

**PENGARUH EKSTRAK LENGKUAS MERAH (*Alpinia purpurata*)
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh :

**DESY AMALIA HIDAYATI
NIM. 175080507111018**



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



**PENGARUH EKSTRAK LENGKUAS MERAH (*Alpinia purpurata*)
TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO**

SKRIPSI

Oleh :

**DESY AMALIA HIDAYATI
NIM. 175080507111018**



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

2021



SKRIPSI

**PENGARUH EKSTRAK LENGKUAS MERAH (*Alpinia purpurata*) TERHADAP
DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO**

Oleh :

DESY AMALIA HIDAYATI
NIM. 175080507111018

Telah dipertahakan di depan penguji
pada tanggal 19 Juli 2021
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Pembimbing 1



(Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, M.S.)
NIP. 19611106 198602 2 001
Tanggal: 23 Juli 2021

Menyetujui,

Dosen Pembimbing 2



(Ir. Ellana Sanoesi, M.P.)
NIP. 19630924 199802 2 001
Tanggal: 23 Juli 2021

Mengetahui,
Ketua Jurusan
Manajemen Sumberdaya Perairan



(Dr. Ir. Muhamad Firdaus, M.P.)
NIP. 19680919 200501 1 001
Tanggal: 7/27/2021

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini Saya yang bertanda tangan dibawah ini:

Nama : Desy Amalia Hidayati

NIM : 175080507111018

Judul Skripsi : Pengaruh Ekstrak Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*)
Terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens*
Secara In Vitro

Menyatakan dengan sebenarnya bahwa penulisan skripsi ini berdasarkan hasil penelitian, pemikiran dan pemaparan asli dari saya sendiri, baik untuk naskah, tabel, gambar maupun ilustrasi lainnya yang tercantum sebagai bagian dari Skripsi. Jika terdapat karya / pendapat / penelitian dari orang lain, maka saya telah mencantumkan sumber yang jelas dalam daftar pustaka.

Demikian pernyataan ini saya buat, apabila di kemudian hari terdapat penyimpangan dan ketidakbenaran dalam pernyataan ini, maka saya bersedia menerima sanksi akademik sesuai dengan peraturan yang berlaku di Universitas Brawijaya, Malang.

Demikian pernyataan ini saya buat dalam keadaan sadar tanpa adanya paksaan dari pihak manapun.

Malang, Juli 2021

Desy Amalia Hidayati
NIM. 175080507111018

IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : Pengaruh Ekstrak Lengkuas Merah (*Alpinia Purpurata*)

Terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

Secara In Vitro

Nama Mahasiswa : Desy Amalia Hidayati

NIM : 175080507111018

Program Studi : Budidaya Perairan

PENGUJI PEMBIMBING:

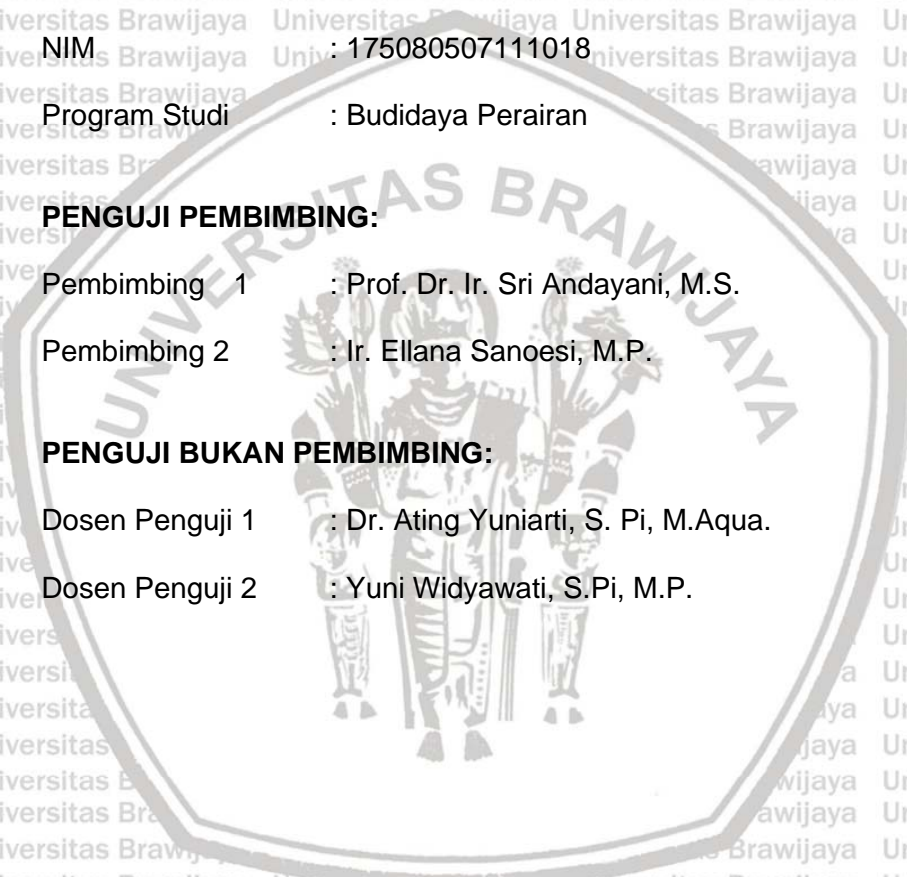
Pembimbing 1 : Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, M.S.

Pembimbing 2 : Ir. Ellana Sanoesi, M.P.

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING:

Dosen Penguji 1 : Dr. Ating Yuniarti, S. Pi, M.Aqua.

Dosen Penguji 2 : Yuni Widyawati, S.Pi, M.P.



UCAPAN TERIMA KASIH

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

1. Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, M.S selaku dosen pembimbing 1 dan Ir. Ellana Sanoesi, M.S selaku dosen pembimbing 2 yang telah memberikan bimbingan serta arahan.
2. Dr. Ating Yuniarti, S. Pi, M.Aqua dan Yuni Widyawati, S.Pi, M.P selaku dosen penguji yang senantiasa memberi bimbingan dukungan dalam melakukan perbaikan penulisan skripsi.
3. Orang tua, keluarga, serta saudara yang selalu memberikan doa, semangat serta motivasi dalam menyelesaikan studi.
4. Mbak Nafida, Mbak Titis, serta Mbak Datu selaku laboran Laboratorium CV. Sumber Rejeki yang selalu memberikan pengetahuan serta arahan selama melaksanakan penelitian
5. Pipi (Dita Nur, Elma Aprilia, Dhea Safira, Sephira, dan Elly Dwi), selaku teman perkuliahan yang senantiasa mendoakan serta memberikan semangat dan motivasi.
6. Tim Bakteri (Putriadji, Dita, Eka, Sandhy dan Rendy) yang selalu memberikan dukungan agar skripsi segera terselesaikan dengan baik
7. Teman-teman Budidaya Perairan 2017 dan sahabat-sahabat yang turut membantu serta mendoakan.

Malang, 11 Juli 2021

Penulis

RINGKASAN

DESY AMALIA HIDAYATI. Pengaruh Ekstrak Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*) terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara In Vitro. Dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, M.S dan Ir. Ellana Sanoesi, M.S**

Budidaya ikan di Indonesia mengalami perkembangan dari tahun ke tahun. Perkembangan budidaya diakibatkan permintaan pasar yang meningkat akibat tingginya kesadaran masyarakat mengonsumsi ikan. Budidaya yang sering dilakukan oleh masyarakat Indonesia adalah budidaya ikan air tawar. Proses budidaya mengalami permasalahan diantaranya adanya serangan penyakit. Penyakit bakterial yang sering menginfeksi ikan air tawar salah satunya *Pseudomonas fluorescens*. *Pseudomonas fluorescens* mengakibatkan pembengkakan, luka bahkan dapat mengakibatkan kematian masal. Upaya pengobatan dengan menggunakan bahan alami merupakan alternatif dalam mengatasi penyakit bakterial, salah satu tumbuhan yang dapat menjadi antibakteri adalah rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*). Rimpang lengkuas merah mengandung senyawa seperti flavonoid, saponin, fenol, dan tannin yang berkhasiat sebagai antibakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Penelitian dilaksanakan pada bulan April 2021 di Laboratorium CV. Sumber Rejeki. Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pemberian ekstrak rimpang lengkuas merah dengan dosis 100 ppm (A), 105 ppm (B), 110 ppm (C), 115 ppm (D), dan 120 ppm (E) dengan kontrol positif menggunakan 30 ppm antibiotik *tetracycline* dan kontrol negatif tanpa pemberian ekstrak. Parameter uji dalam penelitian adalah hasil zona bening di sekitar kertas cakram dengan dosis berbeda.

Hasil yang diperoleh dari penelitian pemberian ekstrak rimpang lengkuas merah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Adapun rerata zona bening pada uji cakram untuk perlakuan 100 ppm (8,15 mm), 105 ppm (8,48 mm), 110 ppm (9,13 mm), 115 ppm (9,34 mm), dan 120 ppm (10,53 mm). Hubungan antara penambahan dosis perlakuan ekstrak rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) terhadap diameter zona hambat menunjukkan pola linear dengan persamaan $y = -3,25 + 0,11x$ dan koefisien $R^2 = 0,85$. Hubungan antara pemberian ekstrak rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* menunjukkan respon meningkat seiring dengan bertambahnya dosis ekstrak dari 110 ppm, 105 ppm, 110 ppm, 115 ppm, dan 120 ppm. Kesimpulan pada penelitian ini adalah pemberian ekstrak rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Dosis terbaik ekstrak rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) pada penelitian sebesar 120 ppm dengan rata-rata diameter zona hambat sebesar 10,53 mm.

SUMMARY

DESY AMALIA HIDAYATI. Effect of Red Galangal Extract (*Alpinia purpurata*) on Inhibition of *Pseudomonas fluorescens* Bacteria In Vitro (under the guidance of **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, M.S dan Ir. Ellana Sanoesi, M.P**)

Fish farming in Indonesia has developed from year to year. The development of aquaculture is due to increased market demand due to the high public awareness of consuming fish. Aquaculture that is often done by the people of Indonesia is freshwater fish farming. The cultivation process has problems including disease attacks. One of the bacterial diseases that often infect freshwater fish is *Pseudomonas fluorescens*. *P. fluorescens* causes swelling, injury and even mass death. Treatment efforts using natural ingredients are an alternative in overcoming bacterial diseases, one of the plants that can be antibacterial is red galangal rhizome (*A. purpurata*). Red galangal rhizome contains compounds such as flavonoids, saponins, phenols, and tannins which have antibacterial properties.

This study aims to determine the effect of red galangal rhizome extract (*A. purpurata*) on the inhibition of *P. fluorescens* bacteria. The research was carried out in April 2021 at the CV. Sumber Rejeki. This study used a Completely Randomized Design (RAL) method with red galangal rhizome extract at a dose of 100 ppm (A), 105 ppm (B), 110 ppm (C), 115 ppm (D), and 120 ppm (E) with control positive using 30 ppm tetracycline antibiotics and negative control without extract. The test parameter in this study was the result of the clear zone around the disc paper with different doses.

The results obtained from the study of giving red galangal rhizome extract can inhibit the growth of *P. fluorescens* bacteria. The mean clear zones in the disc test were 100 ppm (8.15 mm), 105 ppm (8.48 mm), 110 ppm (9.13 mm), 115 ppm (9.34 mm), and 120 ppm (10.53 mm). The relationship between the addition of treatment dose of red galangal rhizome extract (*A. purpurata*) to the diameter of the inhibition zone showed a linear pattern with the equation $y = -3.25 + 0.11x$ and the coefficient $R^2 = 0.85$. The relationship between the administration of red galangal rhizome extract (*A. purpurata*) in inhibiting the growth of *P. fluorescens* bacteria showed an increased response with increasing the dose of extract from 110 ppm, 105 ppm, 110 ppm, 115 ppm, and 120 ppm. The conclusion of this study was that the administration of red galangal rhizome extract (*A. purpurata*) had an effect on the inhibition of *P. fluorescens* bacteria. The best dose of red galangal rhizome extract (*A. purpurata*) in this study was 120 ppm with an average inhibition zone diameter of 10.53 mm.

Keyword: red galangal (*A. purpurata*), *P. fluorescens*, MIC, disc test

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran Allah SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi yang berjudul "Pengaruh Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*) terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara In Vitro" dengan baik.

