

UJI ANTIBAKTERI DAN BIOFILM EKSTRAK KASAR *Selaginella plana* (Desv. Ex. Poir) Hieron, *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara, dan *Ephitema benthamii* C. B. Clarke TERHADAP *Flavobacterium columnare*

LAPORAN SKRIPSI

Oleh:

**RITA FIRMANIA KHOIRUN NISA
NIM. 155080500111049**



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

UJI ANTIBAKTERI DAN BIOFILM EKSTRAK KASAR *Selaginella plana* (Desv. Ex. Poir) Hieron, *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara, dan *Ephitema benthamii* C. B. Clarke TERHADAP *Flavobacterium columnare*

SKRIPSI

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

Oleh:

**RITA FIRMANIA KHOIRUN NISA
NIM. 155080500111049**



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

SKRIPSI

UJI ANTIBAKTERI DAN BIOFILM EKSTRAK KASAR *Selaginella plana* (Desv. Ex. Poir) Hieron, *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara, dan *Ephitema benthamii* C. B. Clarke TERHADAP *Flavobacterium columnare*

Oleh:

RITA FIRMANIA KHOIRUN NISA
NIM. 155080500111049

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 21 Juni 2019
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Dosen Pembimbing I



(Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc)
NIP. 19621014 198701 1 001
TANGGAL: 02 JUL 2019

Menyetujui,
Dosen Pembimbing II



(Dr. Hessy Novita, S.Pi, M.Si)
NIP. 19750924 200312 2 001
TANGGAL: 02 JUL 2019

Mengetahui:

Ketua Jurusan Manajemen Sumberdaya Perikanan



(Dr. I. M. Firdaus, MP)
NIP. 19680919 200501 1 001
TANGGAL: 02 JUL 2019

LEMBAR IDENTITAS TIM PENGUJI

Judul : **UJI ANTIBAKTERI DAN BIOFILM EKSTRAK KASAR *Selaginella plana* (Desv. Ex. Poir) Hieron, *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara, dan *Ephitema benthamii* C. B. Clarke TERHADAP *Flavobacterium columnare***

Nama Mahasiswa : Rita Firmania Khoirun Nisa

NIM : 155080500111049

Program Studi : Budidaya Perairan

PENGUJI PEMBIMBING:

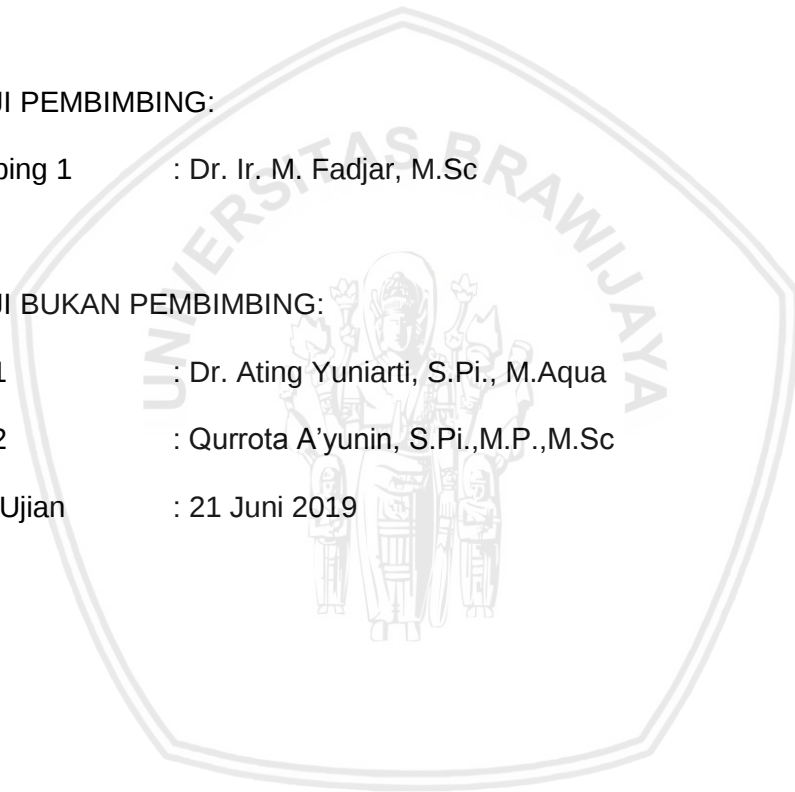
Pembimbing 1 : Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc

PENGUJI BUKAN PEMBIMBING:

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

Penguji 2 : Qurrota A'yunin, S.Pi.,M.P.,M.Sc

Tanggal Ujian : 21 Juni 2019



DAFTAR RIWAYAT HIDUP



Rita Firmania Khoirun Nisa adalah nama penulis skripsi ini. Penulis lahir dari orang tua Achmad Chusaeni dan Nur Ainii sebagai anak kedua dari dua bersaudara. Penulis dilahirkan di Lumajang, 17 Oktober 1996. Penulis menempuh pendidikan mulai dari SD Citrodiwangsan 1 Lumajang (lulus

tahun 2009), melanjutkan SMP Negeri 2 Lumajang (lulus tahun 2012) dan kemudian ke SMA Negeri 2 Lumajang (lulus tahun 2015). Selanjutnya penulis melanjutkan pendidikan di Universitas Brawijaya, Malang hingga akhirnya dapat menempuh kuliah Strata 1 di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Program Studi Budidaya Perairan.

Dengan ketekunan hati serta motivasi tinggi untuk terus berusaha dan belajar, penulis berhasil menyelesaikan pengerjaan skripsi ini. Semoga dengan penulisan skripsi ini mampu memberikan kontribusi positif bagi dunia pendidikan.

Akhir kata penulis mengucapkan syukur yang sebesar – besarnya atas terselesaikannya skripsi yang berjudul “**Uji Antibakteri Ekstrak Kasar *Selaginella plana* (Desv. Ex. Poir) Hieron, *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara, dan *Ephitema benthamii* C. B. Clarke terhadap *Flavobacterium columnare*”.**

PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi yang berjudul “Uji Antibakteri dan Biofilm Ekstrak Kasar *Selaginella plana* (Desv. Ex. Poir) Hieron, *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara, dan *Ephitema benthamii* C. B. Clarke Terhadap *Flavobacterium columnare*” merupakan hasil penelitian saya dibawah payung penelitian Ibu Dr. Hessy Novita, S.Pi, M.Si. Sepanjang pengetahuan saya, tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila dikemudian hari diketemukan dan terbukti skripsi ini merupakan hasil penjiplakan atau plagiasi, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan saya tersebut dengan hukum yang berlaku di Indonesia.

Malang, Juni 2019
Mahasiswa

Rita Firmania Khoirun Nisa
NIM. 155080500111049

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

- Allah SWT atas karunia dan kesehatan yang diberikan selama ini sehingga skripsi ini dapat terselesaikan dengan baik.
- Kedua orang tua saya, Bapak Achmad Chusaeni, S.E dan Ibu Nur Ainii, saudara kembar saya Rika Firmania Khoirun Nisa, dan keluarga saya.
- Bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc selaku dosen pembimbing skripsi I.
- Ibu Dr. Hessy Novita, S.Pi, M.Si selaku pembimbing skripsi II.
- Ibu Dr. Media Fitri Isma Nugraha SP., M.Si selaku ketua program INSINAS Kemnsristekdikti tahun 2018/2019 sebagai peyandang dana dan pembimbing lapang dari Balai Riset Budidaya Ikan Hias (BRBIH) Depok, Jawa Barat.
- Ibu Dr. Ating Yuniarti, S.Pi., M.Aqua dan Ibu Qurrota A'yunin, S.Pi.,M.P.,M.Sc selaku dosen penguji.
- Bapak Nurhidayat, S.Pi, M.Si selaku plt kepala dari Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (BBRBATPP) Sempur, Bogor dan Ibu Dr. Desy Sugiani, S.Pi, M.Si selaku kepala dari Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I) Depok, Jawa Barat.
- Bapak Wahyu, Bapak Septiadi, Bapak Edy, Bapak Johan selaku teknisi, dan Bapak Ahmad, Ibu Tuti, Ibu Nana, Ibu Nuna, Ibu Yani, Ibu Fidah, dan Ibu Lila selaku jajaran staf IRP21 Depok.
- Sahabat seperjuangan skripsi yaitu Dhea Safitri, Malla Resilia dan BP 2015.
- Semua pihak yang berkaitan baik secara langsung maupun tidak langsung.

Penulis

RINGKASAN

RITA FIRMANIA KHOIRUN NISA. Uji Antibakteri dan Biofilm Ekstrak Kasar *Selaginella plana* (Desv. Ex. Poir) Hieron, *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara, dan *Ephitema benthamii* C. B. Clarke terhadap *Flavobacterium columnare* (dibawah bimbingan **Dr. Ir. M. Fadjar, M. Sc** dan **Dr. Hessy Novita, S.Pi, M.Si**).

Budidaya ikan merupakan usaha yang menguntungkan bagi masyarakat. Namun, salah satu kendala yang dihadapi oleh pembudidaya ikan yaitu terserangnya penyakit *columnaris* yang disebabkan oleh patogenitas *Flavobacterium columnare*. Dampak terhadap ikan mengakibatkan munculnya lesi pada jaringan insang sehingga terganggunya sistem pernapasan hingga mengakibatkan kematian. Tindakan yang sering digunakan oleh para pembudidaya dalam menanggulangi penyakit tersebut yaitu pengobatan menggunakan antibiotik sintetik secara terus menerus. Hal itu mengakibatkan resistensi bakteri dan menimbulkan residu di lingkungan sekitarnya. Oleh karena itu, diperlukan adanya alternatif lain sebagai pengganti antibiotik sintetik dengan memanfaatkan potensi tanaman air dari Sulawesi Selatan sebagai bahan antibakteri yang aman terhadap lingkungan.

