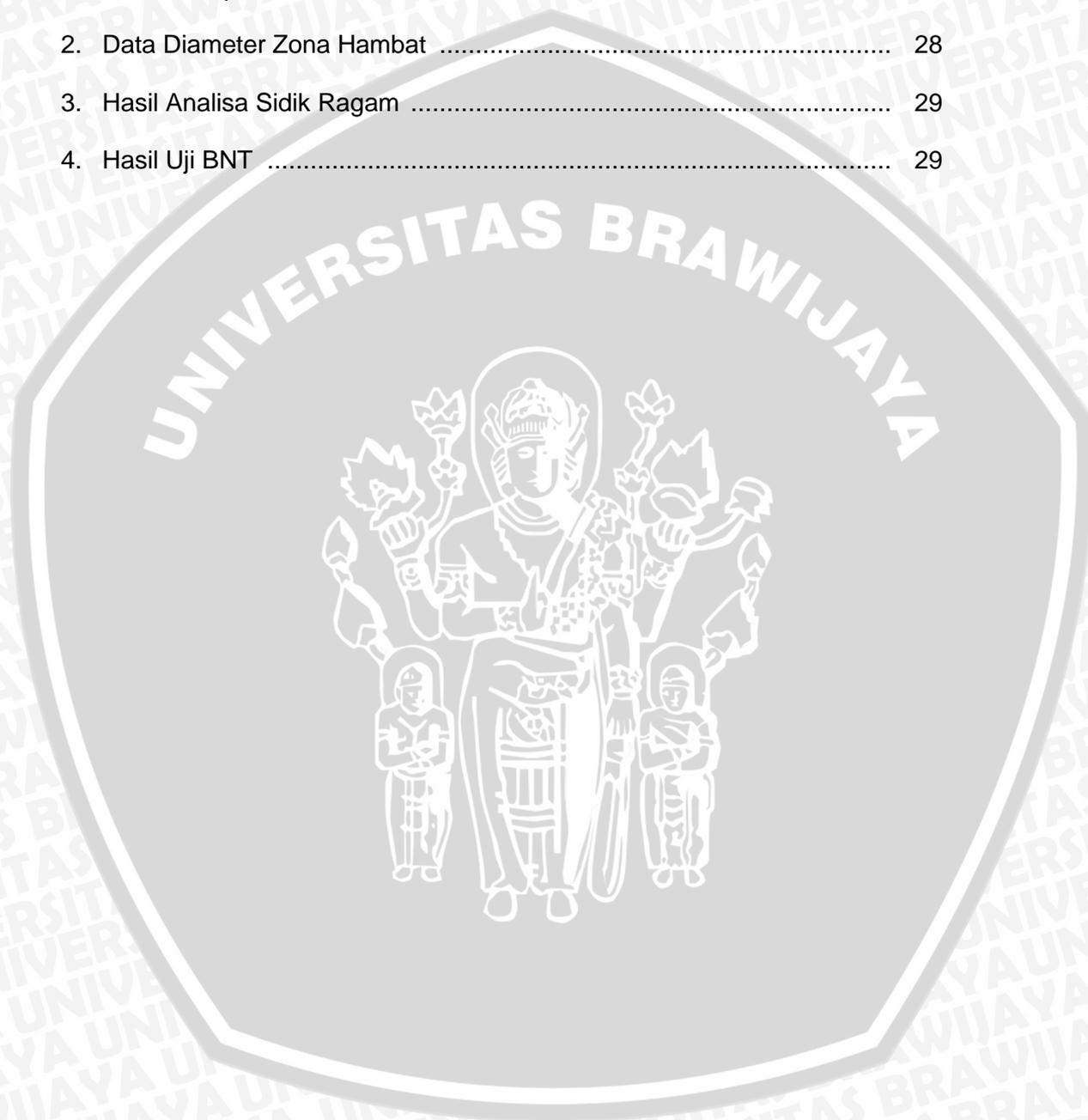
	Halaman
HALAMAN JUDUL	i
HALAMAN PENGESAHAN	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS	iv
RINGKASAN	v
KATA PENGANTAR	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	viii
DAFTAR ISI	x
DAFTAR GAMBAR	xii
DAFTAR TABEL	xiii
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Tempat dan Waktu	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i>	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	6
2.1.3 Pertumbuhan Bakteri	7
2.1.4 Perkembangbiakan Bakteri	8
2.1.5 Infeksi Bakteri	9
2.2 Daun Mengkudu (<i>Morinda citrifolia</i>)	9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	9
2.2.2 Kandungan	11
2.2.3 Aktivitas Mikroba	11
2.2.4 Manfaat	12
2.3 Uji Aktivitas Antibakteri Secara In vitro	13
2.3.1 Uji Cakram	13
2.3.2 Mekanisme Kerja Antimikroba	14
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	16
3.1.1 Alat Penelitian	16
3.1.2 Bahan Penelitian	17
3.2 Metode Penelitian	17
3.3 Pengambilan Data	18
3.4 Rancangan Penelitian	18
3.5 Prosedur Penelitian	20

3.5.1 Persiapan Penelitian	20
3.5.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan	20
3.5.1.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan	20
3.5.1.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Mengkudu	21
3.5.1.4 Pembuatan Media	21
a. PSA (<i>Pseudomonas Selective Agar</i>)	21
b. TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>).....	22
3.5.1.5 Pembiakan Bakteri <i>P. fluorescens</i>	22
3.5.2 Pelaksanaan Penelitian Dengan Uji Cakram.....	22
3.6 Parameter Uji	25
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Hasil Penelitian	27
4.1.2 Daya Antibakterial Ekstrak Kasar Daun Mengkudu Dengan Uji Cakram	27
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	35
5.2 Saran	35
DAFTAR PUSTAKA	36
LAMPIRAN	40



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Perlakuan penelitian	19
2. Data Diameter Zona Hambat	28
3. Hasil Analisa Sidik Ragam	29
4. Hasil Uji BNT	29



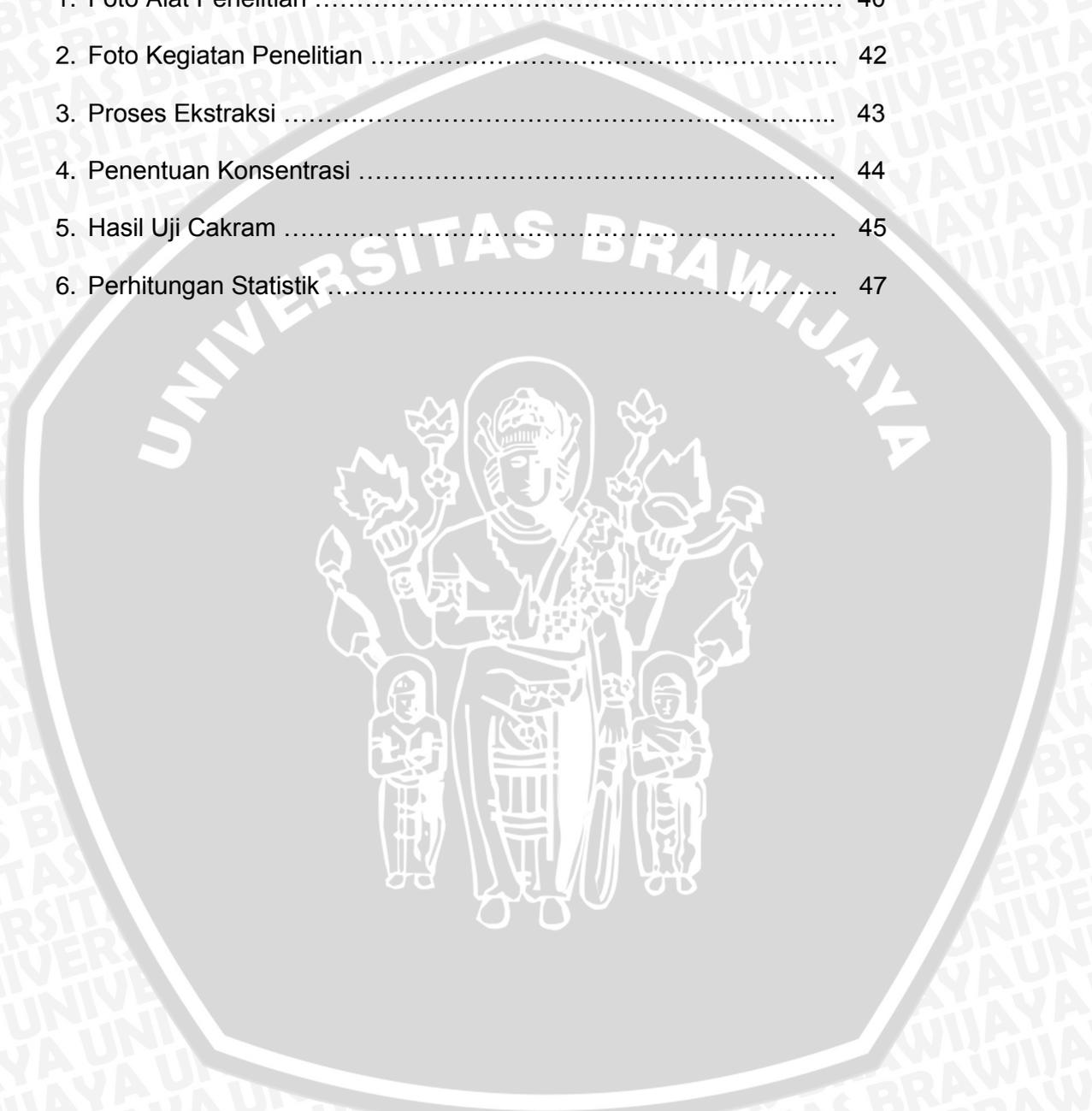
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>P. fluorescens</i>	5
2. Kurva Pertumbuhan Bakteri	8
3. Daun Mengkudu (<i>M. citrifolia</i>)	10
4. Mekanisme Kerja Antimikroba	15
5. Denah Penelitian	19
6. Biakan Murni Bakteri <i>P. fluorescens</i>	24
7. Hubungan Pengaruh Konsentrasi Ekstrak	30
8. Mekanisme Perusakan Membran Sitoplasma	33



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Foto Alat Penelitian	40
2. Foto Kegiatan Penelitian	42
3. Proses Ekstraksi	43
4. Penentuan Konsentrasi	44
5. Hasil Uji Cakram	45
6. Perhitungan Statistik	47



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Konsumsi ikan perkapita masyarakat Indonesia masih rendah jika dibandingkan dengan masyarakat negara kelompok ASEAN lainnya. Pemerintah mencanangkan atau mengharapkan bahwa 2/3 kebutuhan protein hewani bangsa Indonesia dapat dipenuhi dari sektor perikanan. Dengan demikian, tujuan dan sasaran pembangunan sektor perikanan disamping meningkatkan devisa Negara adalah untuk meningkatkan kesejahteraan rakyat dengan sasaran agar target tiap orang Indonesia dapat mengkonsumsi ikan $\pm 25 \text{ kg/orang/tahun}$ tercapai (Mulyono, 2001).

Menurut Suprastyani (1989), pada akhir tahun 1980 dunia perikanan di Indonesia khususnya di bidang budidaya dikejutkan oleh terjadinya wabah penyakit pada ikan air tawar. Dalam waktu yang singkat penyakit ini telah menyebabkan kematian ikan pada ukuran induk, konsumsi maupun benih. Akibat dari penyakit ini tidak saja merugikan nilai ikan yang berjuta – juta rupiah, tetapi juga menyebabkan dampak psikologis yang luas bagi masyarakat.

Menurut Yuliarti (2011), penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan baik fisik maupun fisiologis pada ikan. Gangguan ini dapat disebabkan oleh organisme lain, kondisi lingkungan atau campur tangan manusia. Sakit adalah suatu kondisi dimana terjadi gangguan atau ketidaknormalan fungsi pada ikan baik secara fisik ataupun fisiologis. Sakit dan penyakit ini dapat disebabkan oleh ketidakserasian yang terjadi di dalam lingkungan atau ekosistem dimana ikan tersebut berada.

