

repository.ub.ac.id

**UJI ANTIBAKTERI DAN BIOFILM EKSTRAK KASAR *Ludwigia adscendens*  
L. H Hara, *Eclipta prostrata* (L) L, dan *Epithema benthamii* C. B. Clarke  
TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

**SKRIPSI**

Oleh :

**MALLA RESILIA AMBARIANI**

**NIM. 155080500111003**



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



repository.ub.ac.id

**UJI ANTIBAKTERI DAN BIOFILM EKSTRAK KASAR *Ludwigia adscendens*  
L. H Hara, *Eclipta prostrata* (L) L, dan *Epithema benthamii* C. B. Clarke  
TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila***

**SKRIPSI**

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

Oleh :

**MALLA RESILIA AMBARIANI  
NIM. 155080500111003**



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

SKRIPSI

UJI ANTIBAKTERI DAN BIOFILM EKSTRAK KASAR *Ludwigia adscendens*  
L. H Hara, *Eclipta prostrata* (L) L, dan *Epithema benthamii* C. B. Clarke  
TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila*

Oleh :  
MALLA RESILIA AMBARIANI  
NIM. 155080500111003

Telah Dipertahankan Didepan Penguji  
Pada Tanggal 20 Juni 2019  
Dan Dinyatakan Telah Memenuhi Syarat

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I



(Dr. Ir. M. Fadjar, M. Sc)  
NIP. 19621014 198701 1 001  
TANGGAL : 01 JUL 2019

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing II



(Dr. Hesty Novita, S.Pi. M.Si)  
NIP. 19750924 200312 2 001  
TANGGAL : 01 JUL 2019

Mengetahui,  
Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perairan



(Dr. Ir. M. Firdaus, MP)  
NIP. 19680918 200501 1 001  
TANGGAL : 01 JUL 2019

**LEMBAR IDENTITAS TIM PENGUJI**

Judul : **UJI ANTIBAKTERI DAN BIOFILM EKSTRAK KASAR**  
***Ludwigia adscendens* L. H Hara, *Eclipta prostrata* (L) L, dan**  
***Epithema benthamii* C. B. Clarke TERHADAP BAKTERI**  
***Aeromonas hydrophila***

Nama Mahasiswa : Malla Resilia Ambariani

NIM : 155080500111003

Program Studi : Budidaya Perairan

**PENGUJI PEMBIMBING:**

Pembimbing 1 : Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc

Pembimbing 2 : Dr. Hesy Novita, S.Pi, M.Si

**PENGUJI BUKAN PEMBIMBING:**

Dosen Penguji 1 : Wahyu Endra Kusuma, S.Pi., MP., D.Sc

Dosen Penguji 2 : Nasrullah Bai Arifin, S.Pi., M.Sc

Tanggal Ujian : Kamis, 20 Juni 2019

## UCAPAN TERIMA KASIH

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

1. Allah SWT karena hanya atas karunia-Nya saya dapat melaksanakan penelitian skripsi dan menyusun laporan skripsi ini dengan lancar.
2. Kedua orang tua tercinta (Bpk. Kukuh Pamuji dan Ibu Asih Widati), yang selalu memberikan doa, cinta dan kasih sayang, semangat yang kuat dan kerja kerasnya yang menjadi motivasi saya dalam menjalani hidup ini.
3. Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc dan Dr. Hessy Novita, S.Pi, M.Si selaku dosen pembimbing Skripsi yang telah memberikan bimbingan dan arahan.
4. Ibu DR. Media Fitri Isma Nugraha SP., M.Si dari Balai Riset Budidaya Ikan Hias (BRBIH) Depok, Jawa Barat selaku ketua proyek INSINAS tahun 2019, penyandang dana dalam penelitian dan sebagai pembimbing lapang.
5. Bapak Nur Hidayat S.Pi, M.Si selaku Kepala Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (BRPBATPP), Sempur, Bogor yang telah memberikan izin kepada penulis untuk melaksanakan penelitian Skripsi.
6. Ibu Dr. Desy Sugiani. S.Pi, M.Si selaku Kepala Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I) Depok yang telah memberikan kesempatan untuk melaksanakan penelitian Skripsi.
7. Bu Tuti, Bu Nuna, Bu Fida, Bu Yani dan Bu Lila selaku peneliti di IR2PI Depok, Jawa Barat.

8. Pak Wahyu, Pak Setiadi, Pak Edy, Pak Johan selaku teknisi serta jajaran staff IRP2I yang turut membantu pelaksanaan penelitian Skripsi.
9. Teman-teman seperjuangan Skripsi di IRP2I yaitu Dhea dan Rita juga tidak lupa temen-temen AQUALATTE 2015 FPIK Universitas Brawijaya.

Malang, April 2019

Penulis



## RINGKASAN

**MALLA RESILIA AMBARIANI.** UJI ANTIBAKTERI DAN BIOFILM EKSTRAK KASAR *Ludwigia adscendens* L. H Hara, *Eclipta prostrata* (L) L, dan *Epithema benthamii* C. B. Clarke TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila*.  
(dibawah bimbingan **Dr. Ir. M. Fadjar, M. Sc** dan **Dr. Hesy Novita, S.Pi, M.Si**)

---

Salah satu kendala yang ditemukan dalam budidaya ikan adalah adanya serangan penyakit *Motil Aeromonas Septicemia* yang disebabkan oleh bakteri *A. hydrophila*. Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri patogen utama pada budidaya ikan khususnya ikan air tawar. Cara yang sering digunakan oleh para pembudidaya untuk menanggulangi penyakit bakteri patogen adalah dengan penggunaan antibiotik. Namun dengan penggunaan antibiotik dapat menyebabkan pencemaran lingkungan, resistensi dan menimbulkan residu. Ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan diketahui memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri. Sehingga ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan dapat digunakan sebagai bahan alami untuk menghambat dan membunuh pertumbuhan sel bakteri *A. hydrophila*.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan rancangan percobaan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang menggunakan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan. Konsentrasi dari ekstrak kasar *L. adscendens* yang digunakan pada penelitian ini yaitu A (3 mg/ml), B (6 mg/ml), C (9 mg/ml), dan D (12 mg/ml). Sedangkan untuk *E. Prostrata* konsentrasi yang digunakan yaitu A (1 mg/ml), B (4 mg/ml), C (7 mg/ml) dan D (10 mg/ml). Parameter dalam penelitian ini yaitu kerusakan biofilm ekstrak kasar tanaman air terhadap *A. hydrophila*. Data tersebut diolah menggunakan analisis keberagaman dengan selang kepercayaan 95% atau uji F (ANOVA).

Berdasarkan hasil penelitian didapatkan rerata nilai *Optical Density* ekstrak kasar *L. adscendens* yaitu perlakuan A (3 mg/ml) sebesar 0,304 , perlakuan B (6 mg/ml) sebesar 0,277, perlakuan C (9 mg/ml) sebesar 0,260 dan perlakuan D (3 mg/ml) sebesar 0,126. Pada tanaman *E. prostrata* yaitu perlakuan A (1 mg/ml) sebesar 0,352 , perlakuan B (4 mg/ml) sebesar 0,313, perlakuan C (7 mg/ml) sebesar 0,282 dan perlakuan D (10 mg/ml) sebesar 0,243. Pada uji penghambatan biofilm *L. adscendens* diperoleh persamaan linier  $y = 0,3802 - 0,0184x$  dengan nilai  $R^2 = 0,884$ , sedangkan pada uji penghambatan biofilm *E. prostrata* diperoleh persamaan linier  $y = 0,364 - 0,012x$  dengan  $R^2 = 0,9591$ .

Kesimpulan yang didapatkan pada penelitian ini adalah ekstrak tanaman air dari Sulawesi Selatan berpengaruh terhadap *A. hydrophila*. Perlakuan terbaik ekstrak tanaman *L. adscendens* yaitu perlakuan D (12 mg/ml) dengan nilai % inhibisi sebesar 64 % dan ekstrak tanaman *E. prostrata* yaitu perlakuan D (10 mg/ml) dengan nilai % inhibisi sebesar 36 %. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak tanaman maka semakin rendah nilai *Optical Density* dan semakin tinggi nilai % inhibisi. Tanaman air yang paling efektif untuk menghambat pertumbuhan dan biofilm *A. hydrophila* adalah *E. prostrata* karena pada konsentrasi 10 mg/ml sudah menghambat biofilm sebesar 36%.

## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah Yang Maha Esa atas berkah, karunia serta ridho-Nya penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan judul: “Uji Antibakteri dan Biofilm Ekstrak Kasar *Ludwigia adscendens* L. H Hara, *Eclipta prostrata* (L) L, dan *Epithema benthamii* C. B. Clarke Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*”. Skripsi ini melaporkan pengaruh konsentrasi yang berbeda pada tanaman air sebagai media alternatif untuk menghambat pertumbuhan dan pembentukan biofilm bakteri *A. hydrophila*. Laporan ini sebagai syarat untuk meraih gelar sarjana perikanan di Fakultas perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang. Di bawah bimbingan:

1. Dr. Ir. M. Fadjar, M. Sc
2. Dr. Hesy Novita, S.Pi, M.Si

Penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembaca demi kebaikan dan untuk penyempurnaan laporan selanjutnya, agar tulisan ini dapat bermanfaat bagi kita semua. Demikian penulis sampaikan terimakasih.

Malang, April 2018

Penulis

## DAFTAR ISI

<b>RINGKASAN</b> .....	<b>vii</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>ix</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>xii</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang .....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Hipotesa .....	4
1.5 Waktu dan Tempat .....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi <i>A. hydrophila</i> .....	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran <i>A. hydrophila</i> .....	6
2.1.3 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan.....	7
2.1.4 Infeksi <i>A. hydrophila</i> pada Ikan.....	7
2.2 <i>Ludwigia adscendens</i> L.H. Hara .....	9
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	9
2.2.2 Bahan Aktif .....	10
2.3 <i>Eclipta prostrata</i> (L.) L .....	11
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	11
2.3.2 Bahan Aktif .....	12
2.4 <i>Epithema benthamii</i> C.B. Clarke.....	12
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	12
2.4.2 Bahan Aktif .....	13
2.5 Bahan Aktif Tanaman Air Sebagai Antibakteri .....	14
2.6 Mekanisme Kerja Antibakteri .....	15
2.7 Uji Antibakteri .....	15
2.8 Uji MIC ( <i>Minimum Inhibition Concentration</i> ).....	16
2.9 Uji MBC ( <i>Minimum Bacterisidal Concentration</i> ) .....	17
2.10 Mekanisme Kerusakan Biofilm dengan Senyawa Antibakteri.....	18
2.10.1 Definisi Biofilm .....	18
2.10.2 Mekanisme Biofilm.....	19
<b>3 METODE PENELITIAN</b> .....	<b>21</b>
3.1 Materi Penelitian .....	21
3.1.1 Alat Penelitian .....	21
3.1.2 Bahan Penelitian .....	22
3.2 Metode Penelitian.....	23
3.3 Pengambilan Data .....	23
4 Rancangan Penelitian.....	24

3.5	Prosedur Penelitian .....	26
3.5.1	Sterilisasi Alat dan Bahan .....	26
3.5.2	Ekstrak Tanaman Air .....	26
3.5.3	Pembuatan Media .....	27
3.5.4	Pembiakan Bakteri <i>A. hydrophila</i> .....	31
3.5.5	TPC ( <i>Total Plate Count</i> ) .....	32
3.6	Pelaksanaan Penelitian .....	32
3.6.1	Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Kasar Tanaman Air .....	32
3.6.2	Uji Antibakteri .....	33
3.6.3	Uji MIC ( <i>Minimum Inhibition Concentration</i> ) .....	35
3.6.4	Uji MBC ( <i>Minimum Bacterisidal Concentration</i> ) .....	36
3.6.5	Uji Biofilm .....	36
3.7	Parameter Uji .....	40
3.7.1	Parameter Utama .....	40
3.7.2	Parameter Penunjang .....	40
3.8	Analisis Data .....	41
<b>4.</b>	<b>HASIL DAN PEMBAHASAN .....</b>	<b>42</b>
4.1	Ekstraksi Tanaman Air .....	42
4.2	Uji Antibakteri .....	43
4.2	Uji MIC ( <i>Minimum Inhibition Concentration</i> ) .....	47
4.3	Uji MBC ( <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> ) .....	50
4.4	Uji Biofilm .....	52
4.5	Persentase Inhibisi .....	56
4.6	Uji Visualisasi 3 Dimensi (3D) .....	59
<b>5.</b>	<b>PENUTUP .....</b>	<b>64</b>
5.1	Kesimpulan .....	64
5.2	Saran .....	64
	<b>DAFTAR PUSTAKA .....</b>	<b>65</b>
	<b>LAMPIRAN .....</b>	<b>71</b>

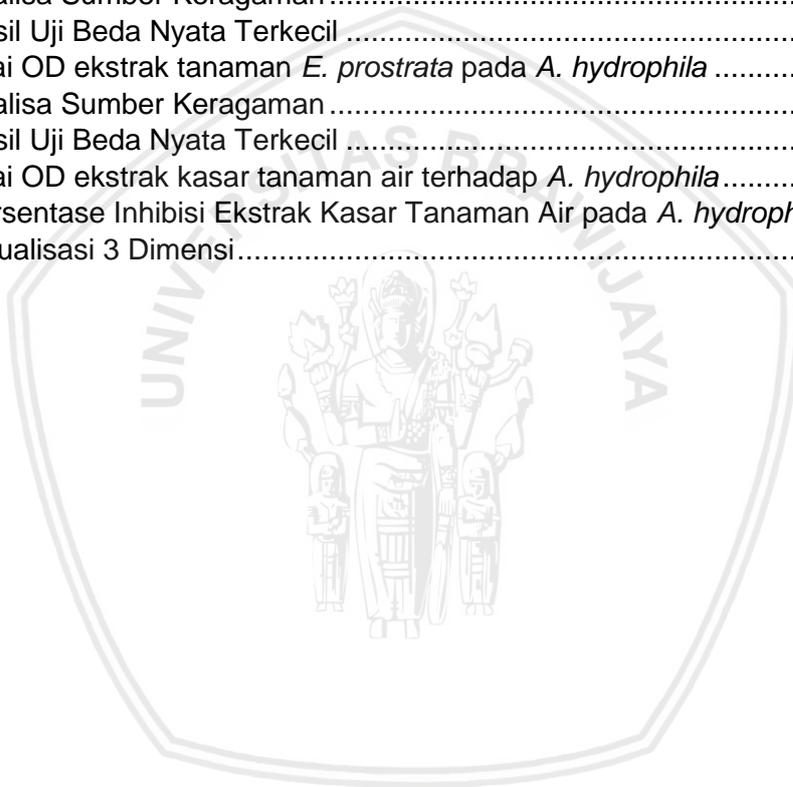
## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>A. hydrophila</i> dengan perbesaran 5000x.....	6
2. Borok pada ikan yang terserang <i>A. hydrophila</i> .....	8
3. <i>Ludwigia adscendens</i> L. H. Hara. ....	10
4. <i>Eclipta prostrata</i> (L.) L.....	11
5. <i>Epithema benthamii</i> .....	13
6. Mekanisme Pembentukan Biofilm .....	19
7. Denah Penelitian .....	25
8. Ekstrak Kasar Tanaman Air .....	43
9. Zona Hambat (A) <i>L. adscendens</i> ; (B) <i>E. prostrata</i> (C) <i>E. benthamii</i> .....	46
10. Hasil Uji MIC .....	48
11. Hasil Uji MBC (A) <i>L. adscendens</i> ; (B) <i>E. prostrata</i> .....	51
12. Hubungan antara konsentrasi dan <i>Optical Density</i> .....	54
13. Hubungan antara konsentrasi dan <i>Optical Density</i> .....	56



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Peralatan Penelitian.....	21
2. Bahan Penelitian .....	22
3. Nama Tanaman Air.....	24
4. Hasil Rendemen .....	42
5. Hasil Pengukuran Zona Hambat.....	44
6. Klasifikasi baku respon hambat pertumbuhan bakteri .....	44
7. Hasil Uji MIC Ekstrak Kasar Tanaman Air.....	48
8. Hasil OD ekstrak tanaman <i>L. adscendens</i> pada <i>A. hydrophila</i> .....	52
9. Analisa Sumber Keragaman .....	53
10. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil .....	53
11. Nilai OD ekstrak tanaman <i>E. prostrata</i> pada <i>A. hydrophila</i> .....	54
12. Analisa Sumber Keragaman .....	55
13. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil .....	55
14. Nilai OD ekstrak kasar tanaman air terhadap <i>A. hydrophila</i> .....	57
15. Persentase Inhibisi Ekstrak Kasar Tanaman Air pada <i>A. hydrophila</i> (%) ..	57
16. Visualisasi 3 Dimensi.....	59



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat Penelitian .....	71
2. Bahan Penelitian .....	76
3. Hasil Perhitungan Rendemen Ekstrak Kasar Tanaman Air .....	80
4. Pembuatan Larutan Ekstrak Kasar Tanaman Air.....	81
5. Perhitungan Data Hasil Penelitian .....	84
6. Perhitungan Persentase Inhibisi Biofilm .....	93
7. Dokumentasi Penelitian.....	98



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Penyakit merupakan salah satu kendala yang menimbulkan masalah kerugian dalam suatu usaha budidaya perairan. Penyakit infeksi dapat diakibatkan oleh parasit, virus, bakteri dan jamur. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan penyakit yang umum dijumpai di dalam usaha budidaya perikanan yang dapat menyebabkan kerugian didalam area pembudidayaan dan mampu berpindah apabila terjadi salah penanganan. Sebagai negara tropis, Indonesia yang memiliki iklim sangat mendukung berkembangnya penyakit. Ditambah lagi dengan tingginya mobilitas ikan dari central produksi yang satu ke central produksi lainnya mempercepat arus penyebaran penyakit pada ikan (Sarjito, *et al.*, 2013). Penyakit bakterial salah satunya disebabkan oleh bakteri *Aeromonas hydrophilla*. *A. hydrophilla* merupakan bakteri patogen penyebab penyakit *Motil Aeromonas Septicemia* (MAS), terutama untuk spesies ikan air tawar di perairan tropis (Rahmaningsih, 2018).

Penanggulangan penyakit dapat dilakukan dengan cara pencegahan dan pengobatan. Pencegahan penyakit pada ikan biasanya dilakukan dengan cara menciptakan lingkungan yang baik dan pemberian pakan yang bernilai gizi baik. Pengobatan yang dilakukan pada saat ikan terserang penyakit, biasanya diberikan pengobatan secara kimia dan antibiotik. Akan tetapi penggunaan bahan kimia dan antibiotik mempunyai dampak lingkungan yang kurang baik karena bisa mencemari lingkungan, meninggalkan residu serta menimbulkan resistensi pada bakteri patogen. Salah satu cara yang digunakan untuk melakukan pengobatan adalah pemberian pengobatan yang alami berasal dari tanaman herbal (Wiyanto, 2010).

Indonesia merupakan negara tropis yang memiliki kekayaan beragam jenis tanaman yang berpotensi sebagai obat. Penggunaan tanaman sebagai obat memiliki beberapa keuntungan yaitu bahan alami pengganti antibiotik, ramah terhadap lingkungan, tidak menyebabkan resistensi pada ikan, mudah diperoleh dan harganya ekonomis (Sudarno, *et al.*, 2011).

Sumber antibakteri baru dapat diperoleh dari senyawa bioaktif yang terkandung dalam suatu tanaman. Beberapa jenis tanaman diketahui memiliki senyawa aktif yang berfungsi sebagai anti bakteri, anti parasit dan anti jamur (Siregar, *et al.*, 2012). Senyawa bioaktif merupakan metabolit sekunder yang dihasilkan tumbuhan melalui serangkaian reaksi metabolisme sekunder. Metabolit sekunder disintesis terutama dari metabolit-metabolit primer seperti asam amino, asetil Co-A dan asam mevalonat. Tumbuhan yang berpotensi sebagai tumbuhan obat memiliki kandungan senyawa bioaktif seperti alkaloid, terpenoid, fenolik, steroid, dan flavonoid dengan jumlah yang sangat bervariasi (Prabowo, *et al.*, 2014).

Tumbuhan *L. adscendens* atau krangkong memiliki senyawa bioaktif yaitu pada bagian daun dan batangnya mengandung senyawa alkaloid, fenol, flavonoid, tanin, terpenoid, dan triterpenoid (Ahmed, *et al.*, 2005). Kandungan senyawa bioaktif tumbuhan *E. prostrata* atau urang-aring antara lain golongan flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, sterol dan terpenoid (Siahaan, 2012). Sedangkan kandungan bioktif *E benthamii* yaitu flavonoid. Flavonoid adalah kelompok fenolik bioaktif yang tersebar luas pada tanaman (Trivellini, *et al.*, 2016).

Antibakteri merupakan zat yang berfungsi membunuh atau menekan pertumbuhan dan reproduksi bakterinya. Berdasarkan aktivitas zat antibakteri dapat bersifat bakterisidal (membunuh bakteri), bakteriostatik (menghambat

pertumbuhan bakteri) atau menghambat germinasi spora bakteri (Sartika, *et al.*, 2013).

Faktor virulensi bakteri salah satunya adalah dengan pembentukan biofilm. Biofilm merupakan suatu kompleks agregasi mikroorganisme yang tumbuh diatas suatu substrat. Bagian terluar biofilm biasanya akan teroksidasi dengan baik daripada bagian dalam yang bersifat anaerobik. Bakteri membelah diri diatas tepi biofilm dan dapat terlepas dari biofilm. Ini menunjukkan bahwa aktivitas metabolisme bakteri lebih tinggi di luar karena lebih banyak nutrisi (dekat atau kontak dengan aliran cairan), tetapi jumlahnya cukup sedikit. Sebaliknya mayoritas bakteri pada biofilm ditemukan pada bagian dalam (Fatmawati, 2011).

Berdasarkan uraian diatas, pengobatan alamiah merupakan salah satu langkah yang dapat dilakukan untuk mengurangi penggunaan bahan kimia dan antibiotik yang dapat mencemari lingkungan perairan. Oleh karena itu, diperlukan suatu bahan alami sebagai pengganti antibiotik yang lebih aman bagi lingkungan perairan yaitu dengan menggunakan ekstrak tanaman air yang mengandung senyawa antibakteri.

## 1.2 Rumusan Masalah

Rumusan Masalah dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kasar *L. adscendens* L. H Hara, *E. prostrata* (L) L, dan *E. benthamii* C. B. Clarke terhadap aktivitas antibakteri dan biofilm *A. hydrophila*?
- Berapa konsentrasi pemberian ekstrak kasar *L. adscendens* L. H Hara, *E. prostrata* (L) L, dan *E. benthamii* C. B. Clarke yang paling efektif dalam menghambat biofilm bakteri *A. hydrophila*?

## 1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

- Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar *L. adscendens* L. H Hara, *E. prostrata* (L) L, dan *E. benthamii* C. B. Clarke terhadap aktivitas antibakteri dan biofilm pada bakteri *A. hydrophila*.
- Untuk mengetahui konsentrasi pemberian ekstrak kasar *L. adscendens* L. H Hara, *E. prostrata* (L) L, dan *E. benthamii* C. B. Clarke yang paling efektif dalam menghambat biofilm *A. hydrophila*.

#### 1.4 Hipotesa

Hipotesa dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

H0 : Diduga pemberian ekstrak kasar *L. adscendens* L. H Hara, *E. prostrata* (L) L, dan *E. benthamii* C. B. Clarke dengan konsentrasi yang berbeda tidak berpengaruh terhadap penghambatan dan biofilm bakteri *A. hydrophila*.

H1 : Diduga pemberian ekstrak kasar tanaman air *L. adscendens* L. H Hara, *E. prostrata* (L) L, dan *E. benthamii* C. B. Clarke dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh terhadap penghambatan dan biofilm bakteri *A. hydrophila*.

#### 1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilakukan di Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (BRPBATPP), Bogor dan Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I) Depok, Jawa Barat pada tanggal 16 Januari 2019 – 24 April 2019.

## 2. TINJAUAN PUSTAKA

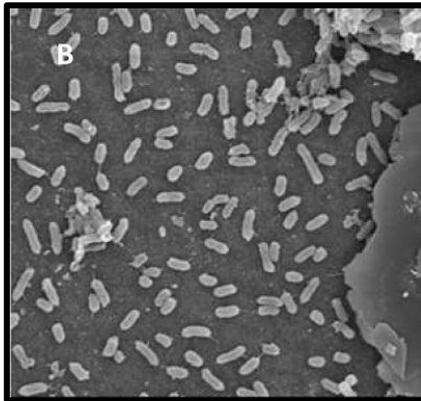
### 2.1 Bakteri *A. hydrophila*

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi *A. hydrophila*

Klasifikasi bakteri *A. hydrophila* adalah sebagai berikut ini (Murwani, *et al.*, 2017) :

Domain	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Aeromonadales
Family	: Aeromonadaceae
Genus	: Aeromonas
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>

*A. hydrophila* merupakan bakteri yang memiliki sifat oksidatif dan anaerobik fakultatif, sehingga dapat hidup di lingkungan perairan dengan atau tanpa oksigen. Bakteri ini tidak memiliki kemampuan untuk membentuk spora. *A. hydrophila* dapat dijumpai di lingkungan payau, air tawar, atau lautan dan termasuk bakteri yang memiliki kemampuan untuk bergerak (motil). Bakteri ini berbentuk batang dan memiliki diameter sel berkisar 0,3-1  $\mu\text{m}$  (Gambar 1). Bakteri ini memiliki alat gerak berupa flagel dan memiliki suhu optimum pertumbuhan 28°C, tetapi masih mampu bertahan hidup pada suhu (4°C dan 37°C). Bakteri *Aeromonas* menyukai lingkungan yang tercemar bahan organik, terutama di musim hujan. Kualitas air yang kurang baik atau perbedaan suhu siang dan malam hari juga berperan dalam munculnya bakteri ini (Afrianto, *et al.*, 2015).