Penulis menyadari bahwa masih banyak kekurangan yang mendasar pada laporan ini. Oleh karena itu, penulis mohon maaf apa bila terdapat kesalahan dalam penyusunan skripsi ini serta mengharapkan saran yang membangun agar tulisan ini bermanfaat bagi pembaca.

Malang, 11 Juli 2021

Desy Amalia Hidayati
175080507111018



DAFTAR ISI

Halaman

IDENTITAS TIM PENGUJI	III
UCAPAN TERIMA KASIH	VI
RINGKASAN	VII
SUMMARY	VIII
KATA PENGANTAR	IX
DAFTAR ISI	X
DAFTAR GAMBAR	XII
DAFTAR TABEL	XIII
DAFTAR LAMPIRAN	XIV
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	2
1.3 Tujuan.....	3
1.4 Hipotesis.....	3
1.5 Tempat dan Waktu Penelitian.....	3
2. TINJAUAN PUSTAKA	4
2.1 Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i>	4
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	4
2.1.2 Habitat.....	5
2.1.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan.....	5
2.2 Lengkuas Merah.....	5
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	5
2.2.2 Bahan Aktif.....	6
2.2.3 Aktivitas Antimikroba.....	7
2.3 Uji Efektivitas Antimikroba secara In Vitro.....	8
2.4 Ekstraksi dengan Metode Maserasi.....	8
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	10
3.1 Materi Penelitian.....	10
3.1.1 Alat - alat Penelitian.....	10
3.1.2 Bahan – bahan Penelitian.....	11
3.2 Metode Penelitian.....	12
3.3 Rancangan Penelitian.....	12
3.4 Prosedur Penelitian.....	14
3.4.1 Persiapan Penelitian.....	14
3.4.2 Pelaksanaan Penelitian.....	19
3.5 Parameter Uji Penelitian.....	20

3.6 Analisis Data.....	21
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
4.1 Uji MIC.....	22
4.2 Uji Cakram.....	24
5. KESIMPULAN DAN SARAN.....	30
5.1 Kesimpulan.....	30
5.2 Saran.....	30
DAFTAR PUSTAKA.....	31
LAMPIRAN.....	34



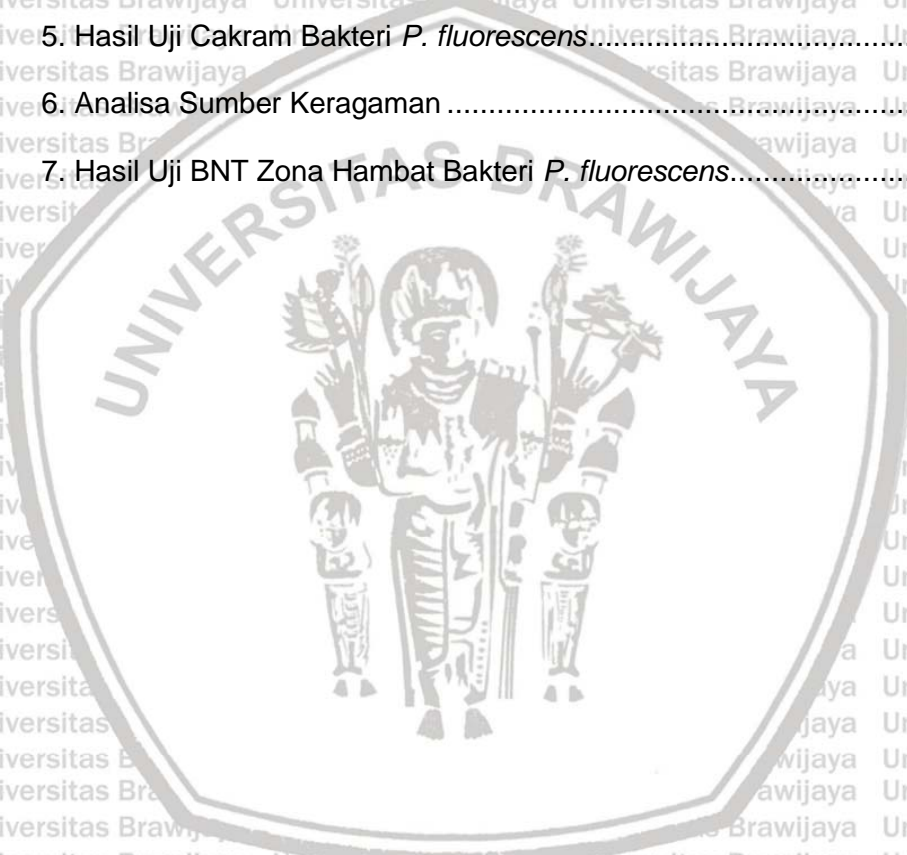
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i>	4
2. Rimpang Lengkuas Merah (<i>Alpinia purpurata</i>)	6
3. Denah Penelitian	14
4. Hasil Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>)	22
5. Hasil Uji Cakram	24
6. Hubungan Dosis dan Diameter Zona Hambat	27



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat Penelitian.....	10
2. Bahan Penelitian.....	11
3. Larutan Standart Mc. Farland	15
4. Hasil Uji MIC menggunakan Spektrofotometer.....	23
5. Hasil Uji Cakram Bakteri <i>P. fluorescens</i>	25
6. Analisa Sumber Keragaman	26
7. Hasil Uji BNT Zona Hambat Bakteri <i>P. fluorescens</i>	26



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat-alat Penelitian.....	34
2. Bahan-bahan Penelitian.....	38
3. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>P. Fluorescens</i>	41
4. Hasil Fitokimia Lengkuas Merah (<i>Alpinia purpurata</i>).....	42
5. Hasil Perhitungan Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah (<i>A. purpurata</i>).....	43
6. Pembuatan Larutan Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah (<i>A. purpurata</i>).....	44
7. Hasil Uji Cakram.....	46
8. Perhitungan Data Hasil Penelitian.....	47



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya ikan di Indonesia mengalami perkembangan dari tahun ke tahun. Perkembangan budidaya diakibatkan permintaan pasar yang meningkat akibat tingginya kesadaran masyarakat mengonsumsi ikan. Budidaya yang sering dilakukan oleh masyarakat Indonesia adalah budidaya ikan air tawar. Proses budidaya mengalami permasalahan diantaranya adanya serangan penyakit. Serangan penyakit merupakan salah satu pemicu kegagalan budidaya yang dapat diakibatkan oleh tingginya padat tebar (Fidyandini, 2020).

Intensitas padat tebar yang tinggi merupakan pemicu munculnya berbagai macam penyakit. Penyakit yang sering menyerang organisme budidaya air tawar merupakan penyakit bakterial. Budidaya ikan dengan padat tebar tinggi atau sistem intensif menjadikan ikan mudah mengalami stres ditambah dengan kualitas air yang buruk mendukung pertumbuhan bakteri merugikan. Bakteri patogen yang sering menginfeksi ikan air tawar umumnya berasal dari genus *Pseudomonas* sp. salah satunya *Pseudomonas fluorescens*. *P. fluorescens* mengakibatkan pembengkakan, luka bahkan dapat mengakibatkan kematian masal (Budianto dan Suprastyani, 2017).

Permasalahan penyakit pada organisme budidaya akibat bakteri patogen biasa menggunakan antibiotik sebagai upaya pengobatan. Penggunaan antibiotik dapat menyebabkan resistensi bakteri terhadap bahan kimia sehingga akan menimbulkan penyakit patogenik lainnya. Penggunaan antibiotik akan menyebabkan mutasi kromosom (Yulvizar *et al.*, 2014). Penggunaan bahan alami merupakan alternatif dalam mengatasi penyakit bakterial.

Penggunaan bahan alami lebih dianjurkan dikarenakan memiliki efek samping kecil, bahan mudah didapat dan harga yang ekonomis. Bahan alami yang dapat digunakan adalah bahan yang mengandung zat antibakteri salah satunya adalah lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K. Schum). Bahan alami yang terkandung dalam lengkuas merah antara lain minyak atsiri, flavonoid, fenol, terpenoid dan lain-lain yang bersifat bakterisidal. Flavonoid merupakan senyawa fenol yang bekerja dengan cara mendenaturasi protein dan merusak membran sel bakteri. Denaturasi protein akan mengakibatkan aktivitas metabolisme sel pada bakteri terhenti sehingga akan menyebabkan kematian sel bakteri (Sari et al., 2017)

Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian tentang pengaruh ekstrak lengkuas merah (*Alpinia purpurata*) terhadap daya hambat bakteri *Pseudomonas fluorescens* secara in vitro.

1.2 Perumusan Masalah

Bakteri *Pseudomonas fluorescens* adalah salah satu bakteri genus *Pseudomonas* yang menginfeksi air tawar dengan gejala pembengkakan, luka pada permukaan, serta dapat mengakibatkan kematian massal. Penggunaan antibiotic atau bahan kimia berlebih dalam jangka panjang akan mengakibatkan resistensi bagi organisme budidaya serta penumpukan bahan organik di perairan. Penggunaan antibiotik dapat diganti dengan menggunakan bahan alami yang mengandung antibakteri salah satunya lengkuas merah. Lengkuas merah mengandung tannin, flavonoid, alkaloid dan minyak atsiri yang bertindak sebagai antibakteri. Berdasarkan uraian di atas, dapat dirumuskan masalah dalam penelitian yaitu sebagai berikut:

1. Apakah pemberian ekstrak lengkuas merah (*A. purpurata*) dapat berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *Pseudomonas fluorescens*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut:

1. Untuk mengetahui pengaruh ekstrak lengkuas merah (*A. purpurata*) pada bakteri *Pseudomonas fluorescens*.

1.4 Hipotesis

H0 : Diduga pemberian ekstrak lengkuas merah (*A. purpurata*) tidak berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

H1 : Diduga pemberian ekstrak lengkuas merah (*A. purpurata*) berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

1.5 Tempat dan Waktu Penelitian

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

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *Pseudomonas fluorescens* adalah sebagai berikut

(Scales *et al.*, 2014):

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria

Class : Gammaproteobacteria

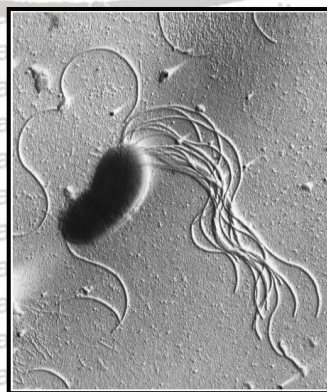
Order : Pseudomonadales

Family : Pseudomonadaceae

Genus : *Pseudomonas*

Species : *Pseudomonas fluorescens*

Pseudomonas merupakan kelompok bakteri berbentuk batang. Ukuran bakteri *Pseudomonas* antara 0,5-1,0 x 1,5-5,0 μm , merupakan bakteri gram negatif yang bersifat aerob, motil dengan letak flagella berlawanan, katalase positif, biasanya berada pada tanah, air, dan laut (Astriani, 2017). Bakteri *Pseudomonas fluorescens* merupakan bakteri gram negatif berbentuk batang (Gambar 1) dengan ukuran 0,8 – 1,0 μm (Hardi dan Pebrianto, 2012).



Gambar 1. Bakteri *Pseudomonas fluorescens* (Scales *et al.*, 2014)

2.1.2 Habitat

Pseudomonas fluorescens merupakan salah satu bagian genus *Pseudomonas* yang tergolong ke dalam bakteri gram negatif. Bakteri *Pseudomonas fluorescens* dapat ditemukan sebagai patogen, sebagai organisme yang hidup bebas di air dan tanah serta tanaman rizosfer dan endosfer (Salmeron *et al.*, 2017). Bakteri *Pseudomonas fluorescens* biasanya dominan pada perairan tawar. Bakteri *Pseudomonas fluorescens* merupakan patogen pada ikan budidaya air tawar (Hardi *et al.*, 2014).

2.1.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan

Tanda penyerangan atau gejala terinfeksi organisme oleh bakteri *P. fluorescens* adalah munculnya bisul atau *hemorrhagic septicemia* pada bagian kulit, sirip, rongga perut, dan organ dalam. Bakteri *P. fluorescens* akan mengakibatkan anemia. Bakteri ini bahkan dapat menyebabkan kematian masal pada organisme budidaya (Sianturi *et al.*, 2019).