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi antibakteri, *Minimum Inhibition Concentration* (MIC), *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC), pengaruh ekstrak terhadap pembentukan biofilm, dan persentase inhibisi biofilm *F. columnare*. Penelitian ini dilaksanakan pada Januari hingga April 2019 di Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I) Depok dan Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar dan Penyuluhan Perikanan (BBRBATPP) Sempur, Jawa Barat.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang menggunakan 4 perlakuan dan 3 kali ulangan. Konsentrasi dari ekstrak kasar *L. adscendens* yang digunakan dalam penelitian ini yaitu A (15,5 mg/ml), B (12,5 mg/ml), C (9,5 mg/ml), D (6,5 mg/ml) dan ekstrak kasar *E. benthamii* yaitu A (2,5 mg/ml), B (2 mg/ml), C (1,5 mg/ml), D (1 mg/ml). Parameter dalam penelitian ini yaitu uji antibakteri, MIC, MBC, nilai % inhibisi dan visualisasi 3D biofilm *F. columnare*. Data tersebut diolah menggunakan analisis keberagaman dengan selang kepercayaan 95% atau uji F (ANOVA).

Hasil penelitian didapatkan rerata nilai OD ekstrak kasar *L. adscendens* perlakuan A sebesar 0,246 nm; perlakuan B sebesar 0,249; perlakuan C sebesar 0,313 dan perlakuan D sebesar 0,407. Persamaan linier yang diperoleh pada ekstrak kasar *L. adscendens* adalah $y = 0,5038 - 0,0182x$ dan koefisien $R^2 = 0,7455$. Rerata nilai OD ekstrak kasar *E. benthamii* perlakuan A sebesar 0,149; perlakuan B sebesar 0,177; perlakuan C sebesar 0,242 dan perlakuan D sebesar 0,332. Persamaan linier yang diperoleh pada ekstrak kasar *E. benthamii* adalah $y = 0,440 - 0,1231x$ dan koefisien $R^2 = 0,7733$.

Kesimpulan yang dapat diambil dari penelitian ini adalah ekstrak kasar tanaman dari Sulawesi Selatan memiliki pengaruh terhadap penghambatan biofilm *F. columnare*. Perlakuan terbaik ekstrak tanaman *L. adscendens* yaitu perlakuan D (15,5 mg/ml) dengan nilai % inhibisi sebesar 48% dan ekstrak tanaman *E. benthamii* yaitu perlakuan A (2,5 mg/ml) dengan nilai % inhibisi sebesar 50%.

KATA PENGANTAR

Puji syukur atas kehadiran ALLAH SWT yang telah melimpahkan rahmat dan hidayah-Nya sehingga penulis dapat menyajikan laporan skripsi yang berjudul “Uji Antibakteri dan Biofilm Ekstrak Kasar *Selaginella plana* (Desv. Ex. Poir) Hieron, *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara, dan *Ephitema benthamii* C. B. Clarke Terhadap *Flavobacterium columnare*”

Laporan ini disusun sebagai salah satu syarat untuk meraih gelar sarjana perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Selain itu, agar penulis mampu menyusun kerangka kegiatan penelitian yang akan dilaksanakan.

Penulis berharap dapat menerima segala kritikan dan saran yang membangun demi kesempurnaan laporan ini dan semoga bermanfaat bagi pembaca.

Malang, Juni 2019

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	vii
DAFTAR ISI.....	x
DAFTAR TABEL	xii
DAFTAR GAMBAR	xiv
DAFTAR LAMPIRAN	xiv
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan	3
1.4 Hipotesis.....	3
1.5 Kegunaan.....	4
1.6 Tempat dan Waktu Penelitian.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Bakteri <i>Flavobacterium columnare</i>	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	6
2.1.3 Infeksi <i>F.columnare</i> Pada Ikan.....	6
2.2 Tanaman Air Sulawesi Selatan.....	7
2.2.1 <i>Selaginella plana</i> (Desv. Ex. Poir) Hieron	7
2.2.2 <i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara.....	9
2.2.3 <i>Epithema benthamii</i> C. B. Clarke	11
2.3 Uji Antibakteri	12
2.4 <i>Minimum Inhibition Concentration</i> (MIC).....	14
2.5 <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC)	14
2.6 Biofilm	15
2.6.1 Definisi Biofilm	15
2.6.2 Mekanisme Pembentukan Biofilm.....	15
3 METODE PENELITIAN	18
3.1 Materi Penelitian.....	18
3.1.1 Peralatan Penelitian.....	18
3.1.2 Bahan Penelitian	19

3.2	Metode Rancangan Peneitian.....	20
3.2.1	Metode Penelitian.....	20
3.2.2	Rancangan Penelitian.....	20
3.3	Prosedur Penelitian	21
3.3.1	Sterilisasi.....	21
3.3.2	Ekstrak Kasar Tanaman Air	22
3.3.3	Pembuatan Media dan Larutan.....	22
3.3.4	Kultur <i>F. columnare</i>	26
3.3.5	<i>Total Plate Count</i> (TPC).....	26
3.3.6	Uji Antibakteri <i>F. columnare</i>	27
3.3.7	Uji <i>Minimum Inhibition Concentration</i> (MIC).....	28
3.3.8	Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC)	29
3.3.9	Uji Biofilm	29
3.4	Parameter Uji.....	34
3.4.1	Parameter Utama	34
3.4.2	Parameter Penunjang.....	34
3.5	Pengambilan Data	34
3.5.1	Data Primer	34
3.5.2	Data Sekunder.....	35
3.6	Analisis Data	35
4	HASIL DAN PEMBAHASAN	36
4.1	Ekstrak Kasar Tanaman Air dari Sulawesi Selatan	36
4.2	Uji Antibakteri Ekstrak Kasar Tanaman Air dari Sulawesi Selatan terhadap Pertumbuhan <i>F. columnare</i>	37
4.3	Uji <i>Minimum Inhibition Concentration</i> (MIC) Terhadap <i>F. columnare</i> ..	40
4.4	Uji <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC) Terhadap <i>F. columnare</i>	43
4.5	Uji Pembentukan Biofilm <i>F. columnare</i>	44
4.5.1	Ekstrak Kasar <i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara.....	44
4.5.2	Ekstrak Kasar <i>Ephitema benthamii</i> C. B. Clarke	46
4.6	Persentase Inhibisi Biofilm <i>F. columare</i>	48
4.9	Visualisasi 3 Dimensi (3D)	51
5	KESIMPULAN DAN SARAN	57
5.1	Kesimpulan.....	57
5.2	Saran.....	57

DAFTAR PUSTAKA	57
LAMPIRAN	65



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Peralatan Penelitian	18
2. Bahan Penelitian	19
3. Hasil Rendemen Ekstrak Tanaman Air	36
4. Pengamatan Diameter Zona Hambat	37
5. Standar Respon Daya Hambat Bakteri	39
6. Hasil Pengamatan Uji MIC <i>F. columnare</i>	41
7. Hasil Pengukuran Nilai OD Ekstrak Kasar <i>L. adscendens</i>	45
8. Analisa Sumber Keragaman	45
9. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil Penghambatan Biofilm <i>F. columnare</i>	46
10. Hasil Rata-Rata Penghambatan Biofilm <i>F. columnare</i>	47
11. Analisa Sumber Keragaman	47
12. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil Penghambatan Biofilm <i>F. columnare</i>	47
13. Pengamatan Nilai OD Pewarnaan Biofilm	49
14. Persentase Inhibisi Biofilm <i>F. columnare</i>	50
15. Hasil Visualisasi 3D Biofilm	52

DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>F.columnare</i> Perbesaran 10.000x	6
2. Lesi pada Insang.....	7
3. <i>Selaginella plana</i> (Desv. Ex Poir.)	8
4. <i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara	10
5. <i>Ephitema benthamii</i> C. B. Clarke	12
6. Pembentukan Biofilm	16
7. Denah Penelitian.....	21
8. Tampilan Awal Software Image-J.....	31
9. Langkah Pemilihan Gambar	32
10. Merubah Format Gambar <i>Grayscale</i>	33
11. Menampilkan Gambar Menjadi <i>Black and White</i>	33
12. Menampilkan Visualisasi 3D	34
13. Hasil Visualisasi 3D.....	34
14. Ekstrak Berbentuk Pasta.....	36
15. Zona Hambat Ekstrak Kasar	38
16. Hasil Uji MIC	41
17. Hasil Uji MBC.....	44
18. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Ekstrak Kasar <i>L. adscendens</i> dengan nilai OD	46
19. Grafik Hubungan Antara Konsentrasi Ekstrak Kasar <i>L. adscendens</i> dengan nilai OD	48
20. Pewarnaan Kristal Violet pada Biofilm <i>F. columnare</i>	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat Penelitian	65
2. Bahan Penelitian	69
3. Dokumentasi Kegiatan Penelitian	72
4. Perhitungan Persentase Rendemen	73
5. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Kasar Tanaman Air	74
6. Perhitungan Persentase Inhibisi Biofilm <i>F. columnare</i>	76
7. Analisis Data Hasil Penelitian.....	81





1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kegiatan akuakultur merupakan salah satu subsektor yang diharapkan mampu dalam mewujudkan misi kesejahteraan masyarakat. Proses produksi akuakultur mengindikasikan sistem produksi berbiaya rendah dengan teknologi ekstensif dan semi intensif sesuai dengan keterbatasan sumberdaya yang dimiliki. Adapun komoditas usaha yang dominan yaitu ikan air tawar yang sebagian besar dikelola secara sederhana (Hermawan, *et al.* 2017). Jumria, *et al.* (2017) menyatakan bahwa salah satu kendala yang umumnya menyerang ikan air tawar adalah terserangnya penyakit *columnaris* yang disebabkan oleh patogenitas *F. columnare*. Penyakit ini ditandai dengan infeksi eksternal di permukaan tubuh ikan, insang, dan sirip. Infeksi bakteri ini ditandai dengan munculnya perubahan warna abu-abu keputihan pada beberapa bagian kepala, sekitar mulut, insang, sirip atau badan pada ikan.