Sedangkan menurut Prajitno (2005), penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Gangguan terhadap ikan dapat disebabkan oleh organisme lain,

pakan maupun kondisi lingkungan yang kurang menunjang kehidupan ikan. Dengan demikian timbulnya serangan penyakit ikan di kolam merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, kondisi lingkungan dan organisme penyakit. Interaksi yang tidak sesuai ini dapat menyebabkan ikan stress, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit.

Dalam budidaya ikan, hambatan yang sering terjadi adalah penyakit pada ikan yang menyebabkan terganggunya kondisi fisiologis ikan, apabila tidak dilakukan pencegahan maka akan menyebabkan kematian. Salah satunya adalah *Pseudomonas fluorescens* yang diketahui sebagai penyakit yang sangat ganas yang dapat menyerang ikan mas. Gejala yang timbul akibat serangan penyakit ini yaitu terjadi pendarahan dan borok pada kulit, serta sirip ekor terkikis (Mulyadi, 2009).

Pseudomonas sp., bakteri ini termasuk kelompok bakteri *gram negative*, yaitu bersifat motil karena adanya flagel untuk alat gerak dan bersifat *aerobic*. Gejala ikan yang telah terinfeksi oleh bakteri ini adalah terdapat benjolan berwarna merah pada pangkal sirip dada, perutnya membengkak, tubuhnya penuh borok, pendarahan pada organ internal, sekitar mulut, opercula dan daerah ventral, terjadi nekrosis pada jaringan limpa dan ginjal, menurunnya nafsu makan sehingga pertumbuhan ikan melambat, serta ikan terlihat lemah (Anonymous, 2012).

Untuk menanggulangi penyakit dapat dilakukan upaya pencegahan dan pengobatan. Upaya pencegahan dapat dilakukan melalui karantina, vaksinasi dan desinfeksi. Sedangkan upaya pengobatan dapat menggunakan antibiotik kemoterapeutik. Pengobatan dengan antibiotik akan membawa efek samping dalam jangka waktu yang lama, karena bakteri akan resisten terhadap antibiotik

yang digunakan. Selain itu dapat juga mengganggu keseimbangan ekosistem perairan, disamping itu harganya relatif mahal (Prajitno , 2005).

Tumbuhan merupakan salah satu kekayaan sumber daya alam hayati di Indonesia. Tumbuhan memiliki kandungan zat kimia aktif yang memiliki potensi besar, salah satunya adalah membunuh atau menghambat pertumbuhan bakteri. Produksi obat tradisional memiliki kelemahan, di antaranya adalah belum banyaknya pengetahuan dan penelitian mengenai kandungan kimia dan senyawa yang bertanggung jawab terhadap penghambatan aktivitas bakteri. Oleh karena itu perlu adanya pengetahuan dan penelitian mendalam mengenai kandungan zat aktif pada tumbuhan (Achmad , 1989).

Tanaman herbal yang memiliki nilai terapi dalam pengobatan adalah menggunakan daun mengkudu. Tanaman ini banyak terdapat di Indonesia sebagai tanaman liar yang dimanfaatkan sebagai tanaman obat. Menurut Rukmana (2002), daun tanaman mengkudu mengandung zat kapur, protein, karoten, arginin, asam glutamat, tirosin, asam karbonat, asam *ursolat*, *thiamin*, dan *antraquinon*. Kandungan flavonoid total dalam daun mengkudu adalah 254mg/100gr fw.

1.2 Perumusan Masalah

Penyediaan ikan untuk konsumsi domestik meningkat sehingga upaya peningkatan produksi terus dilakukan. Sistem budidaya perikanan air tawar dewasa ini telah mencapai tahap intensifikasi, sehingga sistem tersebut tidak terlepas dari resiko biologis terutama gangguan oleh adanya penyakit. Penggunaan obat-obatan dan bahan kimia menyebabkan dampak negatif dengan meningkatnya pencemaran lingkungan untuk budidaya (Suhermanto, Andayani dan Maftuch, 2013).

Hambatan yang sering terjadi pada budidaya ikan yaitu terserangnya penyakit. Dengan adanya penyakit pada ikan, maka diperlukan pencegahan maupun pengobatan menggunakan bahan alami yang dapat digunakan sebagai antibakteri. Berdasarkan latar belakang di atas, masalah yang dihadapi yaitu belum diketahuinya pengaruh penggunaan ekstrak daun mengkudu terhadap bakteri *P. fluorescens*.

Berdasarkan uraian di atas dapat dirumuskan masalah sebagai berikut:

- Apakah pemberian ekstrak kasar daun mengkudu (*Morinda citrifolia*) berpengaruh terhadap daya hambat dari bakteri *P. fluorescens*.

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) pada bakteri *P. fluorescens*.

1.4 Hipotesis

H_0 : Diduga pemberian ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) dengan dosis yang berbeda tidak mempengaruhi daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

H_1 : Diduga pemberian ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) dengan dosis yang berbeda mempengaruhi daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya, Malang. Pada tanggal 20 Januari – 25 Februari 2015.

2. TINJAUAN PUSTAKA

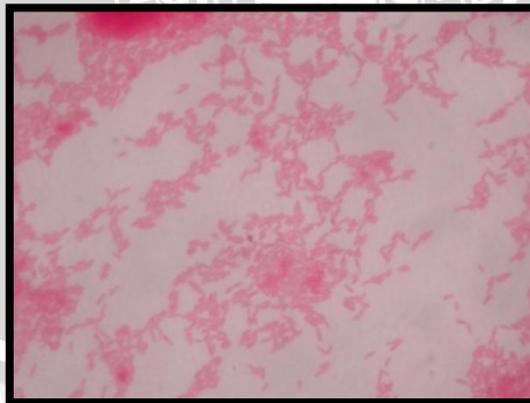
2.1 Bakteri *P. fluorescens*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi *P. fluorescens* menurut Kartika (2009), adalah sebagai berikut :

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

Karakteristik dari bakteri *Pseudomonas* (Gambar 1) adalah memiliki 1-3 flagela dan merupakan bakteri aerob (Rhodes, 1959). Bakteri ini berbentuk batang yang lurus atau sedikit bengkok dan berukuran 0,5 – 1,0 x 1,5 – 5,0 mikron meter dan memiliki suhu optimum pertumbuhan yaitu pada 30 – 37°C (Inggris, Roberts dan Bromage, 2001).



Gambar 1. *P. fluorescens* Perbesaran 1000x (Rhodes,1959).

Bakteri patogen yang sering menyerang ikan air tawar yaitu termasuk bakteri gram negatif. *Pseudomonas* merupakan bakteri gram negatif dan memiliki karakteristik yaitu bersel satu, berbentuk basil, streptobasil, flagel lofotrik yaitu

mempunyai lebih dari satu flagel pada salah satu ujungnya, bakteri heterotrof, hidup berkoloni, bersifat oksidatif. Bakteri ini memiliki flagel yang berfungsi sebagai alat pergerakan, kapsul sebagai bahan kental berupa lapisan lendir, berdinding tipis, fli sebagai pintu gerbang masuknya bahan genetik (Qnoze, 2011).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Kordi (2004), bakteri *P. fluorescens* merupakan bakteri yang mampu menyebabkan penyakit pada ikan (Patogen) hampir semua bakteri jenis ini selalu terdapat di air kolam, tambak atau di perairan umum dan laut, di permukaan tubuh ikan dan pada bagian dalam tubuh ikan. Sedangkan menurut Irianto (2005), bakteri *P. fluorescens* adalah bakteri yang banyak terdapat di lingkungan. Bakteri ini juga diketahui terdapat pada beberapa macam makanan antara lain salad, daging dan susu pateurisasi.

Infeksi bakteri *Pseudomonas* berbahaya bagi ikan kecuali pada ikan dengan stamina yang kuat dan sehat. Serangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini dapat terjadi apabila kondisi tubuh serta pengelolaan air yang kurang baik. Bakteri ini menginfeksi ikan dalam jumlah banyak dapat mengeluarkan zat racun yang bercampur dalam air dan akan meracuni ikan (Lesmana, 2003).

Menurut Tortora *et al.* (2001), *Pseudomonas* sangat umum ditemukan di tanah dan lingkungan alam lainnya. Bakteri ini sangat kurang efisien daripada beberapa bakteri heterotrof lainnya dalam memanfaatkan nutrisi, tetapi mereka mengimbangnya dengan cara yang lain. Misalnya, *Pseudomonas* mampu mensintesis jumlah enzim yang sangat besar dan dapat melakukan metabolisme dalam berbagai substrat. Oleh karena itu, mereka mungkin memberikan kontribusi yang signifikan terhadap dekomposisi bahan kimia seperti pestisida yang ditambahkan ke tanah. Banyak *Pseudomonas* dapat tumbuh pada

temperatur yang rendah. Karakteristik ini dikombinasikan dengan kemampuan bakteri untuk menggunakan protein dan lipid sehingga berperan penting dalam pembusukan makanan.

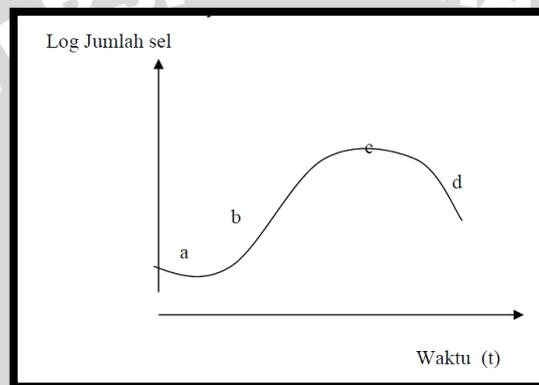
2.1.3 Pertumbuhan Bakteri

Menurut Ariyanto, Maryudani dan Azizah (2007), semua isolat *P. fluorescens* yang diuji bersifat gram negatif, dapat membentuk enzim katalase, oksidase positif, dan memerlukan oksigen untuk tumbuh (aerob), dan mampu menghidrolisa pati dan arginin, membentuk enzim gelatinase, dapat melakukan denitrifikasi, tidak mengakumulasi *polyhydroxy butirate*. Semua isolat dapat menggunakan glukosa, laktosa, fruktosa, trehalosa, selobiosa, manitol, dan dulcitol sebagai sumber karbon. Semua isolat tumbuh baik pada suhu sekitar 20⁰ - 41⁰ C dengan pertumbuhan terbaik pada suhu 30⁰C. pH terbaik untuk pertumbuhan bakteri ini yaitu kisaran 6 - 7. Pada medium yang mengandung NaCl semua bakteri tumbuh sampai pada konsentrasi NaCl 2%. Menurut Anonymous (2013), *P. fluorescens* adalah bakteri Gram-negatif, obligat aerobik, motil dan bakteri berbentuk batang. Bakteri ini tumbuh pada pH netral dan memiliki suhu pertumbuhan optimal sebesar 25-30⁰C (Palleroni, 1984), dengan suhu pertumbuhan terendah sebesar 4⁰C.

Pertumbuhan dapat didefinisikan sebagai penambahan jumlah atau volume serta ukuran sel. Pada organisme prokariot seperti bakteri, pertumbuhan merupakan penambahan volume dan ukuran sel dan juga sebagai penambahan jumlah sel. Pertumbuhan bakteri terbagi menjadi empat fase utama yaitu : fase lag (fase dimana terjadi peningkatan ukuran sel dan merupakan fase penyesuaian untuk pertumbuhan), fase pertumbuhan (fase dimana sel berada dalam keadaan pertumbuhan yang seimbang dan terjadi kecepatan peningkatan), fase stasioner (fase dimana bakteri yang tumbuh sama dengan

bakteri yang mengalami kematian) dan fase kematian (dimana pada fase ini bakteri yang mati lebih banyak daripada yang berkembang biak).

Fase kematian ini dapat berlangsung terus menerus dalam beberapa minggu tergantung pada spesies dan keadaan medium serta faktor-faktor lingkungan. Cara menghitung jumlah bakteri untuk membuat grafik pertumbuhan (Gambar 2), yaitu dengan metode penuangan, penghitungan dengan mikroskop dengan menggunakan *haemocytometer*, dan dengan menggunakan turbidometer (Fauzi, 2011).



Gambar 2. Kurva Pertumbuhan bakteri (Rofi'i, 2009).