Bakteri *Pseudomonas fluorescens* dominan menginfeksi ikan air tawar. Bakteri ini merupakan agen penyebab septicemia dan munculnya ulkus pada ikan tertentu. Organ ikan yang terinfeksi bakteri *Pseudomonas fluorescens* adalah pendarahan pada organ hati, ginjal dan usus. Tanda jika ikan terinfeksi *Pseudomonas fluorescens* adalah kulit rusak, sisik lepas, serta adanya memar dan luka dan produksi lender berlebih (Hardi *et al.*, 2014).

2.2 Lengkuas Merah

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi lengkuas merah (*A. purpurata*) adalah sebagai berikut (Aidah, 2020):

Kingdom : Plantae

Divisi : Spermatophyta
Class : Monocotyledonae
Order : Zingiberales
Family : Zingiberaceae
Genus : Alpinia
Species : *Alpinia purpurata*

Lengkuas merah (*A. purpurata*) memiliki rimpang, batang, daun, buah dan bunga. Batang lengkuas merah semu, tegak, dan dapat mencapai tinggi 1-2 meter. Daun lengkuas merah menyirip dengan ujung daun runcing. Bunga lengkuas merah berbentuk lonceng di ujung batang sementara buah lengkuas merah berbentuk bulat, lengkuas muda berwarna hijau-kekuningan setelah tua menjadi hitam kecoklatan. Rimpang berbentuk silindris dengan ukuran berkisar antara 2-4 cm dan bercabang-cabang. Rimpang lengkuas merah bagian luar berwarna kemerahan atau kuning kemerahan (Gambar 2) sedangkan bagian dalam rimpang berwarna putih (Aidah, 2020).



Gambar 2. Rimpang Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*) (Aidah, 2020)

2.2.2 Bahan Aktif

Rimpang lengkuas merah memiliki bahan aktif minyak atsiri yang bertindak sebagai antijamur dan antibakteri. Kandungan minyak atsiri berwarna kehijauan dengan komponen utamanya berupa 48% metilsinamat, 20 – 30%

sineol, 1% kamfer, dan sisanya d-pinen, galangin, dan eugenol penyebab rasa pedas pada lengkuas merah. Selain mengandung minyak atsiri, lengkuas merah (*Alpinia purpurata*) mengandung saponin dan tannin, serta flavonoid (Azzahra *et al.*, 2013).

Rimpang lengkuas merah mengandung kurang lebih 1% minyak atsiri berwarna kehijauan yang terdiri dari metilsinamat 48%, sineol 20% - 30%, kamfer 1%, seskuiterpen, d-pinen, galangin, dan lain-lain. Selain itu rimpang lengkuas merah mengandung fenol, flavonoid, dan terpenoid. Fenol merupakan senyawa yang terdapat pada vakuola sel tumbuhan. Golongan terbesar fenol adalah flavonoid dan golongan bahan polimer penting seperti tannin, lignin, dan melanin (Tambun *et al.*, 2016).

2.2.3 Aktivitas Antimikroba

Rimpang lengkuas merah memiliki kandungan minyak atsiri yang didalamnya terdapat zat aktif yang memiliki aktivitas antimikroba salah satunya fenol. Fenol berperan dalam mengobati ikan yang terinfeksi bakteri, fenol berkoagulasi dengan protein seluler dan menyebabkan memberan sel menjadi tipis dan rusak. Flavonoid dalam rimpang lengkuas merah bertindak sebagai antibakteri dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membrane sel, dan menghambat metabolisme energi. Saponin dalam rimpang lengkuas merah bekerja sebagai antibakteri dengan mengganggu dan mengurangi kestabilan membrane sel sehingga menyebabkan sitoplasma keluar dari sel yang mengakibatkan kematian sel (Sari *et al.*, 2017).

Aktivitas antimikroba ekstrak rimpang lengkuas merah diantaranya terdapat minyak atsiri. Minyak atsiri tersusun dari kelompok terpenoid dan fenil propane. Fenil propane memiliki cabang berupa gugus fenol dan eter fenol. Senyawa fenol dapat mendenaturasi protein, merusak dinding dan membrane sel

serta menonaktifkan enzim-enzim. Senyawa fenol bersifat bakterisidal.

Mekanisme kerja antibakteri ekstrak lengkuas merah dalam menghambat bakteri adalah dengan merusak susunan dan merubah mekanisme permeabilitas dinding sel bakteri (Kandou *et al.*, 2016).

2.3 Uji Efektivitas Antimikroba secara In Vitro

Metode yang digunakan pada pengujian in vitro adalah metode difusi dan dilusi. Metode difusi, parameter yang diamati adalah zona hambat yang terbentuk, yaitu dengan mengukur diameter zona jernih di sekitar sumur dengan penggaris atau dengan jangka sorong (Ikrom *et al.*, 2014). Metode dilusi dapat dilakukan dengan menggunakan MIC. MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) adalah konsentrasi minimum antimikroba dapat menghambat mikroorganisme sesudah 18 sampai dengan 24 jam masa inkubasi. Nilai MIC merupakan nilai yang didapat dari hasil spektrofotometri (Soelama *et al.*, 2015).

Penentuan aktivitas antimikroba dapat dilakukan dengan menggunakan metode difusi dan dilusi. Metode difusi adalah teknik kualitatif karena metode ini hanya akan menunjukkan ada atau tidaknya senyawa dengan aktivitas antimikroba dengan menggunakan kertas cakram. Metode dilusi digunakan untuk kuantitatif yang akan menentukan Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) (Dewi *et al.*, 2019). Uji Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) bertujuan untuk mencari dosis terendah bahan antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan menggunakan ekstrak. Metode yang digunakan dalam uji MIC adalah metode pengenceran (Jampil *et al.*, 2017).

2.4 Ekstraksi dengan Metode Maserasi

Ekstraksi merupakan metode pemisahan suatu zat berdasarkan pelarut. Etanol merupakan pelarut yang banyak digunakan dalam proses isolasi senyawa

organik bahan alami karena dapat melarutkan seluruh golongan metabolit sekunder. Faktor yang mempengaruhi ekstraksi antara lain ukuran bahan, suhu ekstraksi, dan pelarut. Ukuran bahan yang kecil dapat memperluas permukaan sehingga mempercepat pelarut ke dalam bahan yang akan diekstrak. Suhu ekstraksi yang tinggi akan mempercepat proses ekstraksi. Pelarut yang tepat akan menjadikan ekstrak mudah larut (Tambun *et al.*, 2016). Etanol 96% merupakan pelarut pengestraksi yang *extractive power* terbaik untuk semua senyawa yang mempunyai berat molekul rendah seperti saponin, alkohol, dan flavonoid (Arifianti *et al.*, 2014).

Ekstraksi adalah proses pemisahan berdasarkan perbedaan kelarutan bahan. Ekstraksi pada umumnya mengambil senyawa tertentu. Metode ekstraksi yang sering digunakan adalah metode maserasi. Metode maserasi dilakukan dengan mencampurkan serbuk daun dan ditambahkan pelarut seperti etanol. Serbuk dan pelarut dihomogenkan dan direndam selama 24 jam. Hasil maserasi disaring sehingga didapatkan ekstrak cair (Nurhasnawati *et al.*, 2017)

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat - alat Penelitian

Alat – alat yang digunakan pada penelitian pengaruh pemberian ekstrak lengkuas merah (*A. purpurata*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* disajikan pada Tabel 1. Dokumentasi alat penelitian yang digunakan disajikan pada Lampiran 1.

Tabel 1: Alat Penelitian

No	Alat	Kegunaan
1	Tabung reaksi	Sebagai tempat untuk peremajaan bakteri pada media miring
2	Rak tabung reaksi	Sebagai tempat meletakkan tabung reaksi
3	Gelas ukur	Sebagai tempat mengukur media cair
4	Erlenmeyer	Sebagai tempat pembuatan media
5	<i>Beaker glass</i>	Sebagai tempat tabung reaksi saat sterilisasi
6	Pinset	Sebagai alat untuk mengambil kertas cakram
7	Inkubator	Sebagai tempat inkubasi
8	Jarum ose	Sebagai alat untuk mengambil dan menanam bakteri
9	Blender	Sebagai penghalus bahan kering hingga menjadi simplisia
10	Corong	Sebagai alat untuk memudahkan memasukkan bahan maserasi ke dalam Erlenmeyer
11	Timbangan digital	Sebagai alat untuk menimbang dengan ketelitian 10^{-3}
12	Bunsen	Sebagai alat untuk pembakaran dan pengondisian steril
13	<i>Laminary Air Flow</i> (LAF)	Sebagai tempat penanaman bakteri dalam keadaan steril
14	Lemari pendingin	Sebagai tempat penyimpanan bakteri
15	<i>Rotary vacuum evaporator</i>	Sebagai alat untuk memisahkan cairan dan padatan pada proses pembuatan ekstrak
16	Autoklaf	Sebagai alat sterilisasi alat dan bahan sebelum digunakan
17	<i>Sprayer</i>	Sebagai tempat alcohol
18	Mikropipet	Sebagai alat untuk mengambil larutan dengan ukuran 100-1000mikronliter
19	<i>Blue tip</i>	Sebagai alat untuk menuang campuran bakteri
20	Spatula	Sebagai alat untuk mengaduk dan mengambil ekstrak
21	Jangka sorong	Sebagai alat untuk mengukur diameter zona hambat
22	<i>Vortex mixer</i>	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan

Tabel 1 (Lanjutan)

No	Alat	Kegunaan
23	Hot plate	Sebagai alat untuk memanaskan media
24	Toples	Sebagai tempat saat proses maserasi
25	Botol film	Sebagai tempat untuk mengencerkan ekstrak
26	Cawan petri	Sebagai tempat untuk menanam bakteri dan meletakkan kertas cakram
27	Gunting	Sebagai alat untuk memotong benang
28	Nampan	Sebagai wadah untuk meletakkan alat dan bahan

3.1.2 Bahan – bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan pada penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak lengkuas merah (*A. purpurata*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* disajikan pada Tabel 2. Dokumentasi bahan penelitian yang digunakan disajikan pada Lampiran 2.

Tabel 2. Bahan Penelitian

No	Bahan	Kegunaan
1	Rimpang lengkuas merah (<i>A. purpurata</i>)	Sebagai bahan ekstrak yang akan diuji daya hambatnya
2	Bakteri <i>P. fluorescens</i>	Sebagai bahan penelitian
3	MHA (<i>Mueller Hinton Agar</i>)	Sebagai media hidup bakteri <i>P. fluorescens</i>
4	PSA (<i>Pseudomonas Selective Agar</i>)	Sebagai media peremajaan bakteri
5	TSB (<i>Tryptone Soy Agar</i>)	Sebagai media pengencer bakteri
6	Alkohol 70%	Sebagai bahan aseptis
7	DMSO 10%	Sebagai pelarut ekstrak
8	Etanol 96%	Sebagai bahan pelarut saat proses maserasi
9	Akuades	Sebagai pelarut media
10	Spiritus	Sebagai bahan bakar Bunsen
11	Alumunium foil	Sebagai bahan untuk menutupi alat pada proses sterilisasi
12	Kertas saring	Sebagai bahan untuk menyaring hasil maserasi
13	Kertas cakram ukuran 6 mm	Sebagai bahan untuk mengetahui besar zona bening pada ekstrak
14	Kertas label	Sebagai pemberi tanda pada setiap perlakuan
15	Kertas bekas	Sebagai pembungkus alat yang akan disterilisasi
16	Benang kasur	Sebagai bahan untuk mengikat alat saat sterilisasi
17	Kapas	Sebagai bahan untuk menutup alat saat sterilisasi

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan pada penelitian adalah metode eksperimental. Yusainy (2019) menyatakan bahwa metode eksperimen merupakan metode yang digunakan peneliti untuk mengetahui hubungan sebab akibat antara variabel terikat dan bebas. Peneliti melakukan manipulasi atau mengontrol variabel bebas untuk mengetahui pengaruh pada variabel terikat.

3.3 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian Pengaruh ekstrak lengkuas merah (*A. purpurata*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rahmawati dan Erina (2020) menyatakan bahwa Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan percobaan paling sederhana diantara rancangan baku lainnya. Rancangan Acal Lengkap (RAL) biasa digunakan pada percobaan laboratorium. Kelebihan Rancangan Acak Lengkap (RAL) adalah rancangan denah percobaan lebih mudah. Analisa data penelitian relatif sederhana. Fleksibel dalam penggunaan jumlah perlakuan.