Pengobatan penyakit infeksi saat ini masih menggunakan antibiotik, namun penggunaan antibiotik secara terus menerus menyebabkan munculnya mikroorganisme yang resisten terhadap antibiotik. Keadaan resisten ini disebabkan dari berbagai macam faktor mulai dari pemakaian antibiotik tanpa pedoman, dosis yang kurang tepat, dan lama pemberian yang kurang tepat (Pratiwi, 2008). Khunaifi (2010) menyatakan bahwa penelitian zat yang berkhasiat sebagai antibakteri perlu dilaksanakan karena kandungan senyawa bioaktif yang berpotensi untuk menghambat atau membunuh bakteri yang resisten terhadap antibiotik dengan harga yang terjangkau. Salah satu alternatif yang dapat ditempuh selain menggunakan antibiotik adalah pengobatan menggunakan bahan herbal dengan memanfaatkan senyawa bioaktif yang terkandung dalam tanaman air. Menurut Hariana (2013), tanaman air dapat

dimanfaatkan sebagai antibiotik alami yang mengandung senyawa kimia aktif atau fitokimia. Rijayanti, *et al.* (2014) menyatakan bahwa senyawa fitokimia yang berperan sebagai bahan antibakteri seperti fenol, alkaloid, terpenoid dan triterpenoid.

Sulawesi merupakan salah satu pulau yang memiliki keanekaragaman hayati terbesar di Indonesia dan memiliki keunikan flora tersendiri apabila dibandingkan dengan keanekaragaman flora di bagian lainnya. Keunikan tersebut disebabkan karena kawasan ini merupakan daerah antara (*intermediate*) bertemunya flora dari dua daerah yang berbeda, yaitu flora yang terdapat di sebelah utara dan selatan Sulawesi. Potensi keanekaragaman flora perlu dimanfaatkan sebagai pengobatan alternatif, termasuk dalam pengobatan dalam mengatasi patogenitas suatu bakteri. Berbagai tanaman air yang mungkin mengandung zat aktif dibutuhkan sebagai bahan antibakteri (Rahayu dan Rugayah, 2007).

Patogenitas bakteri *F. columnare* terjadi karena adanya kemampuan virulensi pada inang yang disebabkan oleh adanya respon kemotaksik. Faktor lingkungan juga berpengaruh terhadap virulensi seperti salinitas air, suhu, stress dan nutrisi ikan. Misalkan, kekurangan pakan ikan menyebabkan kerentanan penyakit *columnaris*. Adanya kemoatraktan dari lendir kulit dan insang menyebabkan motilitas pada *F. columnare*. Sejumlah komponen kimia pada lendir seperti lektin dapat mengikat reseptor karbohidrat pada kapsul sehingga sel bakteri dapat bergerak menempel pada inang (Klesius, *et al.*, 2008).

Biofilm merupakan kumpulan sel mikroorganisme khususnya bakteri yang melekat erat pada permukaan yang disertai bahan-bahan organik dan diselimuti oleh matriks polimer ekstraseluler (Dewi, *et al.*, 2015). Gunardi (2017) menyatakan bahwa 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. Sel planktonik menjadi sel fenotip biofilm karena terjadi banyak sekali perubahan sel planktonik. Sel biofilm berbeda dengan sel planktonik secara metabolik dan fisiologiknya. Sel biofilm berkembang dan melekat membentuk suatu mikrokoloni.

Berdasarkan latar belakang di atas, maka perlu dilakukan penelitian untuk mengetahui adanya potensi ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan terhadap pertumbuhan dan pembentukan biofilm *F.columnare*.

1.2 Perumusan Masalah

Berikut perumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

- Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan terhadap pertumbuhan dan pembentukan biofilm *F. columnare*?
- Berapa konsentrasi ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan yang efektif dalam menghambat pertumbuhan dan pembentukan biofilm *F. columnare*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini antara lain:

- Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan terhadap pertumbuhan dan pembentukan biofilm *F. columnare*.
- Untuk mengetahui konsentrasi ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan yang efektif dalam menghambat pertumbuhan dan pembentukan biofilm *F. columnare*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis dari penelitian ini antara lain:

H_0 : Diduga pemberian ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan dengan konsentrasi yang berbeda tidak berpengaruh terhadap pertumbuhan dan pembentukan biofilm *F. columnare*.

H_1 : Diduga pemberian ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan dengan konsentrasi yang berbeda berpengaruh terhadap pertumbuhan dan pembentukan biofilm *F. columnare*.

1.5 Kegunaan

Kegunaan dari pelaksanaan penelitian ini adalah untuk mengetahui potensi ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan sebagai bahan alternatif pengganti antibiotik sintetik dalam menghambat pertumbuhan dan pembentukan biofilm *F. columnare*.

1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Kegiatan penelitian telah dilaksanakan di Instalasi Riset Pengendalian Penyakit Ikan (IRP2I) Depok, Balai Riset Perikanan Budidaya Air Tawar, Penyuluhan Perikanan (BBRBATPP) Sempur, Jawa Barat. Penelitian ini telah dilaksanakan pada Januari 2019 hingga April 2019.

2. TINJAUAN PUSTAKA

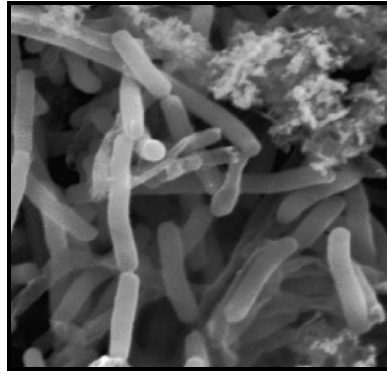
2.1 Bakteri *Flavobacterium columnare*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Bernardet dan Bowman (2006) menyatakan bahwa klasifikasi *F. columnare* secara sistematis sebagai berikut:

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Bacteroidetes
Kelas	: Flavobacteria
Ordo	: Flavobacteriales
Famili	: Flavobacteriaceae
Genus	: Flavobacterium
Spesies	: <i>Flavobacterium columnare</i>

F. columnare termasuk dalam bakteri gram negatif yang selnya berbentuk basil (batang) panjang dengan panjang 3-10 μm dan lebar 0.3-0.7 μm , tidak berflagel, bersifat motil, dan berpigmen kuning. Bentuk tepian koloni *F. columnare* pada media kultur agar adalah berwarna kuning, rhizoid, melekat kuat, dan menyebar ke seluruh permukaan yang membentuk garis tidak beraturan (Beck, *et al.*, 2012). Bernardet dan Grimont (1989) menyatakan bahwa secara visual dalam media cair bakteri ini membentuk banyak rumbai filament yang menempel pada dinding tabung reaksi. Liu, *et al.* (2008) menyatakan bahwa struktur membran selnya kompleks bersifat sebagai penghalang masuknya senyawa antibakteri membentuk pembatas antara sel dan sekitarnya. Protein membran luar merupakan komponen protein integral dari membran luar dan berperan utama dalam interaksi dengan molekul dari permukaan sel.



Gambar 1. *F. columnare* Perbesaran 10.000x (Wenxing *et al.*, 2012)

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Beberapa spesies dari genus *Flavobacterium* memiliki toleransi yang berbeda terhadap tingkat salinitas rendah. Penyebaran bakteri ini tersebar luas di alam. Habitat bakteri *F. columnare* biasanya ditemukan di perairan air tawar dan air laut. Bakteri ini mampu tumbuh pada suhu 4°C hingga 30 °C atau disebut psikrofil (Bernardet dan Bowman, 2006). Marista, *et al.* (2013) menyatakan bahwa bakteri *F. columnare* tumbuh secara aerob dan hanya sedikit yang hidup secara anaerob fakultatif. Massinai, *et al.* (2017) menyatakan bahwa pada kondisi aerobik bakteri ini dapat mengoksidasi asam amino, sedangkan pada kondisi anaerobik metabolismenya bersifat fermentatif, energi diproduksi dengan memecah gula menjadi asam organik. Bakteri ini dapat hidup pada karang, karena jenis bakteri ini dapat tumbuh pada medium sederhana.

2.1.3 Infeksi *F. columnare* Pada Ikan

Penyakit *columnaris* (juga dikenal sebagai penyakit *myxobacterial*) menyerang pada ikan yang stres akibat kondisi lingkungan perairan yang buruk. Faktor luar seperti tercemarnya perairan menyebabkan kualitas lingkungan perairan yang buruk (Dong, *et al.*, 2016). Eissa, *et al.* (2010) menyatakan bahwa faktor yang dapat menyebabkan ikan stres dan terinfeksi patogen ini ialah kenaikan suhu yang terlalu tinggi pada perairan (16-25°C). Kondisi oksigen terlarut yang terlalu rendah dan konsentrasi ammonia yang terlalu tinggi. Kondisi

pH perairan yang terlalu rendah. Jenis ikan yang terbukti terisolasi bakteri ini antara lain ikan nila (*Oechromis niloticus*), ikan lele (*Ictalurus punctatus*), ikan maskoki (*Carassius auratus*), ikan sidat (*Anguilla japonica*), ikan flounder Jepang (*Paralichthys olivaceous*), ikan trout pelangi (*Oncorhynchus mykiss*), ikan brown trout (*Salmo trutta*), dan ikan brook trout (*Salvelinus fontinalis*).