2.1.4 Perkembangbiakan Bakteri

Bakteri biasanya melakukan pembiakan secara aseksual atau vegetatif. Pembiakan ini berlangsung cepat, jika faktor-faktor luar menguntungkan. Pelaksanaan pembiakan yaitu dengan pembelahan diri atau *divisio*. Jika faktor-faktor luar menguntungkan, maka setelah terjadi pembelahan, sel-sel baru membesar sampai masing-masing menjadi sebesar sel induk. Bakteri yang diinokulasikan dalam medium yang sesuai dan pada keadaan yang optimum bagi pertumbuhannya, maka terjadi kenaikan jumlah yang sangat tinggi dalam waktu yang relatif pendek. Pada beberapa spesies, populasi (panen sel terbanyak yang dapat diperoleh) tercapai dalam waktu 24 jam, populasinya dapat mencapai 10 sampai 15 milyar sel bakteri per milliliter (Volk dan Wheeler, 1993).

2.1.5 Infeksi Bakteri *P. fluorescens*

Bakteri dari famili *Pseudomonadaceae* banyak menginfeksi ikan air tawar yang mengakibatkan gejala – gejala ikan terinfeksi penyakit. Penyakit bisul disebabkan oleh bakteri *Pseudomonas fluorescens*, ikan yang terinfeksi penyakit ini memperlihatkan gejala – gejala antara lain ; mempunyai bisul terutama pada kulit, sirip, rongga perut dan organ – organ dalam. Aktivitas bakteri *P. fluorescens* dapat menyebabkan anemia dan kematian massal. Penyakit bisul ini yang disebabkan oleh bakteri ini juga sering disebut *hemorrhagic septicemia* (Kordi , 2004).

Kerugian yang ditimbulkan oleh bakteri *A. hydrophila* dan *P. fluorescens* ini sangat besar. Hampir semua bagian tubuh ikan dapat terinfeksi oleh bakteri ini, karena penginfeksiannya yang sangat ganas sehingga dapat menyebabkan kematian. Penularannya bisa melalui air, alat-alat budidaya, bagian tubuh ikan yang sudah terinfeksi, melalui perantara hewan lain dan melalui tumbuhan air. Gejala yang terlihat pada ikan yang telah terinfeksi bakteri ini adalah ikan berwarna gelap (kusam), nafsu makan berkurang atau bahkan tidak ada nafsu makan, ikan bergerombol di dekat pintu pengeluaran air, terdapat luka pada kulit, sirip dan sisik rusak (Cahyono, 2001).

2.2 Daun Mengkudu (*M. citrifolia*)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Tanaman mengkudu diklasifikasikan sebagai berikut (Sitepu dan Josua 2012),

- Kingdom : *Plantae*
- Divisi : *Spermatophyta*
- Subdivisi : *Angiospermae*
- Kelas : *Dicotyledone*

Anak kelas : *Sympetalae*
Bangsa : *Rubiales*
Suku : *Rubiaceae*
Genus : *Morinda*
Spesies : *Morinda citrifolia*

Tanaman mengkudu berbentuk bunga dengan tinggi mencapai 8 meter. Mengkudu banyak dimanfaatkan sebagai pewarna dan obat. Tanaman ini tumbuh di tepi pantai, kebun belakang rumah dan mulai menghasilkan buah pada usia 3-4 tahun. Batang pendek dan bercabang banyak. Daun tersusun dan bertangkai pendek. Daunnya lebar, tebal dan mengkilap (Gambar 3). Bentuk daun lonjong menyempit kearah pangkal (Mangoting, Irawan dan Abdullah, 2005).



Gambar 3. Daun mengkudu (*M. citrifolia*) (Munandi, 2008)

Mengkudu termasuk jenis tanaman yang umumnya memiliki batang pendek dan banyak cabang dengan ketinggian pohon sekitar 3-8 m di atas permukaan tanah serta tumbuh secara liar di hutan-hutan, tegalan, pinggir sungai, dan pekarangan. Mengkudu dapat tumbuh di berbagai tipe lahan dan iklim pada ketinggian tempat dataran rendah sampai 1.500 m diatas permukaan laut dengan

curah hujan 1500–3500 mm/tahun, pH tanah 5-7, suhu 22-30°C dan kelembaban 50-70% (Rukmana 2002).

Mengkudu tumbuh setinggi 4-6 m. Pohon ini berbatang bengkok, berkulit coklat keabu-abuan atau coklat kekuning-kuningan. Berdaun tunggal, besar, berbentuk jorong-lanset dengan ukuran 15-50 x 5-17 cm, tebal dan berwarna hijau mengkilap, tanpa bulu. Ujung lancip pendek, pangkal juga pendek yaitu berbentuk pasak ukuran 0,5-2,5 cm, tepinya rata, dan daunnya menyirip. Daun mengkudu terletak berhadapan - hadapan, mempunyai daun berbentuk segitiga lebar dengan ukuran bervariasi (Nuraini, 2013).

2.2.2 Kandungan

Salah satu kandungan mengkudu adalah antrakuinon dan scolopetin yang aktif sebagai antimikroba, terutama bakteri dan jamur. Senyawa antrakuinon dapat melawan bakteri. Senyawa Scolopetin sangat efektif sebagai unsur anti peradangan dan anti alergi (Bangun dan Sarwono, 2002).

Menurut Pranata (2014), tanaman mengkudu mengandung banyak senyawa yang baik untuk kesehatan, yaitu ; Scoloptetin, Alkaloid, Terpenoid, Xeronin, Antraquinon, Karoten, Asam amino. Sedangkan menurut Rukmana (2002), daun tanaman mengkudu mengandung zat kapur, protein, karoten, arginin, asam glutamat, tirosin, asam karbonat, asam *ursolat*, *thiamin*, dan *antraquinon*. Kandungan flavonoid total dalam daun mengkudu adalah 254mg/100gr fw. Daun mengkudu juga mengandung spektrum luas antrakuinon seperti iridoid, glikosida flavonol, dan triterpen. Senyawa ini berfungsi sebagai antibakteri. Masing-masing senyawa yang terkandung dalam mengkudu mempunyai peran yang spesifik.

2.2.3 Aktivitas Mikroba

Antimikroba adalah zat yang mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroba apabila zat tersebut mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri disebut antibakteri. Mekanisme kerja antimikroba antara lain dengan jalan merusak dinding sel, merusak membran sitoplasma, men-denaturasi protein sel dan menghambat enzim dalam sel (Prajitno, 2005). Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol. Flavonoid bersifat antibakteri dan antioksidan serta mampu meningkatkan kerja sistem imun karena leukosit sebagai pemakan antigen lebih cepat dihasilkan dan sistem limfoid cepat diaktifkan. Selain itu flavonoid merupakan senyawa yang larut dalam air dan berupa senyawa fenol (Harborne , 1987).

Menurut Waluyo (2008), bahan antimikrobal dapat bersifat bakteriostatik pada konsentrasi rendah, namun bersifat bakterisidal pada konsentrasi tinggi. Istilah bakteriosidal digunakan untuk zat yang dapat membunuh bakteri dan bakteriostatik adalah sesuatu keadaan yang mencegah pertumbuhan bakteri sehingga populasi bakteri tetap.

2.2.4 Manfaat

Beberapa tumbuhan yang tergolong sebagai pestisida nabati diketahui mengandung senyawa yang bersifat sebagai antimikroba, baik sebagai antijamur maupun antibakteri. Salah satu tanaman yang diketahui bersifat antibakteri adalah tanaman mengkudu (*M. citrifolia*). Tanaman mengkudu dapat digunakan sebagai antibakteri mulai dari biji, buah dan juga daunnya. Beberapa macam kandungan senyawa aktif yang dapat berfungsi sebagai zat antibakteri adalah acubin, alizarin, antaraquinon dan flavonoid (Waha, 2001).

Salah satu kandungan mengkudu adalah antrakuinon dan scolopetin yang aktif sebagai antimikroba, terutama bakteri dan jamur. Antibakteri

merupakan bahan atau senyawa yang khusus digunakan untuk kelompok bakteri. Antibakteri dapat dibedakan berdasarkan mekanisme kerjanya, yaitu antibakteri yang menghambat pertumbuhan dinding sel, antibakteri 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. Aktivitas antibakteri dibagi menjadi 2 macam yaitu aktivitas bakteriostatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen dalam kisaran luas) (Brooks, Butel dan Morse, 2005).

2.3 Uji Efektivitas Antibakteri Secara In vitro

2.3.1 Uji Cakram

Pada uji cakram lempengan agar disemai dengan mikroorganisme yang diuji, cakram yang berisi antibakteri diletakkan diatas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme yang diuji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antibakteri terlihat sebagai wilayah bening sekitar pertumbuhan mikroorganisme. Uji antibakteri dengan cara cakram adalah untuk mengetahui pada konsentrasi berapa persen yang bersifat bakteriostatik maupun bakteriosidal (Lay, 1994).

Selain menggunakan cakram steril, juga bisa menggunakan cakram kertas yang harus dipotong dan melalui proses sterilisasi terlebih dahulu. Metode difusi dilakukan dengan metode Kirby-Bauer yang dikenal dengan sebutan metode cakram kertas. Tiap-tiap cakram kertas kosong sebelumnya dipanaskan dalam oven pada suhu 70°C selama 15 menit, kemudian kertas cakram dicelupkan ke dalam larutan uji. Cakram yang telah berisi supernatan, kemudian didiamkan selama 15 menit sebelum diletakkan pada media uji. Kemudian secara aseptik, setelah kertas cakram menyerap supernatant tersebut, masing-masing diletakkan pada permukaan medium yang telah berisi mikroba uji dan diinkubasi pada suhu

37°C selama 18-24 jam, dilakukan pengukuran diameter zona bening, yaitu zona bening yang terbentuk di sekitar cakram, dengan menggunakan penggaris millimeter (Noverita, Fitria dan Sinaga, 2009).

2.3.2 Mekanisme Kerja Antimikroba

Menurut Laili (2007), cara kerja zat antimikroba terhadap mikroorganisme (Gambar 4) adalah sebagai berikut:

1. Merusak Dinding Sel

Struktur dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai dibentuk. Tersusun atas peptidoglikan, asam terkonat, protein, lipoprotein dan polisakarida.

2. Mengubah Permeabilitas Membran

Membran sitoplasma tersusun atas protein dan fosfolipid, bersifat permeable, berfungsi mengatur lewatnya substansi keluar-masuk sel, kerusakan membran mengakibatkan nukleotida dan enzim merembes keluar dan bahan-bahan yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidupnya terhambat masuk.

3. Merusak Sitoplasma

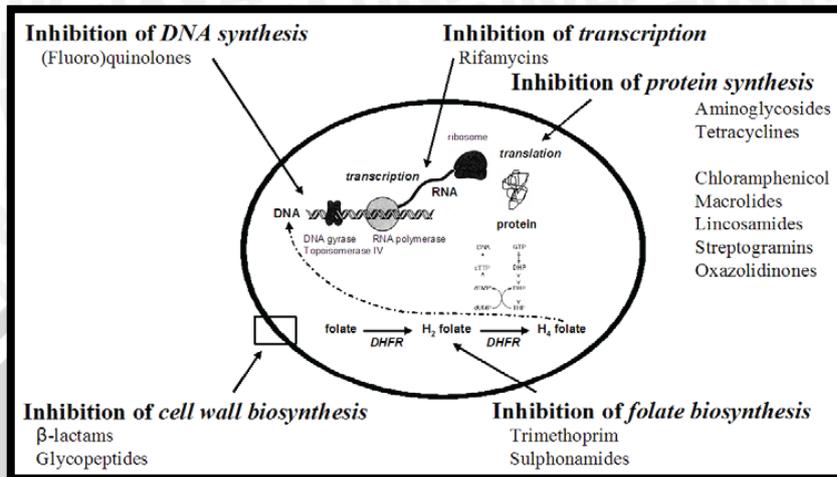
Sitoplasma terdiri atas 80% air, asam nukleat, protein, karbohidrat, lipid, ion organik dan sebagai senyawa dengan berat molekul rendah. Adanya konsentrasi beberapa zat kimia dapat menyebabkan koagulasi komponen-komponen seluler yang vital.