**Gambar 1.** *A. hydrophila* dengan perbesaran 5000x (Castro, *et al.*, 2014)

### 2.1.2 Habitat dan Penyebaran *A. hydrophila*

*A. hydrophila* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang yang banyak ditemukan di danau dan lingkungan akuatik lainnya. *A. hydrophila* dikenal sebagai bakteri yang menginfeksi ikan, amfibi dan reptil. Jenis ikan yang terinfeksi *A. hydrophila* yaitu ikan lele, ikan mas, ikan patin, dan ikan nila. Serangan bakteri *A. hydrophila* biasanya muncul pada musim kemarau karena pada saat tersebut kandungan bahan organik di perairan relatif tinggi. Bakteri *A. hydrophila* berperan dalam penguraian bahan organik sehingga sering ditemukan di perairan yang subur. Kandungan oksigen yang rendah, suhu yang tinggi, akumulasi bahan organik atau sisa metabolisme ikan dan padat tebar ikan yang tinggi sangat menunjang perkembangbiakan bakteri ini (Ho, *et al.*, 1990).

*A. hydrophila* merupakan mikroorganisme akuatik yang berada di perairan laut maupun perairan tawar, bakteri tersebut menjadi patogen dan bersifat patogen oportunistik pada penyakit *hemoragic septicemia* (penyakit bercak merah) pada ikan yang dalam kondisi stres. *A. hydrophila* merupakan bakteri yang mampu memanfaatkan karbohidrat pada kondisi anaerob melalui proses fermentasi. *A. hydrophila* dapat tumbuh dalam air maupun sedimen, tetapi tidak dapat berkembang biak dan bersifat obligat. (Anggraini, *et al.*, 2016).

### 2.1.3 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Bakteri *A. hydrophila* merupakan bakteri fakultatif anaerob, yaitu bakteri yang dapat berkembang dalam keadaan dengan atau tanpa oksigen, meskipun perkembangannya lebih cepat pada lingkungan yang ada oksigen. Bakteri fakultatif anaerob akan tersebar di seluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair, bersifat heterotrofik, yaitu mampu mengoksidasi bermacam-macam persenyawaan organik sebagai sumber karbon. Pertumbuhan maksimal bakteri pada kisaran suhu 28°C - 41°C, sedang pertumbuhan minimum bakteri pada suhu 0°C - 5°C. Bakteri akan tumbuh dengan baik pada pH 5,5 – 9,0 (Prajitno, 2005). Bakteri *A. hydrophila* berkembangbiak secara seksual, yaitu berkembangbiak dengan memanjangkan sel yang diikuti dengan pembelahan inti yang disebut pembelahan biner. Waktu yang diperlukan untuk pembelahan satu sel menjadi dua sel kurang lebih 10 menit (Quddus, 2014).

Proses invasi bakteri patogen *A. hydrophila* kedalam tubuh inang adalah diawali dengan melekatnya bakteri pada permukaan kulit dengan memanfaatkan pili, flagela dan kait untuk bergerak dan melekat kuat pada lapisan terluar tubuh ikan yaitu sisik yang dilindungi oleh zat kitin. Selama proses berlangsung bakteri *A. hydrophila* memproduksi enzim kitinase yang berperan dalam mendegradasi lapisan kitin sehingga bakteri dapat dengan mudah masuk kedalam host (Rahmaningsih, 2018).

### 2.1.4 Infeksi *A. hydrophila* pada Ikan

Gejala yang terlihat pada ikan yang terinfeksi bakteri *A. hydrophila* ini bervariasi, tetapi pada umumnya ditandai adanya hemoragik pada kulit, insang, rongga mulut dan borok pada kulit (Gambar 2). Penyebaran dapat terjadi secara horizontal lewat kontak langsung dengan air. Infeksi oleh bakteri *A. hydrophila* terjadi melalui permukaan badan yang luka, saluran pencernaan makanan atau

melalui insang. Ketika *A. hydrophila* masuk kedalam tubuh, maka target infeksi adalah pembuluh darah. Saat masuk kedalam saluran darah, *A. hydrophila* menghasilkan enzim hemolisin yang merupakan salah satu eksotoksin. Hemolisin ini memiliki kemampuan untuk melisis sel darah merah, sehingga jumlah sel darah merah pada pembuluh darah cenderung berkurang. (Ziyadaturrohmah, *et al.*, 2013).

Kemerahan kulit atau hiperemi dimana merupakan tanda klinis yang pertama kali timbul setelah penginfeksi, *A. hydrophila* dapat mengenali dan berikatan dengan sel reseptor pada se-sel tertentu dan mengurai sel inang dengan memproduksi enzim-enzim ekstraseluler seperti hemolisin, protease dan elastase sehingga menyebabkan inflamasi, peradangan dan berkembang menjadi borok. Hiperemi merupakan respon awal terhadap infeksi mikrobial, kemudian diikuti dengan terjadinya peradangan, nekrosis dan terbentuknya tukak. Hiperemi ini terjadi karena mobilitas eritrosit ke jaringan tempat berkembangnya patogen, leukosit merupakan salah satu komponen sel darah yang berfungsi sebagai pertahanan non spesifik akan melokalisasi dan mengeliminasi patogen. Eliminasi ini dilakukan melalui proses fagositosis (Lukistyowati dan Kurniasih, 2011).



**Gambar 2.** Borok pada ikan yang terserang *A. hydrophila* (Afrianto, *et al.*, 2015).

## 2.2 *Ludwigia adscendens* L.H. Hara

### 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut India Biodiversity Portal (2019), klasifikasi *L. adscendens* L. H.

Hara yaitu sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Sub kingdom	: Tracheophyta
Division	: Magnoliophyta
Class	: Magnoliopsida
Order	: Myrtales
Familia	: Onagraceae
Genus	: Ludwigia
Species	: <i>Ludwigia adscendens</i>
Nama lokal	: Krangkong

*L. adscendens* merupakan tumbuhan herbal, dengan batang merayap atau mengambang, berwarna putih, tegak, pendek dengan panjang 1-3 cm. Batang mengambang sampai 400 cm, ujung terestrial dengan panjang 20–60 cm, banyak bercabang, ujung tegak keatas, kasar dan sangat padat. Tangkai daun 5-20 mm; helai daun lonjong hingga 0,4-7 × 0,7–3 cm, tebal, vena lateral 6–13 per sisi. Kelopak berwarna putih krem dengan dasar kuning dengan panjang 9–18 × 6–10 mm. Benang sari terdapat 10, filamen putih dengan panjang 2,5–4 mm; kepala sari dengan panjang 0,7–1,8 mm. Kelopak berwarna coklat muda, silinder, dengan panjang 1,2–2,7 cm, berdiameter 3-4 mm, berdinding tebal dan tidak teratur. Biji berwarna pucat coklat, lonjong atau elips, dengan panjang 1,1–1,3 mm dan tidak mencolok. Mempunyai buah tunggal, bentuk seperti kapsul memanjang, ujung runcing, panjang 2-3 cm, hijau. Biji berbentuk bulat, banyak, keras, coklat kehitaman (Al-Snafi, 2018).



**Gambar 3.** *Ludwigia adscendens* L. H. Hara (Caton, *et al.*, 2004).

### 2.2.2 Bahan Aktif

*L. adscendens* merupakan tumbuhan air yang tumbuh liar di tepi-tepi sungai, sawah atau ditempat-tempat yang berair, pada ketinggian 10 m sampai 1600 m di atas permukaan laut. Berbunga pada bulan Mei-Agustus dan pengumpulan bahan dapat dilakukan sepanjang tahun. Batang dan daun dari ekstrak *Ludwigia adscendens* L.H. Hara mempunyai kandungan bioaktif dengan antibakteri dan aktivitas anti inflamasi. Kandungan antibakteri dari tumbuhan ini yaitu triterpenoid, flavonoid, fenol, tanin, alkaloid, dan asam ursolic (Ramesh, *et al.*, 2014).

*L. adscendens* merupakan tumbuhan air yang tumbuh secara liar di tepi-tepi sungai, sawah atau ditempat-tempat yang berair, pada ketinggian 10 m sampai 1600 m di atas permukaan laut. Berbunga pada bulan Mei-Agustus dan pengumpulan bahan dapat dilakukan sepanjang tahun. Tanaman ini bersifat *antiseptic*. Sering dijumpai pada kolam air, selokan, rawa, sawah dan lahan bera berair, sangat umum, dari dataran rendah sampai ketinggian 1600 m dpl. Berbunga sepanjang tahun. Ekstrak daun dan batang memiliki aktivitas antimikroba yang kuat. Kelopak bunga memiliki aktivitas antiinflamasi. Daun dan batang mengandung flavonoid, terpen, triterpenoid, fenol, tanin, alkaloid, dan karbohidrat (Ahmed, *et al.*, 2005).

## 2.3 *Eclipta prostrata* (L.) L

### 2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Jannah dan Safnowandi (2018), klasifikasi *E.prostrata* (L.) L yaitu sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Asterales
Famili	: Asteraceae
Genus	: Eclipta
Spesies	: <i>Eclipta prostrata</i>
Nama lokal	: Urang - aring

*E. prostrata* memiliki tangkai dengan panjang 80 cm. Batang tanaman ini berwarna hijau kecoklatan dengan bentuk bulat dan berambut putih agak kasar. Daunnya berwarna hijau berbentuk bulat memanjang dengan ujung daun meruncing, dan pinggir daun bergerigi halus hampir rata. Permukaan daun berambut agak kasar seperti batangnya. Bunganya majemuk berbentuk bongkol berwarna putih kecil. Buah memanjang, pipih, keras dan berbulu. Tanaman ini biasanya tumbuh di tempat terbuka seperti tanah lapang maupun pinggir selokan (Ulung, 2014).



**Gambar 4.** *Eclipta prostrata* (L.) L. (Cakovic, et al., 2014).

### 2.3.2 Bahan Aktif

Salah satu tumbuhan yang berpotensi untuk dimanfaatkan adalah tumbuhan urang aring (*E. prostrata*). Tumbuhan ini merupakan tumbuhan yang mudah diperoleh karena penyebarannya yang luas dan mudah untuk dikembangbiakkan. Selain itu mengandung senyawa-senyawa bioaktif yang potensial. Kandungan senyawa bioaktif tumbuhan urang aring antara lain golongan flavonoid, alkaloid, saponin, tanin, sterol dan terpenoid. Identifikasi dengan kromatografi menunjukkan dua senyawa flavonoid yaitu epigenin dan epigenin-7-O-glukosida. Ekstraknya mengandung beberapa asam fenolat seperti asam p-hidroksi benzoat, asam p-kumarat dan asam klorogenat (Siahaan, 2011).

*E. prostrata* L. memiliki daun berwarna hijau, tak bertangkai, permukaan halus, panjang 2-4 cm, dan lebar 2-3 cm. Batangnya berbentuk silinder dan panjang, berwarna coklat dan tebal 0,2-0,3 cm. *E. prostrata* secara tradisional telah digunakan sebagai obat herbal diberbagai negara. Tumbuhan ini merupakan tumbuhan yang mudah diperoleh karena penyebarannya yang luas dan mudah untuk dikembangbiakkan. Selain itu, tumbuhan ini mengandung senyawa-senyawa bioaktif yang potensial. Senyawa ini mudah terdegrasi di alam. Senyawa bioaktif tanaman ini yaitu triterpenoid, saponin, steroid, dan flavonoid (Hussein, *et al.*, 2018).

## 2.4 *Epithema benthamii* C.B. Clarke

### 2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut GBIF (2019), klasifikasi *E. benthamii* C. B. Clarke yaitu sebagai berikut :

Kingdom : Plantae  
Phylum : Tracheophyta  
Class : Magnoliopsida

Order : Lamiales  
Family : Gesneriaceae  
Genus : *Epithema Blume*  
Species : *Epithema benthamii* C.B.Clarke

*E. benthamii* banyak ditemukan di Asia timur dan tenggara tumbuh pada batu kapur, granit dan batu pasir. Membutuhkan kondisi lembab dengan kelembaban tinggi dan sering ditemukan di dekat atau di pintu masuk gua, di atas batu di hutan, atau di aliran sungai yang dangkal. Memiliki batang yang sederhana tidak bercabang dengan berwarna hijau. Daun *Epithema* tipis dan biasanya berbentuk bulat telur. Pucuk daun bulat dan bergerigi. Permukaan atas daunnya hijau sampai gelap atau hitam kehijauan dan permukaan bawah biasanya lebih terang dari permukaan atas. Bunga matang secara berurutan dari dasar perbungaan menuju puncak. Sel-sel di dasar bunga terus tumbuh sehingga bunga tumbuh secara horizontal dengan sudut sekitar 45° (Bransgrove dan Middleton, 2015).



**Gambar 5.** *Epithema benthamii* (GBIF, 2019)

#### **2.4.2 Bahan Aktif**

Tanaman ini mengandung senyawa flavonoid, polivenol dan kumarin. Flavonoid dan polivenol tergolong senyawa yang memiliki fungsi sebagai antioksidan. Senyawa kumarin merupakan antibakteri yang dapat merusak sel dengan membentuk pori -pori dinding sel bakteri sehingga menyebabkan

kematian sel (Johannes dan Sjafaraenan, 2017). *E. benthamii* memiliki fenolat tingkat tinggi yang berbeda, seperti asam fenolik, flavonoid, atau terpen fenolik. Senyawa fenolik seperti asam karnosik, yang mencegah oksidatif kerusakan kloroplas dan tampilan sifat antioksidan tinggi. Flavonoid adalah kelompok fenolik bioaktif yang tersebar luas pada tanaman (Trivellini, *et al.*, 2016).

## 2.5 Bahan Aktif Tanaman Air Sebagai Antibakteri

Tumbuhan air merupakan tumbuhan yang tinggal di sekitar air dan didalam air yang berfungsi sebagai produsen penghasil energi pada suatu ekosistem (Dewiyanti, 2012). Tumbuhan dikenal mengandung berbagai golongan senyawa kimia tertentu sebagai bahan obat yang mempunyai efek fisiologis terhadap organisme lain, atau sering disebut sebagai senyawa bioaktif. Senyawa kimia tersebut yaitu flavonoid, fenol, alkaloid dan tanin (Salni, *et al.*, 2011).

Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol. Flavonoid dan flavonol disintesis tanaman dalam responnya terhadap infeksi mikroba. Senyawa ini merupakan antimikroba karena kemampuannya membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler terlarut serta dinding sel mikroba. Flavonoid yang bersifat lipofilik akan merusak membran mikroba. Flavonoid bersifat anti inflamasi sehingga dapat mengurangi peradangan serta membantu mengurangi rasa sakit, bila terjadi pendarahan atau pembengkakan pada luka. Selain itu, flavonoid bersifat antibakteri dan antioksidan serta mampu meningkatkan kerja sistem imun karena leukosit sebagai pemakan antigen lebih cepat dihasilkan dan sistem limfoid lebih cepat diaktifkan (Haryani, *et al.*, 2012).

Tanin merupakan suatu senyawa fenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan beberapa gugus yang bersangkutan seperti karboksil untuk membentuk kompleks kuat yang efektif dengan protein dan beberapa makromolekul. Tanin terdiri dari dua jenis yaitu tanin terkondensasi dan

tanin terhidrolisis. Kedua jenis tanin ini terdapat dalam tumbuhan, tetapi yang paling dominan terdapat dalam tanaman adalah tanin terkondensasi (Hayati, *et al.*, 2010).

## **2.6 Mekanisme Kerja Antibakteri**

Zat antibakteri adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau metabolisme bakteri. Berdasarkan aktivitasnya, zat antibakteri dibagi menjadi 2 jenis, yaitu yang memiliki aktivitas bakteriostatik atau menghambat pertumbuhan bakteri dan yang memiliki aktivitas bakterisidal atau membunuh bakteri. Aktivitas antimikroba ditandai dengan terbentuknya suatu zona bening atau zona hambat di sekitar kertas cakram (Saskiawan dan Nur 2015).

Antibakteri dapat digunakan untuk mengobati penyakit ikan, salah satunya yaitu senyawa flavonoid. Senyawa flavonoid merupakan senyawa yang mempunyai efek antibakteri dan paling banyak terdapat pada tumbuhan. Flavonoid merupakan kelompok dari fitokimia fenolik yang berfungsi sebagai peredam radikal bebas dan bermanfaat melindungi sel, meningkatkan efektifitas vitamin C, serta sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme seperti bakteri dan virus. Mekanisme kerja senyawa flavonoid terjadi dengan cara mendenaturasi protein sel dan merusak membran sel tanpa dapat diperbaiki lagi. Dalam flavonoid terkandung senyawa fenol yang merupakan suatu alkohol yang bersifat asam sehingga disebut juga asam karbolat. Senyawa fenol ini berperan sebagai antibakteri sehingga dapat mengganggu pertumbuhan bakteri (Malinggas, *et al.*, 2015).

## **2.7 Uji Antibakteri**

Uji antibakteri atau tes kepekaan terhadap antibakteri adalah penentuan terhadap bakteri penyebab penyakit yang kemungkinan menunjukkan resistensi terhadap suatu antibakteri atau kemampuan suatu antibakteri untuk menghambat

pertumbuhan bakteri yang tumbuh, sehingga dapat dipilih sebagai antibakteri yang berpotensi untuk pengobatan. Hasil tes kepekaan, mikroorganisme diklasifikasikan ke dalam dua atau lebih kategori. Sistem yang sederhana menentukan dua kategori, yaitu sensitif dan resisten (Soleha, 2015).

Penentuan aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode *disc diffusion* Kirby-Bauer yaitu penentuan sensitivitas bakteri dengan suatu zat tertentu yang kemungkinan memiliki aktivitas antibakteri dengan menggunakan cakram kertas. Alasan dilakukannya uji kepekaan atau sensitivitas bakteri adalah untuk mendapatkan agen antimikroba yang tepat untuk pengobatan penyakit infeksi tertentu. Uji sensitivitas antimikroba tidak dilakukan pada setiap spesimen, melainkan hanya dilakukan pada spesimen dengan jenis mikroba tertentu yang belum diketahui secara umum sensitivitasnya terhadap jenis-jenis antimikroba yang umum digunakan (Amalia, *et al.*, 2014).

## **2.8 Uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*)**

*Minimum Inhibition Concentration* (MIC), metode ini digunakan untuk menentukan konsentrasi terendah bahan antimikrobia yang diperlukan untuk menghambat pertumbuhan mikroorganisme secara kasat mata. Konsentrasi hambat minimum (MIC) didefinisikan sebagai konsentrasi terendah dari suatu antimikroba yang akan menghambat pertumbuhan mikroorganisme terlihat setelah inkubasi semalam. MIC paling sering digunakan sebagai alat penelitian untuk menentukan aktivitas *in vitro* antimikroba baru (Syamsuryah, *et al.*, 2013).

Penentuan antimikroba secara *in vitro* adalah MIC (*minimum Inhibition Concentration*). MIC merupakan konsentrasi terendah bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan hasil yang dilihat dari pertumbuhan koloni pada agar atau kekeruhan pada pembiakan cair. Secara umum untuk penentuan MIC, pengenceran antimikroba dilakukan penurunan konsentrasi

setengahnya misal mulai dari 16, 8, 4, 2, 1, 0,5, 0,25 µg/ml konsentrasi terendah yang menunjukkan hambatan pertumbuhan dengan jelas baik dilihat secara visual atau alat semiotomatis dan otomatis disebut dengan konsentrasi daya hambat minimum atau MIC (*Minimum Inhibition Concentration*). MIC dapat membantu dalam penentuan tingkat resistensi dan dapat menjadi petunjuk penggunaan antimikroba. Nilai MIC ditentukan dengan melihat konsentrasi terkecil yang menunjukkan kejernihan pada media (Soleha, 2015).

## 2.9 Uji MBC (*Minimum Bacterisidal Concentration*)

MBC (*Minimum Bacterisidal Concentration*) atau Kadar Bunuh Minimum (KBM) didefinisikan sebagai konsentrasi terendah yang mampu membunuh seluruh pertumbuhan bakteri dan ditetapkan pada konsentrasi yang memberikan zona jernih tanpa pertumbuhan mikroba pada media agar dengan pengamatan secara visual. Aktivitas antibakteri tertentu dapat ditingkatkan dari bakteriostatik menjadi bakteriosidal apabila kadar antibakteri ditingkatkan melebihi nilai KHM (Efendi dan Hertiani, 2013). Penentuan konsentrasi minimum antimikroba yang dapat membunuh bakteri dilakukan dengan menanam bakteri pada uji MIC ke dalam agar kemudian diinkubasi semalam pada suhu 37°C. MBC adalah ketika tidak terjadi pertumbuhan lagi pada agar (Soleha, 2015).

MBC didapatkan dari hasil positif uji MIC yang dapat membunuh bakteri uji. Kemampuan daya bunuh yang dimiliki suatu senyawa antibakteri pada ekstrak dapat diketahui dengan adanya uji MBC dengan melihat pada konsentrasi minimal berapakah dari ekstrak perlakuan terbaik yang mampu membunuh bakteri uji. Hasil positif MBC ditunjukkan dengan tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh dari konsentrasi ekstrak positif uji MIC pada media agar setelah inkubasi (Magdalena dan Kusnadi, 2015).

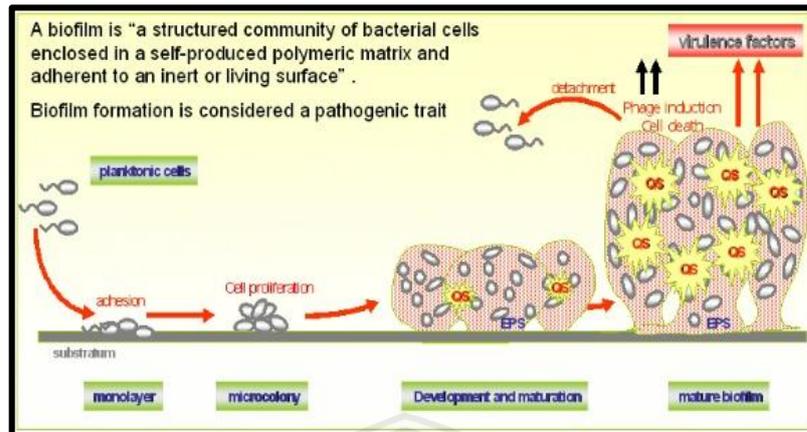
## 2.10 Mekanisme Kerusakan Biofilm dengan Senyawa Antibakteri

### 2.10.1 Definisi Biofilm

Biofilm adalah kumpulan sel mikroorganisme, khususnya bakteri, yang melekat erat di suatu permukaan yang disertai dengan bahan-bahan organik dan diselimuti oleh matriks polimer ekstraseluler yang dikeluarkan oleh bakteri. Biofilm tumbuh melalui proses yaitu tahap awal yang terdiri dari perlekatan bakteri pada substrat. Bakteri tumbuh dan membelah kemudian membentuk kolonisasi di lingkungan sekitar dan terbentuklah biofilm. Bakteri ini tidak bekerja secara individual untuk membentuk biofilm, tetapi berkumpul menjadi rantai yang panjang untuk membantu mengawali tahap awal pembentukan biofilm (Rachmawati, *et al.*, 2015).

Keragaman genetik organisme yang membentuk biofilm dengan berbagai kondisi lingkungan tempat biofilm muncul membuktikan bahwa biofilm adalah bentuk kehidupan dari suatu mikroorganisme. Biofilm bakteri sebagai bentuk kehidupan sesil, memastikan keberadaan bakteri dan merupakan fenotip yang melayang bebas di alam dalam bentuk planktonik. Bakteri biofilm dilindungi dari pengaruh lingkungan negatif, mereka dapat menyebar dan sangat resisten terhadap antibiotik. Biofilm memiliki efek positif dalam bioteknologi, tetapi sangat luar biasa berbahaya dalam industri dan dalam kedokteran. Selain itu, biofilm juga menyebabkan berbagai infeksi biomaterial seperti infeksi yang terkait dengan penggunaan obat-obatan (Maric dan Vranes, 2007).

## 2.10.2 Mekanisme Biofilm



**Gambar 6.** Mekanisme Pembentukan Biofilm (Gunardi, 2014)

Pembentukan biofilm dimulai dari beberapa bakteri yang hidup bebas (sel planktonik) melekat pada suatu permukaan, kemudian memperbanyak diri dan membentuk satu lapisan tipis (monolayer) biofilm. Pada saat ini, pembelahan akan berhenti selama beberapa jam dan pada masa ini terjadi banyak sekali perubahan pada sel planktonik, yang akan menghasilkan trasi sel planktonik menjadi sel dengan fenotip biofilm. Sel biofilm berbeda secara metabolik dan fisiologik dari sel planktoniknya. Sejalan dengan pertumbuhannya, sel biofilm ini akan menghasilkan EPS (*Extracellular Polymeric Substances*) yang akan melekatkan mereka pada suatu permukaan dan melekatkan satu sama lain untuk membentuk suatu mikrokoloni. Dalam perkembangannya, sel-sel bakteri dalam matriks akan mengeluarkan sinyal kimia. Molekul sinyal ini berperan dalam pembentukan karakteristik biofilm menjadi lebih matang dan dalam koordinasi aktivitas biofilm. Aksi dari sinyal ini merupakan suatu proses dari *quorum sensing* yaitu komunikasi antar sel dan kemampuan molekul untuk mencetuskan suatu aksi bergantung pada konsentrasi sinyal dalam lingkungan (Gunardi 2014).