Dampak ikan yang terinfeksi bakteri *F. columnare* yaitu muncul lesi pada insang yang ditandai dengan degenerasi sel berwarna putih kekuningan atau kecoklatan, kulit, dan siripnya. Bakteri yang menempel pada permukaan insang menyebar dan menutupi filamen insang sehingga dapat menyebabkan kematian sel. Lesi pada kulit menyebabkan bercak putih yang dimulai disekitar sirip punggung memanjang mengelilingi tubuh. Hal tersebut disebut sebagai kondisi *saddleback*. Saat infeksi patogen berlangsung, bisul berwarna coklat kekuningan sering ditemukan di tengah tubuh ikan (Durborow, *et al.*, 1998),



Gambar 2. Lesi pada Insang (Declercq, *et al.*, 2013)

2.2 Tanaman Air Sulawesi Selatan

2.2.1 *Selaginella plana* (Desv. Ex. Poir) Hieron

• Klasifikasi dan Morfologi

GBIF (2019) menyatakan bahwa klasifikasi *Selaginella plana* secara sistematis sebagai berikut:

Kingdom : Plantae

Divisi	: Tracheophyta
Kelas	: Lycopodiopsida
Ordo	: Selaginellales
Famili	: Selaginellaceae
Genus	: Selaginella P. Beauv
Spesies	: <i>Selaginella plana</i> (Desv. Ex. Poir) Hieron

Tanaman ini memiliki batang yang terdapat berkas daun dan pola percabangan *flabellate* dengan percabangan dikotom berbentuk bulat telur teratur. Percabangan akar batang memiliki panjang 10 cm. Bentuk daun menjantung (*obcordate*). Kuncup daun lateral nya 0,4-5 x 0,5 x 2 mm berdekatan dan saling menimpa. Tepi daun bergerigi (*dentate*), pertulangan daun terlihat jelas, permukaan daun licin dan berwarna hijau kecoklatan. Tunas aksiler yang terdapat pada sudut antara daun dan batang (Panjaitan, 2013).



Gambar 3. *Selaginella plana* (Desv. Ex. Poir) Hieron (Setyawan, et al., 2011)

• Ekologi dan Penyebaran

Tanaman ini tumbuh di permukaan tanah (terestial). Biasanya tumbuh di dekat sawah dan di tebing pinggir aliran tepi sungai. Tanaman ini hidup pada dataran rendah hingga dataran tinggi (250-2771 mdpl). Keaneragaman tanaman ini dijumpai di daerah sub tropis. Keberadaan beberapa spesies jenis tanaman ini

ditemukan di pulau Jawa, Nusa Tenggara, Sumatera, Sulawesi Selatan dan Maluku (Panjaitan, 2013).

• Kandungan Senyawa Bioaktif

Selaginella memiliki peran dalam pengobatan tradisional. Penelitian biomedis menunjukkan bahwa tanaman ini memiliki potensi sebagai antibakteri. Kandungan senyawa aktif yang teridentifikasi terhadap ekstrak Selaginella menunjukkan bahwa tanaman ini memiliki potensi antibakteri (Setyawan, *et al.*, 2016). Chikmawati, *et al.* (2012) menyatakan bahwa senyawa bioaktif yang terkandung dalam tanaman spesies *S. plana* mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, saponin, dan steroid.

2.2.2 *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara

• Klasifikasi dan Morfologi

Wagner, *et al.* (2007) menyatakan bahwa klasifikasi *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara secara sistematis sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Myrtales
Famili	: Onagraceae
Genus	: Ludwigia
Spesies	: <i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara

Morfologi tanaman ini memiliki batang yang berbentuk gelondongan dengan panjang 1 hingga 4 m berwarna kuning kehijauan atau kemerahan, bentuk sudut percabangannya yang tegak, memiliki akar yang melebar dan tegak di permukaan air. Daun yang berbentuk bulat dengan panjang 10 cm dan lebarnya 4 cm, tangkai daun berwarna kemerahan. Letak bunga berada di ketiak

batang dengan struktur kelopak bunga berbentuk ovate dengan panjang 2 cm yang berwarna kuning cerah hingga putih, bentuk benang sari yaitu epipetal berhadapan dengan daun-daun tajuk dan berseling dengan daun-daun kelopak, tangkai sarinya berwarna putih berukuran 2,5-4 mm, kepala sarinya berukuran 1,2-8 mm dan serbuk sari berbentuk lurus berwarna putih berukuran 4-8 mm (Holm, *et al.*, 1997).



Gambar 4. *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara (Caton, *et al.*, 2004)

• Ekologi dan Penyebaran

Spesies *L. adscendens* hidup di sub-perairan. Tanaman ini dapat tumbuh di daerah yang tergenang air antara lain dapat ditemukan di sekitar wilayah pesisir, danau, sungai, dan selokan. Lingkungan yang digunakan sebagai tempat tumbuh tanaman ini dapat mempengaruhi kondisi tanaman. Beberapa spesies dalam genus ini tersebar di wilayah yang beriklim subtropis di bagian negara Asia. Tanaman ini juga ditemukan di wilayah beriklim sedang yaitu di Amerika Utara dan di Afrika Barat (Oziegbe dan Faluyi, 2012).

• Kandungan Senyawa Bioaktif

Senyawa bioaktif merupakan senyawa yang secara alami didapatkan dari bahan alam yang terbentuk akibat proses pengolahan. Senyawa fitokimia sebagai senyawa bioaktif yang dapat memberikan cita rasa, aroma ataupun warna khas dari tanaman. Senyawa fitokimia berperan sebagai senyawa antibakteri (Astawan dan Kasih, 2008). Ahmed, *et al.* (2005) menyatakan bahwa

senyawa bioaktif yang terkandung dalam tanaman spesies *L. adscendens* yaitu pada bagian daun dan batangnya mengandung senyawa alkaloid, fenol, flavonoid, tanin, terpenoid, dan triterpenoid.

2.2.3 *Epithema benthamii* C. B. Clarke

• Klasifikasi dan Morfologi

GBIF (2019) menyatakan bahwa klasifikasi *Ephitema benthamii* C. B. Clarke secara sitematik sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Tracheophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Lamiales
Famili	: Gesneriaceae
Genus	: Epithema Blume
Spesies	: <i>Ephitema benthamii</i> C. B. Clarke

Tanaman ini termasuk dalam jenis herba (tidak memiliki batang berkayu di atas permukaan tanah), tipe batangnya tumbuh lurus ke atas (*caulescent*) hingga mencapai 5-30 cm, lebar batangnya 1-4 mm dengan 2-3 simpul dan panjang ruas 0,5-6,5 cm. Daunnya berbentuk linear dengan tepi daun bergerigi tidak teratur, warna daun hitam kehijauan. Permukaan daunnya memendek (*strigose*) dan berambut hingga panjang 0,8 mm, bagian luar kelopak sangat pendek, rapat, halus (*pubescent*) berambut hingga panjang 0,2 mm. Daun-daunnya keluar dari struktur batang yang berada di dalam tanah (*acaulescent*). Bentuk buahnya silindris dengan panjang 2,1-2,3 mm dan lebarnya 1,7-1,9 mm. Tiap tanaman memiliki 1-6 bunga dengan panjang tangkai 2,5-16 cm. Panjang benang sarinya 1,4-1,5 mm dan panjang filamennya 1 mm (Bransgrove dan Middleton, 2015).



Gambar 5. *Euphemia benthamii* C. B. Clarke (GBIF, 2019)

- **Ekologi dan Penyebaran**

Tanaman ini tumbuh di batuan berkapur atau disebut *lithophytes*. Biasanya ditemukan pada batu-batu besar di tepi aliran sungai dan di celah-celah batu yang wilayah yang lembab serta dapat ditemukan di permukaan tanah (terestial). Tanaman ini ditemukan pada wilayah dengan ketinggian 0-1600 m di atas permukaan laut. Tanaman ini tersebar di berbagai negara yaitu Indonesia (Sulawesi Selatan dan Maluku), Papua Barat dan Filipina (Bransgrove dan Middleton, 2015).

- **Kandungan Senyawa Bioaktif**

Tanaman *E. benthamii* yang termasuk dalam Lamiales memiliki kandungan senyawa bioaktif. Senyawa bioaktif yang terkandung dalam tanaman ini adalah flavonoid. Flavonoid adalah kelompok fenolik bioaktif yang tersebar luas pada tanaman (Trivellini, et al., 2016). Sharma, et al. (2015) menyatakan bahwa tanaman ini dapat digunakan sebagai antibakteri. Kandungan bahan antibakteri seperti alkaloid dan saponin.

2.3 Uji Antibakteri

Antibakteri merupakan suatu senyawa yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri. Sifat antibakteri dibedakan menjadi dua yaitu bakteriostatik dan bakterisidal. Bakteriostatik ialah sifat yang kerjanya

mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Sedangkan bakterisidal ialah sifat yang kerjanya membunuh bakteri (Trisia, *et al.*, 2018). Putri, *et al.* (2016) menyatakan bahwa mekanisme kerja antibakteri dalam menghambat aktivitas bakteri diawali dengan mengganggu pembentukan dinding sel karena adanya akumulasi komponen lipofilat yang terdapat pada dinding sel sehingga terjadi perubahan komposisi penyusun dinding sel. Kedua, mekanismenya mempengaruhi membran sitoplasma mengakibatkan kebocoran materi intraseluler, lisis sel, denaturasi protein, penghambatan pembentukan protein sitoplasma, asam nukleat dan ikatan ATP-ase pada membran sel karena kandungan senyawa bioaktif antibakteri. Ketiga, menginaktivasi enzim sehingga sel bakteri memerlukan energi dalam jumlah banyak. Energi yang dibutuhkan untuk pertumbuhan menjadi berkurang sehingga aktivitas bakteri menjadi terhambat bahkan terhenti (inaktif). Keempat, menginaktivasi fungsi material genetik sehingga mengganggu pembentukan asam nukleat (RNA dan DNA) yang menyebabkan terganggunya transfer informasi genetik sehingga proses pembelahan untuk pembiakan terhambat.