4. Menghambat Kerja Enzim

Penghambat kerja enzim untuk beberapa zat kimia akan merugikan gugus enzim sulfaridrin sehingga mengganggu proses metabolisme.

5. Menghambat Sintesis Nukleat dan Protein

DNA, RNA dan protein memegang peranan penting di dalam proses kehidupan normal sel, sehingga mengganggu pada pembentukan fungsi fungsi zat-zat tersebut yang menyebabkan kerusakan sel.



Gambar 4. Mekanisme Kerja Antimikroba (Brockstael dan Arthur, 2008).



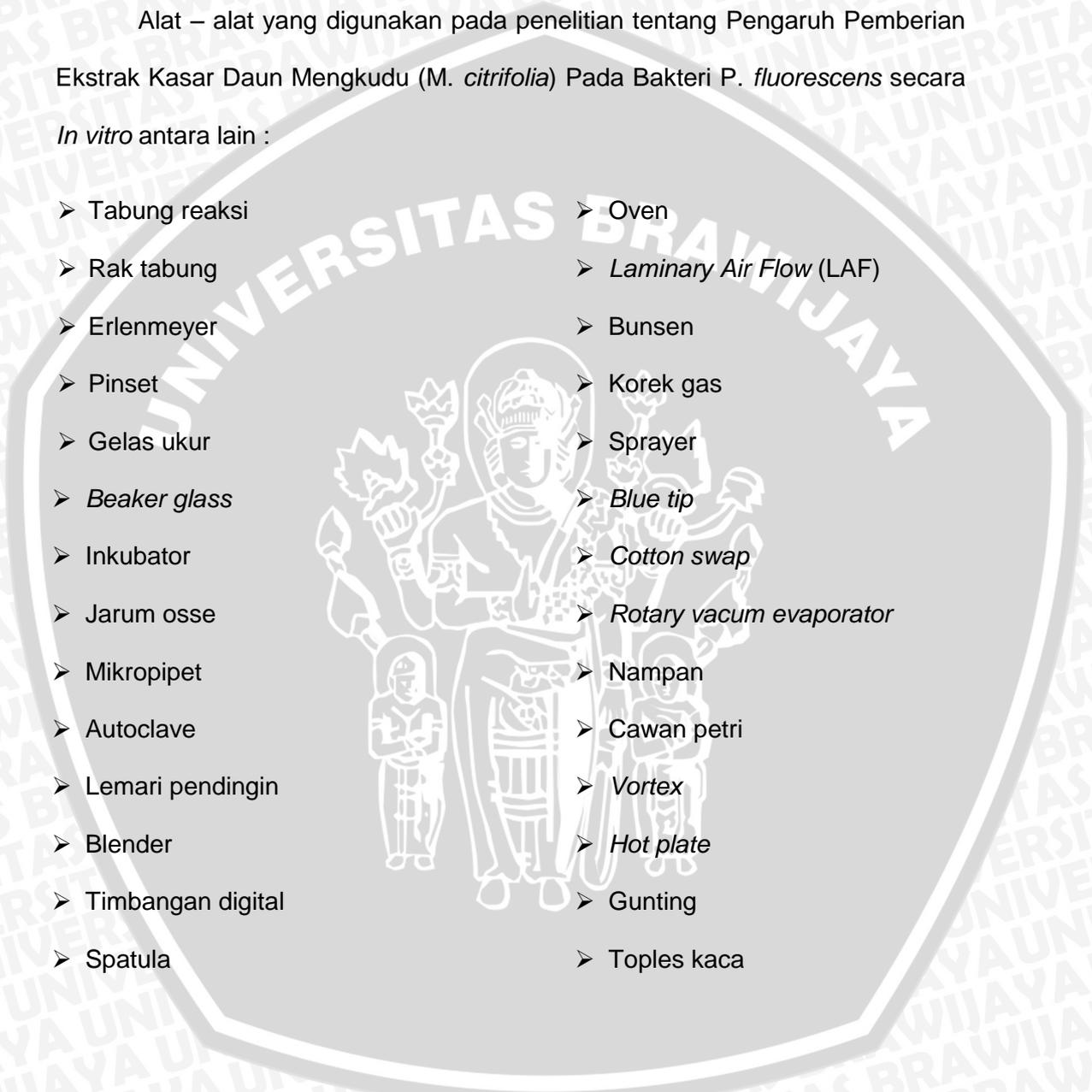
3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan pada penelitian tentang Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Mengkudu (*M. citrifolia*) Pada Bakteri *P. fluorescens* secara

In vitro antara lain :

- 
- Tabung reaksi
 - Rak tabung
 - Erlenmeyer
 - Pinset
 - Gelas ukur
 - *Beaker glass*
 - Inkubator
 - Jarum osse
 - Mikropipet
 - Autoclave
 - Lemari pendingin
 - Blender
 - Timbangan digital
 - Spatula
 - Oven
 - *Laminary Air Flow* (LAF)
 - Bunsen
 - Korek gas
 - Sprayer
 - *Blue tip*
 - *Cotton swap*
 - *Rotary vacum evaporator*
 - Nampan
 - Cawan petri
 - *Vortex*
 - *Hot plate*
 - Gunting
 - Toples kaca

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan – bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*)
- Bakteri *Pseudomonas fluorescens*
- Kertas label
- Alkohol 70%
- PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)
- NB (*Nutrient Broth*)
- Tali
- Lap kering
- DMSO 10%
- Plastik
- Sarung tangan
- Masker
- Karet Gelang
- Kapas
- Tissue
- Etanol 96%
- Kertas Saring
- Akuades
- Alumunium Foil
- Spiritus
- Kertas cakram ukuran 6mm

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan metode eksperimen. Menurut Setyanto (2005), penelitian eksperimen bertujuan untuk meneliti kemungkinan sebab akibat dengan mengenakan satu atau lebih kondisi perlakuan pada satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak diberi perlakuan. Definisi eksperimen secara lebih singkat, adalah merupakan cara mengatur kondisi suatu eksperimen untuk mengidentifikasi variabel-variabel dan menentukan sebab akibat suatu kejadian.

3.3 Pengambilan Data

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu penyelidik mengadakan pengamatan terhadap gejala-gejala subyek yang diselidiki baik secara langsung dalam situasi yang sebenarnya maupun dalam situasi buatan atau dengan perantara sebuah alat, baik alat yang sudah ada maupun yang sengaja dibuat untuk keperluan khusus (Surachmad, 1998).

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). 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 (Sastrosupadi, 2000).

Model untuk RAL adalah sebagai berikut :

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

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

Dalam penelitian ini menggunakan variabel bebas yaitu dengan perlakuan pemberian ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) dengan perlakuan menggunakan perbedaan konsentrasi ekstrak kasar daun mengkudu (M.

citrifolia) pada bakteri *P. fluorescens*. Dasar dari penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat dalam penggunaan ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*). Dalam penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan 3 kali pengulangan. Sedangkan untuk kontrol menggunakan kontrol positif dan negatif. Dosis yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari hasil penelitian pendahuluan. Tabel perlakuan dapat dilihat sebagai berikut:

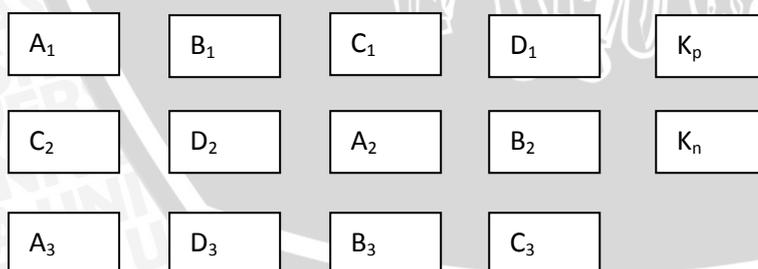
Tabel 1. Perlakuan dalam penelitian

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
A	A ₁	A ₂	A ₃
B	B ₁	B ₂	B ₃
C	C ₁	C ₂	C ₃
D	D ₁	D ₂	D ₃

Keterangan:

- A : Perlakuan konsentrasi ekstrak kasar daun mengkudu 20%
- B : Perlakuan konsentrasi ekstrak kasar daun mengkudu 40%
- C : Perlakuan konsentrasi ekstrak kasar daun mengkudu 60%
- D : Perlakuan konsentrasi ekstrak kasar daun mengkudu 80%

Denah penelitian disajikan pada (Gambar 5) berikut:



Gambar 5. Denah Penelitian Uji Cakram

Keterangan:

- K (+) : Kontrol positif
- K (-) : Kontrol negatif

A,B,C,D : Perlakuan

1,2,3 : Ulangan

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan penelitian

3.5.1.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

- Alat – alat yang akan digunakan dalam penelitian dicuci bersih menggunakan sabun cuci dan dikeringkan. Kemudian dibungkus menggunakan koran dan siap di sterilisasi.
- Dituang air secukupnya ke dalam *autoclave* sampai elemen terendam, kemudian alat yang telah dibungkus koran dimasukkan ke dalam *autoclave* dan ditutup rapat.
- Tombol ON dinyalakan, setelah mencapai suhu 121°C dan tekanan menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit dengan cara membuka dan atau menutup klep uap yang berada di bagian atas tutup *autoclave*.
- Tombol OFF ditekan, ditunggu beberapa saat sampai suhu menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka klep uap lalu buka penutup *autoclave*, kemudian alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil.
- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

3.5.1.2 Sterilisasi tempat perlakuan

Tempat yang akan digunakan untuk penelitian juga disterilkan agar tidak terkonaminasi. Dalam melakukan kegiatan apapun yang berkaitan dengan penelitian harus selalu dalam keadaan steril. Sterilisasi pada peneliti cukup menggunakan alkohol 70%, sedangkan untuk tempat perlakuan dilakukan dengan cara penyinaran UV.

3.5.1.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Mengkudu dan Penentuan Konsentrasi

Proses pembuatan ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) yang harus dilakukan terlebih dahulu disiapkan daun mengkudu segar kemudian dikeringkan dengan cara di oven pada suhu 40⁰ C. Berat awal daun mengkudu yaitu 5kg , setelah dikeringkan dihasilkan penyusutan berat sebesar 2 kg. Setelah di oven langkah selanjutnya yaitu dilakukan proses penggilingan dengan menggunakan *blender* hingga di dapat berat daun mengkudu sebesar 754 gr. Proses ekstraksi daun mengkudu dapat dilihat pada Lampiran 3.

Setelah bahan yang akan digunakan sudah siap kemudian dilakukan persiapan perendaman (maserasi) dimana serbuk daun mengkudu sebanyak 200 gr dimaserasi dalam etanol 96% dengan perbandingan 1 : 5 sebanyak 1 L selama 2 x 24 jam dan dilakukan dalam suhu kamar. Larutan yang sudah didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak daun mengkudu sebanyak 18,17 gr. Penentuan konsentrasi ekstrak kasar daun mengkudu dapat dilihat pada Lampiran 4.

3.5.1.4 Pembuatan Media

A. PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)

- PSA dengan dosis 25 gr/L.
- Dirimbang 7,5 gr PSA.
- Dimasukkan ke dalam Erlenmeyer yang berisi akuades 300 ml.
- Diaduk hingga tercampur merata.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan alumunium foil kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121⁰C selama 15 menit.

- Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
- Dituang pada cawan petri tunggu dingin dan gunakan atau simpan pada lemari pendingin dengan diberi label.
- Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin.
- Panaskan lagi apabila akan digunakan kembali.

B. Tryptic Soy Broth (TSB)

3.5.1.5 Pemiakan Bakteri *P. fluorescens*

- Larutan TSB disiapkan sebanyak 0,6 gram dalam *erlenmeyer* sebanyak 100 ml.
- Jarum ose dipanaskan diatas bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum ose disentuhkan kebiakan murni *P. fluorescens* kemudian dicelupkan ke TSB.
- Larutan TSB dibiarkan 12-24 jam dalam inkubator pada suhu 37°C .
- Disiapkan petridisk yang berisi media PSA.
- Setelah TSB menjadi keruh, jarum ose dicelupkan ke TSB dan digoreskan ke permukaan PSA.
- Digoreskan ke dalam media PSA secara zig-zag dengan metode goresan Sinambung, T atau Kuadran.
- Media PSA di Inkubasi di dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 24 jam.