Penelitian dilakukan untuk mengetahui pengaruh ekstrak lengkuas merah (*A. purpurata*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* dan dosis terbaik ekstrak untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Penelitian ini menggunakan variabel bebas ekstrak kasar lengkuas merah dengan perlakuan perbedaan konsentrasi ekstrak lengkuas merah untuk mengetahui daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Model umum RAL adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

- Y : respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j
- μ : nilai tengah umum
- T : pengaruh perlakuan ke-i

E : pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

Rancangan percobaan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari lima perlakuan dengan empat kali ulangan dan dua kontrol yaitu kontrol positif berupa *Tetracycline* 30 ppm dan kontrol negatif tanpa pemberian ekstrak.

Penggunaan *Tetracycline* 30 ppm dikarenakan antibiotik tersebut memiliki spektrum yang luas dan dapat digunakan pada bakteri gram positif maupun negatif. Perlakuan yang digunakan adalah pemberian ekstrak rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) dengan dosis yang berbeda sebagai daya hambat terhadap bakteri *Pseudomonas fluorescens*. Penentuan dosis perlakuan berdasarkan uji MIC dengan melihat tingkat kekeruhan dan nilai absorbansi yang mendekati kontrol positif. Uji MIC dilakukan dengan dosis 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 0.1 ppm, dan 0.01 ppm. Dosis 100 ppm merupakan dosis dengan nilai absorbansi dan tingkat kekeruhan mendekati kontrol positif sehingga dosis tersebut merupakan dosis minimal yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Selanjutnya membuat interval perlakuan dengan jarak 5 ppm karena untuk mengetahui apakah semakin menghambat dari hasil uji MIC. Adapun perlakuan yang digunakan adalah sebagai berikut:

Perlakuan A : Perlakuan ekstrak rimpang lengkuas merah sebesar 100 ppm

Perlakuan B : Perlakuan ekstrak rimpang lengkuas merah sebesar 105 ppm

Perlakuan C : Perlakuan ekstrak rimpang lengkuas merah sebesar 110 ppm

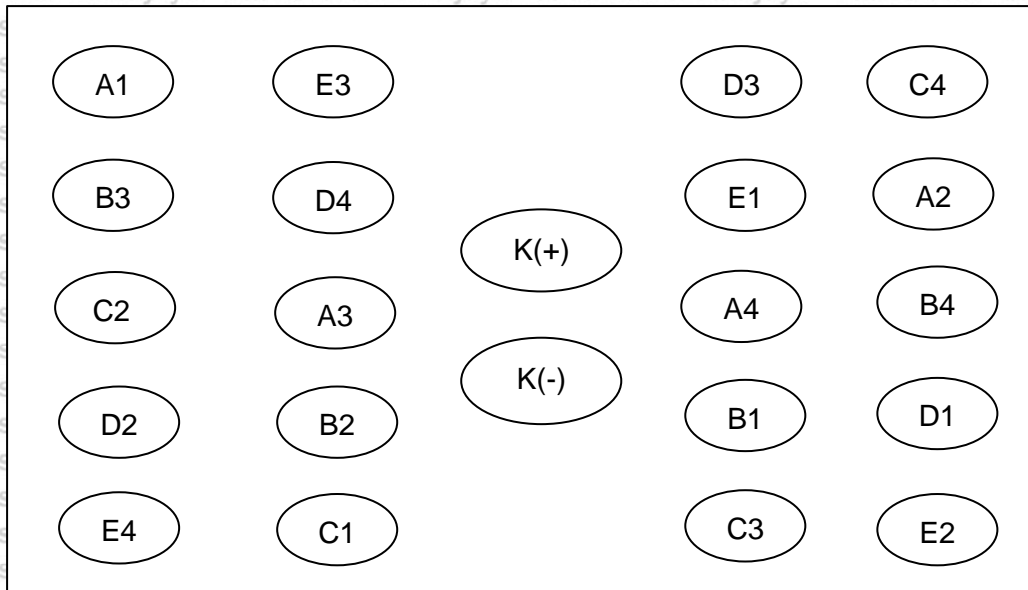
Perlakuan D : Perlakuan ekstrak rimpang lengkuas merah sebesar 115 ppm

Perlakuan E : Perlakuan ekstrak rimpang lengkuas merah sebesar 120 ppm

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

Kontrol (-) : Perlakuan tanpa pemberian ekstrak rimpang lengkuas merah

Denah penelitian yang akan dilakukan yaitu sebagai berikut (Gambar 3):



Gambar 3. Denah Penelitian

Keterangan:

A, B, C, D, E : Perlakuan

K+ : Kontrol positif

K- : Kontrol negatif

1,2,3,4 : Ulangan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan Penelitian

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi merupakan proses persiapan penelitian yang dilakukan untuk menjadikan alat bahan steril bebas dari mikroorganisme. Tridianti *et al.*, (2013), sterilisasi adalah proses pemusnahan segala mikroorganisme yang akan menyebabkan kontaminasi. Efek sterilisasi menjadikan perangkat bebas dari agen pathogen. Metode untuk sterilisasi biasanya menggunakan panas, bahan kimia, atau radiasi untuk menghancurkan patogen. Alat untuk sterilisasi yang sering digunakan salah satunya adalah autoklaf. Penggunaan autoklaf untuk sterilisasi yaitu pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

b. Persiapan Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

Isolat bakteri *Pseudomonas fluorescens* didapatkan dari Balai Besar Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara yaitu pada Laboratorium Uji. Isolat bakteri yang telah didapat diremajakan pada media TSB pada tabung reaksi. Perhitungan jumlah bakteri yang terdapat pada media TSB dapat dilakukan dengan metode Mc. Farland dan diperoleh kepadatan 3×10^8 sel/ml, dengan tahapan perhitungan sebagai berikut:

- 1) 11 tabung reaksi disiapkan dalam kondisi bersih
- 2) Membuat larutan Mc. Farland yaitu H₂SO₄ murni 1% dan larutan BaCl 1%
- 3) Kedua larutan tersebut dicampurkan dalam tabung berdasarkan perbandingan pada ketentuan Mc. Farland. Kemudian diisi 10 ml pada masing-masing tabung dan ditutup
- 4) Warna suspense bakteri pada media cair dicocokkan dengan tabung larutan standart Mc. Farland
- 5) Tabel standart Mc. Farland dapat dilihat pada Tabel 3. Uji Biokimia bakteri *P. fluorescens* dapat dilihat pada Lampiran 3.

Tabel 3. Larutan Standart Mc. Farland

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

c. Ekstraksi Lengkuas Merah (*A. purpurata*)

Lengkuas merah didapatkan dari Materia Medica Batu yang terletak pada Jalan Lahor No. 87, Pesanggrahan, Kec. Batu, Kota Batu, Jawa Timur. Lengkuas merah yang digunakan sebanyak 3 kg. Lengkuas merah dihaluskan menggunakan blender sampai halus hingga didapatkan hasil berupa serbuk. Lengkuas merah yang telah dihaluskan dilakukan proses maserasi. Serbuk lengkuas merah sebanyak 100gram dimasukkan ke dalam wadah dan ditambahkan pelarut etanol 96% dimana semakin besar konsentrasi semakin besar pula bahan aktif yang akan terikat. Pelarut etanol yang digunakan sebanyak 600 ml sehingga diperoleh perbandingan bahan dengan pelarut sebesar 1:6. Toples ditutup menggunakan alumunium foil dan kresek hitam serta dihindarkan dari sinar matahari. Proses maserasi ini direndam selama 3 x 24 jam agar dapat mengikat senyawa bioaktif yang terdapat pada lengkuas merah. Setelah 3 hari, filtrat disaring menggunakan kertas saring untuk memisahkan larutan dengan ampas. Hasil maserasi dievaporasi menggunakan alat *rotary evaporator*. Proses evaporasi menghasilkan ekstrak dalam bentuk pasta dan dilakukan uji fitokimia. Adapun hasil fitokimia dapat dilihat pada Lampiran 4. Pasta yang dihasilkan sebanyak 15,65gram sehingga rendemen yang didapatkan sebesar 15,56%. Adapun perhitungan rendemen dapat dilihat pada Lampiran 5.

d. Pembuatan Media

• Media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) untuk Peremajaan Bakteri

Media yang digunakan untuk peremajaan bakteri *Pseudomonas fluorescens* adalah PSA (*Pseudomonas Selective Agar*). Adapun prosedur pembuatannya ialah media PSA ditimbang sebanyak 0,48 gram. Selanjutnya media dilarutkan ke dalam erlenmeyer yang berisi akuades sebanyak 10 ml dan diaduk menggunakan spatula dan dipanaskan pada *hot plate* agar homogen.

Setelah larut dan dingin, erlenmeyer ditutup menggunakan kapas dan ditutup lagi dengan menggunakan alumunium foil. Media yang sudah tertutup disterilisasi menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit dan ditunggu hingga hangat lalu dituang ke dalam tabung reaksi steril.

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

Media yang digunakan untuk media kultur bakteri *Pseudomonas fluorescens* adalah TSB (*Tryptone Soy Broth*). Adapun prosedur pembuatan media TSB ditimbang sebanyak 0,3 gr. Selanjutnya media dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan akuades sebanyak 10 ml. Setelah media dan aquades terlarut, kemudian erlenmeyer yang berisi media cair dipanaskan dengan *hot plate* agar media homogen. Media yang sudah homogen ditutup dengan kapas dan dilapisi alumunium foil. Kemudian distrerilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

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

Media yang digunakan sebagai media untuk uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) adalah TSB (*Tryptic Soy Broth*). Adapun prosedur dalam pembuatan media TSB (*Tryptic Soy Broth*) untuk uji MIC ditimbang sebanyak 2,4 gram. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dilarutkan dengan 80 ml akuades kemudian dihomogenkan. Media dituang kedalam 8 tabung reaksi masing-masing sebanyak 10 ml. Kemudian tabung ditutup dengan kapas dan alumunium foil. Media disterilisasi dengan autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.

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

Media yang digunakan untuk Uji Cakram adalah MHA (*Mueller Hinton Agar*). Adapun prosedur pembuatan media MHA ditimbang media MHA sebanyak 3,8 gram. Selanjutnya media dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan

dilarutkan dengan akuades sebanyak 100 ml kemudian dihomogenkan.

Erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas dan dilapisi aluminium foil.

Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm selama 15 menit dan ditunggu hingga hangat kemudian dituang ke dalam 4 cawan petri.

e. Peremajaan Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

Peremajaan bakteri dilakukan untuk menginokulasi kembali bakteri, peremajaan dilakukan dalam keadaan steril dengan menginokulasi kembali isolat

bakteri dengan menggunakan jarum ose dan digoreskan pada agar miring dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 32°C. Andayani, *et al.* (2019)

menyatakan bahwa peremajaan bakteri dilakukan secara steril, jarum ose yang akan digunakan untuk menginokulasi terlebih dahulu dipanaskan diatas bunsen dan digoreskan pada media secara zig-zag dalam kondisi steril kemudian diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam.

f. Kultur Bakteri

Kultur bakteri dilakukan menggunakan biakan bakteri yang telah diremajakan pada media agar miring menggunakan jarum ose sebanyak 1 gores.

Jarum ose dicelupkan pada media dan dinkubasi menggunakan inkubator selama 24 jam dengan suhu 32°C. Andayani, *et al.* (2019) menyatakan bahwa

prosedur kultur bakteri adalah dengan mengambil 1 gores jarum ose bakteri yang sudah diremajakan dalam keadaan steril. Jarum ose yang berisi bakteri dicelupkan pada media dan disimpan pada inkubator selama 24 jam.

g. Pembuatan Dosis Ekstrak Lengkuas Merah (*A. purpurata*)

Ekstrak kasar lengkuas merah dalam bentuk pasta diencerkan dengan pelarut DMSO 10% dan ditentukan dosis yang diinginkan dalam satuan ppm (mg/L). Satuan liter dikonversikan menjadi mililiter dan membuat dosis ekstrak

tertinggi sebanyak 10 ml sebagai induk. Dosis ekstrak yang lebih kecil dibuat dengan pengenceran dari dosis tertinggi dengan rumus sebagai berikut:

$$V_1N_1 = V_2N_2$$

Keterangan:

V1 = Volume larutan stok (ml)

V2 = Konsentrasi larutan stok (ppm)

V2 = Volume larutan yang diinginkan (ml)

N2 = Konsentrasi larutan yang diinginkan (ppm)

Perhitungan dosis ekstrak lengkuas merah dengan menggunakan pengenceran dapat dilihat pada Lampiran 6.