Metode yang digunakan yaitu metode Kirby Bauer. Metode ini menggunakan kertas cakram (*blank disc*) berukuran 6 mm dimana senyawa antibakteri dijenuhkan ke dalam kertas cakraanya. Kertas cakram yang mengandung senyawa antibakteri tertentu ditanam pada media *Mueller Hinton Agar* yang telah diinokulasikan dengan suspensi bakteri, kemudian diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu. Pengamatan hasil uji dengan melihat adanya zona bening di sekitar kertas cakram yang (Hudzicki, 2016). Brooks, *et al.* (2008) menyatakan bahwa kelebihan uji antibakteri menggunakan kertas cakram yakni mudah dilakukan, tidak memerlukan peralatan khusus, efisien dan relatif murah. Kelemahannya pada ukuran zona bening yang terbentuk tergantung oleh beberapa faktor antara lain kondisi inkubasi, inokulum, serta ketebalan media

yang digunakan sebab ukuran zona hambat dipengaruhi oleh kedalaman media, karena antibakteri berdifusi dalam tiga dimensi, sehingga lapisan dangkal media akan menghasilkan zona hambat yang lebih besar daripada lapisan yang lebih dalam.

2.4 Minimum Inhibition Concentration (MIC)

MIC merupakan konsentrasi terendah bahan antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, sehingga dapat diketahui tingkat resistensi dalam menggunakan antibakteri. Uji MIC dapat dilakukan dengan dua metode yaitu dengan metode dilusi (*Dilution Test*) atau dengan metode difusi (*Diffusion Test*) (Rinawati, 2011). Pada penelitian ini uji MIC dilakukan secara mikrodilusi. Soleha (2015) menyatakan bahwa mikrodilusi memberikan hasil kuantitatif yang menunjukkan jumlah antimikroba yang dibutuhkan dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Volume yang digunakan dalam pengenceran pada umumnya sebesar 0,05 ml - 0,1 ml dan satuan yang digunakan $\mu\text{g/ml}$. Penentuan pengenceran konsentrasi bahan antibakteri dalam MIC dilakukan dengan penurunan konsentrasi setengahnya.

Metode pengenceran secara efisien bertujuan untuk memperoleh berbagai konsentrasi yang berbeda pada bahan antibakteri. Masing-masing konsentrasi kemudian ditambahkan suspensi bakteri uji dalam media cair. Perlakuan tersebut diinkubasi pada suhu dan waktu yang telah ditentukan. (Pratiwi, 2008). Almurdani, *et al.* (2016) menyatakan bahwa hasil MIC juga ditentukan dengan mengukur *Optical Density* (OD) menggunakan spektrofotometer dan panjang gelombang (λ) sebesar 600 nm.

2.5 Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

MBC didefinisikan sebagai uji dalam menentukan konsentrasi dalam membunuh kelangsungan hidup bakteri. Metode MBC menggunakan media

cawan petri yang telah diberi perlakuan dengan konsentrasi yang berbeda dengan ditebar dan diinkubasi selama 18-24 jam (Fasolato, *et al.*, 2015). Hayrapetyan, *et al.* (2012) menyatakan bahwa hasil uji MBC ditentukan dengan melakukan pengamatan secara visual. Pengamatan dengan melihat tidak adanya koloni bakteri yang tumbuh pada media kultur.

2.6 Biofim

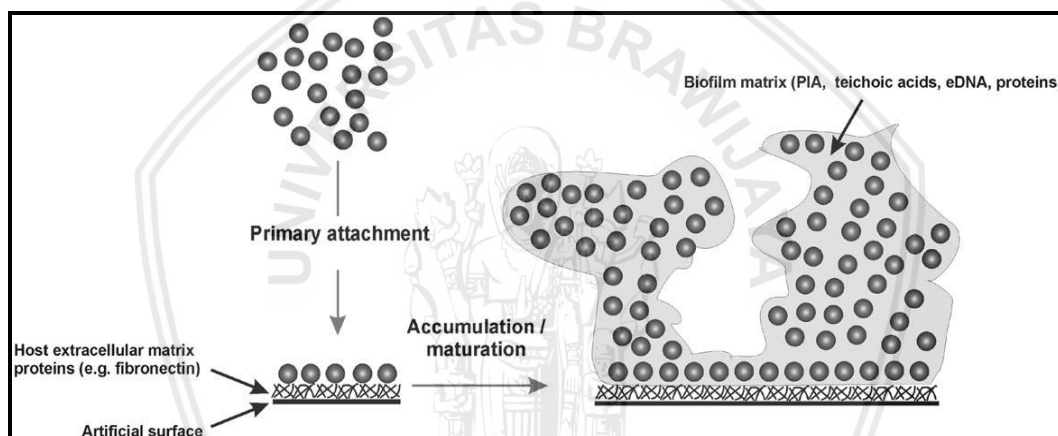
2.6.1 Definisi Biofilm

Biofilm merupakan kumpulan mikroorganisme khususnya sel bakteri yang memiliki protein kompleks, polisakarida, dan DNA dalam matriks ekstraseluler atau *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) yang diproduksi sendiri. Biofilm melekat erat pada suatu permukaan termasuk perairan alami, jaringan hidup dan lain-lain. Komunitas biofilm yang berada di lingkungan memiliki rongga interstitik (koloni makro dan mikro). Rongga tersebut memungkinkan difusi nutrisi, gas dan agen antimikroba melalui biofilm. Biofilm sebagai modulasi respon terhadap perubahan-perubahan yang terjadi di dalam internal dan eksternal (Singh, *et al.*, 2017). Homenta (2016) menyatakan bahwa sifat EPS pada bakteri gram negatif yaitu polisakaridanya bersifat netral atau polianionik. Sedangkan sifat kimianya bersifat anionik karena adanya asam uronik, yang menyebabkan asosiasi kation divalen seperti kalsium dan magnesium bereaksi silang dengan benang polimer dan memberikan kekuatan mengikat yang lebih besar dalam pembentukan biofilm.

2.6.2 Mekanisme Pembentukan Biofilm

Mekanisme pembentukan biofilm terjadi sangat kompleks, dimana mikroorganisme berubah dari pertumbuhan planktonik menjadi sesil. Pembentukan biofilm juga tergantung pada ekspresi gen spesifik serta keadaan lingkungan (Jamal, *et al.*, 2015). Proses mikroorganisme mengalami perubahan

tertentu setelah menempel ke permukaan disajikan pada Gambar 6. Rohde, *et al.* (2010) menyatakan bahwa mekanisme pembentukan biofilm dimulai dengan penempelan sel-sel bakteri yang melayang (planktonik) di permukaan substrat. Tahap kedua sel bakteri kemudian memproduksi matriks ekstraseluler atau *Extracellular Polymeric Substance* (EPS) ke permukaan sehingga tidak lepas kembali. Tahap ketiga, mulai terbentuknya mikrokoloni karena mengalami replikasi (*aggregation*). Tahap keempat, terjadinya interaksi koloni bakteri dan matriks ekstraseluler yang dihasilkan sehingga menghasilkan maturasi berbentuk biofilm.



Gambar 6. Pembentukan Biofilm (Rohde *et al.*, 2010)

Uji biofilm dilakukan pada penelitian dalam mengetahui antibakteri bahan antibakteri terhadap penghambatan pembentukan biofilm mikroorganisme. Ekstrak daun mangrove *Acanthus ilicifolius* memiliki efektivitas antibakteri terhadap biofilm *Enterococcus faecalis* pada konsentrasi terbesar 100 mg/ml (Rachmawati, *et al.*, 2015). Sari, *et al.* (2014) menyatakan bahwa penelitian terhadap fraksi etil asetat sampel buah kapulaga, rimpang temu putri, dan kulit batang senggugu menunjukkan adanya aktivitas hambatan pembentukan biofilm *E. coli*. Fraksi etil asetat dari kapulaga dan senggugu mengandung senyawa fenolik dan flavonoid, sedangkan pada fraksi etil asetat rimpang temu putri menunjukkan keberadaan senyawa terpenoid. Dewi, *et al.* (2015) menyatakan

bahwa hasil penelitian menunjukkan aktivitas penghambatan biofilm ekstrak sereh terhadap bakteri *S. mutans* sebesar 0,17%. Batang sereh mengandung senyawa antibakteri seperti fenol, flavonida, polifenol dan saponin.



3 METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Peralatan Penelitian

No.	Alat	Fungsi
1	Autoklaf	Mensterilkan peralatan yang akan digunakan
2	<i>Beaker glass</i>	Menyimpan suatu larutan
3	<i>Bubble</i>	Membantu mengambil larutan melalui pipet volume
4	Botol kaca	Menyimpan hasil ekstrak tanaman air
5	Bunsen	Menciptakan kondisi aseptis dan mencegah terjadinya kontaminasi pada saat perlakuan
6	Cawan petri	Tempat menumbuhkan bakteri
7	Corong	Memudahkan menuang larutan ke dalam wadah
8	<i>Cover glass</i>	Tempat pewarnaan biofilm
9	Erlenmeyer	Tempat membuat larutan media
10	Gelas ukur	Mengukur larutan yang dibutuhkan
11	Gunting	Memotong suatu bahan
12	<i>Hot plate</i>	Memanaskan media
13	Inkubator	Menginkubasi bakteri yang telah ditanam pada media padat dan cair
14	Jarum ose	Mengambil bakteri yang akan dikultur
15	Jerigen	Wadah menyimpan akuades
16	<i>Laminary Air Flow</i> (LAF)	Mencegah kontaminasi dalam melakukan penanaman bakteri
17	Lemari pendingin	Menyimpan suatu bahan
18	<i>L glass</i>	Meratakan bakteri di media kultur
19	<i>Magnetic stirrer</i>	Menghomogenkan larutan
20	Mikropipet	Mengambil cairan satuan μ l
21	<i>Mikroplate 96 well</i>	Wadah uji MIC dan biofilm
22	Mikroskop cahaya	Mengamati bakteri secara morfologi
23	Nampan	Wadah alat dan bahan
24	Penggaris	Mengukur diameter zona hambat
25	<i>Objek glass</i>	Wadah pewarnaan bakteri
26	Oven	Menyimpan cawan petri steril
27	Pinset	Meletakkan <i>blank disc</i> secara aseptis
28	Pipet 10 ml	Mengambil larutan sebanyak 1-10 ml
29	Rak tabung reaksi	Tempat tabung reaksi
30	Sendok media	Mengambil bahan yang digunakan dalam pembuatan media kultur yang akan digunakan
31	Spektrofotometer	Mengukur nilai OD dengan panjang gelombang tertentu
32	Sprayer	Memecahkan cairan dalam bentuk tetesan kecil