Pembentukan biofilm diawali dengan pergerakan mikroba menuju ke permukaan material penempelan, kemudian akan menempel secara reversible maupun irreversible. Penempelan reversible dapat terjadi akibat , interaksi

mikroba dengan permukaan, gerak Brown, dan aliran konveksi. Penempelan irreversible terjadi saat sel mikroba menghasilkan EPS (*Extracellular Polymeric Substances*) yang membentuk ikatan dari sel ke sel, dan melekatkan kumpulan sel ke permukaan material penempelan. Pelekatan irreversible ini memicu kolonisasi dari mikroba, dimana sel-sel mikroba tumbuh membentuk mikrokoloni yang menyusun biofilm (Lindsay dan Holy, 2006).

Biofilm cenderung tumbuh dan berkembang dengan pesat terutama pada permukaan bahan yang lembab dan kaya akan nutrisi. Secara umum, bakteri memiliki kemampuan untuk menempel dan membentuk biofilm pada permukaan padat. Menempelnya bakteri pada permukaan benda padat merupakan langkah awal pembentukan biofilm. Pengendalian biofilm atau antibiofilm dapat dilakukan dengan memanfaatkan bahan alam yang salah satunya dapat menggunakan senyawa kimia dari tanaman berupa alkaloid, flavonoid, tanin, saponin, steroid dan triterpenoid (Alvita, *et al.*, 2016).

Sejak adanya penemuan mikroskop, maka untuk pertama kali Van Leeuwenhoek mengamati mikroorganisme menggunakan mikroskop dan menemukan biofilm mikroba. Penelitian biofilm yang lebih rinci menggunakan mikroskop elektron untuk menilai biofilm pada filter air dalam pengolahan air limbah tanaman dan menunjukkan biofilm terdiri dari berbagai organisme berdasarkan morfologi sel. Pada dua dekade terakhir, penelitian telah mengandalkan alat-alat seperti *Scanning Electron Microscopy* (SEM) atau teknik kultur standar mikrobiologis untuk karakterisasi biofilm. Dua pernyataan utama tentang biofilm, yaitu pemanfaatan mikroskop pemindai laser konfokal untuk mengkarakterisasi ultrastruktur biofilm, dan penyelidikan gen yang terlibat dalam adhesi sel dan pembentukan biofilm (Homenta, 2016).

### 3 METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan untuk penelitian tentang Uji Antibakteri dan Biofilm Ekstrak Kasar *L. adscendens* L. H. Hara, *E. prostrata* (L). L, dan *E. benthamii* C. B. Clarke terhadap Bakteri *A. hydrophila* yang disajikan pada Tabel 1.

**Tabel 1.** Peralatan Penelitian

No	Alat	Fungsi
1	Autoklaf	Untuk mensterilkan alat dan bahan yang akan digunakan
2	Beaker glass	Untuk menampung suatu cairan
3	Mikrotip 1000ml dan 200 ml	Untuk memindahkan sampel dengan bantuan mikropipet
4	<i>Bubble</i>	Untuk membantu mengambil larutan dengan pipet volume
5	Bunsen	Untuk pengkondisian aseptis dan mencegah terjadinya kontaminasi pada saat perlakuan
6	Cawan petri	Untuk tempat menumbuhkan bakteri
7	Corong	Untuk membantu dalam menuangkan cairan
8	Erlenmeyer	Untuk tempat membuat media
9	Gelas ukur	Untuk membantu mengukur banyaknya larutan
10	<i>L glass</i>	Untuk meratakan bakteri saat dikultur
11	Hotplate	Untuk memanaskan media
12	Inkubator	Untuk menginkubasi bakteri yang telah ditanam pada media padat dan cair
13	Penggaris	Untuk mengukur diameter zona hambat
14	Jarum ose	Untuk mengambil bakteri yang akan di kultur
15	Korek gas	Untuk menyalakan bunsen
16	LAF ( <i>Laminary Air Flow</i> )	Untuk mencegah kontaminasi dalam melakukan kultur bakteri
17	Lemari pendingin	Untuk menyimpan suatu bahan
18	Pipet volume	Untuk mengambil larutan sebanyak 1-10 ml
19	Rak tabung reaksi	Untuk tempat tabung reaksi
20	<i>Magnetic stirer</i>	Untuk menghomogenkan media
21	Syringe 10 ml	Untuk membantu mengambil larutan
22	Spektrofotometer	Untuk mengukur absorbansi dengan panjang gelombang tertentu
23	Mikroplate	Untuk mengencerkan bakteri pada saat

24	Tabung reaksi	TPC, MIC, dan Biofilm Untuk tempat peremajaan bakteri pada media cair dan agar miring
25	Timbangan digital	Untuk menimbang ekstrak dan media yang akan dibuat
26	Vortex	Untuk menghomogenkan larutan
27	Washing bottle	Untuk wadah akuades
28	Oven	Untuk menguapkan bahan setelah di autoklaf
29	Mikroskop	Untuk mengamati pewarnaan gram bakteri
30	Objek glass	Untuk membuat preparat pewarnaan gram dan biofilm
31	Mikro pipet	Untuk membantu mengambil larutan
32	Tube	Untuk wadah media cair
33	Botol kaca	Untuk wadah ekstrak tanaman air
34	Mikrotube	Untuk wadah larutan dan ekstrak
35	Cover glass	Untuk menutup objek glass dan tempat melekatnya bakteri saat uji biofilm

### 3.1.2 Bahan Penelitian

Berikut bahan beserta fungsinya yang akan digunakan dalam penelitian ini yang disajikan pada Tabel 2.

**Tabel 2.** Bahan Penelitian

No	Bahan	Fungsi
1	Ekstrak kasar <i>L. adscendens</i> , <i>E. prostrata</i> , <i>E. benthamii</i>	Sebagai ekstrak sampel yang diamati
2	Bakteri <i>A. hydrophila</i>	Sebagai bakteri yang digunakan untuk perlakuan
3	Kertas label	Sebagai penanda sampel, alat dan bahan
4	Alkohol 70%	Sebagai bahan sterilisasi
5	Aluminium Foil	Sebagai pembungkus alat dan bahan steril
6	Kapas	Sebagai penutup media pada tabung reaksi
7	Masker	Sebagai pelindung mulut bagi peneliti agar tidak mengkontaminasi
8	Sarung Tangan	Sebagai bahan untuk mencegah kontaminasi
9	Plastik wrap	Sebagai pembungkus bagian sisi pada cawan petri
10	Spirtus	Sebagai bahan bakar bunsen
11	Tissue	Sebagai pembersih alat yang digunakan
12	Safranin	Sebagai pembeda (kontras) terhadap warna kristal violet-iodium
13	Kristal violet	Sebagai pewarna primer yang akan memberi warna pada mikroba



14	Iodine lugol	Sebagai pewarna untuk memperkuat pengikatan warna oleh mikroba
15	Decolorizing	Sebagai larutan pembilas atau melunturkan kelebihan zat warna pada sel bakteri
16	DMSO ( <i>Dimethyl Sulfoxide</i> ) 5%	Sebagai larutan pengenceran
17	<i>Antibiotic disc chloramphenicol</i>	Sebagai bahan untuk kontrol positif pada uji sensitivitas
18	<i>Blank disc</i>	Sebagai bahan untuk uji sensitivitas
19	TSA ( <i>Tryptone Soy Agar</i> )	Sebagai media kultur bakteri
20	TSB ( <i>Tryptone Soy Broth</i> )	Sebagai media kultur bakteri
21	MHA ( <i>Mueller Hinton Agar</i> )	Sebagai media kultur bakteri
22	MHB ( <i>Mueller Hinton Broth</i> )	Sebagai media kultur bakteri
23	PBS ( <i>Phospat Buffer Saline</i> )	Sebagai pelarut ekstrak
24	Akuades	Sebagai pelarut steril
25	Etanol 96%	Sebagai bahan untuk maserasi tanaman air
26	<i>Chloramphenicol</i> cair	Sebagai bahan untuk kontrol pada uji MIC
27	Akuades steril	Sebagai pelarut steril
28	Asam Asetat Glasial	Sebagai larutan untuk dehidrasi sel bakteri

### 3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimental, dimana metode ini merupakan metode penelitian yang memungkinkan peneliti memanipulasi variabel dan meneliti akibatnya. Menurut Jeedun (2011), metode eksperimen merupakan satu-satunya metode penelitian yang dianggap paling dapat menguji hipotesis hubungan sebab – akibat, atau paling dapat memenuhi validitas internal. Metode eksperimen merupakan penelitian yang digunakan untuk mencari pengaruh perlakuan tertentu terhadap dampaknya dalam kondisi yang terkendalikan.

### 3.3 Pengambilan Data

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu pengamatan langsung ke lokasi penelitian yang dilakukan dengan memperhatikan, mempelajari dan mencatat berbagai hal yang

dapat dijadikan objek penelitian serta mengumpulkan data sekunder dari berbagai dokumen. Menurut Hasanah (2016), observasi merupakan kegiatan yang melibatkan seluruh kekuatan indera seperti pendengaran, penglihatan, perasa, sentuhan, dan cita rasa berdasarkan pada fakta-fakta peristiwa empiris.

### 3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) yaitu keragaman atau variasi hanya disebabkan oleh perlakuan yang dicobakan dan perlakuan tersebut merupakan level-level dari satu faktor tertentu. Misal faktor yang ingin dikaji pengaruhnya adalah Varietas. Perlakuan yang dicobakan adalah Varietas 1 (V1), Varietas 2 (V) dan Varietas 3 (level-level dari varietas). Selanjutnya faktor-faktor di luar perlakuan atau faktor lingkungan pada unit percobaan dikondisikan serbasama (homogen) serta penempatan perlakuannya dalam unit-unit percobaan dilakukan secara acak lengkap. Karena lingkungan homogen maka lingkungan atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati dan model untuk RAL menurut (Bambang, *et al.*, 2011) adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij}$$

Keterangan :

- $Y_{ij}$  : Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j  
 $\mu$  : Nilai tengah umum  
 $T_i$  : Pengaruh perlakuan ke-i  
 $e_{ij}$  : Pengaruh Galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

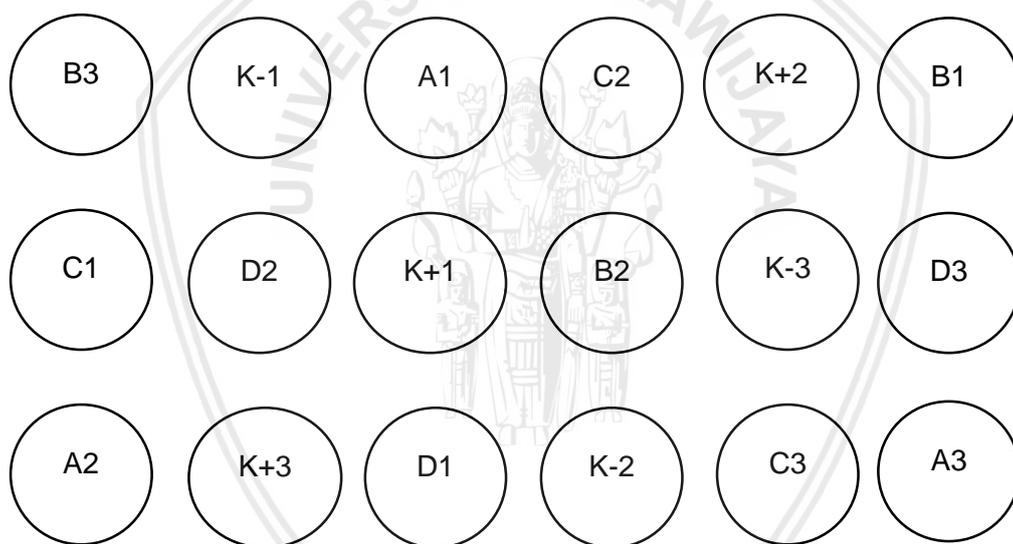
Pada penelitian ini, sebagai perlakuan menggunakan 3 bahan ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan. Nama tanaman air yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Tabel 3.

**Tabel 3.** Nama Tanaman Air

No	Nama Tanaman	Nama Lokal
1	<i>Ludwigia adscendens</i> L. H. Hara	Krangkong

2	<i>Eclipta prostrata</i> (L) L	Urang-aring
3	<i>Epithema benthamii</i> C.B. Clarke	-

Sebelumnya dilakukan skrining terlebih dahulu diantara 3 tanaman air pada Uji Antibakteri dan di ambil 2 tanaman terbaik untuk uji selanjutnya. Pemberian konsentrasi ekstrak kasar ini berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan sebelumnya yaitu penentuan konsentrasi minimal yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) yang selanjutnya digunakan untuk menentukan konsentrasi pada Uji Biofilm. Untuk mempermudah dalam menganalisa diperlukan kontrol sebagai pembanding yaitu kontrol positif dan kontrol negatif. Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan yang disajikan pada Gambar 7.



**Gambar 7.** Denah Penelitian

Keterangan :

A, B, C, D : perlakuan dengan konsentrasi ekstrak yang berbeda

*L. adscendens* : A (3 mg/ml), B (6 mg/ml), C (9 mg/ml), D (12 mg/ml)

*E. prostrata* : A (1 mg/ml), B (4 mg/ml), C (7 mg/ml), D (10 mg/ml)

K+ : suspensi bakteri, media MHB dan antibiotik *chloramphenicol* cair 30 µg

K- : suspensi bakteri, media MHB dan akuades steril

1,2,3 : Ulangan

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Alat dan bahan yang digunakan dalam penelitian, sebelumnya perlu dilakukan proses sterilisasi. Hal ini bertujuan untuk membunuh semua mikroorganisme yang tidak dikehendaki yang menempel pada alat dan bahan.

Proses sterilisasi tersebut adalah sebagai berikut :

- Alat-alat yang akan digunakan terlebih dahulu dicuci, dikeringkan kemudian dibungkus dengan kertas bekas dan diikat menggunakan karet.
- Akuades dimasukkan ke dalam ruang sterilisasi autoklaf sampai menutup sistem pemanas.
- Keranjang yang berisi bahan atau alat yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam autoklaf, kemudian tutup autoklaf.
- Tombol "ON" ditekan.
- Suhu dan waktu diatur sesuai dengan kebutuhan, kunci autoklat dengan menggeser ke arah "LOCK"
- Tombol "START" ditekan dan ditunggu sampai proses sterilisasi selesai (2 jam).
- Suhu ditunggu hingga turun dari 121<sup>0</sup>C menjadi sekitar 70<sup>0</sup>C.
- Klep diputar pada autoklaf.
- Tombol "STOP" ditekan, kemudian geser ke arah "UNLOCK"
- Penutup autoklaf dibuka dan dimatikan dengan menekan tombol "OFF"

#### 3.5.2 Ekstrak Tanaman Air

Tanaman air yang digunakan pada penelitian ini didapatkan dari Sulawesi Selatan yang merupakan hasil ekspedisi Tanaman Air Sulawesi oleh Quarto Institusi (Balai Riset Budidaya Ikan Hias KKP – Balai Besar Bioteknologi dan

Sumberdaya Genetik Pertanian Bogor Kementan, Politeknik Negeri Pangkep Sulawesi Selatan dan Fakultas Farmasi Universitas Indonesia. Ekspedisi tanaman air Sulawesi ini di Danai oleh Program INSINAS Kemenristekdikti tahun 2018/2019. Tanaman air sudah dilakukan ekstraksi di Fakultas Farmasi Universitas Indonesia menggunakan pelarut Etanol 70% dengan perbandingan 1:10. Ekstraksi dilakukan dengan merendam tanaman yang sudah kering selama 24 jam. Tahap maserasi dilakukan tiga kali pengulangan. Kemudian hasil maserasi disaring. Hasil ekstraksi yang telah didapatkan kemudian diuapkan dengan *rotary evaporator* hingga diperoleh ekstrak kental.

### 3.5.3 Pembuatan Media

#### 1). Media TSA (*Tryptone Soya Agar*)

Media TSA digunakan sebagai media untuk kultur bakteri *A. hydrophila*.

Proses pembuatan media TSA adalah sebagai berikut :

- Media TSA ditimbang sebanyak 6 gram dengan menggunakan timbangan digital.
- TSA dilarutkan ke dalam Erlenmeyer berisi aquades 200 ml dan dihomogenkan.
- Sambil diaduk pada kondisi hangat diatas *hotplate* sampai tercampur rata.
- Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan diikat dengan menggunakan karet kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 20 menit.
- Media yang akan digunakan dibiarkan sedikit dingin.
- Media dituang pada cawan petri di LAF ditunggu hingga dingin dan disimpan pada lemari pendingin dengan diberi kertas label sebagai penanda.

## 2). **Media TSB (*Tryptone Soya Broth*)**

Media TSB merupakan media cair yang digunakan untuk kultur bakteri *A. hydrophila*. Adapun proses pembuatan media TSB adalah sebagai berikut :

- Media TSB ditimbang sebanyak 8 gr dengan menggunakan timbangan digital.
- TSB dilarutkan ke dalam Erlenmeyer berisi aquades 200 ml dan dihomogenkan.
- Kemudian diaduk menggunakan *hotplate* hingga larut sempurna dan berwarna kuning.
- Media dituang pada tabung reaksi dengan masing-masing 10 ml kemudian tutup dengan kapas.
- 10 tabung reaksi diikat dan dibungkus dengan menggunakan kertas bekas dan diikat dengan karet selanjutnya beri label sebagai penanda.
- Media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C tekanan 1 atm selama 20 menit.
- Media ditunggu hingga dingin dan disimpan pada lemari pendingin.

## 3) **Media MHA (*Mueller Hinton Agar*)**

Media MHA digunakan sebagai media untuk uji antibakteri bakteri *A. hydrophila*. Proses pembuatan media MHA adalah sebagai berikut :

- Media MHA ditimbang sebanyak 38 gram dengan menggunakan timbangan digital.
- MHA dilarutkan ke dalam Erlenmeyer berisi aquades 1000 ml dan dihomogenkan.
- Sambil diaduk pada kondisi hangat diatas *hotplate* sampai tercampur rata.

- Erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil dan diikat dengan menggunakan karet kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121° C tekanan 1 atm selama 20 menit.
- Media yang akan digunakan dibiarkan dingin.
- Media dituang pada cawan petri di LAF ditunggu hingga dingin dan disimpan pada lemari pendingin dengan diberi kertas label sebagai penanda.

#### 4) **Media MHB (*Mueller Hinton Broth*)**

Media MHB adalah media cair yang digunakan untuk kultur bakteri.

Adapun proses pembuatan media MHB adalah sebagai berikut :

- Media MHB ditimbang sebanyak 10,5 gr dengan menggunakan timbangan digital.
- MHB dilarutkan ke dalam Erlenmeyer berisi aquades 500 ml dan dihomogenkan.
- Media dituang pada tabung reaksi dengan masing-masing 10 ml kemudian tutup dengan kapas.
- Ikat 10 tabung reaksi dan dibungkus dengan menggunakan kertas bekas kemudian ikat dengan karet selanjutnya beri label sebagai penanda.
- Media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121° C tekanan 1 atm selama 20 menit.
- Media ditunggu hingga dingin dan disimpan pada lemari pendingin.

#### 5) **Media PBS (*Phospat Buffer Saline*)**

Media PBS adalah media cair yang digunakan untuk pengenceran pada saat TPC dan pada saat uji MIC . Adapun proses pembuatan media PBS adalah sebagai berikut :

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  4 gr,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  6,5 gr dan  $\text{NaCl}$  8,4 gr ditimbang dengan timbangan digital.
- Bahan-bahan tersebut dilarutkan ke dalam Erlenmeyer berisi akuades 1000 ml dan dihomogenkan.
- pH PBS diukur sebesar 7 dengan pH paper.
- PBS dituang ke dalam tube sebanyak 9 ml.
- PBS dimasukkan ke autoklaf dengan suhu  $121^\circ\text{C}$  tekanan 1 atm selama 20 menit.
- Media PBS disimpan di lemari pendingin sampai siap digunakan.

#### 6) Larutan DMSO 5%

Larutan DMSO 5% adalah larutan pengencer ekstrak kasar tanaman air.

Adapun proses pembuatan larutan DMSO 5% adalah sebagai berikut :

- Akuades steril dan DMSO murni disiapkan.
- Pada erlenmeyer akuades steril sebanyak 950 ml ditambahkan DMSO murni sebanyak 50 ml.
- DMSO dihomogenkan dan ditutup *aluminium foil*.
- DMSO disimpan pada lemari pendingin sampai siap digunakan.

#### 7) Larutan Asam Asetat Glasial 33%

Larutan Asam Asetat Glasial merupakan larutan untuk mendegradasi sel bakteri. Adapun proses pembuatan larutan Asam Asetat Glasial adalah sebagai berikut :

- Akuades steril dan Asam Asetat Glasial murni disiapkan.
- Akuades steril sebanyak 67 ml ditambahkan dengan Asam Asetat Glasial murni sebanyak 33 ml pada erlenmeyer.
- Asam Asetat Glasial dihomogenkan dan tutup dengan *aluminium foil*.

- Asam Asetat Glisial disimpan pada lemari pendingin sampai siap digunakan.

#### 3.5.4 Pemiakan Bakteri *A. hydrophila*

Bakteri *A. hydrophila* diperoleh dari IRP2I (Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan) Depok, Jawa Barat. Isolat murni yang kemudian diremajakan pada media agar miring yaitu dengan menggunakan media TSA. Adapun prosedur yang dilakukan dalam peremajaan bakteri *A. hydrophila* adalah sebagai berikut :

- Media agar miring yang masih steril disiapkan.
- Jarum ose dipanaskan sampai berwarna merah menyala, kemudian dinginkan pada ujung agar TSA.
- Penutup kapas dibuka pada tabung reaksi berisi bakteri kemudian panaskan ujung tabung terlebih dahulu diatas bunsen.
- Satu inokulan bakteri diambil dari hasil peremajaan sebelumnya, kemudian digoreskan pada media agar yang masih steril di dekat bunsen yang menyala.
- Setelah itu, media hasil goresan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 30° C untuk melihat pertumbuhan bakteri.

Untuk mendapatkan bakteri *A. hydrophila* dalam bentuk cair, maka bakteri diremajakan kembali dari metode gores dengan menggunakan media cair yaitu TSB. Adapun proses pemiakan adalah sebagai berikut :

- Media TSB yang sudah steril disiapkan.
- Jarum ose dipanaskan diatas bunsen sampai berwarna merah menyala, setelah dingin jarum ose disentuhkan ke biakkan murni *A. hydrophila* kemudian dicelupkan ke media TSB yang sudah dingin.

- Media TSB dibiarkan selama 24 jam dalam inkubator pada suhu 30° C. Setelah dibiarkan, media TSB akan keruh menandakan bakteri telah tumbuh.
- Kepadatan bakteri hasil kultur diketahui dengan menggunakan metode TPC (*Total Plate Count*).

### 3.5.5 TPC (*Total Plate Count*)

Metode TPC dilakukan untuk menduga kepadatan awal suatu bakteri.

Adapun prosedur melakukan metode TPC adalah sebagai berikut :

- Microplate steril disiapkan dan setiap lubang diisi dengan PBS 180  $\mu$ L.
- Isolat bakteri diambil dari media cair sebanyak 20  $\mu$ L menggunakan mikropipet.
- Isolat bakteri dimasukkan pada microplate berisi PBS menggunakan mikropipet dan dilakukan pengenceran berseri.
- Bakteri diambil pada pengenceran  $10^{-5}$  sebanyak 30  $\mu$ L dan ditetaskan pada cawan petri secara duplo.
- Isolat bakteri diratakan menggunakan *L glass*.
- Menutup cawan petri dengan plastic wrap dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.
- Menghitung kepadatan bakteri dan diperoleh kepadatan bakteri dalam CFU/ml.

## 3.6 Pelaksanaan Penelitian

### 3.6.1 Pembuatan Konsentrasi Ekstrak Kasar Tanaman Air

Ekstrak kasar tanaman air dalam bentuk pasta diencerkan dengan pelarut DMSO 5%. Menurut Fadlila, *et al.*, (2015), DMSO merupakan salah satu pelarut yang dapat melarutkan hampir semua senyawa baik polar maupun nonpolar. Selain itu, DMSO tidak memberikan daya hambat pertumbuhan bakteri sehingga

tidak mengganggu hasil pengamatan pengujian aktivitas antibakteri. Adapun pembuatan dosis ekstrak kasar adalah sebagai berikut :

- Ekstrak dan DMSO 5% disiapkan, lalu ditentukan konsentrasi yang diinginkan dalam satuan mg/ml.
- Ekstrak ditimbang sebanyak 0.1 gram dan 0,2 gram dengan timbangan digital.
- DMSO 5% dilarutkan sebanyak 1 ml pada mikrotube untuk larutan stok.
- Selanjutnya konsentrasi ekstrak yang lebih kecil dibuat dengan cara pengenceran dari konsentrasi tertinggi dengan rumus :

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

Dimana :

$V_1$  = Volume larutan stok (ml)

$N_1$  = Konsentrasi larutan stok (mg/ml)

$V_2$  = Volume larutan yang diinginkan (ml)

$N_2$  = Konsentrasi larutan yang diinginkan (mg/ml)

### 3.6.2 Uji Antibakteri

Uji antibakteri dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian konsentrasi ekstrak tanaman air tertentu yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri yang bersifat bakteristatik (menghambat bakteri) dan bakterisidal (membunuh bakteri). Adapun prosedur uji kertas cakram dengan metode Kirby-Bauer adalah sebagai berikut :

- *Blank disc* berdiameter 6 mm dan *antibiotic chloramphenicol disc* sebagai kontrol positif disiapkan.
- Ekstrak tanaman air yang telah dilarutkan dalam DMSO 5% disiapkan.
- Media MHA 10 ml pada cawan petri dan 10 ml pada tabung reaksi disiapkan.