3.4.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Uji MIC

Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) dilakukan dengan menambahkan berbagai dosis ekstrak lengkuas merah yang telah dilarutkan menggunakan akuades dan DMSO 10% yang bertujuan untuk mengetahui dosis terkecil dalam menghambat bakteri *Pseudomonas fluorescens*. Uji MIC dilakukan dengan menggunakan tabung reaksi sebanyak 8 tabung yang telah berisi TSB (*Tryptic Soy Broth*) steril sebanyak 8 ml. Tabung reaksi diberi bakteri yang telah dikultur sebanyak masing – masing 1 ml. Kemudian diberi ekstrak lengkuas merah pada 7 tabung reaksi dengan dosis yang berbeda. Dosis yang digunakan pada penelitian pendahuluan menggunakan skala log yang berbeda - beda diantaranya 0.01 ppm, 0.1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm. Pada 2 tabung reaksi dijadikan kontrol positif dan negatif. Kontrol positif diberi antibiotik *tetracycline* 30 ppm dan kontrol negatif tanpa ekstrak. Selanjutnya tabung reaksi diinkubasi pada suhu 32°C selama 24 jam. Setelah diinkubasi dilakukan pengukuran absorbansi menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 635 nm. Nilai absorbansi antar perlakuan dicocokkan dengan nilai absorbansi kontrol positif. Nilai absorbansi yang mendekati kontrol positif dapat

digunakan untuk penentuan dosis uji cakram. Hasil uji MIC didapatkan dosis 100 ppm memiliki nilai absorbansi dan tingkat kekeruhan mendekati kontrol positif sehingga dosis 100 ppm merupakan dosis minimum ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Selanjutnya membuat interval perlakuan dengan jarak 5 ppm untuk mengetahui apakah semakin menghambat dari hasil uji MIC.

b. Uji Cakram

Uji cakram dilakukan untuk mengetahui kemampuan daya hambat ekstrak terhadap bakteri. Prosedur uji cakram yaitu cawan petri diisi dengan media MHA sebanyak 25 ml dan menyiapkan berbagai konsentrasi ekstrak lengkuas merah serta bakteri yang telah dikultur pada media TSB. Penanaman bakteri pada media MHA dilakukan dengan mencelupkan *cotton swap* pada bakteri. Selanjutnya bakteri digoreskan pada media MHA dengan metode sebar. Penanaman bakteri dilakukan pada *Laminary Air Flow* agar tidak terkontaminasi. Kertas cakram direndam pada masing – masing konsentrasi selama 30 menit lalu diletakkan pada lempeng agar yang telah ditanam bakteri. Cawan petri yang telah berisi bakteri, ekstrak dan kertas cakram diinkubasi selama 24 hingga 48 jam pada suhu 32°C. Pengamatan 48 jam untuk mengetahui sifat antibakteri pada rimpang lengkuas merah, bakteriostatik ataukah bakteriosidal. Setelah diinkubasi diukur zona bening di sekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong untuk menentukan konsentrasi optimum yang dapat menghambat bakteri.

3.5 Parameter Uji Penelitian

Parameter yang diamati pada penelitian ini terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama pada penelitian ini adalah besar diameter zona hambat bakteri yang diukur menggunakan jangka sorong dan

dinyatakan dalam satuan millimeter (mm). Parameter penunjang adalah suhu inkubasi.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh selanjutnya dianalisis secara statistik menggunakan analisis uji keragaman atau (ANOVA) dengan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 95%. Analisis statistik dilakukan untuk mengetahui pengaruh variabel bebas (perlakuan) terhadap parameter ukur. Jika data sidik ragam berpengaruh nyata maka untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan yaitu menggunakan uji beda nyata kecil (BNT) dan untuk mengetahui hubungan atau regresi antar perlakuan dengan diameter zona hambat menggunakan uji *polynomial orthogonal*.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji MIC

Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) dilakukan dengan menggunakan ekstrak rimpang lengkuas merah dengan tujuan untuk mengetahui dosis terkecil ekstrak dalam menghambat bakteri *P. fluorescens*. Uji MIC dilakukan dengan penelitian pendahuluan menggunakan skala log dengan metode pengenceran bertingkat meliputi 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 0.1 ppm, 0.01 ppm. Hasil spektrofotometer menunjukkan bahwa konsentrasi 100 ppm menghasilkan nilai absorbansi mendekati kontrol positif dengan tingkat kekeruhan yang mendekati kontrol positif, sehingga dapat dikatakan bahwa dosis minimum ekstrak rimpang lengkuas merah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* yaitu sebesar 100 ppm. Hasil uji MIC dapat dilihat pada Gambar 4 dan Tabel 4.



Gambar 4. Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Keterangan:

Tabung 1: 1000 ppm, Tabung 2: 100 ppm, Tabung 3: 10 ppm, Tabung 4: 1 ppm,
Tabung 5: 0.1 ppm, Tabung 6: 0.01 ppm, Tabung 7: Kontrol (+), Tabung 8:
Kontrol (-)

Tabel 4. Hasil Uji MIC menggunakan Spektrofotometer

No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Warna
1	1000	0,148	Bening
2	100	0,200	Bening
3	10	0,441	Agak Bening
4	1	0,668	Keruh
5	0,1	0,855	Keruh
6	0,01	0,902	Keruh
7	K (+)	0,187	Bening
8	K (-)	0,887	Keruh

Keterangan:

Tabung nomor 2: Konsentrasi 100 ppm yang dapat menghambat bakteri

P. fluorescens

Kontrol (+) : Perlakuan menggunakan antibiotik *Tetracycline* 30 ppm

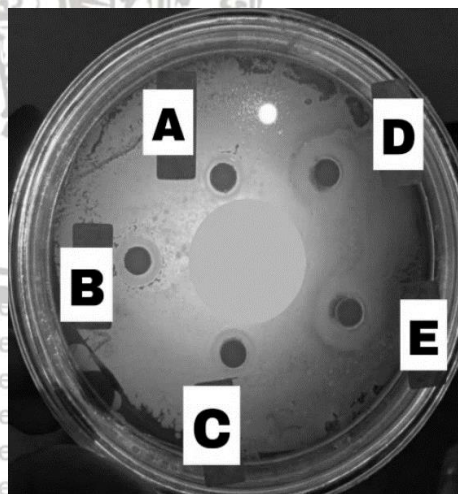
Kontrol (-) : Perlakuan tanpa menggunakan ekstrak

Hasil uji MIC berdasarkan Tabel 4, pada dosis 100 ppm dapat menghambat pertumbuhan *P. fluorescens* karena hasil spektrofotometer menunjukkan nilai absorbansi dosis 100 ppm mendekati nilai absorbansi kontrol positif dan warna pada dosis tersebut bewarna bening. Hal ini dikarenakan ekstrak rimpang lengkuas merah memiliki kandungan senyawa antibakteri yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Kandungan antibakteri pada rimpang lengkuas merah berdasarkan hasil uji fitokimia diantaranya mengandung flavonoid, tannin, fenol, dan saponin. Hal ini sesuai dengan pernyataan Puasa *et al.* (2019), rimpang lengkuas merah mengandung senyawa flavonoid, fenol, dan terpenoid. Rimpang lengkuas merah juga mengandung minyak atsiri yang berfungsi menghambat pertumbuhan dengan mengganggu terbentuknya membran sel. Abubakar *et al.* (2019), senyawa fenol bersifat koagulator protein sehingga protein akan menggumpal dan tidak bekerja, pada saat itu fenol berperan dalam mengganggu pembentukan dinding sel bakteri yang menyebabkan bakteri dapat kehilangan kemampuan membentuk koloni dan akan menyebabkan kematian sel bakteri. Tannin pada rimpang lengkuas merah bereaksi dengan membran sel sehingga terjadi inaktivasi materi genetik bakteri.

4.2 Uji Cakram

Uji Cakram merupakan uji yang digunakan untuk mengetahui kemampuan daya hambat suatu ekstrak, dimana pada penelitian ini menggunakan ekstrak rimpang lengkuas merah. Mulyadi *et al.* (2017), metode difusi cakram merupakan metode yang digunakan untuk mengetahui daya hambat suatu antibakteri. Metode cakram diaplikasikan dengan menggunakan kertas cakram. Kertas cakram direndam terlebih dahulu pada larutan uji, setelah itu diletakkan pada media yang telah diinokulasi bakteri. Pertumbuhan bakteri diamati setelah dilakukan inokulasi. Pengamatan bertujuan untuk melihat zona bening yang terbentuk di sekitar cakram.

Uji Cakram dilakukan dengan menggunakan dosis 100 ppm, 105 ppm, 110 ppm, 115 ppm, 120 ppm serta kontrol positif dan negatif. Hasil uji daya hambat bakteri *P. fluorescens* setelah pemberian ekstrak rimpang lengkuas merah dapat dilihat pada Gambar 5 sementara data hasil uji cakram dapat dilihat pada Tabel 5. Hasil penelitian keseluruhan dapat dilihat pada Lampiran 7.



Gambar 5. Hasil Uji Cakram

Keterangan:

Dosis perlakuan A = 100 ppm, B = 105 ppm, C = 110 ppm, D = 110 ppm, dan E = 120 ppm

Tabel 5. Hasil Rerata Uji Cakram Bakteri *P. fluorescens*

Perlakuan	Ulangan				Total	Rerata + SD
	1	2	3	4		
A (100 ppm)	8,01	8,2	8,15	8,22	32,58	8,15 ± 0,09
B (105 ppm)	8,58	8,06	8,625	8,65	33,92	8,48 ± 0,28
C (110 ppm)	9,175	9,17	9,18	9,06	36,59	9,15 ± 0,06
D (115 ppm)	9,65	9,652	9,016	9,023	37,34	9,34 ± 0,36
E (120 ppm)	10,01	10,35	10,86	10,9	42,12	10,53 ± 0,43
Total					182,54	

Berdasarkan Tabel 5, dapat disimpulkan ekstrak rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) berpengaruh terhadap bakteri *P. fluorescens* yang ditandai dengan terbentuknya zona bening. Diameter zona bening yang terbentuk di sekitar kertas cakram bergantung oleh besar kecilnya pemberian dosis, dimana semakin tinggi dosis ekstrak yang diberikan maka zona bening yang terbentuk akan semakin besar begitu juga sebaliknya. Hal ini sesuai dengan pernyataan Alfiah *et al.* (2015), besar kecilnya zona hambat atau zona bening yang terbentuk bergantung oleh besar kecilnya konsentrasi ekstrak yang diberikan. Semakin besar konsentrasi maka kemampuan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri semakin kuat. Besar kecilnya zona hambat juga dipengaruhi oleh faktor lain diantaranya suhu saat inkubasi, waktu pemasangan cakram serta jarak antar cakram. Besaran zona hambat diklasifikasikan menjadi beberapa tingkatan. Suliani *et al.* (2016), menyatakan bahwa diameter zona hambat sebesar ≥ 20 mm berarti sangat kuat, 10-20 mm berarti kuat, 5-10 mm berarti sedang dan ≤ 5 mm berarti lemah. Berdasarkan pernyataan tersebut respon daya hambat ekstrak rimpang lengkuas merah terhadap *P. fluorescens* pada perlakuan A, B, C, dan D termasuk kategori sedang sementara pada perlakuan E termasuk dalam kategori kuat.

Berdasarkan data hasil uji cakram ekstrak rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) dengan menggunakan 5 perlakuan dan 4 ulangan didapatkan

diameter zona hambat setelah pengamatan 24 jam dapat dilihat pada Tabel 5.

Pengaruh antar perlakuan dapat diketahui dengan melakukan analisa sumber keragaman. Data analisa sumber keragaman dapat dilihat pada Tabel 6 dan perhitungan lengkap disajikan pada Lampiran 8.