No.	Alat	Fungsi
33	<i>Syringe</i> 10 ml	Mengambil larutan dalam skala kecil
34	Tabung reaksi	Tempat peremajaan bakteri pada media cair dan tempat pengenceran
35	Timbangan analitik	Menimbang ekstrak tanaman air dan media
36	Tube	Menyimpan suatu larutan
37	<i>Vortex mixer</i>	Menghomogenkan suatu larutan

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian ini disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Bahan Penelitian

No.	Bahan	Fungsi
1	Akuades steril	Larutan pengencer
2	Alkohol 70%	Bahan pengkondisian aseptis
3	<i>Alumunium Foil</i>	Pembungkus alat-alat agar steril
4	<i>Antibiotic disk</i>	Bahan antibiotik bakteri uji
5	Asam asetat glasial	Bahan pembilasan pewarnaan bakteri
6	Bakteri <i>F. columnare</i>	Bakteri yang digunakan untuk perlakuan
7	<i>Blank disc</i>	Bahan uji antibakteri
8	Ekstrak kasar tanaman air	Bahan yang diuji
9	Kapas	Bahan penutup tabung reaksi
10	Kertas label	Menandai alat dan bahan
11	Korek api	Bahan untuk menyalakan api bunsen
12	Larutan alkohol aseton	Larutan pembilas zat warna pada bakteri
13	Larutan iodin lugol	Pewarna untuk memperkuat pengikatan warna oleh bakteri
14	Larutan kristal violet	Pewarna primer yang akan memberi warna pada bakteri
15	Larutan PBS	Larutan penyangga (<i>buffer</i>)
16	Larutan safranin	Larutan pembeda (kontras) warna
17	Masker	Pelindung dalam meminimalisir kontaminasi
18	Mikrotip	Mengambil larutan
19	<i>Mikrotube</i> 1.5 ml	Wadah ekstrak kasar tanaman air
20	<i>Mikrotube</i> 2 ml	Wadah penanaman biofilm
21	<i>Mueller Hilton Agar</i> (MHA)	Media kultur uji antibakteri
22	<i>Mueller Hilton Broth</i> (MHB)	Media kultur bakteri dan uji MIC
23	NaH ₂ PO ₄	Bahan membuat larutan PBS
24	Na ₂ HPO ₄	Bahan membuat larutan PBS
25	NaCl	Bahan membuat larutan PBS
26	<i>Plastic wrap</i>	Membungkus bagian sisi cawan petri
27	Sarung tangan	Meminimalisir kontaminasi
28	Spirtus	Bahan bakar bunsen
29	Tanaman air	Bahan yang diuji
30	<i>Tissue</i>	Membersihkan alat-alat
31	<i>Trypsin Soy Agar</i> (TSA)	Media kultur bakteri berbentuk padat
32	<i>Trypsin Soy Broth</i> (TSB)	Media kultur bakteri berbentuk cair

3.2 Metode Rancangan Peneitian

3.2.1 Metode Penelitian

Frick (2008) menyatakan bahwa metode penelitian adalah suatu cara dalam menguraikan metode yang sesuai dan tepat untuk menjawab rumusan masalah. Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimental. Metode eksperimental adalah metode yang bertujuan melakukan eksperimen terhadap suatu objek dan menjelaskan secara keseluruhan hasil observasi suatu objek yang diteliti, eksperimen pada objek tersebut.

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan pada penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Pratisto (2004) menyatakan bahwa keuntungan menggunakan RAL yaitu denah perancangan lebih mudah, analisis statistik terhadap subjek percobaan sangat sederhana, fleksibel dalam penggunaan jumlah perlakuan dan jumlah ulangan, kehilangan informasi relatif sedikit dalam hal data hilang dibandingkan dengan rancangan lain. Sastrosupadi (2007) menyatakan bahwa model umum RAL sebagai berikut:

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

Keterangan:

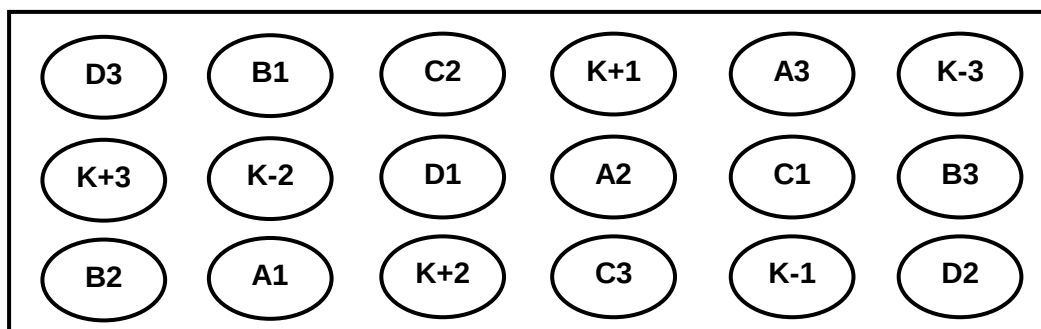
Y_{ij} = respon atau nilai hasil pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

μ = nilai tengah umum.

T_i = pengaruh perlakuan ke-i.

ϵ = pengaruh galat dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

Penelitian ini menggunakan 4 perlakuan dan 2 kontrol pembanding yaitu kontrol positif dan kontrol negatif dengan 3 kali ulangan:



Gambar 7. Denah Penelitian

Keterangan:

- A = perlakuan dengan 15,5 mg/ml (*L. adscendens*) atau 2,5 mg/ml (*E. benthamii*)
D = perlakuan dengan 12,5 mg/ml ekstrak (*L. adscendens*) atau 2 mg/ml (*E. benthamii*)
B = perlakuan dengan 9,5 mg/ml ekstrak (*L. adscendens*) atau 1,5 mg/ml (*E. benthamii*)
C = perlakuan dengan 6,5 mg/ml ekstrak (*L. adscendens*) atau 1 mg/ml (*E. benthamii*)
1,2,3 = ulangan ke-
K (-) = kontrol berisi media MHB, bakteri, dan akuades
K (+) = kontrol berisi media MHB, bakteri, dan *chloramphenicol* 30 µg.

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Sterilisasi

Sterilisasi merupakan proses membunuh semua mikroorganisme yang mengganggu. Tujuan sterilisasi untuk menciptakan kondisi yang aseptis (Taufiq dan Najmudin, 2017). Berikut tahapan sterilisasi menggunakan autoklaf adalah:

- Alat yang telah dicuci, dikeringkan kemudian dibungkus dengan koran dan diikat dengan karet gelang.
- Akuades ditambahkan ke dalam autoklaf sampai menutup sistem pemanas.
- Alat dan bahan yang akan disterilkan dimasukkan ke dalam keranjang untuk dimasukkan ke dalam autoklaf.
- Saklar dihidupkan terlebih dahulu pada aliran listrik dan tekan tombol "ON".

- Suhu dan waktu diatur sesuai dengan kebutuhan dan geser penutup ke arah “LOCK” kemudian putar “EXHAUST” ke arah tutup.
- Tombol “START” ditekan dan ditunggu sampai proses sterilisasi selesai.
- Setelah suhu telah mencapai 121°C, tekanan 1 atm yang muncul pada layar kemudian ditunggu hingga suhu menurun 70°C dan putar “EXHAUST” ke arah buka.
- Tombol “STOP” ditekan dan penutup autoklaf di arahkan ke “UNLOCK” lalu tekan tombol “OFF” dan alat bahan dikeluarkan.

3.3.2 Ekstrak Kasar Tanaman Air

Sampel ekstrak kasar tanaman air 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). Tanaman air tersebut telah diekstraksi menggunakan pelarut etanol 70% di Fakultas Farmasi Universitas Indonesia. Sampel ekstrak kasar *S. plana* didapatkan simplisia sebesar 48,04 gram dan hasil ekstrak bentuk pasta sebesar 2,78 gram. Sampel ekstrak kasar *L. adscendens* didapatkan simplisia sebesar 54,12 gram dan hasil ekstrak bentuk pasta sebesar 2,84 gram. Sampel ekstrak kasar *E. benthamii* didapatkan simplisia sebesar 23,36 gram dan hasil ekstrak bentuk pasta sebesar 2,62 gram.

3.3.3 Pembuatan Media dan Larutan

A. Media *Tryptone Soy Agar (TSA)*

Media TSA adalah medium yang digunakan sebagai media tumbuh *F. columnare*. Berikut langkah membuat media TSA antara lain:

- Erlenmeyer 1000 ml dan akuades disiapkan.

- Media TSA sebanyak 40 gram dengan 1000 ml akuades dimasukkan dalam Erlenmeyer.
- Campuran tersebut dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk hingga homogen.
- Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan *aluminium foil* dan dililit dengan karet gelang.
- Media disterilkan menggunakan autoklaf (suhu 121°C, tekanan 1 atm) selama 15-20 menit.
- Media dituangkan ke tabung reaksi dan dimiringkan dilakukan di LAF dan didekatkan dengan bunsen.
- Setelah media memadat kemudian dimasukkan dalam lemari pendingin dengan diberi penanda dengan kertas label.

B. Media Tryptic Soy Broth (TSB)

Media TSB merupakan medium cair sebagai tempat peremajaan *F. columnare*. Berikut langkah membuat media TSB antara lain:

- Erlenmeyer 1000 ml dan akuades disiapkan.
- Media TSB sebanyak 30 gram dengan 1000 ml akuades dimasukkan ke dalam Erlenmeyer.
- Campuran tersebut dipanaskan di atas *hot plate* dan diaduk hingga homogen.
- Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan *aluminium foil* dan dililit dengan karet gelang.
- Media disterilkan menggunakan autoklaf (suhu 121°C, tekanan 1 atm) selama 15-20 menit.
- Media dituangkan ke tabung reaksi yang dilakukan di LAF dan didekatkan bunsen.