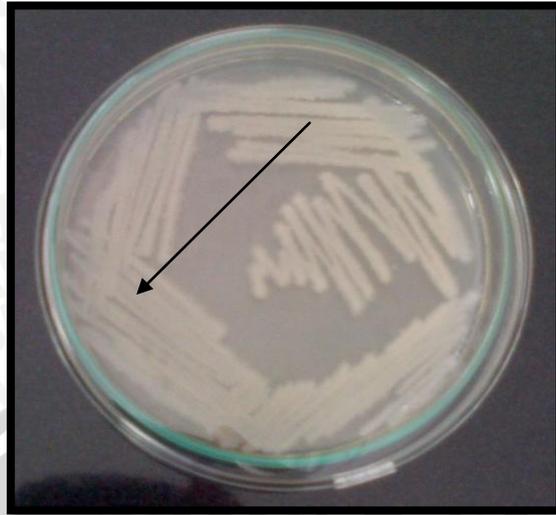
3.5.2 Pelaksanaan Penelitian Dengan Uji Cakram

Pada penelitian ini bakteri yang digunakan adalah isolat murni yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau (BBAP) Jepara. Langkah selanjutnya yang dilakukan adalah peremajaan kembali bakteri *P. fluorescens* yang sudah ada. Media yang digunakan untuk meremajakan bakteri ini ada dua jenis media , yaitu media agar PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) untuk pembiakan bakteri dengan metode gores dan media cair TSB yaitu (*Tryptone Soya Broth*) dimana

media ini merupakan substrat untuk menumbuhkan bakteri, isolasi, dan perhitungan jumlah mikroba. Dalam pembuatan media ini harus dilakukan sterilisasi pada alat-alat dan bahan yang akan digunakan untuk menghindari kontaminasi pada media.

Dalam penelitian digunakan biakan bakteri dengan kepadatan 10^7 CFU/ml. Untuk mendapatkan kepadatan bakteri ini, dilakukan pembiakan bakteri dengan kepadatan sebesar 1 Mc Farland (1 Mc. Farland = 10^7 bakteri/ml) dengan melakukan penanaman bakteri uji ke dalam media agar PSA (*Pseudomonas Selective Agar*), kemudian diambil menggunakan jarum osse dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi TSB, sampai didapat kekeruhan yang sama dengan kepadatan Mc Farland 1, selanjutnya diambil 1 ml menggunakan *micropipet* dan dimasukkan ke dalam 9 ml akuades steril dalam tabung reaksi. Dengan demikian telah didapatkan kepadatan 10^7 bakteri/ml (Jatmikoningtyas, 2001). Larutan Mc Farland merupakan larutan yang digunakan untuk mengetahui kepadatan bakteri yang digunakan saat penelitian. Komposisi dari larutan Mc Farland yaitu $BaCl_2$ (ml) 1%, H_2SO_4 (ml) 1% dan aquadest.

Isolat yang didapat kemudian digores pada media kultur dengan metode gores kuadran (*Streak*), hal ini dilakukan untuk untuk mendapatkan koloni tunggal dan murni. Metode pembiakan *streak* (gores) dilakukan pada media agar yang diletakkan pada cawan petri dengan cara menggesekkan jarum ose yang telah mengandung bakteri dengan arah gerakan ke kiri dan ke kanan secara sinambung sampai meliputi seluruh permukaan agar sehingga akan diperoleh koloni yang menggerombol hingga mengecil. Bakteri *P. fluorescens* yang dibiakkan pada media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) membentuk koloni berwarna kuning. Pembiakan dengan metode streak dapat disajikan pada Gambar 6.



Gambar 6. Biakan Murni Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

Dari gambar 6 di atas diperoleh hasil biakan bakteri *P. fluorescens* yang berbentuk batang lurus, memiliki batang panjang, terlihat tampak putih di media. Menurut Dowson (1957), *P. fluorescens* merupakan genus bakteri tanpa spora, termasuk bakteri Gram-negatif, memiliki batang panjang, motil dengan flagella polar dan merupakan fermentor yang lemah terhadap senyawa karbon. Kebanyakan spesies dari *Pseudomonas* tampak putih ketika dilihat pada media padat dan ketika masih muda semua spesies motil dengan kutub flagel bervariasi dengan jumlah satu sampai tujuh. Biasanya dalam persiapan preparasi, flagel dapat dilihat pada kedua tiang penyangga sel dalam organisme lophotrichous, tetapi *Pseudomonas* menunjukkan sel – sel yang membagi setiap sel karena dilengkapi dengan kutub flagel sebelum pemisahannya.

Uji cakram merupakan pengujian untuk antibakteri dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang mengandung bahan antibakteri sesuai dengan konsentrasi perlakuan (Pelczar dan Chan, 1986).

Uji cakram digunakan untuk mengetahui pada konsentrasi tertentu yang dapat menghambat bakteri yang bersifat bakterostatik (menghambat bakteri) setelah pengamatan 24 jam, maupun bakteriosidal (membunuh bakteri) setelah

pengamatan 48 jam. Kertas cakram yang telah direndam dengan zat antibakteri diletakkan di atas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme yang diuji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antibakterii terlihat sebagai wilayah yang jernih di sekitar pertumbuhan mikroorganisme.

Prosedur pelaksanaan Uji cakram adalah :

- Disiapkan petridisk yang telah terdapat media PSA .
- Disiapkan konsentrasi ekstrak kasar daun mengkudu untuk uji cakram.
- Penanaman bakteri pada media PSA dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri dari media TSB dengan menggunakan mikropipet , kemudian ditetaskan dalam media agar sebanyak 1 tetes dan diratakan pada seluruh permukaan media agar.
- Kertas cakram steril direndam ke dalam ekstrak kasar daun mengkudu selama 15 menit berdasarkan konsentrasi yang telah ditentukan.
- Kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak kasar daun mengkudu ditiriskan dan diletakkan pada permukaan lempeng agar.
- Dibaca hasil setelah diinkubasi pada suhu ruang 30°C selama 24 jam dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong.

3.6 Parameter Uji

Parameter uji terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama yaitu diameter daerah hambatan yang diukur dengan menggunakan kertas cakram yang dinyatakan dengan mm ditambah daerah bening yang ada di sekeliling kertas cakram. Parameter penunjangnya adalah lama perendaman kertas cakram.

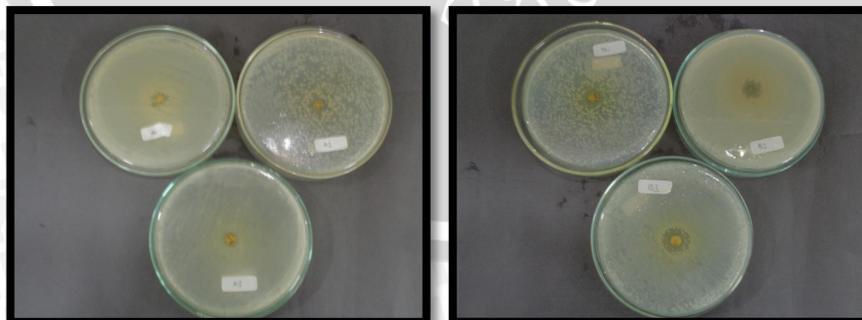
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Hasil Penelitian

4.1.2 Daya Antibakterial Ekstrak Kasar Daun Mengkudu (*M. citrifolia*) Dengan Uji Cakram

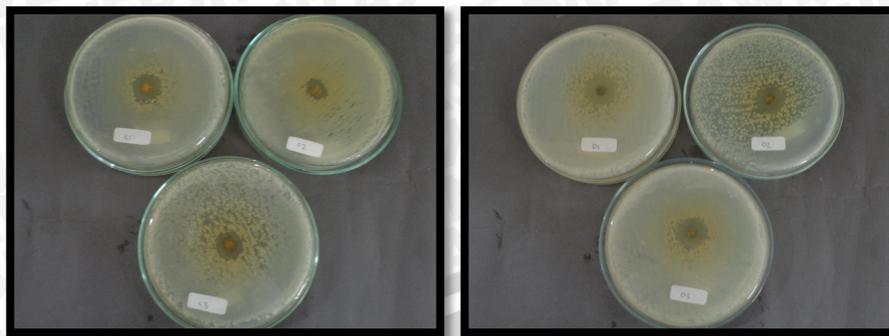
Uji cakram ini dilakukan untuk mengetahui kemampuan daya hambat ekstrak daun mengkudu (*M. citrifolia*) yang ditandai dengan adanya hambatan di daerah kertas cakram. Menurut Sommers (1994) zona hambatan yang terbentuk sebagai daerah yang tidak memperlihatkan adanya pertumbuhan bakteri di sekitar cakram kertas saring, atau dengan kata lain adalah zona bening disekitar kertas cakram.

Pada penelitian ini didapat daerah hambatan ditunjukkan dengan adanya zona bening di sekitar kertas cakram yang telah direndam ekstrak daun mengkudu sesuai konsentrasi masing-masing perlakuan. Hasil dari uji cakram (Gambar 7) dari masing-masing perlakuan yaitu pada perlakuan A (20%) didapat rata-rata zona bening sebesar 9,08 mm, pada perlakuan B (40%) didapat rata-rata zona bening sebesar 12,83 mm, pada perlakuan C (60%) didapat rata-rata zona bening sebesar 16,25 mm, sedangkan pada perlakuan D (80%) didapat rata-rata sebesar 14,92 mm.



A= 20%

B= 40%



C= 60%

D= 80%

Gambar 7. Hasil Diameter Zona Hambat Bakteri *P. fluorescens*

Perhitungan diameter zona hambat didapatkan melalui sidik ragam, uji Beda Nyata Terkecil (BNT), uji polinomial orthogonal, perhitungan tersebut dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak daun mengkudu (*M. citrifolia*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Penggunaan bakteri *P. fluorescens* dalam penelitian ini adalah untuk menambah informasi tentang bakteri *P. fluorescens* yang bersifat gram negatif ini. Perhitungan lebih jelasnya dapat dilihat pada Lampiran 6. Pada perlakuan dengan konsentrasi 80% mengalami penurunan dalam menghasilkan diameter zona hambat yang dimana bakteri telah resisten terhadap ekstrak yang digunakan sehingga flavonoid yang menghasilkan enzim sulfonase akan dimanfaatkan kembali oleh bakteri sebagai bahan dasar pembentukan dan penebalan dari membran luar sel menjadi fosfolipida yang merupakan salah satu bahan dasar dari membran luar sel bakteri (Ayu *et al.*, 2008). Dalam menentukan konsentrasi yang digunakan dalam penelitian dilakukan perhitungan yang disajikan pada Lampiran 4. Untuk perolehan data rerata diameter zona hambat disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Data Rerata Diameter Zona Hambat Bakteri *P. fuorescens*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata (mm)
	1	2	3		
A = 20%	9.4	10.4	7.45	27.25	9.08
B = 40%	11.15	13.2	14.15	38.5	12.83
C = 60%	17.1	15.3	16.35	48.75	16.25
D = 80%	14.1	16.4	14.25	44.75	14.92
Total				159.25	

Pada Tabel 2 diketahui hasil penelitian tentang besar diameter zona hambat ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) terhadap bakteri *P. fluorescens* menunjukkan hasil rata-rata nilai tertinggi yaitu pada konsentrasi 60% dengan nilai sebesar 16,25 mm dan mengalami penurunan pada konsentrasi 80% dengan nilai sebesar 14,92 mm. Pada konsentrasi 60% tidak terjadi pembentukan dan penebalan dari membran luar sel, sedangkan pada konsentrasi 80% terjadi penebalan membran luar sel sehingga diduga bakteri masih dapat tumbuh. Kemudian dilakukan analisa sidik ragam untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan, berikut tabel sidik ragam zona bening yang dihasilkan dari beberapa perlakuan ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) yang berbeda seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Analisa Sidik Ragam Diameter Zona Hambat *P. fluorescens*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	510.608	170.202	96.22**	4.07	7.59
Acak	8	14.15	1.768			
Total	11					

Keterangan : ** = Berbeda sangat nyata

Pada perhitungan sidik ragam menunjukkan bahwa konsentrasi ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Selanjutnya dilakukan perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan seperti dilihat pada Tabel 4.