Tabel 6. Analisa Sumber Keragaman Zona Hambat Bakteri *P. fluorescens*

Sumber Keragaman	DB	JK	KT	Fhitung	F5%
Perlakuan	4	13.59	3.40	41.74*	3.06
Acak	15	1.22	0.08		
Total	19	14.81			

Keterangan; (*) = Berbeda nyata

Berdasarkan data hasil sumber keragaman didapatkan F hitung sebesar 41,74 dimana hasil tersebut lebih besar dari nilai F5%. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) berpengaruh nyata terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Selanjutnya dilakukan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan setiap perlakuan. Hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Uji BNT Zona Hambat Bakteri *P. fluorescens*

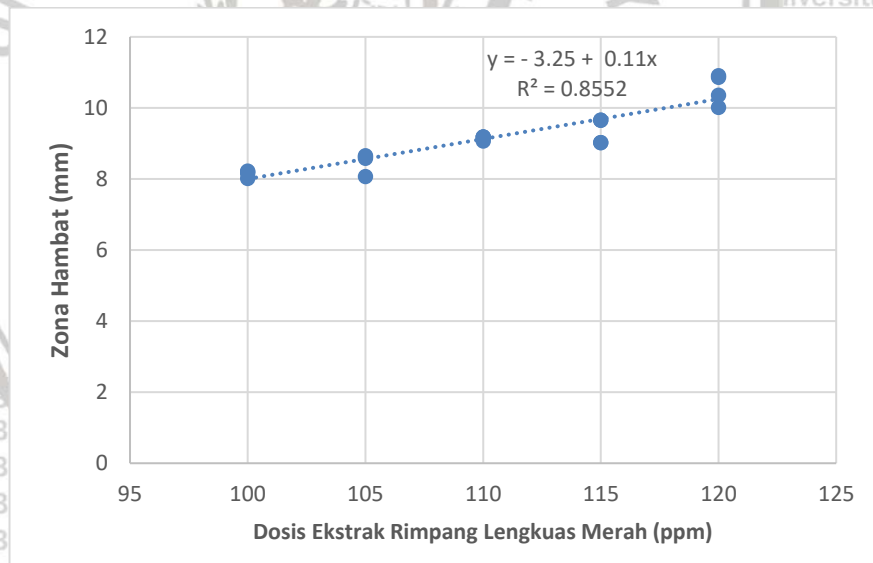
Perlakuan	A (8,15)	B (8,48)	C (9,15)	D (9,34)	E (10,53)	Notasi
A (8,15)	-	-	-	-	-	a
B (8,48)	0,33 ^{ns}	-	-	-	-	a
C (9,15)	1*	0,67*	-	-	-	b
D (9,34)	1,19*	0,86*	0,19 ^{ns}	-	-	bc
E (10,53)	2,38*	2,05*	1,38*	1,19*	-	c

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata

(*) = berbeda nyata

Berdasarkan data pada Tabel 7 dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak rimpang lengkuas merah berpengaruh terhadap pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Zona hambat tertinggi yang didapatkan sebesar 10,86 mm pada perlakuan E dan terendah sebesar 8,01 mm yaitu pada perlakuan A. Perlakuan A tidak memberikan pengaruh terhadap semua perlakuan, sehingga diberikan notasi a. Perlakuan B tidak memberikan pengaruh signifikan sehingga diberikan

notasi yang sama dengan sebelumnya yaitu a. Perlakuan C memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perlakuan A namun tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap perlakuan B sehingga diberi notasi b. Perlakuan D memberikan pengaruh signifikan terhadap perlakuan A namun tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap perlakuan B dan perlakuan C sehingga diberikan notasi bc. Perlakuan E memberikan pengaruh signifikan terhadap perlakuan A namun tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap perlakuan B, perlakuan C, dan perlakuan D sehingga diberikan notasi c. Kemudian untuk mengetahui hubungan atau regresi antara perlakuan dengan diameter zona hambat menggunakan uji *polynomial orthogonal*. Pada penelitian ini didapatkan hasil grafik regresi diameter zona bening yang terbentuk dari setiap perlakuan yaitu pada Gambar 6.



Gambar 6. Hubungan Dosis dan Diameter Zona Hambat

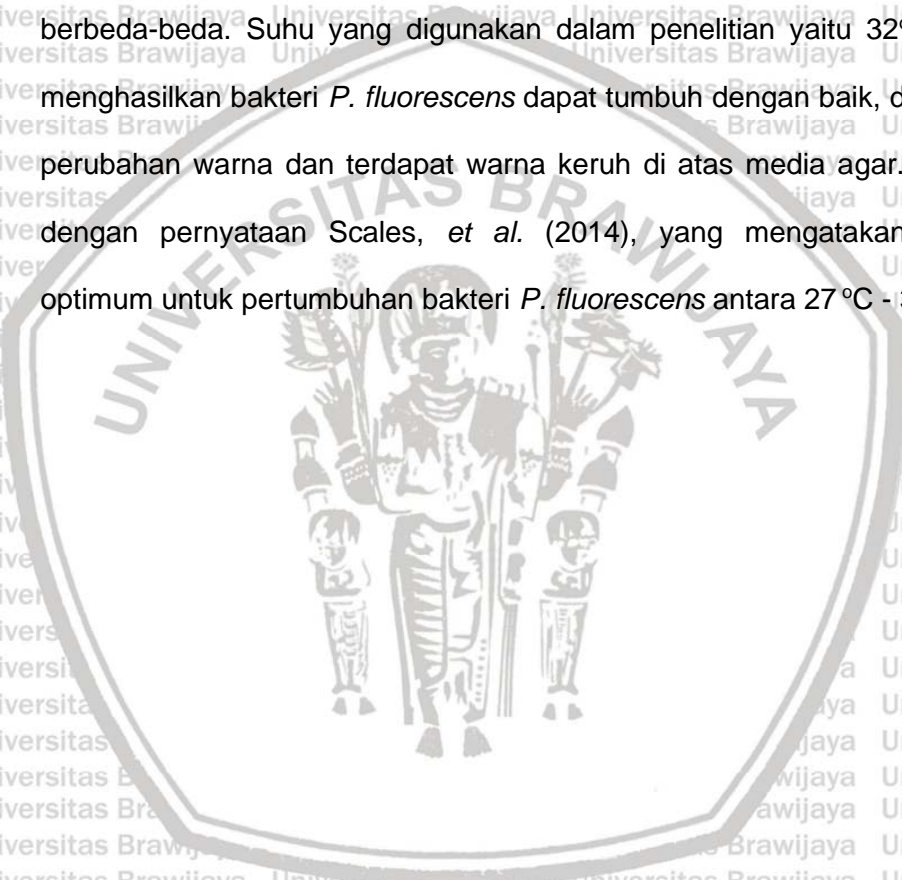
Berdasarkan Gambar 6, hubungan antara penambahan dosis perlakuan ekstrak rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) terhadap zona hambat menunjukkan pola linier dengan persamaan $y = -3.25 + 0.11x$ dan koefisien $R^2 = 0,85$. Nilai R^2 merupakan nilai koefisien determinasi yang menunjukkan jika

pengaruh perlakuan ekstrak terhadap respon daya hambat sebesar 85% dan 15% dipengaruhi oleh faktor luar seperti *human error*. Berdasarkan persamaan regresi linier tersebut pada dosis 100 ppm didapatkan daya hambat sebesar 7,75 mm, dosis 105 ppm didapatkan daya hambat 8,25 mm, dosis 110 ppm didapatkan daya hambat 8,85 mm, dosis 115 ppm didapatkan daya hambat 9,4 mm, dan dosis 120 ppm didapatkan daya hambat 9,95 mm. Berdasarkan kurva diatas maka setiap kenaikan dosis sebesar 5 ppm menghasilkan daya hambat sebesar 0,55 mm. Hal ini disebabkan hubungan antara perlakuan dengan zona bening yang terbentuk dimana semakin tinggi dosis semakin banyak jumlah senyawa antibakteri yang terkandung sehingga zona bening yang terbentuk semakin luas. Senyawa antibakteri yang terdapat pada rimpang lengkuas merah antara lain flavonoid, tannin, fenol, dan saponin. Hal sesuai dengan pernyataan Munfaati *et al.* (2015) bahwa semakin besar konsentrasi ekstrak maka semakin besar pula kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Konsentrasi yang tinggi mengandung senyawa antibakteri yang lebih banyak sehingga bakteri menyerap senyawa antibakteri yang lebih banyak dimana akan mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat. Hal ini didukung oleh pernyataan Ayuratri dan Kusnadi (2017), senyawa antibakteri yang meningkat seperti fenol akan menyebabkan kemampuan fenol dalam memutus ikatan peptidoglikan akan semakin meningkat sehingga dapat merusak dinding sel dan mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat. Mekanisme kerja ekstrak rimpang lengkuas dalam menghambat pertumbuhan bakteri adalah dengan merusak susunan dan mengganggu permeabilitas dinding sel bakteri (Kandou, *et al.*, 2016)

Pada penelitian dilakukan pengamatan 48 jam untuk mengetahui sifat antibakteri pada rimpang lengkuas merah. Hasil penelitian menunjukkan setelah inkubasi 48 jam diameter zona bening menjadi lebih rendah sehingga dapat disimpulkan rimpang lengkuas merah bersifat bakteriostatik. Hal ini didukung

oleh pernyataan Wiyanto (2010), inkubasi selama 48 jam dilakukan untuk mengetahui sifat dari ekstrak, jika zona hambat tetap berwarna bening maka ekstrak tersebut bersifat bakteriosidal sementara jika tumbuh bakteri atau zona bening mengecil maka ekstrak bersifat bakteriostatik.

Parameter penunjang yang digunakan dalam penelitian adalah suhu inkubator selama proses inkubasi. Hal ini dikarenakan pertumbuhan bakteri sangat dipengaruhi oleh suhu. Kisaran suhu setiap bakteri untuk tumbuh berbeda-beda. Suhu yang digunakan dalam penelitian yaitu 32°C. Suhu 32°C menghasilkan bakteri *P. fluorescens* dapat tumbuh dengan baik, ditandai dengan perubahan warna dan terdapat warna keruh di atas media agar. Hal ini sesuai dengan pernyataan Scales, *et al.* (2014), yang mengatakan bahwa suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* antara 27 °C - 32 °C.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan penelitian mengenai Pengaruh Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah (*A. purpurata*) terhadap Daya Hambat Bakteri *P. fluorescens* Secara In Vitro, ekstrak rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) berpengaruh terhadap bakteri *P. fluorescens* dimana semakin besar konsentrasi ekstrak yang diberikan semakin luas zona bening yang terbentuk.

5.2 Saran

Berdasarkan penelitian rimpang lengkuas merah (*A. purpurata*) berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Namun, diperlukan penelitian lanjutan untuk pengaplikasian pada ikan (In Vivo) untuk mengetahui keefektifitasan ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri.

DAFTAR PUSTAKA

- Abubakar, P. M. S., Fatimawali, YamLean, P. V. Y. (2019). Uji daya hambat ekstrak rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* K.Schum) terhadap pertumbuhan bakteri *Klebsiella pneumoniae* isolat sputum pada penderita pneumonia resisten antibiotik seftriakson. *PHARMACON*. 8(1): 11-22.
- Aidah, S. N. (2020). Ensiklopedia Lengkuas, Deskripsi, Filosofi, Manfaat, Budidaya, dan Peluang Bisnisnya. KBM Indonesia: Yogyakarta. 69hlm.
- Alfiah, R. R., Siti Khotimah, S., Turnip, M. (2015). Efektivitas Ekstrak Metanol Daun Sembung Rambat (*Mikania micrantha* Kunth) Terhadap Pertumbuhan Jamur *Candida albicans*. *Protobiont*. 4(1): 52-57
- Andayani, A., Suprastyani, H. dan Rahmawati, E. D. (2019). Pengaruh pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap daya hambat bakteri *Pseudomonas fluorescens* secara in vitro. *Journal of Fisheries and Marine Research*. 3(3): 301-307
- Arifianti, L., Oktarina, R.D. & Kusumawati, I. (2014). Pengaruh jenis pelarut pengekraksi Terhadap Kadar Sinensetin Dalam Ekstrak Daun *Orthosiphon stamineus* Benth. *E-Journal Planta Husada*. 12(1): 1-4
- Astriani, M. (2017). Skrining bakteri selulolitik asal tanah kebun pisang (*Musa paradisiaca*). *Jurnal Biota*. 3(1): 6-10
- Ayuratri, M. K. & Kusnadi, J. (2017). Aktivitas antibakteri kombucha jahe (*Zingiber officinale*) (kajian varietas jahe dan konsentrasi madu). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. 5(3): 95 - 107
- Budianto & Suprastyani, H. (2017). Aktivitas Antagonis *Bacillus subtilis* terhadap *Streptococcus iniae* dan *Pseudomonas fluorescens*. *Jurnal Veteriner*. 18(3): 409-415
- Dewi, R., Febriani, A. dan Wenas, D. M. (2019). Uji aktivitas antimikroba ekstrak metanol daun sirih (*Piper betle* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *Propioni bacterium acnes* dan khamir *Malassezia furfur*. *Sainstech Farm*. 12(1): 32-38
- Fidyandini, H. P., Elisidana, Y., Kartini, N. (2020). Pelatihan Penggunaan Probiotik dan Imunostimulan untuk Pencegahan dan Pengobatan Penyakit Ikan Lele pada Kelompok Pembudidaya Ikan Ulam Adi Jaya Kabupaten Mesuji. *Jurnal Sinergi*. 2: 50-54
- Hardi, E. H dan C. B. Pebrianto. (2012). Isolasi dan uji postulatkoeh *Aeromonas* sp. dan *Pseudomonas* sp. pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) di sentra budidaya loakulu kabupaten kutai kartanegara. *Jurnal Ilmu Perikanan Tropis*. 16(2): 35-39.
- Hardi, E. H., Pebrianto, C. A., Saptiani, G. (2014). Toksisitas Produk Ekstraseluler dan Intraseluler Bakteri *Pseudomonas* sp. pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Veteriner*. 15(3): 312-322

Ikrom, Denok A. T.R , Reni W. A., Bintang B., Rafika T. N., Wasito. (2014). Studi In Vitro Ekstrak Etanol Daun Kamboja (*Plumeria alba*) sebagai Anti Aeromonas hydrophila. *JSV* 32(1): 102-114.