- Simpan media ke dalam lemari.

C. Media *Mueller Hinton Agar* (MHA)

Media MHA digunakan sebagai uji antibakteri *F. columnare*. Berikut langkah membuat media MHA antara lain:

- Media MHA ditimbang sebanyak 38 gram dengan menggunakan timbangan digital.
- Bubuk MHA dicampur dengan aquades 1000 ml ke dalam Erlenmeyer dan diaduk hingga homogen.
- Erlenmeyer ditutup dengan *aluminium foil* dan diikat dengan menggunakan karet gelang kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Media dituang pada cawan petri di LAF ditunggu hingga dingin dan disimpan pada lemari pendingin dengan diberi kertas label sebagai penanda.

D. Media *Mueller Hinton Broth* (MHB)

Media MHB digunakan untuk kultur *F. columnare*. Berikut langkah membuat media MHB antara lain:

- Media MHB ditimbang sebanyak 10,5 gr dengan menggunakan timbangan digital.
- Bubuk MHB dilarutkan dengan aquades 500 ml dan dihomogenkan.
- Erlenmeyer ditutup menggunakan aluminium foil dan diikat dengan menggunakan karet gelang kemudian homogenkan menggunakan stirer.
- Media dituang pada tabung reaksi dengan masing-masing 10 ml kemudian tutup dengan kapas.
- Media disterilkan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.

- Media ditunggu hingga dingin dan siap untuk digunakan.

E. Larutan *Phospat Buffer Saline* (PBS)

Media PBS digunakan dalam proses pengenceran bakteri. Berikut langkah membuat media PBS antara lain:

- NaH_2PO_4 ditimbang sebanyak 4 gram, Na_2HPO_4 sebanyak 6,5 gram dan NaCl sebanyak 8,4 gram.
- Bahan-bahan tersebut dilarutkan ke dalam Erlenmeyer berisi akuades 1000 ml dan dihomogenkan.
- pH akuades diukur sebesar 7.
- Erlenmeyer diutup dengan *aluminium foil* dan diikat dengan karet gelang.
- Erlenmeyer dimasukkan ke autoklaf dengan suhu 121 °C selama 2 jam.
- Menuang PBS ke dalam tube sebanyak 9 ml.
- Larutan PBS disimpan di lemari pendingin.

F. Larutan DMSO 5%

Larutan DMSO 5% digunakan untuk mengencerkan ekstrak bentuk pasta. Berikut langkah membuat larutan DMSO 5% antara lain:

- Akuades steril disiapkan sebanyak 950 ml di dalam erlenmeyer.
- DMSO murni ditimbang sebanyak 50 ml dan dihomogenkan.
- Larutan DMSO 5% disimpan di lemari pendingin.

G. Larutan Asam Asetat Glasial 33%

Larutan asam asetat glasial 33% digunakan untuk pewarnaan biofilm. Berikut langkah membuat larutan asam asetat glasial 33% antara lain:

- Erlenmeyer steril dipersiapkan terlebih dahulu.
- Akuades steril disiapkan sebanyak 67 ml di dalam erlenmeyer steril.
- Asam asetat glasial murni ditimbang sebanyak 33 ml dan dihomogenkan.
- Asam asetat glasial 33% disimpan di lemari pendingin.

3.3.4 Kultur *F. columnare*

Bakteri merupakan koleksi dari IRP2I Depok, Jawa Barat. Berikut kultur bakteri pada media cair TSB antara lain:

- Media TSB yang steril disiapkan
- Jarum ose dibakar di atas nyala bunsen dari ujung ke pangkal hingga kawat memijar dan setelah dingin kemudian disentuh ke biakkan murni *F. columnare* kemudian dicelupkan ke media TSB yang sudah dingin.
- Media TSB disimpan ke dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 24 jam.
- Bakteri yang tumbuh ditandai dengan perubahan media dari jernih menjadi keruh.

Peremajaan kultur bakteri dilakukan dengan metode gores menggunakan media agar miring TSA. Berikut peremajaan kultur *F. columnare* pada media TSA antara lain:

- Media TSA miring yang steril disiapkan.
- Jarum ose diaseptiskan dengan alkohol 70% dan dibakar di atas nyala bunsen dari ujung ke pangkal hingga kawat memijar.
- Ujung tabung reaksi yang berisi bakteri dipanaskan di atas bunsen dengan membuka penutup kapas.
- Satu inokulan bakteri dari hasil peremajaan sebelumnya diambil dengan metode gores ke media agar yang steril di dekat bunsen.
- Media hasil goresan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 30°C.

3.3.5 Total Plate Count (TPC)

Berikut prosedur kerja TPC dalam penelitian ini antara lain:

- *Microplate 96 well* steril disiapkan dan setiap sumuran diisi dengan larutan PBS sebanyak 180 μ L menggunakan mikropipet.
- Isolat bakteri dipipet secara aseptis dari media cair sebanyak 20 μ L menggunakan mikropipet untuk dimasukkan ke dalam *microplate 96 well* tersebut dan dihomogenkan secara dilusi.
- Bakteri disiapkan pada hasil pengenceran 10^{-7} dan 10^{-8} sebanyak 30 μ L dan ditetaskan pada media kultur.
- Isolat bakteri diratakan menggunakan *L-glass* steril.
- Cawan petri ditutup dengan *plastic wrap* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.
- Setelah inkubasi kemudian menghitung kepadatan bakteri dan hasilnya dimasukkan ke dalam rumus perhitungan TPC.

3.3.6 Uji Antibakteri *F. columnare*

Prosedur uji antibakteri melalui beberapa tahap antara lain:

- Media MHA disiapkan sebanyak 10 ml pada cawan petri (*base layer*)
- Suspensi bakteri disiapkan dengan mengencerkan inokulum sebanyak 100 μ L dengan larutan PBS 900 μ L di dalam *tube* 1 ml sebanyak 3 kali.
- Larutan DMSO 5% disiapkan yaitu dengan melarutkan akuades steril sebanyak 950 ml dengan DMSO murni sebanyak 50 ml.
- Masing-masing ekstrak tanaman air dilarutkan dalam DMSO 5% sebanyak 0,1 gram dan 0,2 gram.
- Bakteri uji dituang sebanyak 1 ml ke dalam tabung reaksi yang berisi MHA cair dan dihomogenkan.
- Media MHA cair tersebut (*seed layer*) dituang ke dalam cawan petri yang telah diisi MHA padat 10 ml (*base layer*) dan diratakan dengan membentuk angka 8 tunggu hingga memadat.

- *Chloramphenicol antibiotic disc* 30 µg sebagai kontrol positif dan *blank disc* yang telah ditetesi 50 µl larutan DMSO 5% menggunakan mikropipet sebagai kontrol negatif dan *blank disc* yang ditetesi 50 µl ekstrak tanaman air menggunakan mikropipet sebagai perlakuan sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan di dalam cawan petri.
- Cawan petri ditutup dengan *plastic wrap* dan diberi label.
- Media diinkubasi ke dalam inkubator dengan suhu 30°C selama 24 jam.
- Pengamatan dilakukan dengan mengukur diameter zona hambat di sekitar *blank disc* yang terhitung dari luar diameter zona *blank disc*.

3.3.7 Uji *Minimum Inhibition Concentration* (MIC)

Berikut prosedur kerja uji MIC dalam penelitian ini antara lain:

- *Microplate 96 well* steril dan diisi sumuran dengan aquades steril sebanyak 50 µl dengan mikropipet.
- Sampel ekstrak tanaman air yang telah dilarutkan dengan DMSO 5% dengan konsentrasi 200 mg/ml di dalam sumuran *microplate 96 well* ke-1 sebanyak 100 µl tanpa adanya aquades, kemudian dilakukan pengenceran secara dilusi ke sumuran ke-2 yang telah diisi aquades dengan mengambil 50 µl dari sumuran ke-1 untuk mendapatkan konsentrasi 100 mg/ml dan seterusnya hingga sumuran terakhir ke-12. Masing-masing sumuran berisi 50 µl sampel ekstrak.
- Suspensi bakteri didapatkan dengan mengambil isolat bakteri sebanyak 20 µl untuk diencerkan dengan larutan PBS sebanyak 180 µl.
- Masing-masing perlakuan di dalam sumuran *microplate 96 well* kemudian diisi dengan media MHB sebanyak 35 µl dan bakteri uji sebanyak 15 µl.
- Kontrol media berisi MHB sebanyak 100 µl, kontrol positif berisi MHB sebanyak 85 µl dengan bakteri uji sebanyak 15 µl, kontrol negatif berisi

MHB sebanyak 50 μ l dengan DMSO 5% sebanyak 50 μ l serta kontrol antibiotik berisi *chloromfenicol* cair sebanyak 35 μ l, media MHB sebanyak 35 μ l dan bakteri uji sebanyak 15 μ l.

- *Microplate 96 well* tersebut kemudian ditutup dengan *aluminium foil* hingga rapat dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.
- Setelah diinkubasi kemudian melakukan pengamatan dengan membaca hasil *Optical Density* (OD) dengan panjang gelombang 600 nm di spektrofotometer.

3.3.8 Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC)

Berikut prosedur kerja uji MBC dalam penelitian ini antara lain:

- Hasil tiap perlakuan untuk dikultur dengan metode gores (*streak*) di media MHA.
- Cawan petri ditutup dengan *plastic wrap* dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.
- Setelah diinkubasi kemudian dilakukan pengamatan dengan melihat ada tidaknya koloni bakteri yang tumbuh di media MHA.
- Hasil MBC ditentukan dengan tidak terlihat pertumbuhan bakteri yang telah dikultur.

3.3.9 Uji Biofilm

A. Metode *microplate well 96*

Berikut prosedur metode *microplate 96 well* yang telah dimodifikasi dalam penelitian ini antara lain:

- *Microplate 96 well* steril disiapkan.
- Sampel ekstrak tanaman air diencerkan dengan menggunakan akuades sesuai dengan konsentrasi yang telah ditentukan.