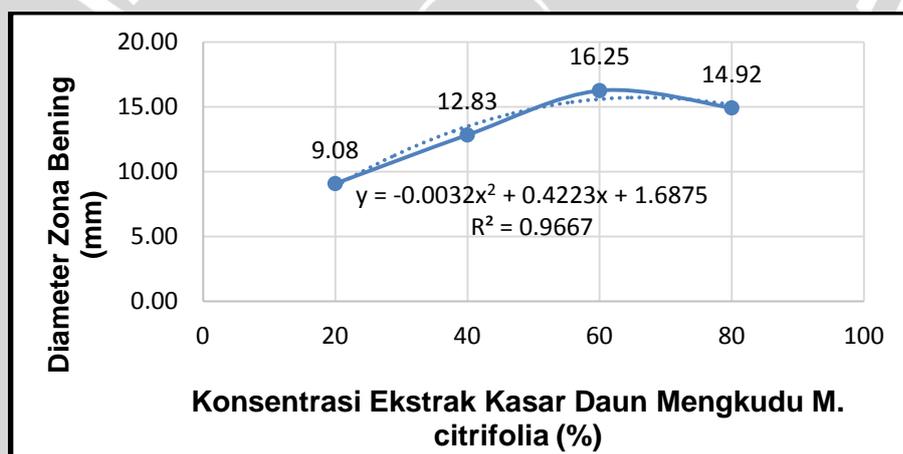
Tabel 4. Hasil Uji Beda Nyata (BNT) Ekstrak Kasar Daun Mengkudu (*M. citrifolia*) terhadap Diameter Zona Hambat Bakteri *P. fluorescens*

Perlakuan	Rerata	A	B	D	C	Notasi
		9.08	12.83	14.92	16.25	
A	9.08	—				a
B	12.83	3.75**	—			b
D	14.92	5.84**	2.09*	—		c
C	16.25	7.17**	3.42**	1.33 ^{ns}	—	d

Keterangan : * : Berbeda Nyata; Ns : Tidak Berbeda Nyata
 ** : Berbeda Sangat Nyata

Pada Tabel 4 di atas menunjukkan bahwa perlakuan A memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan B, D dan C sehingga diberi notasi a. Sedangkan perlakuan C berbeda sangat nyata terhadap perlakuan D dan B, hal ini menunjukkan bahwa perlakuan C memberikan pengaruh terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

Kemudian untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antara perlakuan dengan parameter yang diuji maka dilakukan perhitungan uji polinomial orthogonal pada Lampiran 6. Kemudian dari hasil penelitian didapat grafik regresi diameter zona bening yang dihasilkan dengan perlakuan yang berbeda seperti pada Gambar 7.



Gambar 7. Hubungan Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Kasar Daun Mengkudu (*M. citrifolia*) terhadap Diameter Zona Hambat Bakteri *P. fluorescens*

Hubungan antara konsentrasi ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) terhadap diameter zona hambat (bening) menunjukkan pola kuadratik dengan persamaan $y = -0.0032x^2 + 0.4223x + 1.6875$ dan koefisien $R^2 = 0.9667$. Dari grafik di atas dapat dilihat bahwa pada konsentrasi 20% hingga 60% grafik nampak mengalami kenaikan hingga titik puncak, hal ini dikarenakan ekstrak mengkudu masih mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri *P. fluorescens*, Menurut Elifah (2010) dalam Ariyanti *et al.* (2012), diameter daya hambat tidak selalu naik sebanding dengan naiknya konsentrasi antibakteri, kemungkinan ini

terjadi karena perbedaan kecepatan difusi senyawa antibakteri pada media agar serta jenis dan konsentrasi senyawa antibakteri yang berbeda juga memberikan diameter zona hambat yang berbeda.

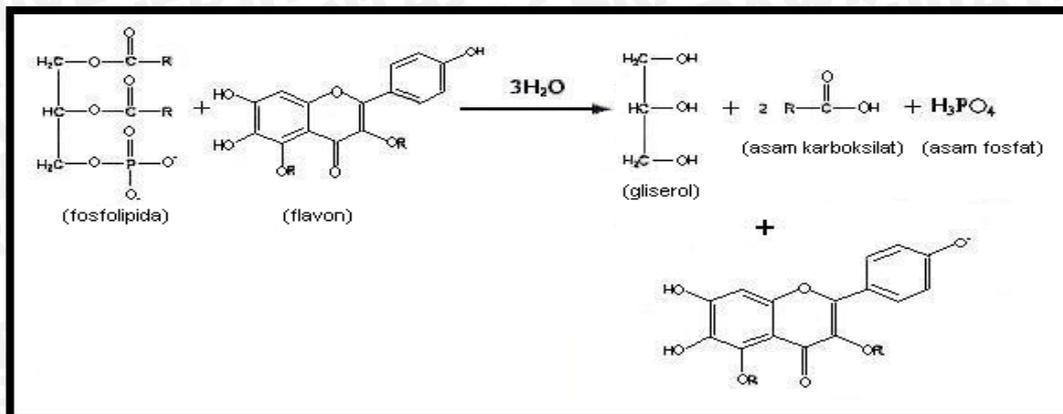
Pada penelitian ini penurunan zona hambat terjadi pada konsentrasi 80%, hal ini bisa terjadi karena bakteri telah resisten terhadap ekstrak yang digunakan sehingga flavonoid yang menghasilkan enzim sulfonase akan dimanfaatkan kembali oleh bakteri sebagai bahan dasar pembentukan dan penebalan dari membran luar sel menjadi fosfolipida yang merupakan salah satu bahan dasar dari membran luar sel bakteri (Ayu *et al.*, 2008). Karena pada konsentrasi 80% terjadi penebalan membran luar sel sehingga diduga bakteri masih dapat tumbuh sehingga berpengaruh terhadap daya hambat yang dihasilkan.

Untuk mengetahui sifat antibakteri termasuk bakteristatik atau bakteriosidal maka inkubasi dilanjutkan sampai 24 jam (ditandai dengan adanya zona bening di daerah sekitar kertas cakram). Menurut Dwidjoseputro (1987), mengatakan bahwa besar kecilnya konsentrasi diameter hambatan di sekitar cakram tergantung dari konsentrasi obat. Pada konsentrasi 80% bersifat bakteriosidal, hal ini dikarenakan ekstrak kasar daun mengkudu mempunyai senyawa antibakteri yang dapat membunuh *Pseudomonas fluorescens*. Hal ini diketahui dari diameter daerah hambatan di sekitar kertas cakram yang tetap jernih (tidak ditumbuhi bakteri) setelah masa inkubasi 48 jam. Antibakterial ekstrak daun mengkudu ini diperoleh karena adanya kandungan flavonoid pada ekstrak kasar daun mengkudu ini. Menurut Chushnie dan Lamb (2005), mengatakan bahwa flavonoid dapat menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi sel.

Menurut Haryani *et al.*, (2012), Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol. Flavonoid dan flavonol disintesis tanaman untuk merespon infeksi mikroba. Mekanisme kerja senyawa flavonoid dalam mengganggu aktifitas

bakteri adalah dengan mendenaturasi protein sel bakteri dan merusak membran sitoplasma. Hal ini didukung dengan pernyataan (Doerge, 1972), bahwa fenol dapat juga berfungsi sebagai zat bakteriosidal. Kadar tinggi akan mengendapkan protein sedangkan kadar rendah akan mendenaturasi protein tanpa koagulasi sehingga bebas menembus jaringan. Daerah hambat (zona bening) yang ada di sekitar kertas cakram juga bisa disebabkan oleh beberapa faktor sehingga menyebabkan ekstrak daun mengkudu mampu menghambat bakteri *P. fluorescens*. Menurut Ardiansyah (2007), bahwa secara umum mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor yaitu gangguan pada senyawa penyusun dinding bakteri, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim, dan destruksi atau kerusakan fungsi material genetik. Selain itu menurut Hooper (2001), mengatakan bahwa dinding sel bakteri merupakan daerah yang sering dimanfaatkan oleh antimikroba untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Volk dan Wheeler (1993) menjelaskan bahwa senyawa flavonoid dapat merusak membran sitoplasma yang dapat menyebabkan bocornya metabolit penting dan menginaktifkan sistem enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino merembes keluar dan mencegah masuknya bahan-bahan aktif ke dalam sel, keadaan ini dapat menyebabkan kematian bakteri. Reaksi penguraian pada membran sitoplasma bakteri oleh flavon menurut Noviana (2004), ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Mekanisme Perusakan Membran Sitoplasma oleh Flavonoid

Pada gambar 8 di atas nampak perusakan membran sitoplasma, ion H⁺ dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipida akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk membran yang tersusun atas protein dan fosfolipid, bersifat permeable, berfungsi mengatur lewatnya substansi keluar-masuk sel, kerusakan membran mengakibatkan nukleotida dan enzim merembes keluar dan bahan-bahan yang dibutuhkan untuk kelangsungan hidupnya terhambat masuk. Akibatnya membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan dan bahkan kematian. Pada daun mengkudu yang mengandung bahan aktif berupa flavonoid akan menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* dengan cara merusak struktur dinding sel, selanjutnya setelah dinding sel rusak maka antibakteri ini akan mengubah permeabilitas (keluar masuknya bahan) membran, ketika membran mengalami kerusakan akan berakibat pada terhambat masuknya bahan-bahan untuk kelangsungan hidup bakteri. Kemudian flavonoid akan merusak sitoplasma yang menyebabkan terjadinya koagulasi (penggumpalan) komponen-komponen seluler yang vital.

Parameter penunjang dari penelitian ini adalah lama waktu perendaman kertas cakram pada perlakuan ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*)

dengan dosis yang berbeda. Selama penelitian kertas cakram direndam selama ± 15 menit. Lama perendaman tersebut dilakukan agar bahan aktif dalam ekstrak dapat meresap secara maksimal dan mencegah agar kertas cakram yang digunakan tidak rusak akibat terlalu lama direndam. Hasil penelitian yang telah dilakukan, lama perendaman kertas cakram memberikan pengaruh terhadap daya serap bahan aktif ke dalam kertas cakram. Hal ini sesuai dengan pernyataan Wiyanto (2010), menyatakan bahwa perendaman kertas cakram dilakukan selama 15 menit agar bahan aktif ekstrak yang digunakan dapat meresap ke dalam kertas cakram yang digunakan sehingga mampu menghambat bakteri pada saat perlakuan di dalam penelitian.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Mengkudu (*M. citrifolia*) terhadap Daya Hambat Bakteri *P. fluorescens* Secara *In Vitro*” diperoleh kesimpulan bahwa dengan dosis yang berbeda memberikan pengaruh terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Dosis optimum pada penelitian ini yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* adalah sebesar 60%.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan untuk menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* menggunakan dosis 60% dan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh ekstrak kasar daun mengkudu secara *In vivo* pada ikan air tawar yang terinfeksi bakteri *P. fluorescens*.