Jampil, T. H., Syawal, H., dan Riauaty, M. (2017). Sensitivitas ekstrak kulit batang mangrove *Rhizophora* sp. terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida*. *Jurnal Online Mahasiswa Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Riau*. 4(2): 1-12.

Kandou, A., Fatimawali, Bodhi, W. (2016). Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata* (Vieill) K. Schum) terhadap bakteri *Klebsiella pneumoniae* isolat sputum penderita bronkitis secara in vivo. *PHARMACON Jurnal Ilmiah Farmasi UNSRAT*. 5(3): 131-138.

Luhurningtyas, F. P., Vifta, R. L., Khotimah, S. K. (2018). Uji aktivitas antijamur ekstrak biji bligo (*Benincasa hispida* (Thunb.) Cogn.) terhadap pertumbuhan jamur *Candida albicans*. *Indonesian Journal of Pharmacy and Natural Product*. 01(01): 30-36

Maftuch, Suprastyani, H. & Setyawan, F. H. (2018). Uji daya hambat ekstrak *Chaetoceros calcitrans* terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida*. *Journal of Fisheries and Marine Research*. 02(1): 39-47

Mulyadi, Wuryanti, Sarjono, P. R. (2017). Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram. *Jurnal Kimia Sains dan Aplikasi*. 20(3): 130 – 135

Munfaati, P. N., Ratnasari, E., Trimulyono, G. (2015). Aktivitas senyawa antibakteri ekstrak herba meniran (*Phyllanthus niruri*) terhadap pertumbuhan bakteri *Shigella dysenteriae* Secara in Vitro. *LenteraBio*. 4(1): 64–71

Nurhasnawati, H., Sukarmi, Handayani, F. (2017). Perbandingan metode ekstraksi maserasi dan sokletasi terhadap aktivitas antioksidan ekstrak etanol daun jambu bol (*Syzygium malaccense* L.). *JURNAL ILMIAH MANUNTUNG*. 3(1): 91-95

Rahmawati, A. S. & Erina, R. (2020). Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan uji anova dua jalur. *OPTIKA: Jurnal Pendidikan Fisika*. 4(1): 54-62

Sari, E. T.P., Gunaedi, T., Indrayani, E. (2017). Pengendalian infeksi bakteri aeromonas hydrophila pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*) dengan ekstrak rimpang lengkuas merah (*Alpinia purpurata*). *JURNAL BIOLOGI PAPUA*. 9(2): 37–42.

Scales, B. S., Dickson, R.P., Lipuma, J.J. & Huffnagle, G.B. (2014). Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Journals American Society for Microbiology*. 27(4): 927-948.

Sianturi, I. T., Prajitno, A. & Sanoesi, E. (2019). Uji sensitivitas ekstrak kasar batang ciplukan (*Physalis angulata*) terhadap bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara in Vitro. *Samakia: Jurnal Ilmu Perikanan*. 10(1): 24-31

Soelama, H. J. J., Kepel B. J., Siagian, K. V. (2015). Uji minimum inhibitory concentration (MIC) ekstrak rumput laut (*Euचेuma cottonii*) sebagai antibakteri terhadap *Streptococcus mutans*. *Jurnal e-GiGi (eG)*. 3(2): 45-57.

Suliani, A., Latief, M., Rahmi, S. L. (2016). Aktivitas antimikroba ekstrak etil asetat buah dan daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* Linn) terhadap mikroba *Salmonella typhimurium* dan *Aspergillus flavus*. *Chempublish Journal*. 1(2): 32-42

Tambun, R., Limbong, H. P., Pinem, C., Manurung, E. (2016). Pengaruh ukuran partikel, waktu dan suhu pada ekstraksi fenol dari lengkuas merah. *Jurnal Teknik Kimia USU*. 5(4): 53-56.

Tridianti, A., Krisnawati & Ismaniati, N. A. (2013). Effectiveness of various sterilization methods of contaminated post-fitted molar band. *Dent. J. (Maj. Ked. Gigi)*. 46(2): 71-74.

Wiyanto, D. B. (2010). Uji aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dan *Euचेuma denticullatum* terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyii*. *Jurnal Kelautan: Indonesian Journal of Marine Science and Technology*, 3(1), 1-17.

Yulvizar, C., Dewiyanti, I., Defira, C. N. (2014). Seleksi Bakteri Berpotensi Probiotik Dari Ikan Mas (*Cyprinus Carpio*) Berdasarkan Aktivitas Antibakteri Secara In Vitro. *Jurnal Teknologi Pertanian*. 6(2): 20-24

Yusainy, C. (2019). Panduan Riset Eksperimental dalam Psikologi. Malang: Ub Press. 215 hlm.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat-alat Penelitian



Tabung Reaksi



Rak Tabung Reaksi



Erlenmeyer



Pinset



Gelas Ukur



Beaker Glass

Lampiran 1 (Lanjutan)



Inkubator



Jarum Ose



Mikropipet



Autoclave



Lemari Pendingin



Blender



Timbangan Digital



Laminary Air Flow (LAF)

Lampiran 1 (Lanjutan)



Bunsen



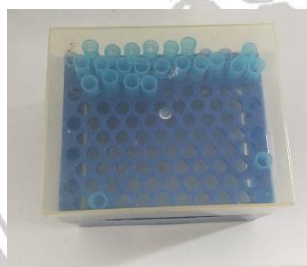
Corong



Sprayer



Rotary Vacum Evaporator



Blue tip



Spatula



Nampan



Jangka Sorong

Lampiran 1 (Lanjutan)



Vortex mixer



Hot plate



Gunting



Baskom



Botol film



Cawan Petri

Lampiran 2. Bahan-bahan Penelitian



Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*)



Pseudomonas fluorescens



Media



Alkohol 70%



DMSO 10%



Etanol 96%

Lampiran 2 (Lanjutan)



Aquades



Spiritus



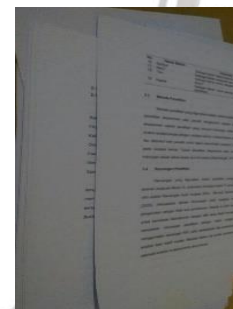
Kertas Saring



Plastik warp



Aluminium foil



Koran/Kertas Bekas

Lampiran 2 (Lanjutan)



Kertas Cakram



Kertas Label



Kapas



Tisu

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



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
 DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA
 BALAI BESAR PERIKANAN BUDIDAYA AIR PAYAU
 LABORATORIUM UJI BBPAP JEPARA
 Alamat surat: PO Box 1 Jepara, Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418
 Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724
www.bbpbapjepara.djpb.kkp.go.id ; Email: bbpbapjpr@gmail.com

HASIL UJI BIOKIMIA

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

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

Lab. Mikrobiologi BBPAP Jepara

Penyelia

Sri Murti Astuti, SP.

Lampiran 4. Hasil Fitokimia Lengkuas Merah (*Alpinia purpurata*)



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

65313

Nomor : 074 / 038 / 102.7-D / 2021
 Sifat : Biasa
 Perihal : Surat Keterangan Analisa Kualitatif

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

1. Identitas Pemohon

Nama	NIM	Instansi
Desy Amalia Hidayati	175080507111018	Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang
Rendy Dwi Pangestu	175080501111015	
Eka Laila Dindayami	175080507111001	




2. Identitas Sampel




Nama sampel : Lengkuas Merah
 Nama latin : *Alpinia purpurata*
 Bagian sampel : Rimpang
 Bentuk sampel : Ekstrak
 Pelarut : Etanol 96%
 Tanggal penerimaan : 1 Februari 2021
 Tanggal pemeriksaan : 1 Februari 2021

3. Hasil

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

4. Lampiran

Nama Sampel	Alkaloid		
	Meyer	Dragendrof	Bouchardat
Ekstrak Lengkuas Merah			

Nama Sampel	Flavonoid	Tanin / Fenol	Saponin
Ekstrak Lengkuas Merah			



Lampiran 5. Hasil Perhitungan Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah (*A. purpurata*)

- Perhitungan Presentase Berat Kering

$$\begin{aligned} \text{Presentase Berat Kering} &= \frac{\text{Berat Kering Rimpang (kg)}}{\text{Berat Basah Rimpang (kg)}} \times 100\% \\ &= \frac{1,5 \text{ kg}}{3 \text{ kg}} \times 100\% \\ &= 50\% \end{aligned}$$

- Perhitungan Presentase Rendemen

$$\begin{aligned} \text{Presentase Rendemen} &= \frac{\text{Berat Ekstrak (gram)}}{\text{Berat Kering Rimpang (gram)}} \times 100\% \\ &= \frac{15,56 \text{ gr}}{100 \text{ gr}} \times 100\% \\ &= 15,56\% \end{aligned}$$



Lampiran 6. Pembuatan Larutan Ekstrak Rimpang Lengkuas Merah (*A. purpurata*)