- Media MHA pada tabung reaksi dipanaskan dengan menggunakan Hot Plate.
- Inokulan bakteri yang sudah dilakukan pengenceran disiapkan.
- *Blank disc* ditetesi dengan ekstrak tanaman air sebanyak 50 µl. Tunggu sampai ekstrak terserap dengan sempurna.
- Bakteri dituang dengan kepadatan  $10^6$  pada media MHA tabung sebanyak 100 µl dan homogenkan. Kemudian tuang pada media MHA cawan petri. Tunggu sampai menjadi agar.
- *Blank disc* yang sudah ditetesi ekstrak diletakkan pada permukaan lempeng agar yang telah diinokulasi bakteri. Untuk kontrol positif menggunakan *antibiotic disc* yang mengandung *chloramphenicol* 30 µg dan kontrol negatif menggunakan DMSO 5%.
- Media agar diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 24 jam.
- Setelah diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam, kemudian hasil dibaca dengan mengukur diameter zona hambat dengan menggunakan penggaris.
- Prosedur pengukuran yaitu dengan diukur jarak zona hambat dari kertas cakram ke zona hambat terluar. Penentuan zona hambat dilakukan dengan cara mengamati zona terang yang berada di zona terluar kertas cakram yang mengandung ekstrak. Semakin besar zona hambat atau zona terang maka semakin besar pula kemampuan ekstrak untuk menghambat pertumbuhan bakteri.
- Hasil daya hambat didapatkan dari hasil rata-rata 2 kali pengulangan.

### 3.6.3 Uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*)

Uji MIC dilakukan untuk mengetahui konsentrasi hambat minimum suatu zat antimikroba yang terkandung dalam ekstrak kasar tanaman air sebagai penghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Adapun prosedur melakukan uji MIC adalah sebagai berikut :

- *Microplate well* 96 steril disiapkan
- Media MHB, ekstrak tanaman air yang telah dilarutkan dengan DMSO 5%, akuades steril, DMSO 5% dan *chloramphenicol* cair disiapkan.
- Ekstrak dengan konsentrasi 200 mg/ml dimasukkan pada well pertama sebanyak 100  $\mu$ l dengan mikropipet.
- 50  $\mu$ l diambil dari well pertama kemudian masukkan pada well kedua yang telah berisi 50  $\mu$ l akuades steril untuk pengenceran, begitu seterusnya sampai pada well yang ke-12. Pada well terakhir dibuang 50  $\mu$ l.
- Media MHB dimasukkan sebanyak 35  $\mu$ l pada setiap well perlakuan.
- Suspensi bakteri dimasukkan sebanyak 15  $\mu$ l dengan kepadatan  $10^6$  pada setiap well dan dihomogenkan.
- Untuk kontrol positif yaitu 85  $\mu$ l media MHB dan 15  $\mu$ l suspensi bakteri, kontrol media yaitu 100  $\mu$ l media MHB, kontrol negatif yaitu DMSO 5% 50  $\mu$ l dan 50  $\mu$ l media MHB, dan kontrol antibiotik yaitu 50  $\mu$ l antibiotik *chloramphenicol*, 35  $\mu$ l media MHB dan 15  $\mu$ l suspensi bakteri.
- Inkubasi pada suhu 30<sup>o</sup>c selama 24 jam, kemudian dibaca ODnya dengan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm.
- Hasil MIC didapatkan dari membandingkan nilai OD perlakuan dengan nilai OD kontrol antibiotik.

### 3.6.4 Uji MBC (*Minimum Bacterisidal Concentration*)

Uji MBC dilakukan untuk mengetahui konsentrasi ekstrak yang dapat membunuh bakteri. Uji MBC merupakan uji lanjutan dari uji MIC. Adapun prosedur Uji MBC sebagai berikut :

- Media agar pada cawan petri disiapkan.
- Setelah inkubasi selama 24 jam setiap sumuran pada *microplate* 96 *well* dicelupkan jarum ose.
- Jarum ose digoreskan pada media agar.
- Inkubasi selama 24 jam pada suhu 30<sup>o</sup>c.
- Nilai MBC diketahui apabila pada media agar tidak terdapat pertumbuhan bakteri sama sekali.

### 3.6.5 Uji Biofilm

Uji biofilm dilakukan untuk mengetahui penghambatan bakteri *A. hydrophila* dengan pemberian ekstrak kasar tanaman air. Adapun prosedur Uji Biofilm sebagai berikut :

#### a. Metode *microplate well* 96

- *Microplate* 96 *well* steril disiapkan.
- Ekstrak tanaman air yang telah dilarutkan dengan DMSO 5% dilakukan pengenceran sesuai dengan perlakuan konsentrasi menggunakan pengencer akuades.
- Sumuran pada *microplate* dimasukkan dengan media MHB sebanyak 35  $\mu$ l.
- Suspensi bakteri diencerkan satu kali pada 3 *well* agar kepadatan menjadi 10<sup>6</sup>.
- Suspensi bakteri dimasukkan sebanyak 15  $\mu$ l pada masing-masing perlakuan pada sumuran.

- Masing-masing perlakuan ekstrak dengan berbagai konsentrasi yaitu 12 mg/ml, 9 mg/ml, 6 mg/ml, dan 3 mg/ml untuk *L. adscendens* dan 10 mg/ml, 7 mg/ml, 4 mg/ml, dan 1 mg/ml untuk *E. prostrata* dimasukkan pada sumuran sebanyak 150 µl.
- Kontrol positif berisi suspensi bakteri 15 µl, media MHB 35 µl dan antibiotik 150 µl.
- Kontrol negatif berisi suspensi bakteri 15 µl, media MHB 35 µl dan akuades 150 µl.
- *Microplate* kemudian ditutup dengan *aluminium foil* dan plastik wrap dan inkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C.
- *Microplate* kemudian dilakukan pewarnaan dengan cara dicuci dengan akuades sebanyak 3 kali dan dikeringkan. Ditambahkan dengan etanol sebanyak 200 µl dibiarkan selama 3 menit dan dibuang. Selanjutnya ditambahkan dengan kristal violet sebanyak 200 µl dan didiamkan selama 20 menit lalu buang. Selanjutnya ditambahkan dengan asam asetat glasial sebanyak 200 µl dan diamkan selama 15 menit.
- Hasil dilakukan dengan membaca nilai OD menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 630 nm. Kemudian masukkan pada rumus perhitungan % inhibisi biofilm. Rumus perhitungan % inhibisi biofilm menurut Khaleghi (2019) yaitu :

$$\% \text{ inhibition} = \frac{\text{OD Kontrol} - \text{OD Sampel}}{\text{OD Kontrol}} \times 100\%$$

**b. Metode Cover slip**

Berikut prosedur metode *cover slip* dalam penelitian ini antara lain:

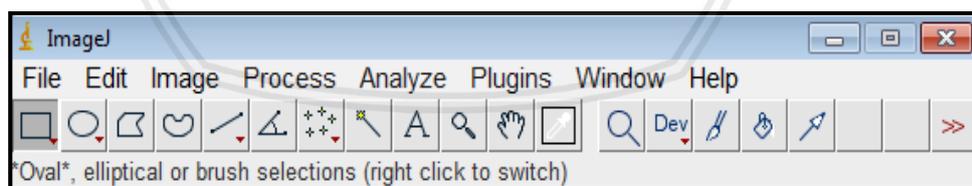
- *Mikrotube* 2 ml yang telah berisi *cover slip* steril disiapkan.

- Sampel perlakuan diambil dengan mikropipet untuk diteteskan hingga menyentuh ke dalam *cover slip* dan diinkubasi pada suhu 36°C selama 24 jam.
- Setelah diinkubasi kemudian membilas *cover glass* menggunakan PBS sebanyak 3 kali dan dikeringkan.
- *Cover slip* dilakukan pewarnaan dengan larutan kristal violet, diamkan selama 20 menit dan dikeringkan.
- *Cover slip* dibilas dengan larutan asam asetat 33%, diamkan 15 menit, dikeringkan.
- Hasil pewarnaan kemudian diamati di dalam mikroskop sebanyak 5 bidang dan diolah ke software Image-J untuk mengetahui visualisasi 3D.

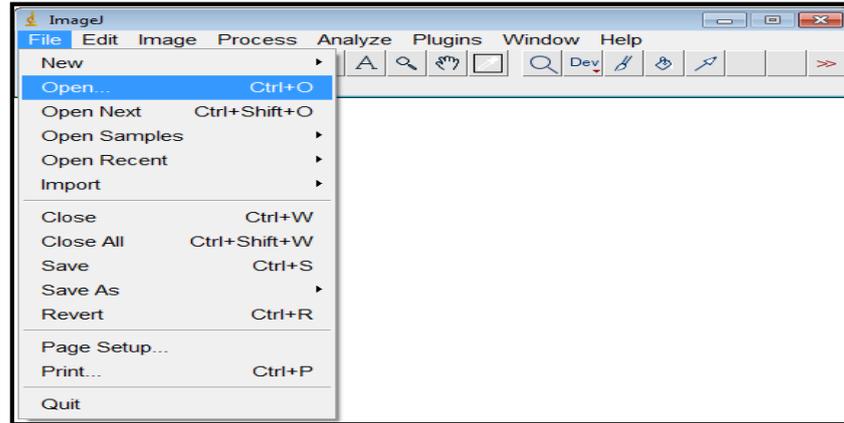
### c. Pengambilan Data

Berikut prosedur metode pengambilan data menggunakan software Image-J dalam penelitian ini antara lain:

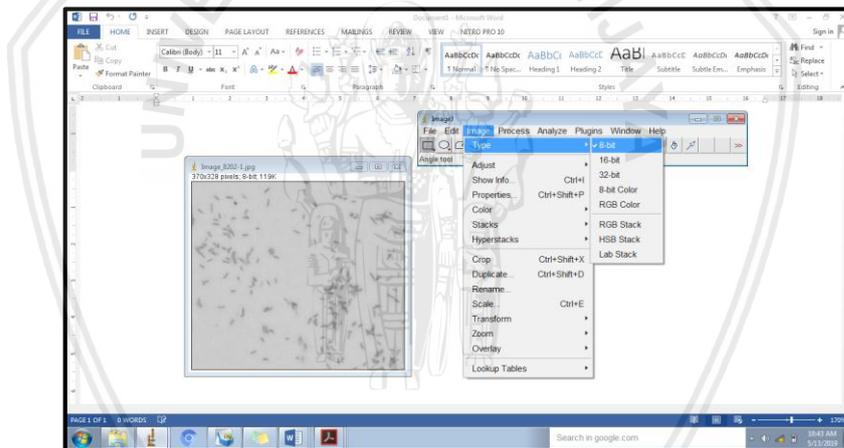
- Software Image-J didownload terlebih dahulu di <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.
- Setelah pengunduhan maka akan muncul tampilan awal.



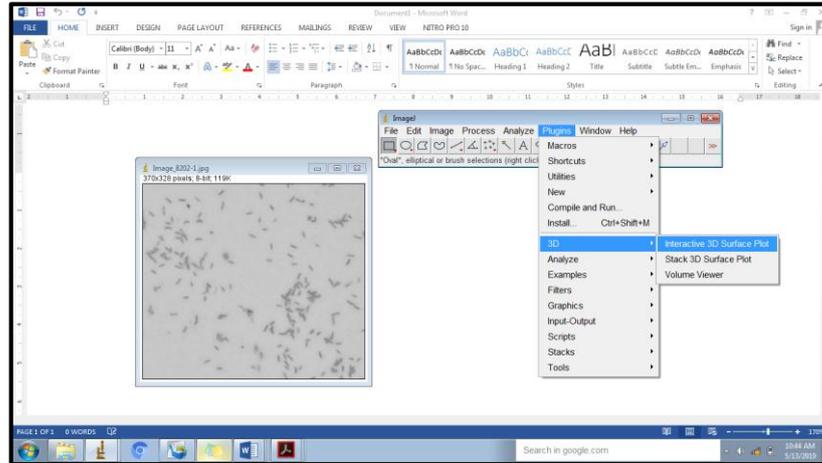
- Gambar yang akan dianalisis dipilah dengan cara memilih menu *File*, pilih *Open* (Ctrl+O) dan pilih gambar yang akan dipilih pada folder yang dituju.



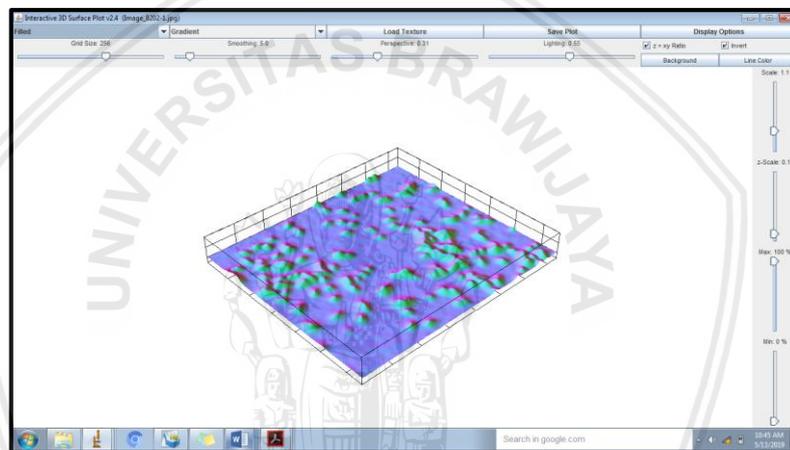
- Gambar yang telah dipilih merupakan hasil pemotretan yang *fullcolour* sehingga harus diubah dalam format *grayscale* dengan cara klik menu *Image*, pilih *Type*, klik 8 bit maka gambar akan berubah dalam format *grayscale*.



- Gambar dengan format *grayscale*, kemudian diubah menjadi 3D. Langkah yang dilakukan yaitu dengan pilih menu *Plugins*, kemudian pilih 3D dan klik *Interactive 3D Surface Plot*.



- Hasil visualisasi gambar 3D akan ditampilkan seperti berikut:



### 3.7 Parameter Uji

#### 3.7.1 Parameter Utama

Parameter utama dalam penelitian ini adalah parameter uji yang berupa hasil Uji Antibakteri, Uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*), Uji MBC (*Minimum Bacterisidal Concentration*), Uji Biofilm serta % inhibisi biofilm bakteri *A. hydrophila*.

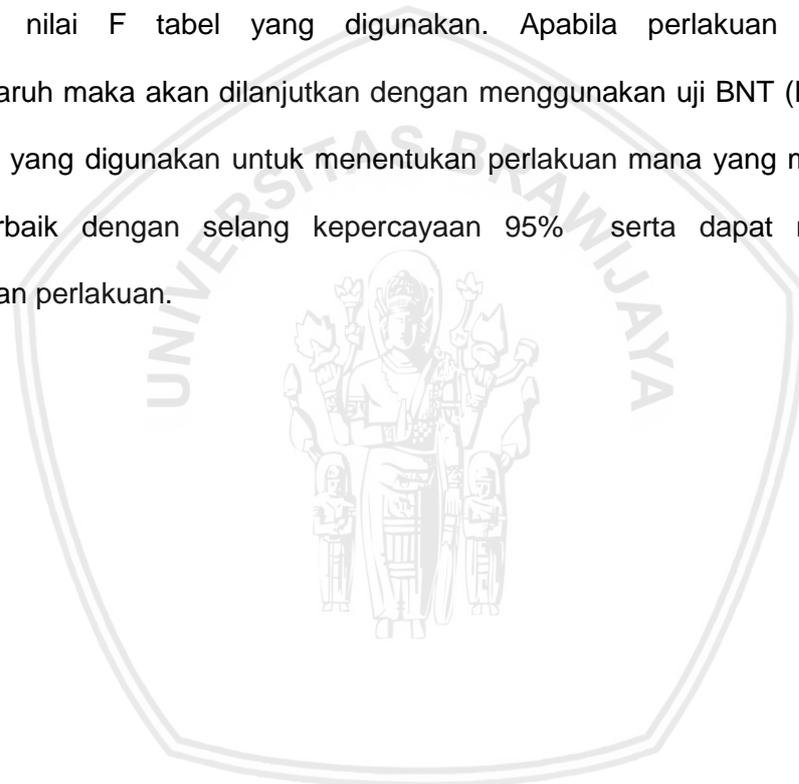
#### 3.7.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang pada penelitian ini yaitu TPC (*Total Plate Count*), suhu inkubasi serta panjang gelombang pada spektrofotometer yaitu 600 nm pada uji MIC dan 630 nm pada uji Biofilm.



### 3.8 Analisis Data

Data yang didapatkan selanjutnya akan dilakukan analisis secara statistik menggunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap. Data yang dilakukan analisis yaitu Uji Biofilm. Tujuan melakukan pengujian menggunakan analisis keragaman untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon dari parameter yang diujikan. Perlakuan dikatakan memberikan pengaruh apabila nilai F hitung melebihi nilai F tabel yang digunakan. Apabila perlakuan dinyatakan berpengaruh maka akan dilanjutkan dengan menggunakan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang digunakan untuk menentukan perlakuan mana yang memberikan hasil terbaik dengan selang kepercayaan 95% serta dapat mengetahui perbedaan perlakuan.



## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Ekstraksi Tanaman Air

Tanaman air yang digunakan telah diekstraksi di Fakultas Farmasi, Universitas Indonesia didapatkan hasil rendemen. Berat simplisia adalah berat kering dari tanaman air. Rendemen merupakan perbandingan jumlah ekstrak yang dihasilkan dari ekstraksi tanaman dengan berat simplisia. Hasil rendemen disajikan pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Hasil Rendemen

No	Tanaman	Berat Ekstrak (gr)	Berat Simplisia (gr)	Rendemen (%)
1	<i>L. adscendens</i> L. H. Hara	2,84	54,12	5
2	<i>E. prostrata</i> (L) L	2,04	67,17	3
3	<i>E. benthamii</i> C. B. Clarke	2,62	23,36	11

Tanaman air *L. adscendens* L. H. Hara didapatkan hasil rendemen sebesar 5% dengan berat simplisia 54,12 gr dan berat ekstrak 2,84 gr, *E. prostrata* (L) L sebesar 3% dengan berat simplisia 67,17 gr dan berat ekstrak 2,04 gr dan *E. benthamii* C. B. Clarke sebesar 11% dengan berat simplisia 23,36 gr dan berat ekstrak 2,62 gr. Tanaman air diekstraksi dengan pelarut etanol 70%. Etanol merupakan pelarut yang lebih efisien dalam menarik komponen polar hingga semi polar, sehingga semua senyawa yang terkandung dalam simplisia dapat terambil. Pelarut etanol juga mempunyai beberapa kelebihan yakni relatif tidak bersifat racun, tidak eksplosif bila bercampur dengan udara, tidak korosif, absorpsinya baik, panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit dan mudah didapatkan (Lestari, *et al.*, 2015).



Gambar 8. Ekstrak Kasar Tanaman Air

#### 4.2 Uji Antibakteri

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. Uji difusi disk dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (*clear zone*) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak/sampel. Antibakteri merupakan bahan yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Aktivitas antibakteri dibagi menjadi 2 macam yaitu aktivitas bakteriostatik (menghambat pertumbuhan tetapi tidak membunuh patogen) dan aktivitas bakterisidal (dapat membunuh patogen dalam kisaran luas) (Minarti, *et al.*, 2015). Syarat jumlah bakteri untuk uji antibakteri/sensitivitas yaitu  $10^5$  -  $10^8$  CFU/mL (Kusmayati dan Agustini, 2007).

Hasil zona hambat yang dihasilkan oleh tanaman air berupa zona bening. Efektivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar cakram. Larutan ekstrak kasar tanaman air digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi cakram Kirby-Bauer, yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba sesuai dengan konsentrasi perlakuan (Roihanah, *et al.*, 2013).

Konsentrasi dari 3 ekstrak kasar tanaman air adalah 100 mg/ml dan 200 mg/ml yang dilakukan 2 kali ulangan serta adanya kontrol negatif DMSO 5% dan

kontrol positif *chloramphenicol* 30 µg. Digunakannya konsentrasi tersebut berdasarkan hasil uji penelitian terdahulu dimana telah dapat menghambat bakteri. Kontrol positif Kloramfenikol adalah antibiotik spektrum luas yang efektif terhadap beberapa jenis bakteri dan kuman anaerob (Dian, *et al.*, 2015). Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan maka diperoleh hasil pengukuran zona hambat dengan diameter yang berbeda. Diameter zona hambat setiap perlakuan disajikan pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Hasil Pengukuran Zona Hambat

Tanaman	Perlakuan (mg/ml)	Ulangan		Total (mm)	Rata-rata (mm)
		1	2		
<i>L. adscendens</i>	100	5	4,7	9,7	4,85
	200	6,3	6	12,3	6,15
<i>E. prostrata</i>	100	3	3,3	6,3	3,15
	200	4,3	4,8	9,1	4,55
<i>E. benthamii</i>	100	2,3	2,3	4,6	2,3
	200	3	3,5	6,5	3,25

Rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan pada *L. adscendens* dengan konsentrasi 100 mg/ml sebesar 4,85 mm dan dengan konsentrasi 200 mg/ml sebesar 6,15 mm. Pada *E. prostrata* dengan konsentrasi 100 mg/ml sebesar 3,15 dan dengan konsentrasi 200 mg/ml sebesar 4,55 mm. Pada *E. benthamii* dengan konsentrasi 100 mg/ml sebesar 2,3 mm dan dengan konsentrasi 200 mg/ml sebesar 3,25 mm . Perlakuan kontrol DMSO 5% tidak terbentuk zona bening, sedangkan perlakuan kontrol positif zona hambat yang dihasilkan rerata sebesar 27 mm. Hasil yang didapatkan dari pengamatan zona hambat dapat diklasifikasikan berdasarkan kekuatan ekstrak dalam menghambat bakteri. Menurut Sambuaga, *et al.*, (2018), menyatakan bahwa klasifikasi baku respon hambat pertumbuhan bakteri ada lima, yang disajikan pada Tabel 6.

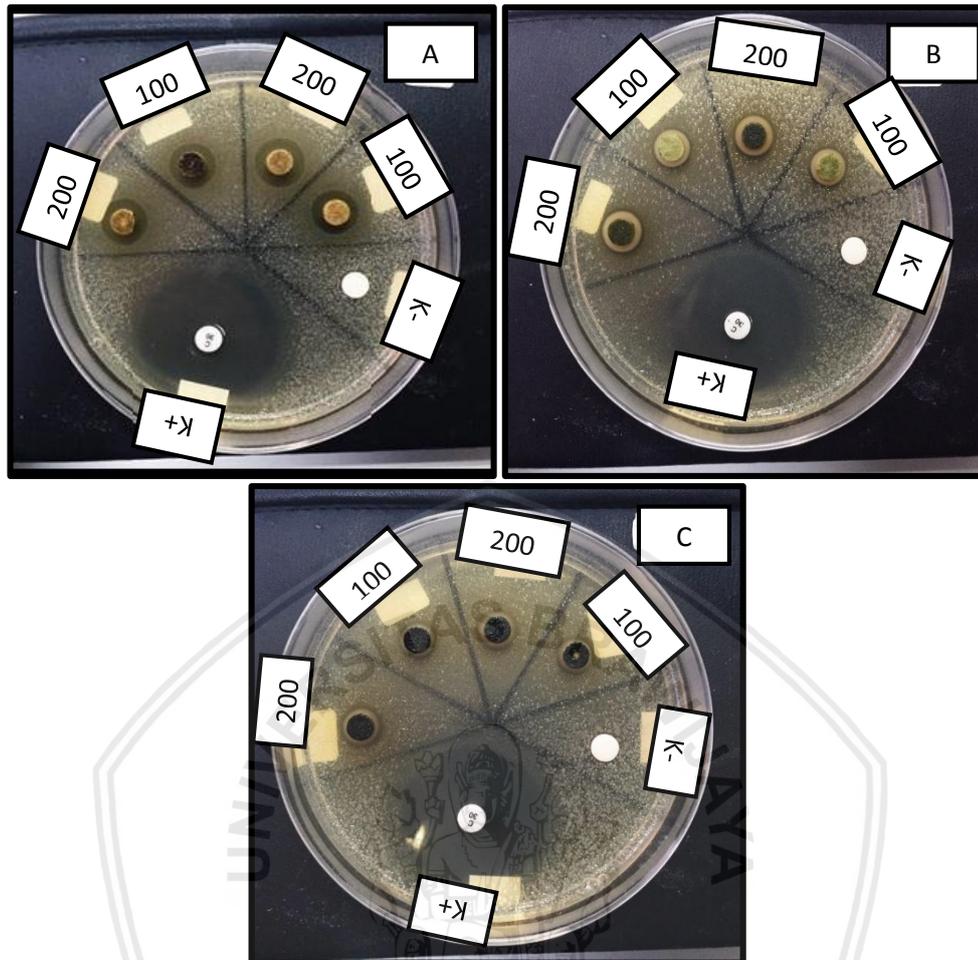
**Tabel 6.** Klasifikasi baku respon hambat pertumbuhan bakteri

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri
0	Tidak ada
< 5 mm	Lemah

<b>5 – 10 mm</b>	Sedang
<b>11 – 20 mm</b>	Kuat
<b>21 – 30 mm</b>	Sangat Kuat

Berdasarkan klasifikasi di atas, hasil penelitian mengenai zona hambat yang terbentuk pada *L. adscendens* dengan konsentrasi 100 mg/ml termasuk dalam respon hambatan kategori lemah dan konsentrasi 200 mg/ml termasuk dalam respon hambatan kategori sedang. Pada *E. prostrata* dengan konsentrasi 100 mg/ml termasuk dalam kategori lemah dan konsentrasi 200 mg/ml termasuk dalam kategori lemah. Pada *E. benthamii* dengan konsentrasi 100 mg/ml termasuk dalam kategori lemah dan konsentrasi 200 mg/ml termasuk dalam kategori lemah.

Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin banyak kandungan bahan aktif antibakterinya. Penambahan konsentrasi senyawa antibakteri diduga dapat meningkatkan penetrasi senyawa antibakteri ke bagian dalam sel mikroba yang akan merusak sistem metabolisme sel dan dapat mengakibatkan kematian sel. Pertumbuhan bakteri sebagian besar akan semakin menurun seiring dengan meningkatnya konsentrasi antibakteri yang ditambahkan. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka jumlah senyawa antibakteri yang dilepaskan semakin besar, sehingga mempermudah penetrasi senyawa tersebut ke dalam sel (Lingga, *et al.*, 2015). Ekstrak tanaman air yang didapat masih dalam bentuk ekstrak kasar sehingga perlu dilakukan pemurnian. Hasil zona hambat yang terbentuk setelah inkubasi 24 jam dari 2 perlakuan diantaranya pemberian konsentrasi 100 mg/ml dan 200 mg/ml beserta kontrol positif dan kontrol negatif disajikan pada Gambar 8.



**Gambar 9.** Zona Hambat (A) *L. adscendens* ; (B) *E. prostrata* (C) *E. benthamii*

Berdasarkan Tabel 5 dan Gambar 8 menunjukkan bahwa ekstrak kasar tanaman air kode dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*. Aktivitas antibakteri yang lebih besar ditunjukkan oleh ekstrak kasar tanaman air *L. adscendens* dan *E. prostrata* dari pada *E. benthamii*. Sehingga *L. adscendens* dan *E. prostrata* akan dilakukan uji lanjut. Sinergisme dari komponen fitokimia dalam ekstrak etanol diduga lebih mudah berdifusi dan mampu menghambat pertumbuhan bakteri, karena memiliki polaritas yang optimum. Suatu senyawa yang mempunyai polaritas yang optimum akan mempunyai aktivitas antimikroba maksimum (Lingga, *et al.*, 2016).

Senyawa antibakteri bekerja dengan cara berinteraksi dengan dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan juga

berdifusi ke dalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat (bakteriostatik) atau mati (bakteriosidal). Selain itu, senyawa antibakteri juga dapat menembus membran dan berinteraksi dengan material genetik sehingga bakteri mengalami mutasi (Roihanah, *et al.*, 2015).

#### **4.2 Uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*)**

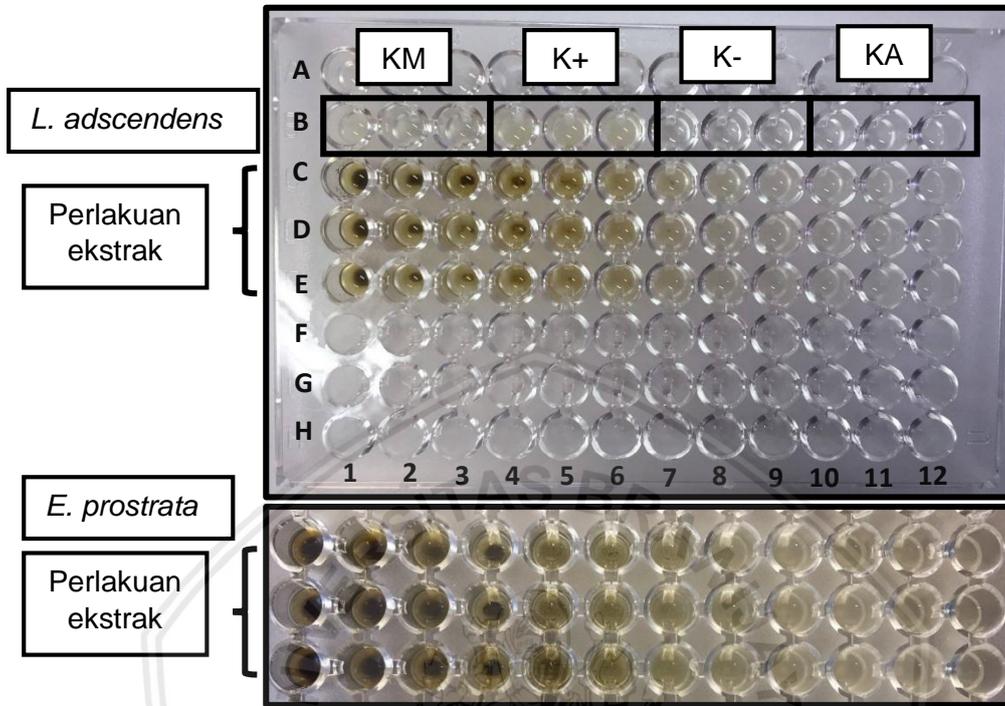
Uji MIC dilakukan apabila pada uji Kirby-bauer menunjukkan aktivitas antibakteri. Penentuan uji MIC atau KHM (Kadar Hambat Minimum) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terkecil ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri (Warnida, *et al.*, 2018).

Prosedur MIC yang dilakukan mempergunakan metode mikro dilusi yang kemudian diukur menggunakan Spektrofotometer. Microplate steril yang terdiri atas 12 kolom dan 8 baris wells dipersiapkan. Metode ini dapat memberikan hasil 30 kali lebih sensitif dibandingkan dengan metode difusi. Selain itu metode mikrodilusi dapat digunakan untuk analisis semikuantitatif hingga kuantitatif sehingga dapat menentukan MIC, tidak mahal, dan sampel yang digunakan relatif sedikit dibandingkan dengan metode makrodilusi (Aristyawan, *et al.*, 2017).

Hasil uji MIC yang diperoleh menunjukkan adanya perbedaan nilai *Optical Density* menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600 nm. Panjang gelombang yang dipakai untuk mengukur *Optical Density* dari jumlah mikroba yaitu 600 nm. Pada dasarnya 600 nm digunakan karena sel-sel menyerap pada panjang gelombang ini. Setelah diukur serapannya kemudian diinkubasi dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 24 jam, hal ini berguna untuk memaksimalkan pertumbuhan bakteri dengan cara menyamakan dengan habitat aslinya (Astutiningsih, *et al.*, 2014).

Nilai *Optical Density* pada penelitian ini diukur saat media telah diberikan perlakuan konsentrasi ekstrak kasar tanaman air dan suspensi bakteri. Nilai *Optical Density* dihitung sesudah inkubasi 24 jam pada suhu 30°C. Hasil uji MIC

ekstrak kasar tanaman air terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Gambar 9.



Gambar 10. Hasil Uji MIC

Keterangan :

Hasil uji MIC dari dosis tertinggi dari well nomor 1C sampai dosis terendah pada well nomor 12C dengan 3 kali ulangan pada well C, D dan E. Kemudian pada well 1B sampai 3B sebagai kontrol media, well 4B sampai 6B sebagai kontrol positif, well 7B sampai 9B sebagai kontrol negatif, dan well 10B sampai 12B sebagai kontrol antibiotik.

Hasil Uji MIC juga dapat dilihat dengan pengukuran nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer dan didapatkan hasil yang berbeda pada setiap perlakuan yang ditunjukkan pada Tabel 7.

**Tabel 7. Hasil Uji MIC Ekstrak Kasar Tanaman Air**

<i>L. adscendens</i>		<i>E. prostrata</i>	
Konsentrasi (mg/ml)	Optical Density	Konsentrasi (mg/ml)	Optical Density
200	3,587	100	-
100	2,050	50	3,513
50	1,085	25	2,526
25	0,678	12,5	2,242
12,5	0,479	6,25	0,916
6,25	0,261	3,125	0,528
3,125	0,663	1,562	0,392
1,562	0,640	0,781	0,634
0,781	0,554	0,390	1,115

0,390	0,691	0,195	1,379
0,195	0,885	0,097	1,100
0,097	1,071	0,048	1,009
K+	0,985	K+	1,121
K-	0,050	K-	0,133
KM	0,053	KM	0,057
KA	0,301	KA	0,365

Keterangan :

K+ : kontrol positif menggunakan media MHB dan suspensi bakteri *A. hydrophila*

K- : kontrol negatif menggunakan media MHB dan DMSO 5%

KM : kontrol media menggunakan 100% media MHB

KA : kontrol antibiotik menggunakan antibiotik *chloramphenicol* dengan konsentrasi 30 µg

Uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*) dilakukan dengan berbagai macam konsentrasi menggunakan ekstrak kasar tanaman air *L. adscendens* dan *E. prostrata* yang dilarutkan menggunakan akuades steril yang bertujuan untuk mengetahui konsentrasi terkecil dalam menghambat bakteri *A. hydrophila*. Pada penelitian ini dilakukan dengan menggunakan konsentrasi berbeda-beda sehingga didapatkan hasil yang berbeda pada setiap konsentrasinya.

Data MIC yang diperoleh dalam penelitian ini dengan kode tanaman air *L. adscendens* yaitu konsentrasi 6,25 mg/ml dengan nilai OD sebesar 0,261 dapat menghambat bakteri *A. hydrophila* karena nilai OD mendekati kontrol antibiotik sebesar 0,301. Pada tanaman air *E. prostrata* yaitu konsentrasi 1,562 mg/ml dengan nilai OD sebesar 0,392 dapat menghambat bakteri *A. hydrophila* karena nilai OD mendekati kontrol antibiotik sebesar 0,365. Maka dari konsentrasi tersebut dilakukan uji lanjutan yaitu Uji Biofilm untuk melihat kerusakan biofilm *A. hydrophila* karena ada senyawa antibakteri dari ekstrak tanaman air yang diuji dengan konsentrasi yang rangenya lebih kecil yaitu 12 mg/ml, 9 mg/ml, 6 mg/ml dan 3 mg/ml pada *L. adscendens* dan 10 mg/ml, 7 mg/ml, 4 mg/ml dan 1 mg/ml pada *E. prostrata* karena dimungkinkan dengan konsentrasi yang rangenya lebih kecil tersebut dapat merusak biofilm bakteri *A. hydrophila* sehingga didapatkan konsentrasi minimum yang dapat merusak biofilm bakteri *A. hydrophila*.

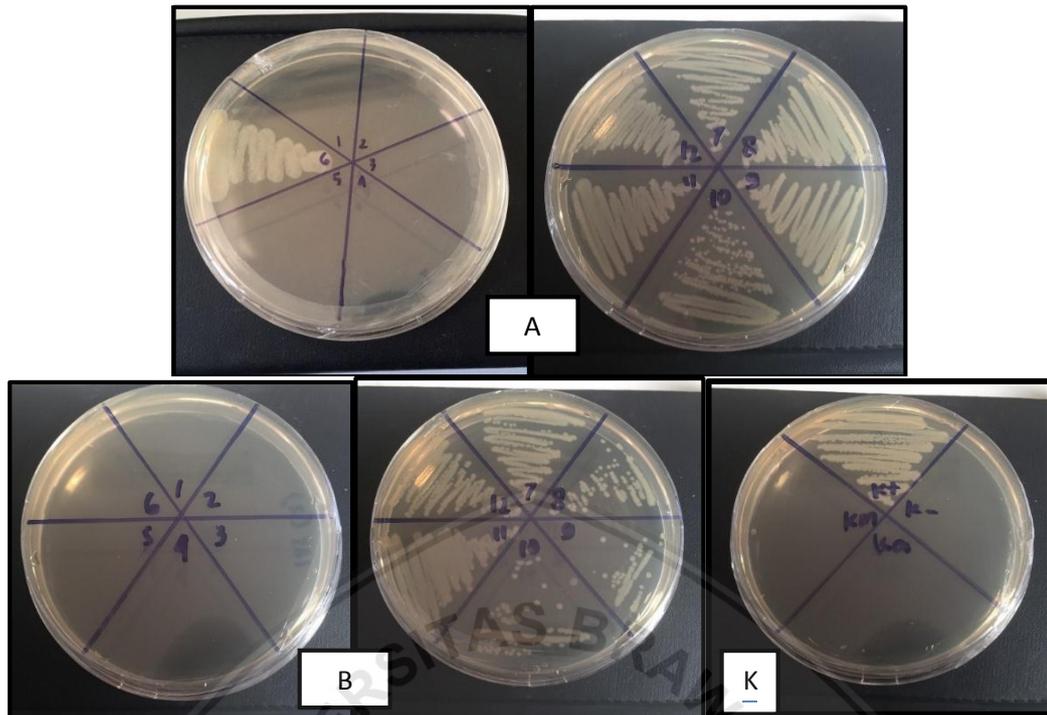
Semakin tinggi konsentrasi ekstrak semakin tinggi nilai OD. Jika konsentrasi rendah maka nilai OD juga rendah. Hal ini menunjukkan bahwa nilai OD berbanding lurus dengan masing-masing konsentrasi ekstrak. Jika selisih nilai OD antara konsentrasi ekstrak yang telah diinokulasi bakteri mendekati kontrol positif maka, konsentrasi ekstrak dianggap mampu menghambat pertumbuhan *A. hydrophila* (Assidqi, *et al.*, 2012).

#### 4.3 Uji MBC (*Minimum Bactericidal Concentration*)

MBC atau kadar Bunuh Minimum (KBM) didefinisikan sebagai konsentrasi terendah yang mampu membunuh seluruh pertumbuhan bakteri dan ditetapkan pada konsentrasi yang memberikan zona jernih tanpa pertumbuhan mikroba pada media Agar dengan pengamatan secara visual (Efendi dan Hertiani, 2013).

Penentuan nilai MBC dilakukan dengan metode dilusi padat dilanjutkan dengan uji penegasan. Uji penegasan dilakukan dengan menggosokkan pada permukaan media kemudian dilakukan *streak plate* pada media secara zig-zag dan diinkubasi selama 24 jam. Bila masih terdapat pertumbuhan bakteri di sekitar goresan *streak plate* maka menunjukkan MIC, sedangkan bila tidak terdapat pertumbuhan bakteri di sekitar goresan *streak plate* maka menunjukkan MBC (Warnida, *et al.*, 2018).

Pada penelitian ini nilai MBC dengan kepadatan bakteri *A. hydrophila*  $10^6$  CFU/ml pada *L. adscendens* yaitu pada pengenceran ke-5 dengan konsentrasi 12,5 mg/ml, sedangkan pada *E. prostrata* yaitu pada pengenceran ke-6 dengan konsentrasi 3,125 mg/ml. Hasil uji MBC ekstrak kasar tanaman air terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* disajikan pada Gambar 10.



**Gambar 11.** Hasil Uji MBC (A) *L. adscendens*; (B) *E. prostrata*

Keterangan :

Hasil MBC dengan konsentrasi tertinggi ke konsentrasi terendah dari nomor 1 sampai nomor 12 serta kontrol positif, kontrol negatif, kontrol media dan kontrol antibiotik.

Pada ekstrak tanaman air *L. adscendens* konsentrasi 200 mg/ml sampai konsentrasi 12,5 mg/ml tidak terdapat pertumbuhan bakteri Gambar A(1-5). Pada konsentrasi 6,25 mg/ml sampai 0,09765 mg/ml terlihat adanya pertumbuhan bakteri Gambar A(6-12). Sedangkan pada kode ekstrak tanaman air *E. prostrata* konsentrasi 100 mg/ml sampai konsentrasi 3,125 mg/ml tidak terdapat pertumbuhan bakteri Gambar B(1-6). Pada konsentrasi 1,56 mg/ml sampai 0,048 mg/ml terlihat adanya pertumbuhan bakteri Gambar B(7-12). Berdasarkan hasil penelitian dengan memperlihatkan pertumbuhan bakteri, dapat diketahui bahwa *L. adscendens* konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat bakteri yaitu 6,25 mg/ml, sedangkan konsentrasi yang dapat membunuh bakteri yaitu 12,5 mg/ml. Sedangkan *E. prostrata* konsentrasi ekstrak yang dapat menghambat bakteri yaitu 1,56 mg/ml dan konsentrasi yang dapat membunuh bakteri yaitu 3,125 mg/ml.

Semakin tinggi konsentrasi antibakteri yang digunakan maka akan semakin cepat bakteri mengalami kematian. Tetapi, penggunaan konsentrasi yang tinggi dalam pengobatan juga tidak dianjurkan karena disamping menimbulkan resistensi, penggunaan konsentrasi yang tinggi dapat bersifat toksik pada hospes (ikan) serta kurang ekonomis dalam pemakaiannya (Kusdarwati, *et al.* 2010).

#### 4.4 Uji Biofilm

Uji aktivitas antibiofilm dapat dilakukan dengan uji penghambatan dan degradasi biofilm. Metode pengujian yang digunakan adalah metode *microtiter* assay dengan pewarnaan kristal violet. Uji degradasi biofilm dilakukan dengan pembentukan biofilm pada *microplate* terlebih dahulu. Pengamatan aktivitas antibiofilm didasarkan pada besarnya penghambatan dan degradasi yang dinilai dari besarnya nilai OD (*Optical Density*) (Ulyah, *et al.*, 2015).

##### a. *L. adscendens* L. H. Hara

Nilai *Optical Density* biofilm ekstrak kasar tanaman air *L. adscendens* terhadap *A. hydrophila* dengan konsentrasi berbeda didapatkan nilai *Optical Density* menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 630 nm disajikan pada Tabel 8.

**Tabel 8.** Hasil *Optical Density* ekstrak tanaman *L. adscendens* pada *A. hydrophila*

Perlakuan (mg/ml)	Ulangan			Total	Rerata	SD
	1	2	3			
A = 3	0,300	0,275	0,335	0,910	0,304	± 0,030
B = 6	0,287	0,285	0,261	0,833	0,277	± 0,014
C = 9	0,219	0,269	0,294	0,782	0,260	± 0,038
D = 12	0,115	0,116	0,149	0,380	0,126	± 0,019
	<b>Total</b>			<b>2,905</b>		

Kemudian untuk mengetahui pengaruh perlakuan ekstrak tanaman air terhadap *A. hydrophila* terhadap penghambatan biofilm, maka dilakukan analisis sumber keragaman. Berikut adalah tabel analisa sumber keragaman yang

disajikan pada Tabel 9 dan hasil perhitungan analisa sumber keragaman disajikan pada Lampiran 6.

**Tabel 9.** Analisa Sumber Keragaman

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,056	0,019	19,00**	4,07	7,59
Acak	8	0,006	0,001			
Total	11	0,062	0,006			

Keterangan : \*\*) : berbeda sangat nyata

Hasil analisa sumber keragaman diatas menunjukkan bahwa nilai F Hitung sebesar 24,889 dimana lebih besar dibandingkan dengan nilai F tabel 5% dan nilai F tabel 1%. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar tanaman *L. adscendens* berpengaruh sangat nyata terhadap *A. hydrophila*. Untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) yang disajikan pada Tabel 10.

**Tabel 10.** Hasil Uji Beda Nyata Terkecil

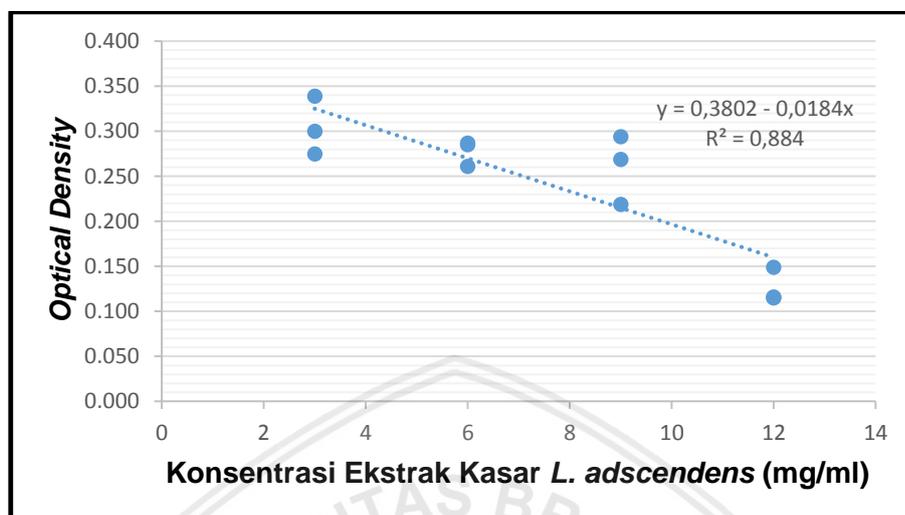
Rerata Perlakuan	D 0,126	C 0,260	B 0,277	A 0,304	Notasi
D = 0,126	-	-	-	-	a
C = 0,260	0,134**	-	-	-	b
B = 0,277	0,151**	0,017 <sup>ns</sup>	-	-	b
A = 0,304	0,178**	0,044 <sup>ns</sup>	0,027 <sup>ns</sup>	-	b

Keterangan : ns) : tidak berbeda nyata

\*\*) : berbeda sangat nyata

Pada Tabel 10 uji BNT dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak kasar tanaman air *L. adscendens* berpengaruh terhadap bakteri *A. hydrophila*. Pada tabel diatas menunjukkan bahwa perlakuan C berbeda sangat nyata dengan perlakuan D. Perlakuan B berbeda sangat nyata dengan perlakuan D, tetapi perlakuan B tidak berbeda sangat nyata dengan perlakuan C. Perlakuan A berbeda sangat nyata dengan perlakuan D, tetapi perlakuan A tidak berbeda sangat nyata dengan perlakuan B dan C. Kemudian berdasarkan hasil penelitian

didapatkan grafik regresi uji biofilm dengan berbagai perlakuan yang disajikan pada Gambar 12.



**Gambar 12.** Hubungan antara konsentrasi dan *Optical Density*

Berdasarkan Gambar 12 dapat dilihat hubungan antara pemberian konsentrasi berbeda ekstrak kasar tanaman air *L. adscendens* terhadap penghambatan biofilm menunjukkan pola linier dengan persamaan  $y = 0,3802 - 0,0184x$  dan koefisien  $R^2 = 0,884$ .

**b. *E. Prostrata* (L) L**

Nilai *Optical Density* biofilm ekstrak kasar tanaman air *E. prostrata* terhadap *A. hydrophila* dengan konsentrasi berbeda didapatkan nilai *Optical Density* menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 630 nm disajikan pada Tabel 11.

**Tabel 11.** Nilai *Optical Density* ekstrak tanaman *E. prostrata* pada *A. hydrophila*

Perlakuan (mg/ml)	Ulangan			Total	Rerata	SD
	1	2	3			
<b>A = 1</b>	0,342	0,359	0,357	1,058	0,352	±0,009
<b>B = 4</b>	0,315	0,305	0,321	0,941	0,313	±0,008
<b>C = 7</b>	0,293	0,288	0,265	0,846	0,282	±0,014
<b>D = 10</b>	0,238	0,243	0,248	0,729	0,243	±0,005
<b>Total</b>				3,574		

Kemudian untuk mengetahui pengaruh perlakuan ekstrak tanaman air terhadap *A. hydrophila* terhadap penghambatan biofilm, maka dilakukan analisis

sumber keragaman. Berikut adalah tabel analisa sumber keragaman yang disajikan pada Tabel 12 dan hasil perhitungan analisa sumber keragaman disajikan pada Lampiran 5.

**Tabel 12.** Analisa Sumber Keragaman

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,0195	0,0065	65,000**	4,07	7,59
Acak	8	0,0008	0,0001			
Total	11	0,0203	0,0018			

Keterangan : \*\*) : berbeda sangat nyata

Hasil analisa sumber keragaman diatas menunjukkan bahwa nilai F Hitung sebesar 65,000 dimana lebih besar dibandingkan dengan nilai F tabel 5% dan nilai F tabel 1%. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar tanaman *E. prostrata* berpengaruh sangat nyata terhadap *A. hydrophila*. Untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) yang disajikan pada Tabel 13.