DAFTAR PUSTAKA

- Achmad, S.A. 1989. *Materi Pokok kimia Organik Bahan Alam*. Karumika. Jakarta. 169 hlm.
- Anonymous, 2012 .Bakteri Penyebab Penyakit Pada Ikan. <http://imi-jogja.blogspot.com/2012/11/bakteri-penyebab-penyakit-pada-ikan.html>. Diakses pada 20 Januari 2015.
- Anonymous. 2013. Draft Screening Assessment for *Pseudomonas fluorescens* ATCC 13525. Gouvernement du Canada: Canada. 48 hlm.
- Ardiansyah. 2007. Antimikroba dari Tumbuhan. www.beritaiptek.com. Diakses pada 14 Februari 2015.
- Ariyanti, N. K., I. B. G. Darmayasa, dan S. K. Sudirga. 2012. Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis* Miller) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. *Jurnal Biologi*. 16 (1): 1-4.
- Arwiyanto, T., Y.M.S. Maryudani, dan N. Azizah. 2007. Sifat-Sifat Fenotipik *Pseudomonas fluoresen*, Agensi Pengendalian Hayati Penyakit Lincat pada Tembakau Temanggung. *Biodiversitas* 8 (2).
- Ayu, W., A. Zaenal, dan Suhendi. 2008. Pemanfaatan Kombinasi Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia cattapa*) dan Bawang Putih (*Allium sativum*) Sebagai Antibiotik Alami Untuk Pencegahan dan Pengobatan Serangan *Aeromonas hydrophila* Pada Ikan Patin (*Pangasionodon hypophthalmus*). PKM. Institut Pertanian Bogor. 11 hlm.
- Bangun, A.P dan B. Sarwono. 2002. Khasiat dan Manfaat Mengkudu. Agromedia Pustaka. Jakarta. 87 hlm.
- Brockstael, K and Arthur, V.A. 2008. Antimicrobial Resistance In bacteria. Laboratory for Medicinal Chemistry. *J. Medicinal*. Universitas Leuven. Belgium. 4(2): 141-155.
- Brooks, G. F., J. S. Butel and S. A. Morse. 2005. *Medical Microbiology*. Mc Graw Hill, New York.
- Cahyono, B. 2001. Budidaya Ikan di Perairan Umum. Kanisius. Yogyakarta. 68 hlm.
- Cushnie, T. P. T. and A. J. Lamb. 2005. Review: Antimicrobial Activity Of Flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 26(1): 343-356.
- Doerge. 1972. *Medisinal untuk Farmakologi*. Penerbit Swadaya. Jakarta. 198 hlm.

Dowson, W. J. 1957. Plant Disease Due to Bacteria. Cambridge at the University Press: New York. 225 hlm.

Dwijoseputro. 1987. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Djambatan. Malang. 214 hlm.

Fauziah, R. 2011. Pengaruh Salinitas Terhadap Prevalensi Ektoparasit pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). Universitas Sumatera Utara. Medan. 23 Hlm.

Harborne, J.B. 1987. Metode Fitokimia: Penuntun Cara Modern Menganalisis Tumbuhan. Edisi ke-2. Penerjemah: Dr. Kosasih Padmawinata dan Iwang Soediro. Bandung. ITB.

Haryani, A., R, Grandiosa., I,D, Buwono dan A, Santika. 2012. Uji efektivitas daun pepaya (*Carica papaya*) untuk pengobatan infeksi bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan mas koki (*Carrasius auratus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. 3(3): 213-220. 18 hlm.

Hooper, D.C. 2001. Mechanisms of Action of Antimicrobials. *Clinical Infectious Diseases*. 1(32). 9-15.

Inglis, V., R. J Roberts and N. R. Bromage. 2001. Bacterial Diseases of Fish. Blackwell Science. London. 312 hlm.

Jatmikoningtyas, W. 2001. Uji efek anti bakteri dekokta daun jambu biji (*Psidium guava*) terhadap bakteri intestinal (*E. coli*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*) penyebab diare akut. Skripsi. Fakultas Kedokteran. Universitas Brawijaya Malang. Malang. 50 hlm.

Kartika, A. 2009. Teknik Eksplorasi dan Pengembangan Bakteri *Pseudomonas fluorescens*. 18 hlm.

Kordi, K. M. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. Rineka Cipta. Bina Adiaksara Jakarta. 190 hlm.

Lay, B.W. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 168 hlm.

Lesmana, D. S. 2003. Mencegah dan Menanggulangi Penyakit Ikan Hias. Penebar Swadaya. Jakarta. 80 hlm.

Mangoting, D., I. Irawan dan S. Abdullah. 2005. Tanaman Lalap Berkhasiat Obat. Penebar Swadaya. Jakarta. 85 hlm.

Mulyadi, R. 2009. Waspadai Hama Dan Penyakit Pada Ikan Mas. Swadaya. Jakarta 56-58 hlm.

Mulyono, D. 2001. Budidaya Ikan Betutu. Kanisius. Yogyakarta. 68 hlm.

Munandi, A. 2013. Manfaat Daun Mengkudu Untuk Burung dan Unggas Lainnya. <http://omkicau.com>. Diakses pada 22 April 2015.

- Noverita., D. Fitria., dan E. Sinaga. 2009. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri Jamur endofit dari daun dan rimpang *Zingiber ottensii* val. *Jurnal Farmasi Indonesia*. 4(4): 173-174.
- Noviana, L. 2004. Identifikasi Senyawa Flavonoid Dari Propolis Lebah Madu (*Apis mellifera*) dan Uji Aktivitasnya Sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus*. Skripsi. Fakultas Matematika dan IPA Universitas Brawijaya. Malang. 61 hlm.
- Nuraini, N.D. 2013. Aneka Daun Berkhasiat Untuk Obat. Gava Media. Yogyakarta. 258 hlm.
- Pelczar, M.J dan E.C.S. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi I. Universitas Indonesia. Jakarta. 443 hlm.
- Prajitno, A. 2005. Diktat Parasit dan Penyakit Ikan .Fakultas Perikanan.Universitas Brawijaya. Malang. 105 hlm.
- Pranata, T.S. 2013. Herbal Toga (Tanaman Obat Keluarga) Gaya Hidup Sehat Alami. Swadaya. Jakarta. 125 hlm.
- Qnoze, F. E. D. 2011. Hama Dan Penyakit Pada Ikan_ Ghalia Indonesia. Jakarta. 39 hlm.
- Rofi'l, F. 2009. Hubungan Antara Jumlah Total Bakteri dan Angka Katalase Terhadap Daya Tahan Susu. Fakultas Kedokteran Hewan. IPB. Bogor. Skripsi. 51 hlm.
- Rhodes, M.E. 1959. The Characterization of *Pseudomonas fluorescens*. Department of Microbiology. University of Reading. *Jurnal Gen. Microbiol.* 21, 221-268.
- Rukmana, R. 2002. *Mengkudu Budi Daya dan Prospek Agribisnis*. Kanisius. Yogyakarta. 87 hlm.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi. Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.
- Setyanto, A.E. 2005. Memperkenalkan Kembali Metode Eksperimen Dalam Kajian Komunikasi. *Jurnal Ilmu Komunikasi*. 3(1):37-48.
- Sommers, H. M. 1994. Dasar Biologis dan Klinis Penyakit Infeksi. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 594 hlm.
- Sitepu dan Josua. 2012. *Perbandingan Efektifitas Daya Hambat terhadap Staphylococcus Aureus dari Berbagai Jenis Ekstrak Buah Mengkudu (Morinda Citrifolia Liin) (In vitro)*, Skripsi, Universitas Sumatera Utara, Medan. 62 hlm.
- Suhermanto, A., Sri. H dan Maftuch. 2011. Pemberian Total Fenol Teripang Pasir (*Holothuria scabra*) untuk Meningkatkan Leukosit dan Differensial Leukosit Ikan Mas (*Cyprinus carpio*) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Kelautan*. Vol 4 (2): 49-56.

- Suprastyani, H. 1989. Dasar – Dasar Mempelajari Penyakit Bakterial Pada Ikan. Malang. 51 hlm.
- Surachmad, W. 1998. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar. Penerbit Tarsito. Bandung. 118 hlm.
- Tortora, G.J., B. R. Funke, C. L. Case. 2001. Microbiology an Introduction. An Imprint of Addison Wesley Longman: New York.
- Volk, W.A and M.F Wheeler. 1993. Mikrobiologi Dasar. Penerbit Erlangga. Jakarta. 396 hlm.
- Waha. 2001. Sehat dengan Mengkudu (*M. citrifolia*). MSF Group. Jakarta. 75 hlm.
- Waluyo, L. 2008. Teknik dan Metode Dasar Mikrobiologi. Cetakan Pertama. Malang: UMM Press. 85 hlm.
- Wiyanto,D,B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus Alvarezii* dan *Eucheuma Denticullatum* Terhadap Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Dan *Vibrio harveyii*. *Jurnal Kelautan*. 3(1): 1-17.
- Yuliarti, E. 2011. Tingkat Serangan Ektoparasit pada Ikan Patin (*Pangasius djamba*) pada Beberapa Pembudidaya Ikan di Kota Makassar. Skripsi . Universitas Hasanuddin. Makassar. 62 hlm.



LAMPIRAN

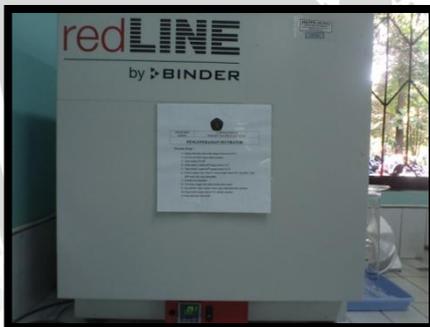
Lampiran 1. Foto Alat Penelitian



Kulkas



Autoklaf sterilisasi



Inkubator



Erlenmeyer

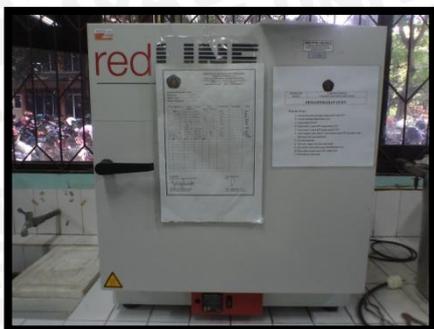


Laminar Air Flow (LAF)



Vortex

Lampiran 1. (Lanjutan)



Oven



Bunsen



Cawan Petri



Micropipet

Lampiran 2. Foto Kegiatan Penelitian



Pemotongan Daun Mengkudu



Penimbangan media PSA



Proses swap bakteri



Proses penuangan media PSA

Lampiran 3. Proses Ekstraksi Daun Mengkudu (*M.citrifolia*)



Disiapkan Daun



Daun dipotong



Daun dioven



Daun dimaserasi



Daun ditimbang



Daun dihaluskan



Dilakukan pemisahan pelarut dengan *Vaccum Rotary Evaporator*



Hasil

Lampiran 4. Penentuan Konsentrasi Ekstrak Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*)

Setelah bahan yang akan digunakan sudah siap kemudian dilakukan persiapan perendaman (maserasi) dimana serbuk daun mengkudu sebanyak 200 gr dimaserasi dalam etanol 96% dengan perbandingan 1 : 5 sebanyak 1 L selama 2 x 24 jam dan dilakukan dalam suhu kamar. Larutan yang sudah didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring kemudian diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak daun mengkudu sebanyak 18,17 gr, selanjutnya dilakukan pengukuran konsentrasi (%) untuk menentukan konsentrasi ekstrak kasar daun mengkudu (*M. citrifolia*) dan ditambahkan DMSO 10%.