Perhitungan Larutan Stok Ekstrak

Larutan Ekstrak 1000 ppm = 1000 mg/L

$$= \frac{1000 \text{ mg}}{1000 \text{ ml}}$$

$$= \frac{1 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}}$$

$$= \frac{0,1 \text{ gr (ekstrak)}}{100 \text{ ml (larutan pengencer)}}$$

Pengenceran Larutan

Pengenceran larutan dari 1000 ppm menjadi dosis 100 ppm, 105 ppm, 110 ppm, 115 ppm, dan 120 ppm

a. 100 ppm

$$V_1 N_1 = V_2 N_2$$

$$V_1 \cdot 1000 = 2 \cdot 100$$

$V_1 = 0,2 \text{ ml}$ larutan stok 1000 ppm + 1,8 ml larutan pengencer

b. 105 ppm

$$V_1 N_1 = V_2 N_2$$

$$V_1 \cdot 1000 = 2 \cdot 105$$

$V_1 = 0,21 \text{ ml}$ larutan stok 1000 ppm + 1,79 ml larutan pengencer

c. 110 ppm

$$V_1 N_1 = V_2 N_2$$

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

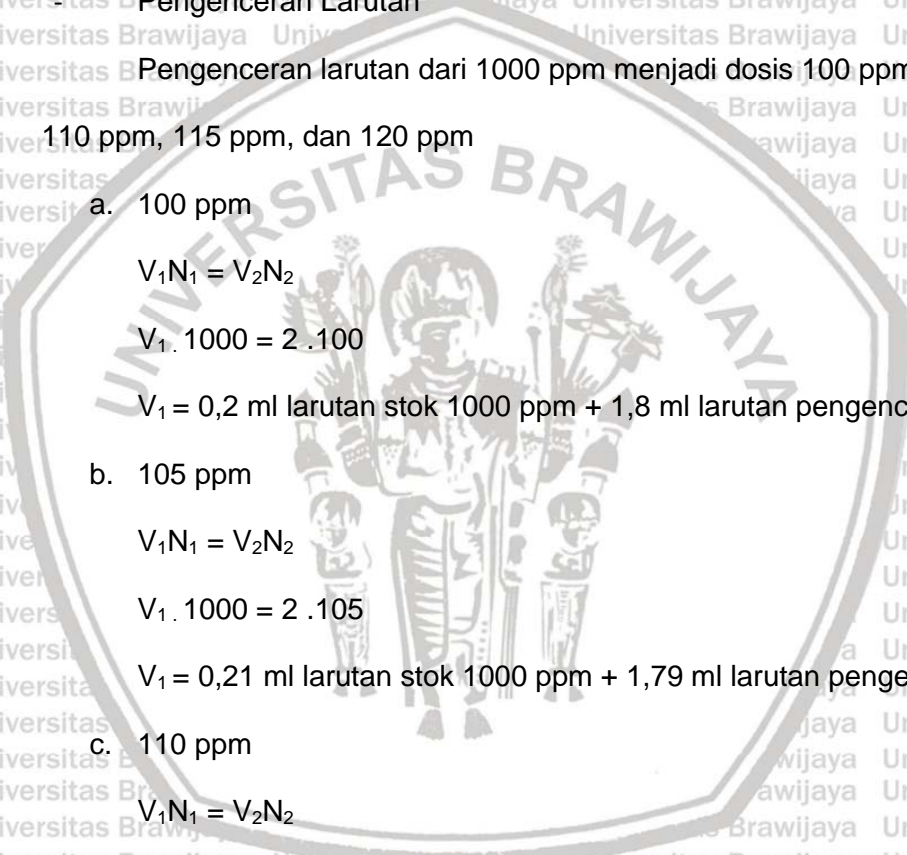
$V_1 = 0,22 \text{ ml}$ larutan stok 1000 ppm + 1,78 ml larutan pengencer

d. 115 ppm

$$V_1 N_1 = V_2 N_2$$

$$V_1 \cdot 1000 = 2 \cdot 115$$

$V_1 = 0,23 \text{ ml}$ larutan stok 1000 ppm + 1,77 ml larutan pengencer



Lampiran 6 (Lanjutan)

e. 120 ppm

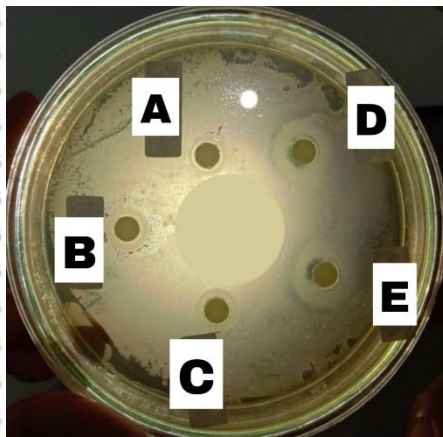
$$V_1 N_1 = V_2 N_2$$

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

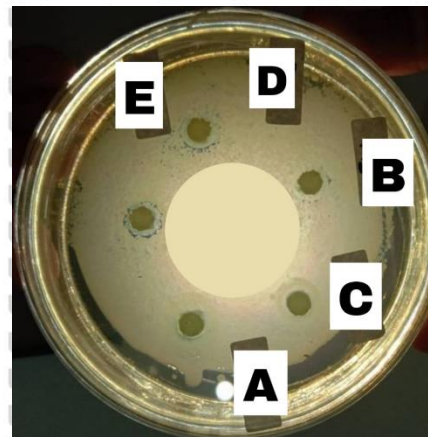
$$V_1 = 0,24 \text{ ml larutan stok } 1000 \text{ ppm} + 1,76 \text{ ml larutan pengencer}$$



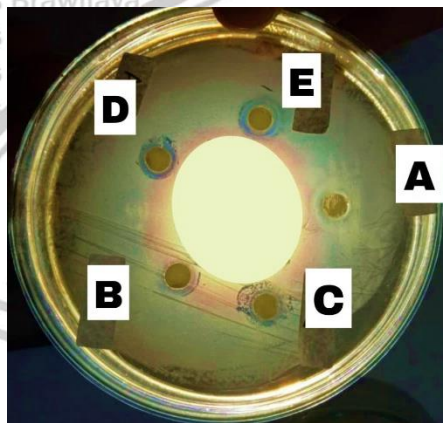
Lampiran 7. Hasil Uji Cakram



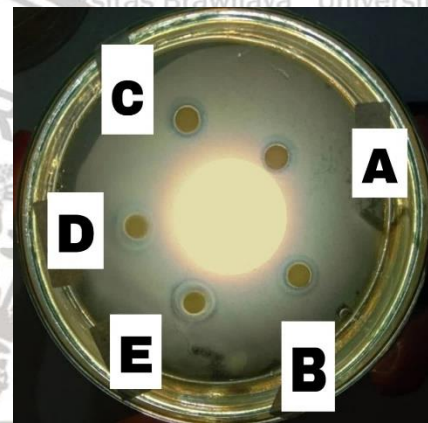
Keterangan: A1, B3, C2, D2, E4



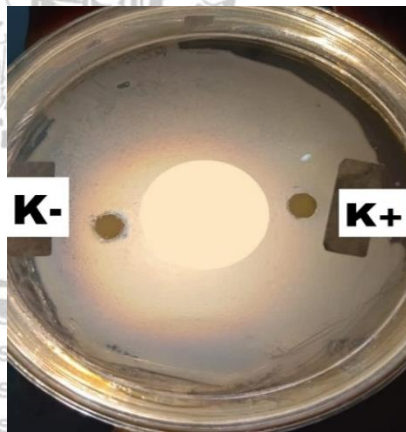
Keterangan: A4, B1, C3, D3, E1



Keterangan: A3, B2, C1, D4, E3



Keterangan: A2, B4, C4, D1, E2



Lampiran 8. Perhitungan Data Hasil Penelitian

Perlakuan	Ulangan				Total	Rerata + SD
	1	2	3	4		
A (100 ppm)	8.01	8.2	8.15	8.22	32.58	8.15 ± 0.09
B (105 ppm)	8.58	8.06	8.625	8.65	33.92	8.48 ± 0.28
C (110 ppm)	9.175	9.17	9.18	9.06	36.59	9.15 ± 0.06
D (115 ppm)	9.65	9.652	9.016	9.023	37.34	9.34 ± 0.36
E (120 ppm)	10.01	10.35	10.86	10.9	42.12	10.53 ± 0.43
Total					182,54	

• Perhitungan Sidik Ragam

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

$$= \frac{182,54^2}{20}$$

$$= 1666,06$$

$$\text{JK Total} = (A^2 + A^2 + \dots + E^2) - \text{FK}$$

$$= (8,1^2 + 8,2^2 + \dots + 10,9^2) - 1666,06$$

$$= 14,81$$

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

$$= \frac{32,58^2 + 33,92^2 + 36,59^2 + 37,34^2 + 42,12^2}{4} - 1666,06$$

$$= 13,59$$

$$\text{JK Acak} = \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan}$$

$$= 14,81 - 13,59$$

$$= 1,22$$

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

$$= (5 \times 4) - 1$$

$$= 19$$

Lampiran 8 (Lanjutan)

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

= $5 - 1$

= 4

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

= $5 \times (4-1)$

= 15

- Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan = $\frac{JK \text{ Perlakuan}}{db \text{ Perlakuan}}$

= $\frac{13,59}{4}$

= 3,40

- Kuadrat Tengah (KT) Acak = $\frac{JK \text{ Acak}}{db \text{ Acak}}$

= $\frac{1,22}{15}$

= 0,08

- F hitung = $\frac{KT \text{ Perlakuan}}{KT \text{ Acak}}$

= $\frac{3,40}{0,08}$

= 41,47

• Analisa Sidik Ragam

Sumber Keragaman	DB	JK	KT	Fhitung	F5%
Perlakuan	4	13.59	3.40	41.74*	3.06
Acak	15	1.22	0.08		
Total	19	14.81			

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

Lampiran 8 (Lanjutan)

• **Perhitungan Uji BNT**

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

$$= \sqrt{\frac{2 \times 0.08}{4}}$$

$$= 0,2$$

$$BNT \ 5\% = T \ \text{tabel } 5\% \ (\text{db acak}) \times SED$$

$$= 2,131 \times 0,2$$

$$= 0,43$$

• **Tabel Uji BNT**

Perlakuan	A (8.15)	B (8.48)	C (9.15)	D (9.34)	E (10.53)	Notasi
A (8.15)	-	-	-	-	-	a
B (8.48)	0.33 ^{ns}	-	-	-	-	a
C (9.15)	1*	0.67*	-	-	-	b
D (9.34)	1.19*	0.86*	0.19 ^{ns}	-	-	b
E (10.53)	2.38*	2.05*	1.38*	1.19*	-	c

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata

(*) = berbeda nyata

Berdasarkan data diatas hasil perhitungan uji Berbeda Nyata Terkecil

(BNT) diketahui bahwa hasil terbaik yaitu pada perlakuan E yang kemudian

diikuti oleh perlakuan D, C, B, dan A.



Lampiran 8 (Lanjutan)

Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	32.58	-2	2	-1	1
B	33.92	-1	-1	2	-4
C	36.59	0	-2	0	6
D	37.34	1	-1	-2	-4
E	42.12	2	2	1	1
Q = Σci*Ti		22.51	4.97	-2.69	9.19
Hasil kuadrat		10	14	10	70
Kr = (Σci ²)*r		40	56	40	280
JK=Q ² /Kr		12.66	0.44	0.18	0.30

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

$$= 12,66 + 0,44 + 0,18 + 0,30$$

• Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	Fhitung	F5%
Perlakuan	4	13.59			3.06
Linier	1	12.66	12.66	155.62*	
Kuadratik	1	0.44	0.44	5.43*	
Kubik	1	0.18	0.18	2.22 ^{ns}	
Kuartik	1	0.30	0.30	3.70*	
Acak	15	1.22	0.08		
Total	19	14.81			

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata

* = berbeda nyata

Berdasarkan data diatas hasil regresi linier dan kuadratik berbeda nyata,

maka selanjutnya dihitung R² pada masing-masing regresi tersebut.

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

$$= \frac{12,66}{12,66 + 1,22}$$

$$= 0,91$$

Lampiran 8 (Lanjutan)

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

$$= \frac{0,44}{0,44 + 1,22}$$

$$= 0,27$$

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

$$= \frac{0,18}{0,18 + 1,22}$$

$$= 0,13$$

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

$$= \frac{0,30}{0,30 + 1,22}$$

$$= 0,2$$

Berdasarkan hasil perhitungan R^2 diatas menunjukkan bahwa nilai R^2 linier lebih besar daripada R^2 kuadrat, kubik, dan kuartik. Dari hasil tersebut menunjukkan bahwa kurva yang digunakan yaitu kurva linier yang kemudian dicari persamaan regresi linier. Dosis yang digunakan sebagai sumbu x dan rata-rata daya hambat sebagai sumbu y sehingga didapatkan garis linier pada grafik.

Tabel Sumbu X dan Y

Perlakuan	X	Y	XY	X ²
A1	100	8,01	801,00	10000
A2	100	8,2	820,00	10000
A3	100	8,15	815,00	10000
A4	100	8,22	822,00	10000
B1	105	8,58	900,90	11025
B2	105	8,06	846,30	11025
B3	105	8,63	905,63	11025
B4	105	8,65	908,25	11025
C1	110	9,18	1009,25	12100

Lampiran 8 (Lanjutan)

Perlakuan	X	Y	XY	X ²
C2	110	9,17	1008,70	12100
C3	110	9,18	1009,80	12100
C4	110	9,06	996,60	12100
D1	115	9,65	1109,75	13225
D2	115	9,65	1109,98	13225
D3	115	9,02	1036,84	13225
D4	115	9,02	1037,65	13225
E1	120	10,01	1201,20	14400
E2	120	10,35	1242,00	14400
E3	120	10,86	1303,20	14400
E4	120	10,9	1308,00	14400
TOTAL	2200	182,541	20192,04	243000

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

$$= 0,11$$

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

$$= -3,25$$

Berdasarkan perhitungan diatas menunjukkan b0 dan b1, sehingga didapatkan persamaan linier $y = -3,25 + 0,11x$