**Tabel 13.** Hasil Uji Beda Nyata Terkecil

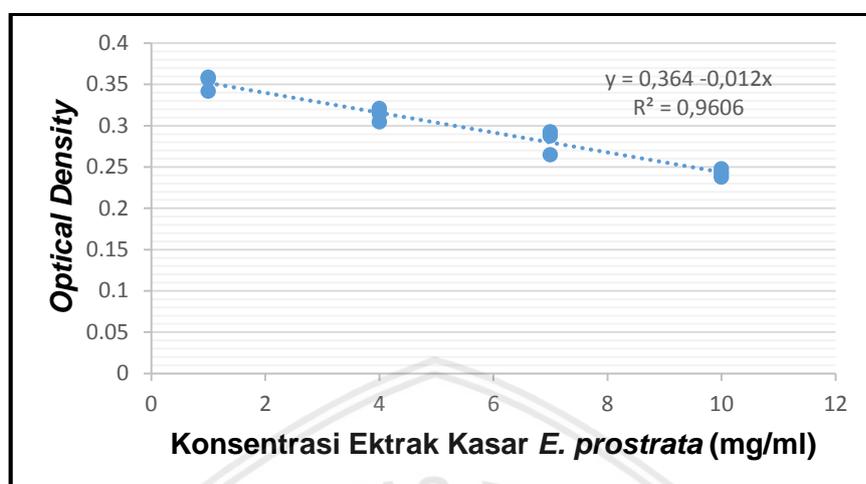
Rerata perlakuan	D 0,243	C 0,282	B 0,313	A 0,352	Notasi
D = 0,243	-	-	-	-	a
C = 0,282	0,039 <sup>ns</sup>	-	-	-	ab
B = 0,313	0,274**	0,031 <sup>ns</sup>	-	-	b
A = 0,352	0,109**	0,070 <sup>ns</sup>	0,039 <sup>ns</sup>	-	b

Keterangan : ns) : tidak berbeda nyata

\*\*) : berbeda sangat nyata

Pada Tabel 13 uji BNT dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak kasar tanaman air *E. prostrata* berpengaruh terhadap bakteri *A. hydrophila*. Pada tabel diatas menunjukkan bahwa perlakuan C tidak berbeda sangat nyata dengan perlakuan D. Perlakuan B berbeda sangat nyata dengan perlakuan D, tetapi perlakuan B tidak berbeda sangat nyata dengan perlakuan C. Perlakuan A berbeda sangat nyata dengan perlakuan D, tetapi perlakuan A tidak berbeda sangat nyata dengan perlakuan B. Kemudian berdasarkan hasil penelitian

didapatkan grafik regresi uji biofilm dengan berbagai perlakuan yang disajikan pada Gambar 13.



**Gambar 13.** Hubungan antara konsentrasi dan *Optical Density*

Berdasarkan Gambar 13 dapat dilihat hubungan antara pemberian konsentrasi berbeda ekstrak kasar tanaman air *E. prostrata* terhadap penghambatan biofilm menunjukkan pola linier dengan persamaan  $y = 0,364 - 0,012x$  dan koefisien  $R^2 = 0,9606$ . Pengujian koefisien determinasi ( $R^2$ ) bertujuan untuk mengetahui seberapa besar kemampuan variabel bebas menjelaskan variabel terikat (Suwati, 2013).

Biofilm terbentuk dari koloni bakteri, proses pembentukan dan maturasi biofilm masih belum diketahui, tidak ada mekanisme pengaturan ukuran koloni bakteri dan spesies. Biofilm biasanya terbentuk diatas permukaan yang tergenang dalam suatu cairan dan biasanya tahan terhadap antibiotik, desinfektan dan cairan pembersih. Biofilm sedikit peka terhadap bahan antimikrobia, pada saat komunitas mikroba tidak dapat meningkatkan kemampuan patogenitas (sinergis patogenitas) (Fatmawati, 2011).

#### 4.5 Persentase Inhibisi

Konsentrasi ekstrak kasar tanaman air *L. adscendens* pada Uji Biofilm adalah 3 mg/ml (P1), 6 mg/ml (P2), 9 mg/ml (P3) dan 12 mg/ml (P4). *E. prostrata*

adalah 1 mg/ml (P1), 4 mg/ml (P2), 7 mg/ml (P3), dan 10 mg/ml (P4). Masing-masing perlakuan konsentrasi dilakukan 3 kali pengulangan. Untuk kontrol positif yaitu dengan menggunakan antibiotik *cloramphenicol* dan kontrol negatif dengan menggunakan akuades. Hasil nilai *Optical Density* diukur menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 630 nm. Nilai % Inhibisi didapatkan dari nilai OD Kontrol negatif dikurangi dengan OD masing-masing perlakuan. Nilai *Optical Density* disajikan pada Tabel 14.

**Tabel 14.** Nilai *Optical Density* ekstrak kasar tanaman air terhadap *A. hydrophila*

Tanaman	Ulangan	Perlakuan					
		K-	K+	P1	P2	P3	P4
<i>L. adscendens</i>	1	0,376	0,064	0,300	0,287	0,219	0,115
	2	0,353	0,062	0,275	0,285	0,269	0,116
	3	0,343	0,062	0,335	0,261	0,294	0,149
	<b>Total</b>	1,072	0,188	0,910	0,833	0,782	0,380
	<b>Rerata</b>	0,357	0,062	0,304	0,277	0,260	0,126
<i>E. prostrata</i>	1	0,387	0,085	0,342	0,315	0,293	0,238
	2	0,385	0,071	0,359	0,305	0,288	0,243
	3	0,381	0,097	0,357	0,321	0,265	0,248
	<b>Total</b>	1.153	0,253	1,058	0,941	0,846	0,729
	<b>Rerata</b>	0,384	0,084	0,352	0,313	0,282	0,243

Dari tabel diatas dapat diketahui semakin tinggi konsentrasi ekstrak kasar tanaman air maka nilai OD yang dihasilkan semakin rendah dan % inhibisi semakin tinggi. Hal ini menunjukkan bahwa nilai OD berbanding terbalik dengan % inhibisi. Hasil data yang diperoleh nilai OD dari Tabel 14 yang digunakan untuk mengetahui persentase inhibisi biofilm pada setiap perlakuan. Data OD digunakan dalam perhitungan % inhibisi dengan rumus =  $(\text{OD kontrol negatif} - \text{OD sampel} / \text{OD kontrol negatif}) \times 100\%$ . Persentase inhibisi ekstrak kasar tanaman air terhadap *A. hydrophila* disajikan pada Tabel 15.

**Tabel 15.** Persentase Inhibisi Ekstrak Kasar Tanaman Air pada *A. hydrophila* (%)

Tanaman	Ulangan	Perlakuan					
		K-	K+	P1	P2	P3	P4
<i>L. adscendens</i>	1	0	82	20	23	41	69
	2	0	82	22	19	22	67
	3	0	81	2	23	14	56
	<b>Total</b>	0	245	44	65	77	192



	<b>Rerata</b>	0	81	14	21	25	64
	1	0	78	11	18	24	38
	2	0	81	6	20	25	36
<b><i>E. prostrata</i></b>	3	0	74	6	15	30	34
	<b>Total</b>	0	233	23	33	79	108
	<b>Rerata</b>	0	77	7	17	26	36

Hasil persentase inhibisi biofilm *A. hydrophila* menunjukkan bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin besar pula kerusakan biofilm, sehingga nilai konsentrasi dan % inhibisi berbanding lurus. Pada perlakuan kontrol negatif tidak terjadi aktivitas kerusakan biofilm. Hal ini menunjukkan bahwa biofilm tidak mengalami kerusakan.

Tanaman air *L. adscendens* nilai % inhibisi terbesar yaitu pada konsentrasi 12 mg/ml sebesar 64% dan terendah pada konsentrasi 3 mg/ml yaitu sebesar 14 %. Tanaman air *E. prostrata* nilai % inhibisi terbesar yaitu pada konsentrasi 10 mg/ml sebesar 36% dan terendah pada konsentrasi 1 mg/ml yaitu sebesar 7 %. Sehingga tanaman air *E. prostrata* lebih efektif daripada *L. adscendens* karena dengan konsentrasi 10 mg/ml sudah dapat membentuk biofilm sebesar 36%.

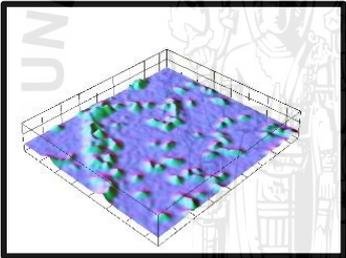
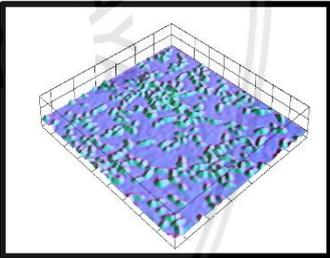
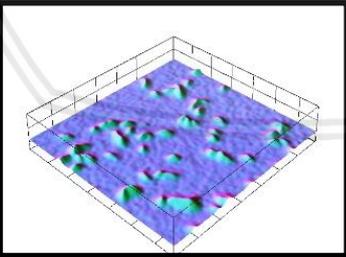
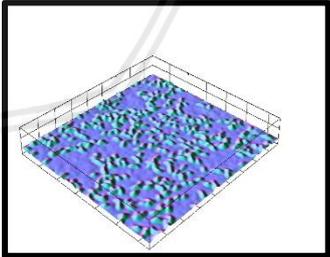
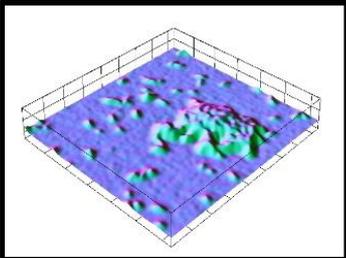
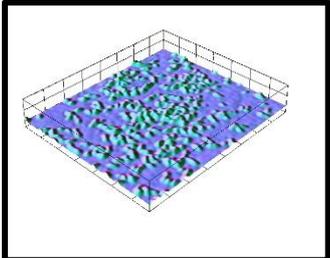
Semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin kecil rerata OD biofilm. Hal ini diperkirakan karena, semakin besar konsentrasi yang digunakan, maka kandungan senyawa antibakteri yang terdapat dalam ekstrak tersebut semakin besar. Saponin, alkaloid, terpenoid, dan tannin memiliki kemampuan dalam mengganggu integritas membran sel bakteri sehingga dapat menyebabkan lisisnya sel bakteri. Dengan lisisnya sel bakteri tersebut, diharapkan tidak terjadi pembentukan biofilm. Senyawa tannin memiliki kemampuan secara langsung dalam menghambat pembentukan biofilm dengan cara menghambat produksi enzim, mengganggu reaksi enzimatik dan menurunkan ion kalsium yang berperan dalam proses koagulasi plasma. Dimana proses koagulasi plasma ini dibutuhkan oleh bakteri untuk membentuk biofilm. Dengan adanya tannin, proses

koagulasi plasma akan terhambat sehingga diharapkan tidak terjadi pembentukan biofilm (Rachmawati, *et al.*, 2015).

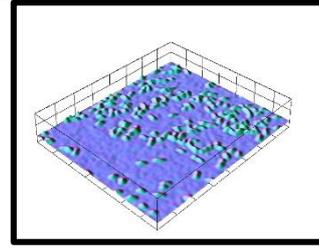
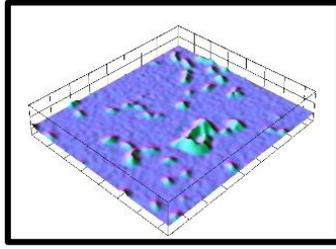
#### 4.6 Uji Visualisasi 3 Dimensi (3D)

Visualisasi 3 dimensi (3D) dilakukan setelah mengetahui nilai inhibisi. Hal ini dilakukan untuk mengetahui bentukan biofilm yang dihasilkan. Penampilan visual 3D dengan menggunakan software *Image-J*. Pada tanaman air *L. adscendens* menggunakan konsentrasi A (3mg/ml), B (6mg/ml), C (9mg/ml), dan D (12mg/ml). Pada tanaman air *E. prostrata* menggunakan konsentrasi A (1mg/ml), B (4mg/ml), C (7mg/ml), dan D (10mg/ml). Hasil dari visualisasi 3D disajikan pada Tabel 16.

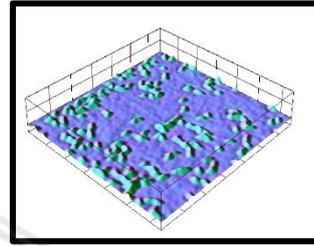
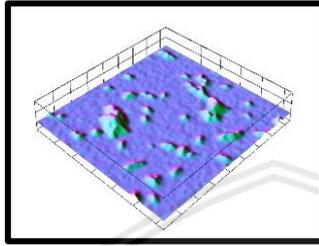
**Tabel 16.** Visualisasi 3 Dimensi

Perlakuan	<i>L. adscendens</i> L. H. Hara	<i>E. prostrata</i> (L). L
A1		
A2		
A3		

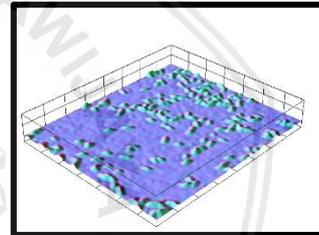
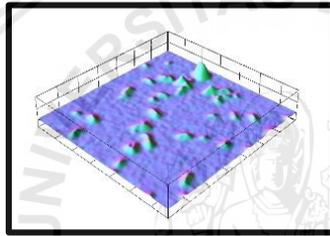
B1



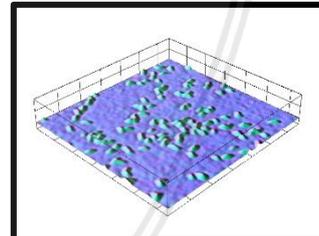
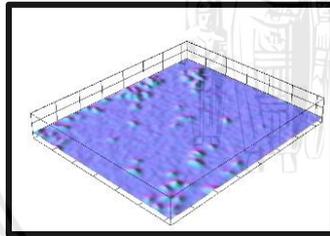
B2



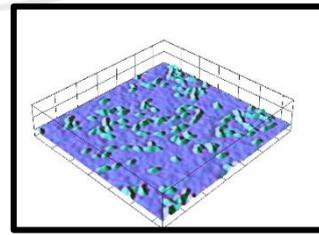
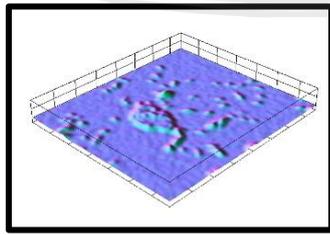
B3



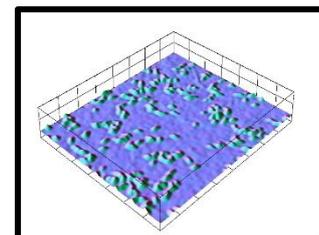
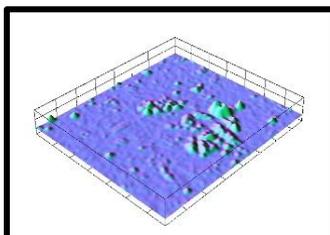
C1



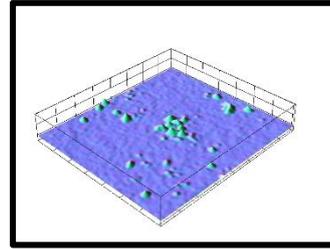
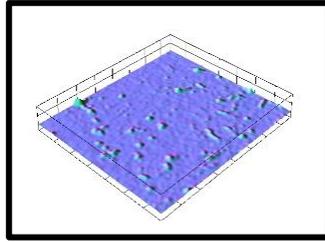
C2



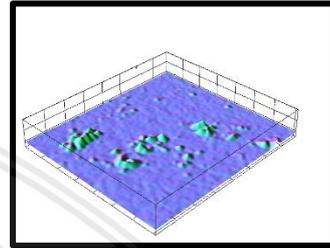
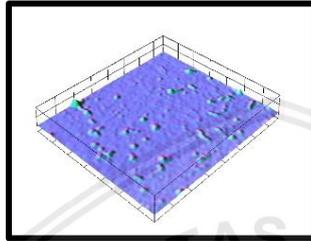
C3



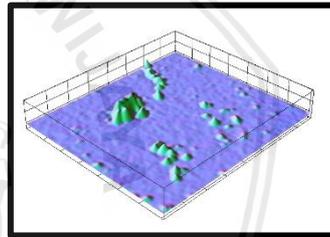
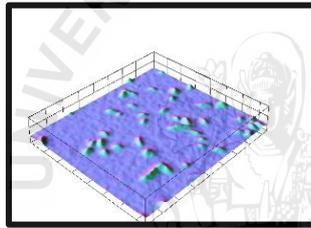
D1



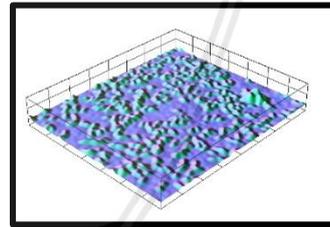
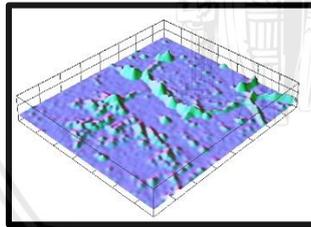
D2



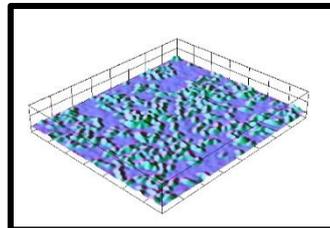
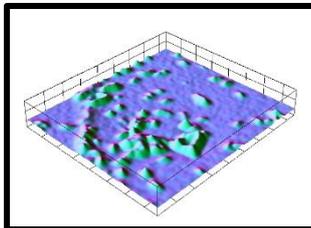
D3

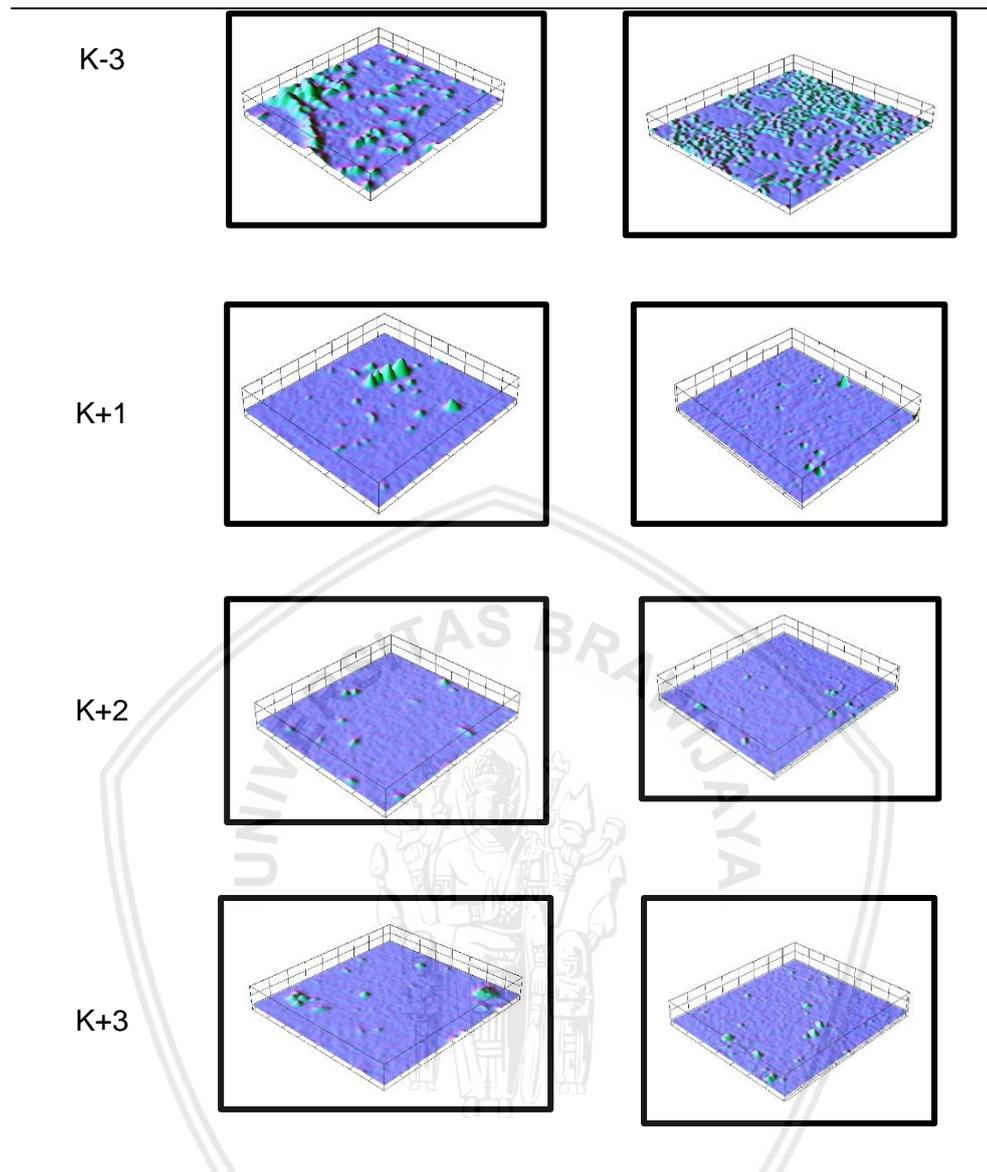


K-1



K-2





Berdasarkan Tabel 16 menunjukkan hasil visualisai 3D biofilm bakteri *A. hydrophila* menggunakan software *Imagej*. Berdasarkan Tabel 16 dapat diketahui bahwa semakin sedikit bukit yang terbentuk pada gambar maka menunjukkan semakin besar kerusakan biofilm yang dihasilkan. Namun apabila semakin banyak bukit yang terbentuk maka menunjukkan semakin kecil kerusakan biofilm yang dihasilkan. Bukit berwarna hijau menunjukkan besarnya tutupan biofilm pada suatu substrat. Dari gambar visualisasi 3D diketahui bahwa tutupan biofilm terluas secara berurutan pada tanaman air *L. adscendens* yaitu pada perlakuan

kontrol negatif (tanpa perlakuan ekstrak), perlakuan A (3mg/ml), perlakuan B (6mg/ml), perlakuan C (9mg/ml), perlakuan D (12mg/ml), dan perlakuan kontrol (dengan pemberian antibiotik). Pada tanaman air *E. prostrata* tutupan biofilm terluas secara berurutan yaitu pada perlakuan kontrol negatif (tanpa perlakuan ekstrak), perlakuan A (1mg/ml), perlakuan B (4mg/ml), perlakuan C (7mg/ml), perlakuan D (10mg/ml), dan kontrol positif (dengan pemberian antibiotik).

Menurut Prihanto, *et al.*, (2015), metode penghitungan dan penyajian biofilm dalam bentuk tiga dimensi (3D) menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM), *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM) yang dilanjutkan dengan menganalisisnya dengan software berbayar adalah cara yang umum untuk pengujian biofilm. Metode tersebut menghasilkan visualisasi yang baik tetapi metode-metode tersebut tergolong mahal, membutuhkan proses preparasi sampel yang lama serta mempunyai kelemahan pada penetrasi sampel yang disebabkan karena sampel dalam kondisi kering sehingga dikhawatirkan dapat mengacaukan hasil analisis sebagai akibat dari penyusutan biofilm. *Image-J*, adalah software pemrosesan gambar yang dapat diunduh secara gratis dari "National Institute of Health", USA. Software ini dapat digunakan untuk menganalisis berbagai gambar yang berhubungan dengan gambar analisis di bidang biologi molekuler seperti western blotting dan PCR band.

## 5. PENUTUP

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai Uji Antibakteri dan Biofilm Ekstrak Kasar *L. adscendens* L. H. Hara, *E. prostrata* (L). L, dan *E. benthamii* C. B. Clarke terhadap Bakteri *A. hydrophila* dapat disimpulkan sebagai berikut :

- Pemberian ekstrak kasar tanaman berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila*. Uji Antibakteri hasil terbaik yaitu pada ekstrak tanaman *L. adscendnes* L. H. Hara yaitu sebesar 4,85 mm pada konsentrasi 100 mg/ml dan 6,15 mm pada konsentrasi 200 mg/ml. Pada uji MIC hasil yang diperoleh yaitu tanaman *L. adscendens* L. H. Hara pada kosentrasi 6,25 mg/ml dan tanaman *E. prostrata* pada konsentrasi 1,562 mg/ml.
- Pada pembentukan biofilm diketahui perlakuan terbaik yaitu tanaman *L. adscendens* L. H. Hara pada kosentrasi 12 mg/ml dengan persentase inhibisi sebesar 64 %. Sedangkan tanaman *E. prostrata* pada kosentrasi 10 mg/ml dengan persentase inhibisi sebesar 36 %. Sehingga *E. prostrata* lebih efektif daripada *L. adscendens* karena dengan konsentrasi 10 mg/ml dapat menghambat biofilm sebesar 36%.

### 5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan untuk penelitian ini yaitu dengan adanya penelitian lanjutan yaitu uji fitokimia untuk mengetahui kandungan senyawa bioktif pada tanaman dan uji potensi tanaman air tersebut terhadap pengaruh lebih lanjut ke hewan uji.

## DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E., E. Liviawaty, Z. Jamaris dan Hendi. 2015. Penyakit Ikan. Penebar Swadaya. Jakarta. 226 hlm.
- Ahmed, F., M. S. T. Selim dan J. A. Shilpi. 2005. Antibacterial activity of *Ludwigia adscendens*. *Fitoterapia*. **76**: 473-475.
- Al-Snafi, A. E. 2018. Constituents and pharmacological importance of *Jussiaea repens*- a review. *IAJPS*. **5**(4): 2206-2212.
- Alvita, L. R., S. Falah dan N. Nurhidayat. 2016. Aktivitas Ekstrak Air Daun Pepaya sebagai Antibiofilm terhadap *Escherichia coli*. *Curret Biochemistry*. **2**(3): 164-175.
- Amalia, S., S. Wahdaningsih dan E. K. Untari. 2014. Uji aktivitas antibakteri fraksi n-heksan kulit buah naga merah (*Hylocereus polyrhizus britton & rose*) terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. *Jurnal Fitofarmaka Indonesia*. **1**(2): 61-64.
- Anggraini, R., D. Aliza dan S. Mellisa. 2016. Identifikasi Bakteri *Aeromonas hydrophila* dengan Uji Mikrobiologi pada Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) yang di Budidayakan di Kecamatan Baitussalam Kabupaten Aceh Besar. *Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kelautan dan Perikanan Unsyiah*. **1**(2):270-286.
- Aristyawan, A. D., N. E. Sugijanto dan Suciati. 2017. Potensi antibakteri dari ekstrak etanol spons *Agelas cavernosa*. *Jurnal Faramasi dan Ilmu Kefarmasian Indonesia*. **4**(1): 39-43.
- Astutiningsih, C., W. Setyani dan H. Hindratna. 2014. Uji daya antibakteri dan identifikasi isolat senyawa katekin dari daun teh (*Camellia sinensis*L. var *assamica*). *Jurnal Farmasi Sains dan Komunitas*. **11**(2): 50-57.
- Assidqi, K., W. Tjahjaningsih dan S. Sigit. 2012. Potensi ekstrak daun patikan kebo (*Euphorbia hirta*) sebagai antibakteri terhadap *Aeromonas hydrophila* secara in vitro. *Journal of Marine and Coastal Science*. **1**(2): 113-124.
- Bambang, A. H., I. W. Arnata dan G. A. K. D. Puspawati. 2011. Rancangan Percobaan: Teori, Aplikasi SPSS dan Excel. Lintas Kata Publishing. Malang. 79 hlm.
- Bransgrove, K dan D. J. Middleton. 2015. A revision of *Epithema* (Gesneriaceae). *Gardens Bulletin Singapore*. **67**(1): 159-229.
- Cakovic, D., D. Stetevic, S. Vuksanovic dan K. Tan. 2014. *Colchicum cupanii* Guss. subsp. *glossophyllum* (Heldr.) Rouy, *Datura innoxia* Mill. and *Eclipta prostrata* (L.) L., new floristic records in Montenegro and western Balkan. *Acta Bot. Croat*. **73**(1): 255-265.



- Castro, L., M. Vera, J. A. Munoz, M. L. Blazquez, F. Gonzalez, W. Sand and A. Ballester. 2014. *Aeromonas hydrophila* produces conductive nanowires. *Research in Microbiology*. **165**: 794-802.
- Caton, B. P., M. Mortimer dan J. E. Hill. 2004. A Practical Field Guide to Weeds of Rice in Asia. Los Banos (Philippines): International Rice Research Institute. 116 p.
- Dian, R., Fatimawali dan F. Budiarmo. 2015. Uji resistensi bakteri *Escherichia coli* yang diisolasi dari plak gigi terhadap merkuri dan antibiotik kloramfenikol. *Jurnal e-Biomedik*. **3**(1): 59-63.
- Efendi, Y. N., dan T. Hertiani. 2013. Antimicrobial potency of ant-plant extract (*Myrmecodia tuberosa jack.*) Against *Candida albicans*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus*. *Trad. Med. J*. **18**(1): 53-58.
- Fadlila, W. N., L. M. Yuliaty dan L. Syafnir. 2015. Identifikasi senyawa aktif antibakteri dengan metode Bioautogafi Kit terhadap ekstrak etanol tangkai daun talas (*Colocasia Esculenta* (L.) Scott. *SpeSia Unisba*. 583-590.
- Fatmawati, D. W. A. 2011. Hubungan biofilm *Streptococcus mutans* terhadap resiko terjadinya karies gigi. *Stomatognotic (J. K. G. Unej)*. **8**(3): 127-130.
- Gunardi, W. D. 2014. Peranan biofilm dalam kaitannya dengan penyakit infeksi. *Jurnal Kedokteran Medika*. 1-9.
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF). 2019. Catalogue of Life. [www.gbif.org](http://www.gbif.org). Diakses pada tanggal 01 Mei 2019.
- 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 (*Carassius auratus*). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **3**(3):213-220.
- Hasanah, H. 2016. Teknik-teknik observasi. *Jurnal at-Taqaddum*. **8**(1): 21-46.
- Hayati, E. K., A. G. Fasyah dan L. Sa'adah. 2010. Fraksinasi dan identifikasi senyawa tanin pada daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.). *Jurnal Kimia*. **4**(2) : 193 – 200.
- Ho, A. S. Y., T. A. Mietzner, A. J. Smith, and G. K. Schoolnik. 1990. The Pili of *Aeromonas hydrophila*: Identification of an Environmentally Regulated "Mini Pilin". *J. Exp. Med*. 172:795-806.
- Homenta, H. 2016. Infeksi Biofilm Bakterial. *Jurnal e-Biomedik*. **4**(1): 1-11.
- Hussein, N. S., A.S. helmy, N. M. Sherif, H. Z. Ghanem, N. A. Ibrahim, A. N. G. El Gendy, A. H. Z. A. Hamid. 2018. Lipidomic analysis reveals the efficiency of *Eclipta prostrata* on diet-induced nonalcoholic fatty liver disease in rats. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1-32.

- India Biodiversity Portal. 2019. <https://indiabiodiversity.org/>. Diakses pada tanggal 23 Maret 2019.
- Jannah, H dan Safnowandi. 2018. Identifikasi jenis tumbuhan obat tradisional di kawasan hutan Olat Cabe Desa Batu Bangka Kecamatan Moyo Hilir Kabupaten Sumbawa Besar. *Jurnal Ilmiah Biologi*. **6**(2): 120-142.
- Jeedun, A. 2011. Metode Penelitian Eksperimen. Puslit Dikdasmen, Lemlit Uny. 58 hlm.
- Johannes, E dan Sjafaraenan. 2017. Uji toksisitas ekstrak daun jeruju *Acanthus ilicifolius* terhadap *Artemia salina* leach. *Jurnal Biologi Makasar*. **2**(1): 56-59.
- Khaleghi, M., S. Khorrami dan H. Ravan. 2019. Identification of *Bacillus thuringiensis* bacterial strain isolated from the mine soil as a robust agent in the biosynthesis of silver nanoparticles with strong antibacterial and anti-biofilm activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 1-24.
- Kusdarwati, R., L. Sari dan A. T. Mukti. 2010. Daya antibakteri ekstrak buah adas (*Foeniculum vulgare*) terhadap bakteri *Micrococcus luteus* secara in vitro. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **2**(1): 31-35.
- Kusmayati dan N.W.S. Agustini. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. **8**.
- Lestari, T., A. Nurmala dan M. Nurmalasari. 2015. Penetapan kadar polifenol dan aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun sintrong (*Crassocephalum crepidiodes* (Benth.) S. moore). *Jurnal Kesehatan Bakti Tunas Husada*. **13** (1): 107-112.
- Lindsay, A dan A. V. Holy. 2006. Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*. **64**: 313-325.
- Lingga, A. R., U. Pato dan E. Rossi. 2015. Uji antibakteri ekstrak batang kecombrang (*Nicolaia speciosa horan*) terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *Jom Faperta*. **2**(2): 1-15.
- Lukistyowati, I dan Kurniasih. 2011. Kelangsungan hidup ikan mas (*Cyprinus carpio* L) yang diberi pakan ekstrak bawang putih (*Allium sativum*) dan di infeksi *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **16**(1): 144-160.
- Magdalena, N. V dan J. Kusnadi. 2015. Antibakteri dari ekstrak kasar daun gambir (*Uncaria gambir* var Cubadak) metode *Microwave-Assisted* extraction terhadap bakteri patogen. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **3**(1): 124-135.
- Malinggas, F., D. H. C. Pangemanan dan N. W. Mariati. 2015. Uji Daya Hambat Ekstrak Buah Mengkudu (*M. Citrifolia*, L.) terhadap Pertumbuhan

*Streptococcus mutans* secara *In Vitro*. *Jurnal Ilmiah Farmasi-UNSRAT*. **4(4)**:2302-2493.

- Maric, S dan J. Vranos. 2007. Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum Biologorum*. **109(2)**: 1-7.
- Minarti., A. Budiana dan T. Ernawati. 2015. Bioaktivitas Turunan Metil Sinamat Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aureugenosa* dan Jamur *Candida albicans*. *Jurnal Kimia VALENSI*. **1(1)**: 60-64.
- Murwani, S., D. D. Qosimah dan I. A. Amri. 2017. Penyakit Bakterial Pada Ternak Hewan Besar dan Unggas. Malang. UB Press. 306 hlm.
- Prabowo, A. Y., T. Estiasih dan I. Purwantiningrum. 2014. Umbi gembili (*Dioscorea esculenta* L.) sebagai bahan pangan mengandung senyawa bioaktif : Kajian Pustaka. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **2(3)**: 129-135.
- Prajito, A. 2005. Diktat Parasit dan Penyakit Ikan. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya. Malang. 105 hlm.
- Prihanto, A. A., Sukoso, M. Fadjar dan A. Kurniawan. 2015. Metode sederhana dan efektif untuk penghitungan dan visualisasi tiga dimensi (3D) biofilm *Vibrio cholera*. *Media Litbangkes*. **25(3)**: 147-152.
- Quddus, R. 2014. Teknik Pengelolaan Air Bersih dengan Sistem Saringan Pasir Lambat (*Dowflow*) yang Bersumber dari Air Musi. *Jurnal Teknik Sipil dan Lingkungan*. **2(4)**: 669-674.
- Rachmawati, H. D., Aprilia dan K. Parisihni. 2015. Efektivitas antibakteri ekstrak Daun Mangrove *Acanthus ilicifolius* terhadap biofilm *Enterococcus faecalis*. *Jurnal Kedokteran Gigi*. **9(2)**: 138-147.
- Rahmaningsih, S. 2018. Hama dan Penyakit Ikan. Deepublish. Yogyakarta. 347 hlm.
- Ramesh, S., R. Rajan dan R. Santhanam. 2014. Freshwater Phytopharmaceutical Compounds. CRC Press. US. 250 hlm.
- Roihanah, S., Sukoso dan Andayani. S. 2013. Aktivitas antibakteri ekstrak teripang *Holothuria sp.* terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* secara in vitro. *J. Exp. Life. Sci*. **3(1)**: 40-44.
- Salni., H. Marisa dan R. W. Mukti. 2011. Isolasi Senyawa Antibakteri Dari Daun Jengkol (*Pithecolobium lobatum* Benth) dan Penentuan Nilai KHM-nya. *Jurnal Penelitian Sains*. **14(1)**: 38-41.
- Sambuaga, M. E., S. N. J. Longdong dan H. Manoppo. 2018. Sensitivitas ekstrak tanaman kemangi (*Ocimum sactum*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Budidaya Perairan*. **6(1)**: 1-7.
- Sarjito, S. B. Prayitno dan A. H. C. Haditomo. 2013. Buku Pengantar Parasit dan Penyakit Ikan. UPT UNDIP Press Semarang. Semarang. 90 hlm.

- Sartika, R., Melki dan A. I. S. Purwiyanto. 2013. Aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *Euचेuma cottoni* terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholera* dan *Salmonella typhosa*. *Maspari Journal*. **5**(2): 98-103.
- Saskiawan, I dan N. Hasanah. 2015. Aktivitas Antimikroba dan Antioksidan Senyawa Polisakarida Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*). *Pros Sem Nas Biodiv Indon*. **1**(5): 1105-1109.
- Siahaan, P. 2011. Pertumbuhan bakteri *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith pada pemberian ekstrak urang aring. *Eugenia*. **17**(3): 202-209.
- \_\_\_\_\_. 2012. Pengaruh ekstrak Urang Aring (*Eclipta alba* L. Hask.) terhadap Pertumbuhan Jamur *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici* (Sacc.) Snyder & Hans. *Jurnal Bioslogos*. **2**(1): 28-36.
- Siregar, A. F., A. Sabdono dan D. Pringgenies. 2012. Potensi antibakteri ekstrak rumput laut terhadap bakteri penyakit kulit *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, dan *Micrococcus luteus*. *Journal of Marine Research*. **1**(2): 152-160.
- Soleha, T. U. 2015. Uji Kepekaan Terhadap Antibiotik. *Juke Unila*. **5**(9):119-123.
- Sudarno, F. A. Setiorini dan H. Suprpto. 2011. Efektivitas ekstrak tanaman meniran (*Phyllanthus niruri*) sebagai antibakteri *Edwardsiella tarda* secara In-vitro. *Jurnal Ilmiah Perikanan dan Kelautan*. **3**(1): 103-108.
- Suwati, Y. 2013. Pengaruh kompensasi dan motivasi kerja terhadap kinerja karyawan pada PT. Tunas Hijau Samarinda. *eJurnal Ilmu Administrasi Bisnis*. **1**(1): 41-55.
- Syamsuryah, N. S., S. Jarre dan N. Asmi. 2013. Potensi 2-(Feniletil)-Oktanoat Dalam Peningkatan Sensivitas Antibiotik INH, SM dan ETA terhadap *M. Tuberculosis* Strain H37Rv. 1-5.
- Trivellini, A., M. Lucchesini, R. Manggini, H. Mosadegh, T. S. S. Villamarin, P. Velnieri, A. M. Sodi dan A. Pardossi. 2016. *Lamiaceae* phenols as multifaceted compounds: bioactivity, industrial prospects and role of "positive-stress". *Industrial Crops and Products*. **83**: 241-254.
- Ulung, G. 2014. Sehat Alami dengan Herbal 250 Tanaman Berkhasiat Obat. Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 544 hlm.
- Ulyah, H., E. U. Ulfa dan E. Puspitasari. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri dan Antibiofilm Minyak Atsiri Rimpang Bengle (*Zingiber purpureum* Roscoe) terhadap Bakteri *Staphylococcus epidermidis*. *E-Jurnal Pustaka Kesehatan*. **3**(2): 267-271.
- Warnida, H., D. Mustika, Supomo dan Y. Sukawaty. 2018. Efektivitas ekstrak etanol daun mahang (*Macaranga triloba*) sebagai obat anti jerawat. *Jurnal Penelitian Ekosistem Dipterokarpa*. **4**(1): 9-18.

- Wiyanto, D. B. 2010. Uji aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dan *Eucheuma denticullatum* terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyi*. *Jurnal Kelautan*. **3**(1): 2-17.
- Zakki, M. 2017. Uji aktivitas antibakteri ekstrak Cathechin teh putih terhadap *Streptococcus sanguinis*. *ODONTO Dental Journal*. **4**(2): 108-113.
- Ziyadaturrohmah, S., S. B. Prayitno, Sarjito, N. Hidayati, dan G. Saptiani. 2013. Pengaruh penggunaan ekstrak daun jeruju (*Acanthus ilicifolius*) dengan dosis berbeda terhadap gambaran darah, gejala klinis dan kelulushidupan lele dumbo (*Clarias gariepinus*) yang diinfeksi *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **2**(4):40-49.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Alat Penelitian



Laminary Air Flow (LAF)



Oven



Autoklaf



Lemari pendingin



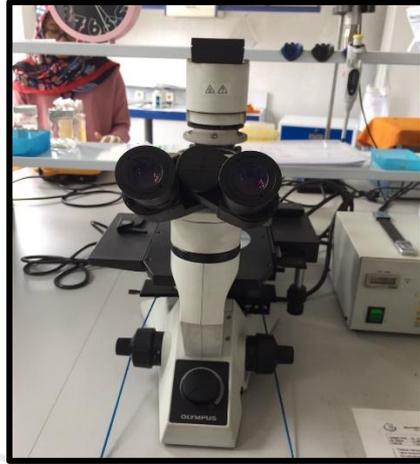
Spektrofotometer



Timbangan digital



Bunsen



Mikroskop



Cawan petri



Pipet volume



Jarum ose



Tabung reaksi



Rak tabung reaksi



Syringe



Beaker glass



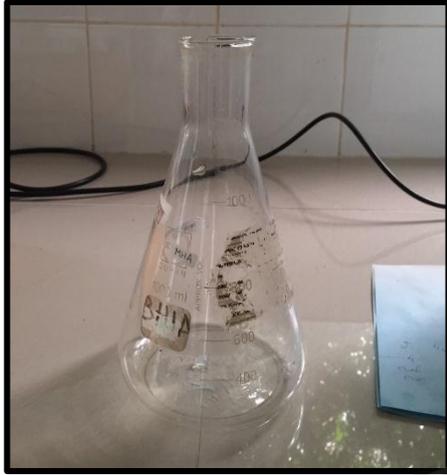
Mikro pipet



Inkubator



Mikroplate



Erlenmeyer



Hot plate



Gelas ukur



Corong



Objek glass



Mikrotube



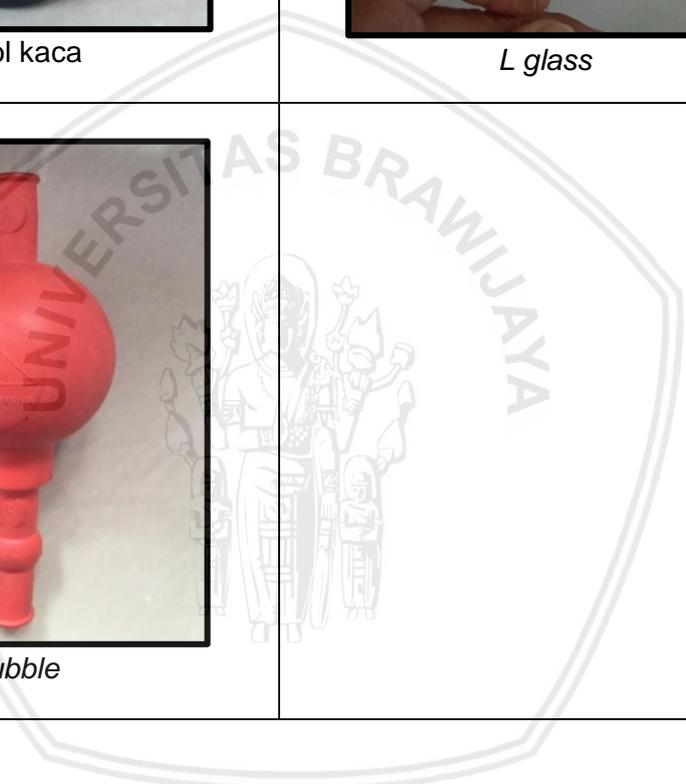
Botol kaca



L glass



Bubble



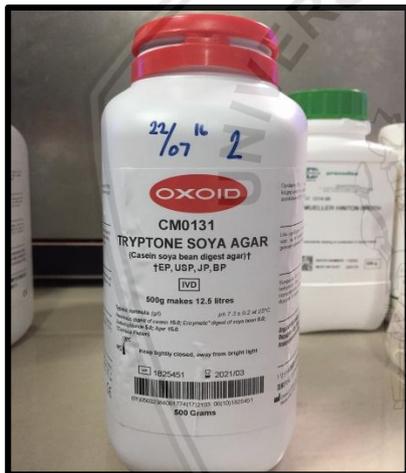
Lampiran 2. Bahan Penelitian



*Mueller Hinton Broth (MHB)*



*Agar Mueller Hinton (AMH)*



*Tryptone Soya Agar (TSA)*



*Tryptone Soya Broth (TSB)*



*Sarung tangan*



*Etanol 96%*



Alkohol 70%



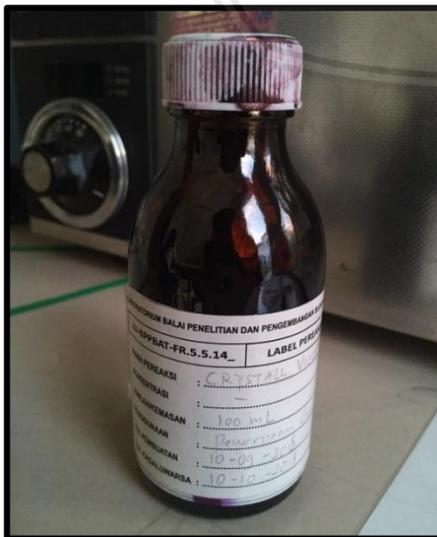
Kapas



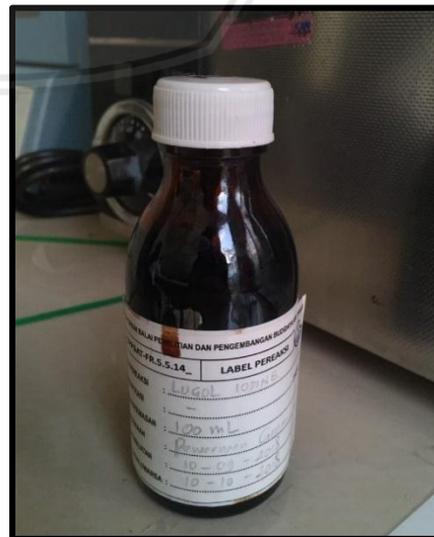
Tisu



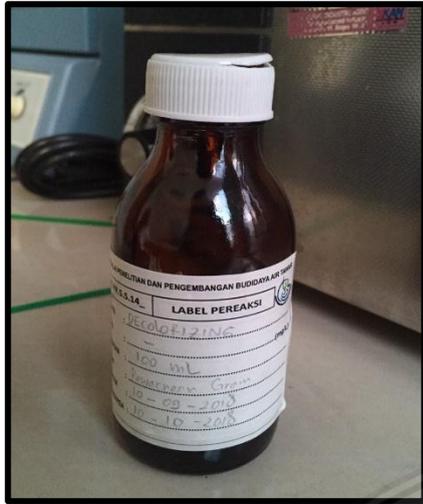
Aluminium foil



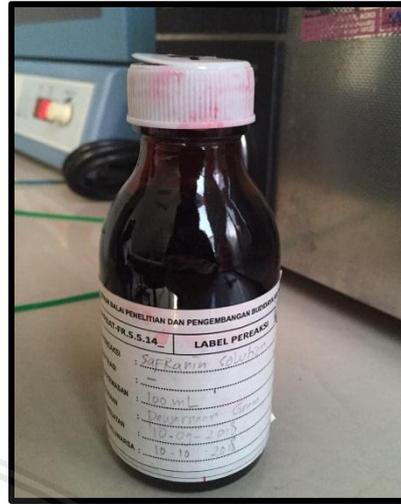
Crytasl violet



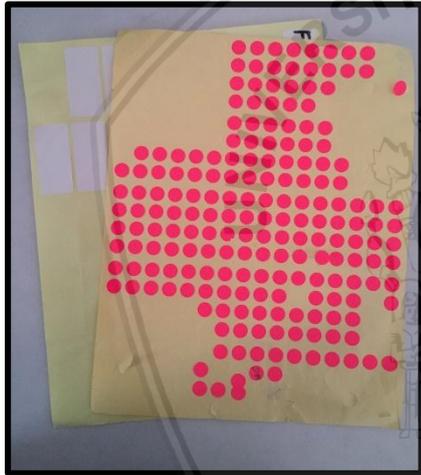
Lugol iodine



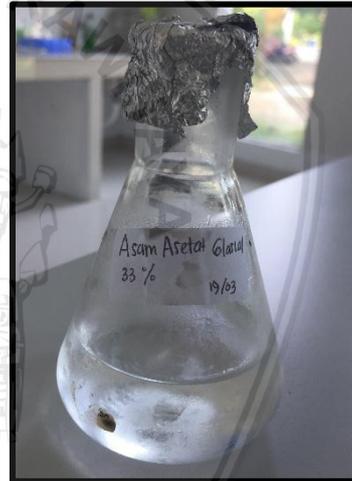
Decolorizing



Safranin



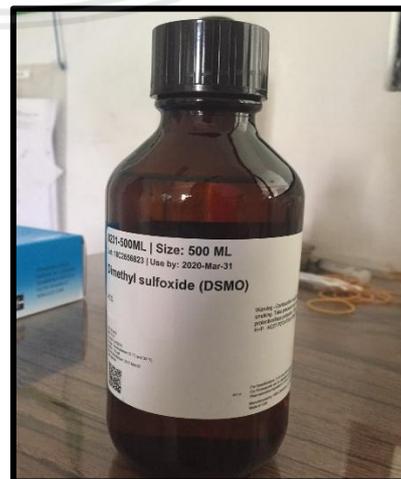
Kertas label



Asam Asetat Glacial



Akuades



DMSO



Spiritus



Antibiotic disc



Blank disc

**Lampiran 3. Hasil Perhitungan Rendemen Ekstrak Kasar Tanaman Air**

- Perhitungan Persentase Rendemen

$$\text{Persentase Rendemen } L. \text{ adscendens} = \frac{\text{Berat Ekstrak}(gr)}{\text{Berat kering daun}(gr)} \times 100\%$$

$$= \frac{2,84}{54,12} \times 100\%$$

$$= 5\%$$

$$\text{Persentase Rendemen } E. \text{ prostrata} = \frac{\text{Berat Ekstrak}(gr)}{\text{Berat kering daun}(gr)} \times 100\%$$

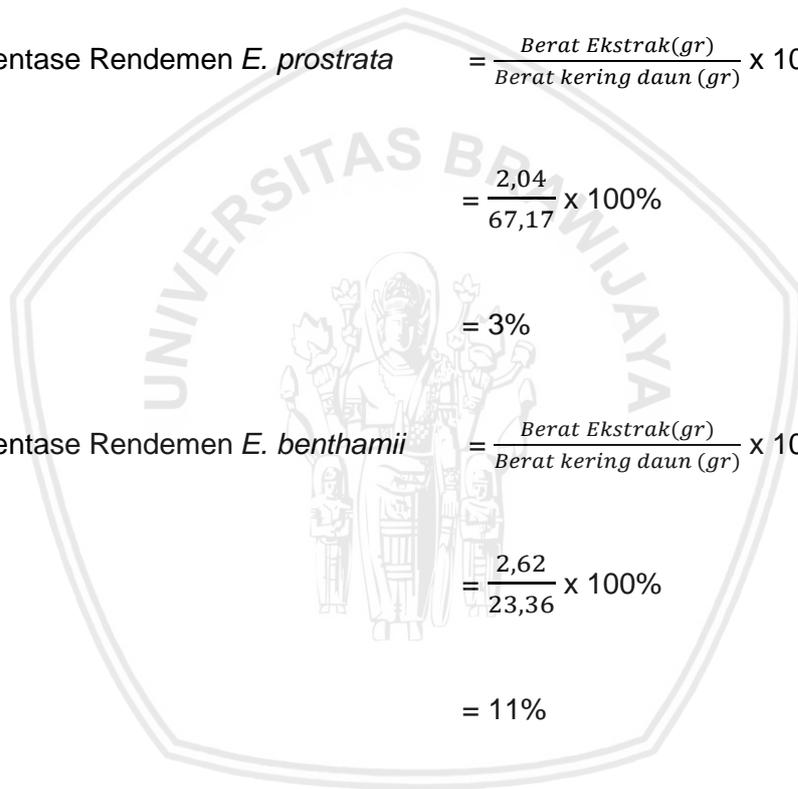
$$= \frac{2,04}{67,17} \times 100\%$$

$$= 3\%$$

$$\text{Persentase Rendemen } E. \text{ benthamii} = \frac{\text{Berat Ekstrak}(gr)}{\text{Berat kering daun}(gr)} \times 100\%$$

$$= \frac{2,62}{23,36} \times 100\%$$

$$= 11\%$$



**Lampiran 4. Pembuatan Larutan Ekstrak Kasar Tanaman Air**

- Perhitungan Larutan Stok Ekstrak

$$\begin{aligned} \text{Larutan Ekstrak } 100 \text{ mg/ml} &= 100 \text{ mg/ml} \\ &= \frac{0,1 \text{ gram (ekstrak)}}{1 \text{ ml (larutan pengencer)}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Larutan Ekstrak } 200 \text{ mg/ml} &= 200 \text{ mg/ml} \\ &= \frac{0,2 \text{ gram (ekstrak)}}{1 \text{ ml (larutan pengencer)}} \end{aligned}$$

- Pengenceran larutan ekstrak kasar *L. adscendens*

Pengenceran larutan dilakukan dari larutan konsentrasi 200 mg/ml ke larutan 12 mg/ml, 9 mg/ml, 6 mg/ml dan 3 mg/ml. Volume yang diinginkan 200  $\mu$ l (0,2 ml).