➤ 20%

Ditimbang ekstrak kasar daun mengkudu sebesar 0,2 gram dan ditambahkan DMSO 10% sebesar 0,8ml dan menghasilkan 1ml ekstrak kasar daun mengkudu dengan konsentrasi 20%

➤ 40%

Ditimbang ekstrak kasar daun mengkudu sebesar 0,4 gram dan ditambahkan DMSO 10% sebesar 0,6ml dan menghasilkan 1ml ekstrak kasar daun mengkudu dengan konsentrasi 40%

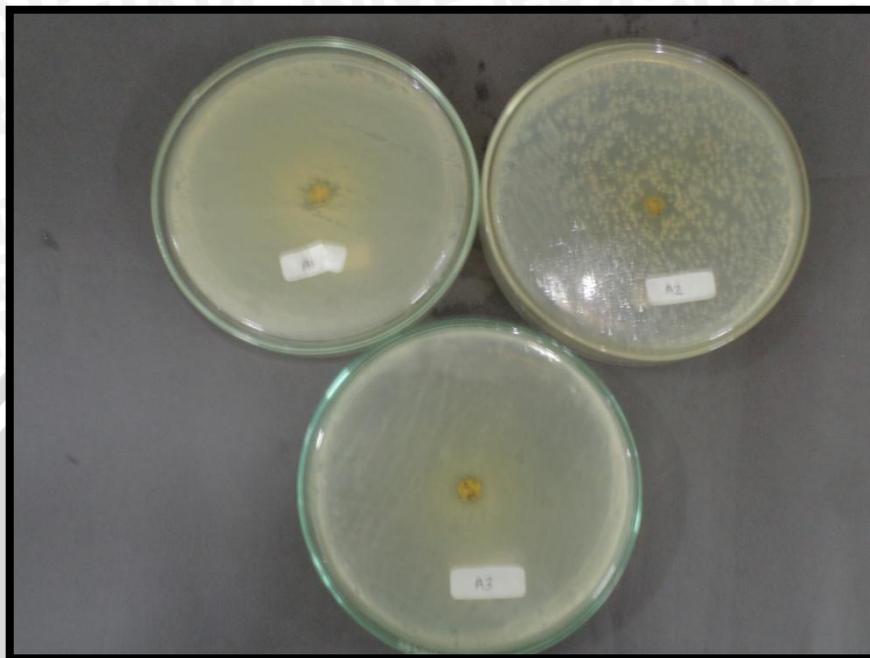
➤ 60%

Ditimbang ekstrak kasar daun mengkudu sebesar 0,6 gram dan ditambahkan DMSO 10% sebesar 0,4ml dan menghasilkan 1ml ekstrak kasar daun mengkudu dengan konsentrasi 60%

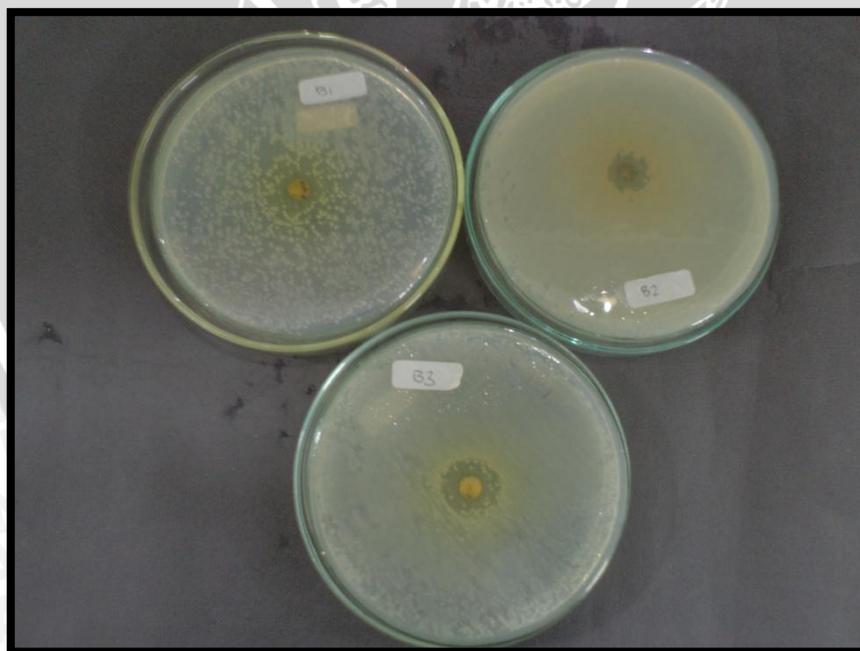
➤ 80%

Ditimbang ekstrak kasar daun mengkudu sebesar 0,8 gram dan ditambahkan DMSO 10% sebesar 0,2ml dan menghasilkan 1ml ekstrak kasar daun mengkudu dengan konsentrasi 80%

Lampiran 5. Hasil Uji Cakram Ekstrak Kasar Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*) Pada Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

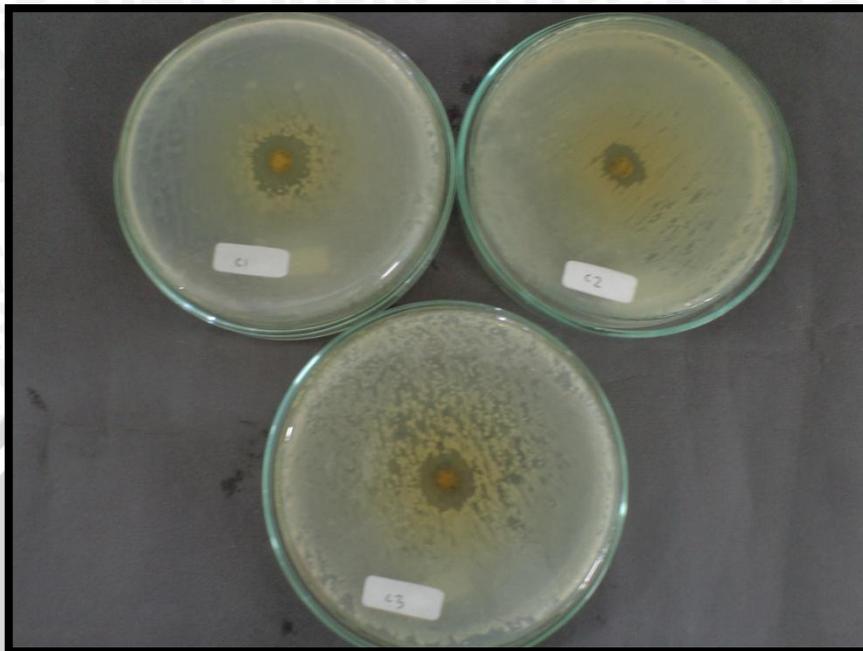


Perlakuan A = 20%

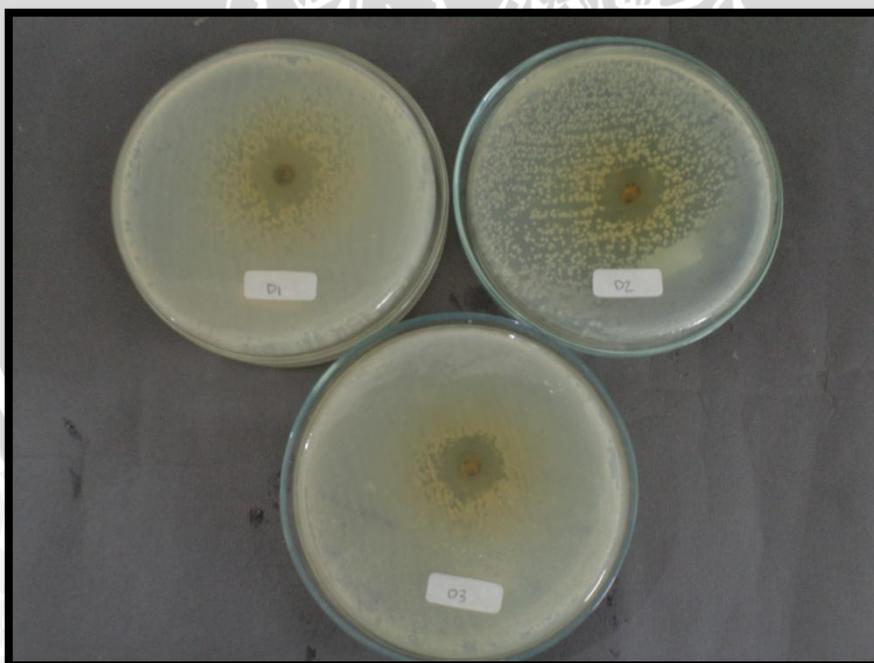


Perlakuan B = 40%

Lampiran 5. (Lanjutan)



Perlakuan C = 60%



Perlakuan D = 80%

Lampiran 6. Perhitungan Statistik Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Mengkudu (*M. citrifolia*)

➤ **Data Diameter Daya Hambat (mm) Bakteri *Pseudomonas fluorescens***

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata (mm)
	1	2	3		
A = 20%	9.4	10.4	7.45	27.25	9.08
B = 40%	11.15	13.2	14.15	38.5	12.83
C = 60%	17.1	15.3	16.35	48.75	16.25
D = 80%	14.1	16.4	14.25	44.75	14.92
Total				159.25	

➤ **Perhitungan**

FK	$\frac{159,25^2}{4 \times 3}$	2113.38
JK Total	$(A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + D3^2) - FK$	524.75
JK Perlakuan	$\frac{(\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2 + \sum D^2)}{3} - FK$	510.6
JK Acak	JK Total - JK Perlakuan	14.15
KT	JK/db	

➤ **Analisa Keragaman**

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	510.608	170.202	96.22**	4.07	7.59
Acak	8	14.15	1.768			
Total	11					

F 5% < F.hitung > F 1% = berbeda sangat nyata

Keterangan :

** : berbeda sangat nyata

➤ **Uji BNT**

SED	$\sqrt{\frac{2 \times \text{KT acak}}{3}}$	1,08
BNT 5%	t tabel 5 % (db acak) x SED	2,01
BNT 1 %	t tabel 1 % (db acak) x SED	3,1

Lampiran 6. (Lanjutan)

➤ Tabel Uji BNT

Perlakuan	Rerata	A	B	D	C	Notasi
		9.08	12.83	14.92	16.25	
A	9.08	—				a
B	12.83	3.75**	—			b
D	14.92	5.84**	2.09*	—		c
C	16.25	7.17**	3.42**	1.33 ^{ns}	—	d

➤ Uji polinomial orthogonal

Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)		
		Linier	Kuadratik	Kubik
A	27.25	-3	1	-1
B	38.5	-1	-1	3
C	48.75	1	-1	-3
D	44.75	3	1	1
Q= Σci*Ti		62.75	-15.25	-13.25
Hasil Kuadrat		20	4	20
Kr= (Σci^2)*r		60	12	60
JK=Q^2/Kr		65.62	19.38	2.92
JK Regresi		87.93		

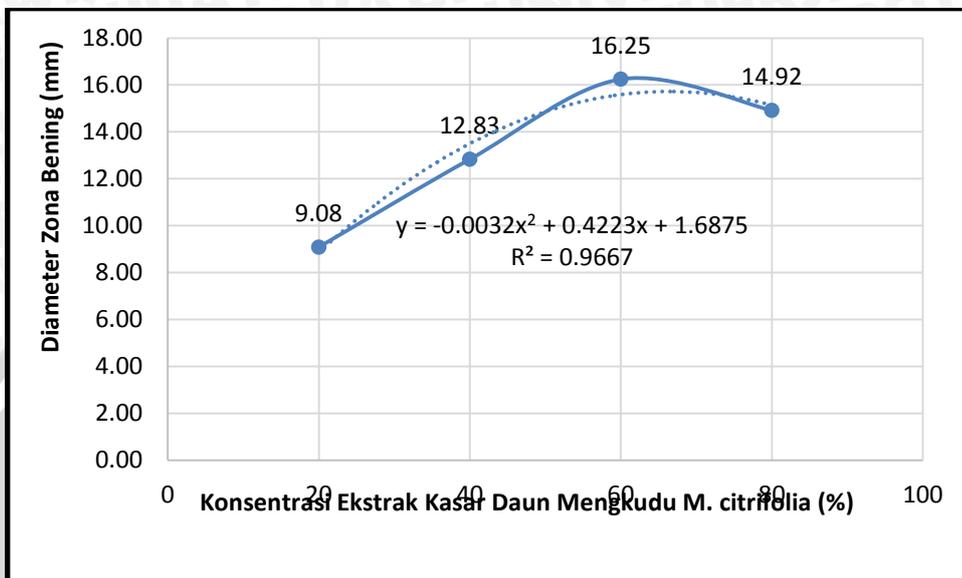
Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	87.93			4.07	7.59
Linier	1	65.62	65.62	37.103	**	
Kuadratik	1	19.38	19.38	10.957	**	
Kubik	1	2.92	2.92	1.654	ns	
Acak	8	14.15	1.768			
Total	11					

$$R^2 \text{ Linier} = \text{JK Linier} / (\text{JK Linier} + \text{JK Acak}) = 0.82262845$$

$$R^2 \text{ Kuadratik} = \text{JK Kuadratik} / (\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}) = 0.57799248$$

$$R^2 \text{ Kubik} = \text{JK Kubik} / (\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}) = 0.17135363$$

Nilai regresi linier lebih besar dari nilai regresi kuadratik dan nilai regresi kuadratik lebih besar daripada regresi kubik, sehingga grafik yang dibuat adalah grafik kuadratik.



x	y
20	9.08
40	12.83
60	16.25
80	14.92

Keterangan:

X = Konsentrasi Ekstrak (%)

Y = Zona Bening (mm)