- 12 mg/ml

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

$$V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} = 0,2 \text{ ml} \cdot 12 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 0,012 \text{ ml} = 12 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan stok } 200 \text{ mg/ml} + 188 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan pengencer}$$

- 9 mg/ml

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

$$V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} = 0,2 \text{ ml} \cdot 9 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 0,009 \text{ ml} = 9 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan stok } 200 \text{ mg/ml} + 191 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan pengencer}$$

- 6 mg/ml

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

$$V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} = 0,2 \text{ ml} \cdot 6 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 0,006 \text{ ml} = 6 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan stok } 200 \text{ mg/ml} + 194 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan pengencer}$$

**Lampiran 4. (Lanjutan)**

d. 3 mg/ml

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

$$V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} = 0,2 \text{ ml} \cdot 3 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 0,003 \text{ ml} = 3 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan stok } 200 \text{ mg/ml} + 197 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan pengencer}$$

- Pengenceran larutan ekstrak kasar *E. prostrata*

Pengenceran larutan dilakukan dari larutan konsentrasi 200 mg/ml ke larutan 10 mg/ml, 7 mg/ml, 4 mg/ml dan 1 mg/ml. Volume yang diinginkan 200  $\mu\text{l}$  (0,2 ml)

a. 10 mg/ml

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

$$V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} = 0,2 \text{ ml} \cdot 10 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 0,01 \text{ ml} = 10 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan stok } 200 \text{ mg/ml} + 190 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan pengencer}$$

b. 7 mg/ml

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

$$V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} = 0,2 \text{ ml} \cdot 7 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 0,007 \text{ ml} = 7 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan stok } 200 \text{ mg/ml} + 193 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan pengencer}$$

c. 4 mg/ml

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

$$V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} = 0,2 \text{ ml} \cdot 4 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 0,004 \text{ ml} = 4 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan stok } 200 \text{ mg/ml} + 196 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan pengencer}$$

**Lampiran 4. (Lanjutan)**

d. 1 mg/ml

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

$$V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} = 0,2 \text{ ml} \cdot 1 \text{ mg/ml}$$

$V_1 = 0,001 \text{ ml} = 1 \text{ } \mu\text{l}$  larutan stok 200 mg/ml + 199  $\mu\text{l}$  larutan pengencer



## Lampiran 5. Perhitungan Data Hasil Penelitian

a. *Ludwigia adscendens* L.H. Hara

Perlakuan (mg/ml)	Ulangan			Total	Rerata	SD
	1	2	3			
3	0,300	0,275	0,335	0,910	0,304	± 0,030
6	0,287	0,285	0,261	0,833	0,277	± 0,014
9	0,219	0,269	0,294	0,782	0,260	± 0,038
12	0,115	0,116	0,149	0,380	0,126	± 0,019
	<b>Total</b>			<b>2,905</b>		

### • Perhitungan Sidik Ragam

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

$$= \frac{2,905^2}{12}$$

$$= 0,703$$
- JK Total =  $(A1^2 + A2^2 + \dots + E3^2) - FK$   

$$= (0,300^2 + 0,287^2 + \dots + 0,149^2) - 0,703$$

$$= 0,765 - 0,703$$

$$= 0,062$$
- JK Perlakuan =  $\frac{\sum(\sum xi)^2}{r} - FK$   

$$= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2}{3} - FK$$

$$= \frac{0,910^2 + 0,833^2 + 0,782^2 + 0,380^2}{3} - 0,703$$

$$= 0,056$$
- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan  

$$= 0,062 - 0,056$$

$$= 0,006$$
- Derajat Bebas (db) Total =  $(n \times r) - 1$   

$$= (4 \times 3) - 1 = 11$$
- Derajat Bebas (db) Perlakuan =  $n - 1$   

$$= 4 - 1$$

$$= 3$$
- Derajat Bebas (db) Acak =  $n \times (r - 1)$   

$$= 4 \times (3 - 1) = 8$$

**Lampiran 5. (Lanjutan)**

- Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan = JKP/db Perlakuan  

$$= 0,056/3$$

$$= 0,019$$
- Kuadrat Tengah (KT) Acak = JKA/db Acak  

$$= 0,006/8$$

$$= 0,001$$
- F.Hitung = KTP/KTA  

$$= 0,019/0,001$$

$$= 19,00$$

• **Analisa Sidik Ragam**

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,056	0,019	19,00**	4,07	7,59
Acak	8	0,006	0,001			
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>0,062</b>	<b>0,006</b>			

Keterangan: (\*\*) berbeda nyata

Karena nilai F hitung memiliki nilai yang lebih besar dari pada nilai F 5% dan F 1% maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Uji BNT.

• **Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)**

- $$SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{r}}$$

$$= \sqrt{\frac{2 \times 0,001}{3}} = 0,022$$
- BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED  

$$= 2,306 \times 0,022$$

$$= 0,052$$
- BNT 1% = T tabel 1% (db acak) x SED  

$$= 3,355 \times 0,022$$

$$= 0,075$$



Lampiran 5. (Lanjutan)

• Tabel BNT

Rerata Perlakuan	D 0,126	C 0,260	B 0,277	A 0,304	Notasi
D = 0,126	-	-	-	-	a
C = 0,260	0,134**	-	-	-	b
B = 0,277	0,151**	0,017 <sup>ns</sup>	-	-	bc
A = 0,304	0,178**	0,044 <sup>ns</sup>	0,027 <sup>ns</sup>	-	cd

Keterangan: (ns) = tidak berbeda nyata

(\*\*) = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil terbaik adalah perlakuan D diikuti oleh perlakuan C kemudian diikuti oleh perlakuan B dan A.

• Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total Data (Ti)	Perbandingan (Ci)		
		linier	kuadratik	kubik
A	0,910	-3	1	-1
B	0,833	-1	-1	3
C	0,782	1	-1	-3
D	0,380	3	1	1
Q = $\sum ci.Ti$		-1,641	-0,325	-0,377
Kr = $(\sum ci^2) \cdot R$		60	12	60
JK Regresi = $Q^2/Kr$		0,045	0,009	0,002

- JK Regresi Total = JK Linier + JK Kuadratik + JK Kubik

$$= 0,045 + 0,009 + 0,002$$

$$= 0,056$$

Lampiran 5. (Lanjutan)

• Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber keragaman	Db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,056	0,019	19,000	4,07	7,59
Linier	1	0,045	0,045	45,000**		
Kuadratik	1	0,009	0,009	9,000**		
Kubik	1	0,002	0,002	2,000 <sup>ns</sup>		
Acak	8	0,006	0,001			
Total	11	0,062	0,006			

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata

(\*\*) = sangat berbeda nyata

Karena Regresi Linier sangat berbeda nyata, maka dihitung  $R^2$  masing-masing regresi tersebut:

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Linier} &= \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Linier} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,045}{0,045 + 0,006} \\
 &= 0,884
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kuadratik} &= \frac{\text{JK Kuadratik}}{\text{JK Kuadratik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,009}{0,009 + 0,006} \\
 &= 0,599
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 R^2 \text{ Kubik} &= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,002}{0,002 + 0,006} \\
 &= 0,286
 \end{aligned}$$

Hasil perhitungan  $R^2$  diatas menunjukkan bahwa nilai  $R^2$  linier lebih besar dari nilai  $R^2$  kuadratik dan kubik. Berdasarkan hasil tersebut maka kurva yang digunakan adalah kurva linier. Selanjutnya dicari persamaan regresi linier. Dosis yang digunakan tiap perlakuan dijadikan sebagai sumbu x sedangkan nilai rerata skoring dijadikan sebagai sumbu y, sehingga akan didapatkan garis linier pada grafik.

Lampiran 5. (Lanjutan)

Perlakuan	X	Y	X.Y	X <sup>2</sup>
A1	3	0,300	0,9	9
A2	3	0,275	0,825	9
A3	3	0,339	1,017	9
B1	6	0,287	1,722	36
B2	6	0,285	1,71	36
B3	6	0,261	1,566	36
C1	9	0,219	1,971	81
C2	9	0,269	2,421	81
C3	9	0,294	2,646	81
D1	12	0,115	1,38	144
D2	12	0,116	1,392	144
D3	12	0,149	1,788	144

$$B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = -0,0183$$

$$B0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 0,3802$$

Berdasarkan perhitungan b0 dan b1, maka didapat persamaan linier sebagai berikut:  $y = 0,3802 - 0,0183x$

b. *E. prostrata*

Perlakuan (mg/ml)	Ulangan			Total	Rerata	SD
	1	2	3			
1	0,342	0,359	0,357	1,058	0,352	±0,009
4	0,315	0,305	0,321	0,941	0,313	±0,008
7	0,293	0,288	0,265	0,846	0,282	±0,014
10	0,238	0,243	0,248	0,729	0,243	±0,005
<b>Total</b>				<b>3,574</b>		

• Perhitungan Sidik Ragam

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

$$= \frac{3,574^2}{12}$$

$$= 1,064$$

- JK Total =  $(A1^2 + A2^2 + \dots + E3^2) - FK$

$$= (0,342^2 + 0,315^2 + \dots + 0,248^2) - 1,064$$

Lampiran 5. (Lanjutan)

$$= 1,085 - 1,064$$

$$= 0,0203$$

- JK Perlakuan =  $\frac{\sum(\sum xi)^2}{r} - FK$

$$= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2}{r} - FK$$

$$= \frac{1,058^2 + 0,941^2 + 0,846^2 + 0,729^2}{3} - 1,064$$

$$= 0,0195$$

- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan

$$= 0,0203 - 0,0195$$

$$= 0,0008$$

- Derajat Bebas (db) Total =  $(n \times r) - 1$

$$= (4 \times 3) - 1 = 11$$

- Derajat Bebas (db) Perlakuan =  $n - 1$

$$= 4 - 1$$

$$= 3$$

- Derajat Bebas (db) Acak =  $n \times (r - 1)$

$$= 4 \times (3 - 1) = 8$$

- Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan =  $JKP/db$  Perlakuan

$$= 0,0195/3$$

$$= 0,0065$$

- Kuadrat Tengah (KT) Acak =  $JKA/db$  Acak

$$= 0,0008/8$$

$$= 0,0001$$

- F.Hitung =  $KTP/KTA$

$$= 0,0065/0,0001$$

$$= 65,000$$

• **Analisa Sidik Ragam**

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,0195	0,0065	65,000**	4,07	7,59
Acak	8	0,0008	0,0001			
Total	11	0,0203	0,0018			

Keterangan: (\*\*) berbeda nyata

**Lampiran 5. (Lanjutan)**

Karena nilai F hitung memiliki nilai yang lebih besar dari pada nilai F 5% dan F 1% maka perhitungan dilanjutkan dengan perhitungan Uji BNT.

• **Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)**

$$\begin{aligned} - \text{ SED} &= \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{r}} \\ &= \sqrt{\frac{2 \times 0,0001}{3}} = 0,008 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ BNT } 5\% &= T \text{ tabel } 5\% \text{ (db acak)} \times \text{ SED} \\ &= 2,306 \times 0,008 \\ &= 0,019 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{ BNT } 1\% &= T \text{ tabel } 1\% \text{ (db acak)} \times \text{ SED} \\ &= 3,355 \times 0,008 \\ &= 0,027 \end{aligned}$$

• **Tabel BNT**

Rerata perlakuan	D 0,243	C 0,282	B 0,313	A 0,352	Notasi
<b>D = 0,243</b>	-	-	-	-	a
<b>C = 0,282</b>	0,039 <sup>ns</sup>	-	-	-	a
<b>B = 0,313</b>	0,274 <sup>**</sup>	0,031 <sup>ns</sup>	-	-	ab
<b>A = 0,352</b>	0,109 <sup>**</sup>	0,070 <sup>ns</sup>	0,039 <sup>ns</sup>	-	bc

Keterangan: (ns) = tidak berbeda nyata

(\*\*) = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), diketahui bahwa hasil terbaik adalah perlakuan D diikuti oleh perlakuan C kemudian diikuti oleh perlakuan B dan A.

Lampiran 5. (Lanjutan)

• Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total Data (Ti)	Perbandingan (Ci)		
		linier	kuadratik	kubik
A	1,058	-3	1	-1
B	0,941	-1	-1	3
C	0,846	1	-1	-3
D	0,729	3	1	1
$Q = \sum ci.Ti$		-1,082	0	-0,044
$Kr = (\sum ci^2). R$		60	12	60
$JK \text{ Regresi} = Q^2/Kr$		0,0195	0	0

- JK Regresi Total = JK Linier + JK Kuadratik + JK Kubik  
 $= 0,0195 + 0,000 + 0,000$   
 $= 0,0195$

• Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber keragaman	Db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,0195	0,0065	24,889	4,07	7,59
Linier	1	0,0195	0,0195	19,500**		
Kuadratik	1	0,0000	0,0000	0,0000 <sup>ns</sup>		
Kubik	1	0,0000	0,0000	0,0000 <sup>ns</sup>		
Acak	8	0,0008	0,0001			
<b>Total</b>	<b>11</b>	<b>0,0203</b>	<b>0,0018</b>			

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata

(\*\*) = sangat berbeda nyata

Karena Regresi Linier sangat berbeda nyata, maka dihitung  $R^2$  masing-masing regresi tersebut:

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

$$= \frac{0,0195}{0,00195 + 0,0008}$$

$$= 0,961$$

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

$$= \frac{0,0000}{0,0000 + 0,006}$$

$$= 0,0000$$

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

$$= \frac{0,0000}{0,0000 + 0,006}$$

$$= 0,0000$$

Hasil perhitungan  $R^2$  diatas menunjukkan bahwa nilai  $R^2$  linier lebih besar dari nilai  $R^2$  kuadrat dan kubik. Berdasarkan hasil tersebut maka kurva yang digunakan adalah kurva linier. Selanjutnya dicari persamaan regresi linier. Dosis yang digunakan tiap perlakuan dijadikan sebagai sumbu x sedangkan nilai rerata skoring dijadikan sebagai sumbu y, sehingga akan didapatkan garis linier pada grafik.

Perlakuan	X	Y	XY	X <sup>2</sup>
A1	1	0,342	0,342	1
A2	1	0,359	0,359	1
A3	1	0,357	0,357	1
B1	4	0,315	1,26	16
B2	4	0,305	1,22	16
B3	4	0,321	1,284	16
C1	7	0,293	2,051	49
C2	7	0,288	2,016	49
C3	7	0,265	1,855	49
D1	10	0,238	2,38	100
D2	10	0,243	2,43	100
D3	10	0,248	2,48	100

$$B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = -0,0120$$

$$B0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 0,3639$$

Berdasarkan perhitungan b0 dan b1, maka didapat persamaan linier sebagai berikut:  $y = 0,3639 - 0,012$

## Lampiran 6. Perhitungan Persentase Inhibisi Biofilm

$$\text{Inhibisi (\%)} = \frac{(\text{OD kontrol negatif} - \text{OD sampel}) \times 100\%}{\text{OD kontrol negatif}}$$

### • Inhibisi Ekstrak Kasar *L. adscendens*

#### a. Konsentrasi 3 mg/ml

$$\text{Inhibisi } a_1 = \frac{(0,376 - 0,300) \times 100\%}{0,376}$$

$$= 0,20 \times 100\%$$

$$= 20\%$$

$$\text{Inhibisi } a_2 = \frac{(0,353 - 0,275) \times 100\%}{0,353}$$

$$= 0,23 \times 100\%$$

$$= 23\%$$

$$\text{Inhibisi } a_3 = \frac{(0,343 - 0,335) \times 100\%}{0,343}$$

$$= 0,02 \times 100\%$$

$$= 2\%$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{(20 + 23 + 2)}{3}$$

$$= 14\%$$

#### b. Konsentrasi 6 mg/ml

$$\text{Inhibisi } b_1 = \frac{(0,376 - 0,287) \times 100\%}{0,376}$$

$$= 0,23 \times 100\%$$

$$= 23\%$$

$$\text{Inhibisi } b_2 = \frac{(0,353 - 0,269) \times 100\%}{0,353}$$

$$= 0,19 \times 100\%$$

$$= 19\%$$

$$\text{Inhibisi } b_3 = \frac{(0,343 - 0,294)}{0,343} \times 100\%$$

$$= 0,23 \times 100\%$$

$$= 23\%$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{(23+19+23)}{3}$$

$$= 21\%$$

c. Konsentrasi 9 mg/ml

$$\text{Inhibisi } c_1 = \frac{(0,376 - 0,219)}{0,376} \times 100\%$$

$$= 0,41 \times 100\%$$

$$= 41\%$$

$$\text{Inhibisi } c_2 = \frac{(0,353 - 0,269)}{0,353} \times 100\%$$

$$= 0,22 \times 100\%$$

$$= 22\%$$

$$\text{Inhibisi } c_3 = \frac{(0,343 - 0,294)}{0,343} \times 100\%$$

$$= 0,14 \times 100\%$$

$$= 14\%$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{(41+22+14)}{3}$$

$$= 25\%$$

d. Konsentrasi 12 mg/ml

$$\text{Inhibisi } d_1 = \frac{(0,376 - 0,115)}{0,376} \times 100\%$$

$$= 0,69 \times 100\%$$

$$= 69\%$$

$$\text{Inhibisi } d_2 = \frac{(0,353 - 0,116)}{0,353} \times 100\%$$

$$= 0,67 \times 100\%$$

$$= 67\%$$

$$\text{Inhibisi } d_3 = \frac{(0,343 - 0,149)}{0,343} \times 100\%$$

$$= 0,56 \times 100\%$$

$$= 56\%$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{(69+67+56)}{3}$$

$$= 64\%$$

• Inhibisi Ekstrak Kasar *E. prostrata*

a. Konsentrasi 1 mg/ml

$$\text{Inhibisi } a_1 = \frac{(0,387 - 0,342)}{0,387} \times 100\%$$

$$= 0,11 \times 100\%$$

$$= 11\%$$

$$\text{Inhibisi } a_2 = \frac{(0,385 - 0,305)}{0,385} \times 100\%$$

$$= 0,6 \times 100\%$$

$$= 6\%$$

$$\text{Inhibisi } a_3 = \frac{(0,381 - 0,357)}{0,381} \times 100\%$$

$$= 0,6 \times 100\%$$

$$= 6\%$$



$$\begin{aligned} \text{Rata-rata} &= \frac{(11+6+6)}{3} \\ &= 7\% \end{aligned}$$

b. Konsentrasi 4 mg/ml

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi } b_1 &= \frac{(0,387 - 0,315)}{0,387} \times 100\% \\ &= 0,18 \times 100\% \\ &= 18\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi } b_2 &= \frac{(0,385 - 0,305)}{0,385} \times 100\% \\ &= 0,20 \times 100\% \\ &= 20\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi } b_3 &= \frac{(0,381 - 0,321)}{0,381} \times 100\% \\ &= 0,15 \times 100\% \\ &= 15\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata} &= \frac{(15+18+20)}{3} \\ &= 17\% \end{aligned}$$

c. Konsentrasi 7 mg/ml

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi } c_1 &= \frac{(0,387 - 0,293)}{0,387} \times 100\% \\ &= 0,24 \times 100\% \\ &= 24\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi } c_2 &= \frac{(0,385 - 0,288)}{0,385} \times 100\% \\ &= 0,25 \times 100\% \\ &= 25\% \end{aligned}$$



$$\text{Inhibisi } c_3 = \frac{(0,381-0,265) \times 100\%}{0,381}$$

$$= 0,30 \times 100\%$$

$$= 30\%$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{(24+25+30)}{3}$$

$$= 26\%$$

d. Konsentrasi 10 mg/ml

$$\text{Inhibisi } d_1 = \frac{(0,387-0,238) \times 100\%}{0,387}$$

$$= 0,38 \times 100\%$$

$$= 38\%$$

$$\text{Inhibisi } d_2 = \frac{(0,385-0,243) \times 100\%}{0,385}$$

$$= 0,36 \times 100\%$$

$$= 36\%$$

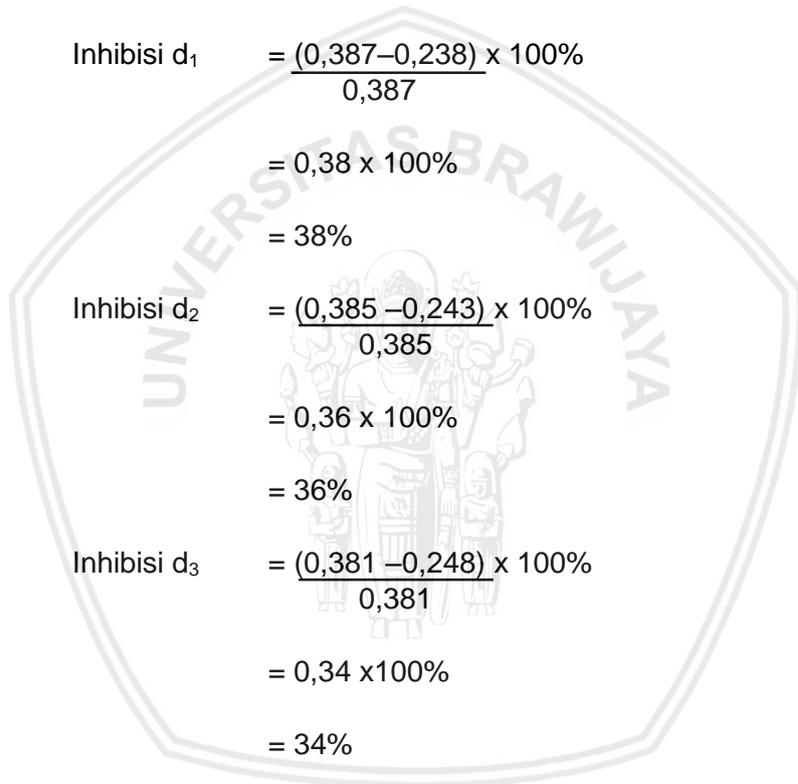
$$\text{Inhibisi } d_3 = \frac{(0,381-0,248) \times 100\%}{0,381}$$

$$= 0,34 \times 100\%$$

$$= 34\%$$

$$\text{Rata-rata} = \frac{(38+36+34)}{3}$$

$$= 36\%$$



Lampiran 7. Dokumentasi Penelitian