- Masing-masing perlakuan di dalam sumuran kemudian diisi dengan media MHB sebanyak 35 µl.
- Suspensi bakteri uji diencerkan sebanyak 20 µl ke dalam akuades 180 µl.
- Bakteri uji diencerkan sebanyak 15 µl pada masing-masing perlakuan.
- Kontrol positif berisi MHB sebanyak 35 µl, bakteri uji sebanyak 15 µl, *chloromfenicol* 30 µl sebanyak 100 µl.
- Kontrol negatif berisi MHB sebanyak 35 µl, bakteri uji sebanyak 15 µl, akuades sebanyak 100 µl.
- *Microplate 96 well* tersebut kemudian ditutup dengan *aluminium foil* hingga rapat dan diinkubasi pada suhu 30°C selama 24 jam.
- Setelah diinkubasi 24 jam, *microplate 96 well* dibilas menggunakan PBS steril sebanyak 3 kali dan dikeringkan.
- 200 µl larutan etanol 99% ditambahkan, diamkan selama 3 menit dan dibuang.
- 200 µl larutan kristal violet ditambahkan, diamkan selama 20 menit dan dibuang.
- 200 µl larutan asam asetat glasial 33% ditambahkan, diamkan 15 menit.
- Pengamatan dengan membaca hasil nilai OD dengan panjang gelombang 630 nm di spektrofotometer dan nilai OD dimasukkan ke dalam rumus perhitungan persentase inhibisi (%).

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

B. Metode *Cover slip*

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

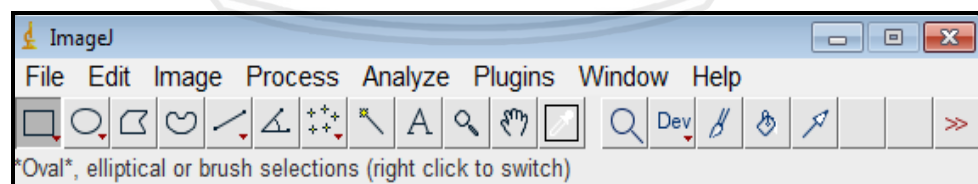
- Menyiapkan *mikrotube* 2 ml yang telah berisi *cover glass* steril.

- Sampel perlakuan diambil dengan mikropipet untuk ditetaskan hingga menyentuh ke dalam *cover glass* dan diinkubasi pada suhu 36°C selama 24 jam.
- Setelah diinkubasi kemudian membilas *cover glass* menggunakan PBS sebanyak 3 kali dan dikeringkan.
- Pewarnaan biofilm dengan larutan kristal violet, diamkan selama 20 menit dan dikeringkan.
- Membilas biofilm larutan asam asetat glasial 33%, diamkan 15 menit, dikeringkan.
- Hasil pewarnaan kemudian diamati di dalam mikroskop sebanyak 5 bidang dan diolah ke software Image-J untuk menggambarkan tutupan biofilm.

C. Pengambilan Data

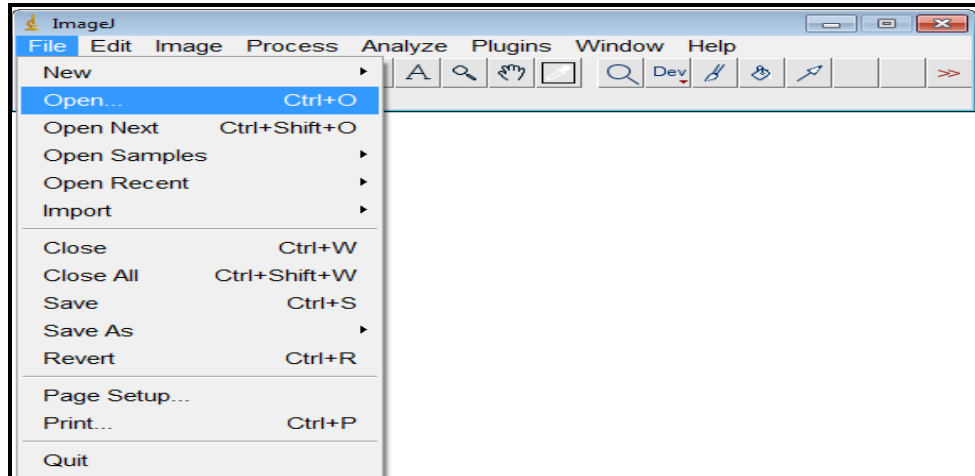
Berikut prosedur metode pengambilan data menggunakan software Image-J dalam penelitian ini antara lain:

- Software Image-J didownload terlebih dahulu di alamat web <https://imagej.nih.gov/ij/download.html>.
- Setelah pengunduhan maka muncul tampilan awal (Gambar 8).



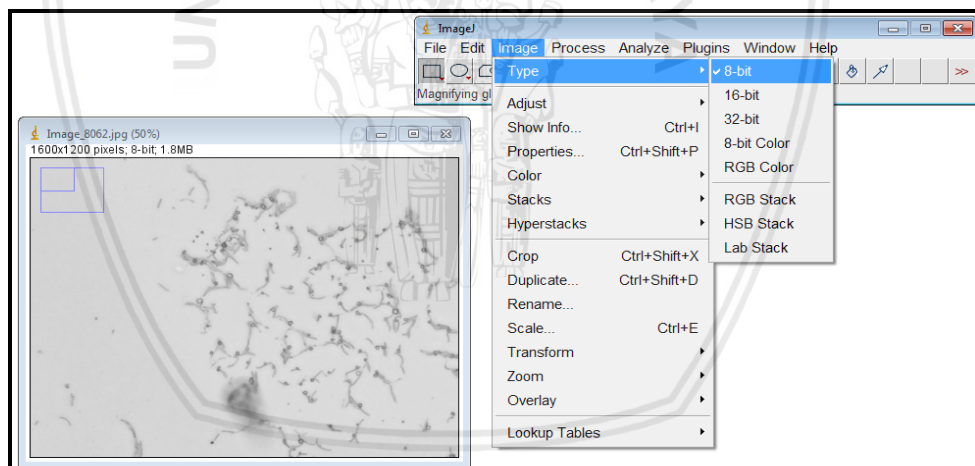
Gambar 8. Tampilan Awal Software Image-J

- 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 9).



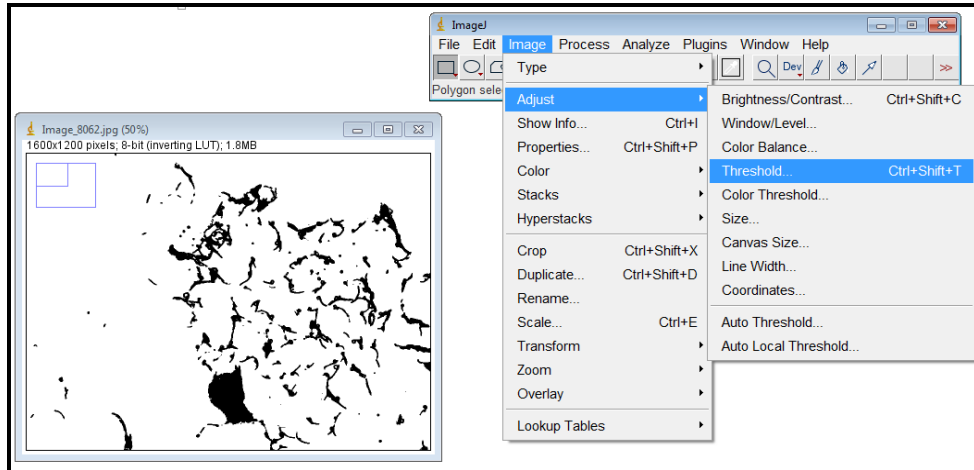
Gambar 9. Langkah Pemilihan Gambar

- Gambar yang telah dipilih merupakan hasil pemotretan yang *fullcolour* sehingga harus diubah dalam format *grayscale* dengan klik menu *Image*, pilih *Type*, klik 8 bit maka gambar berubah dalam format *grayscale* (Gambar 10).



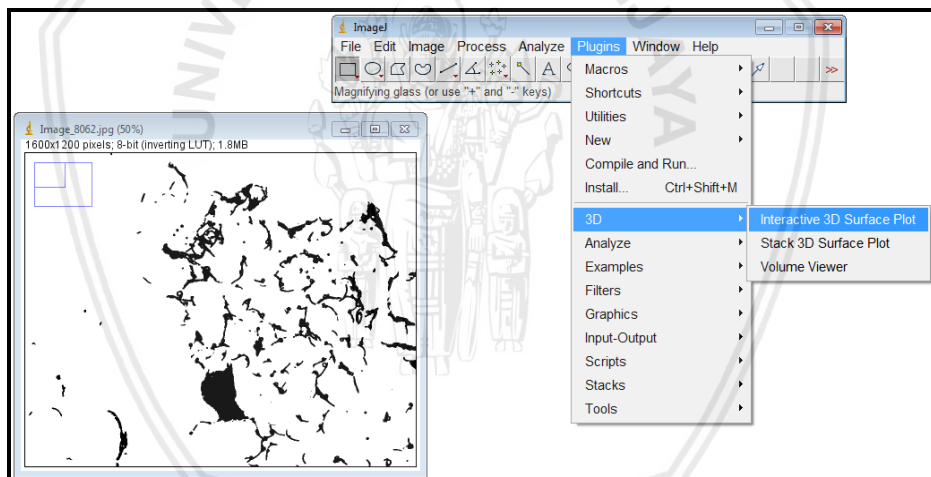
Gambar 10. Merubah Format Gambar *Grayscale*

- Gambar kemudian diubah menjadi *Black and White*. Cara yang harus dilakukan yaitu dengan memilih menu *Image*, klik *Adjust*, kemudian pilih *Threshold* (Gambar 11).



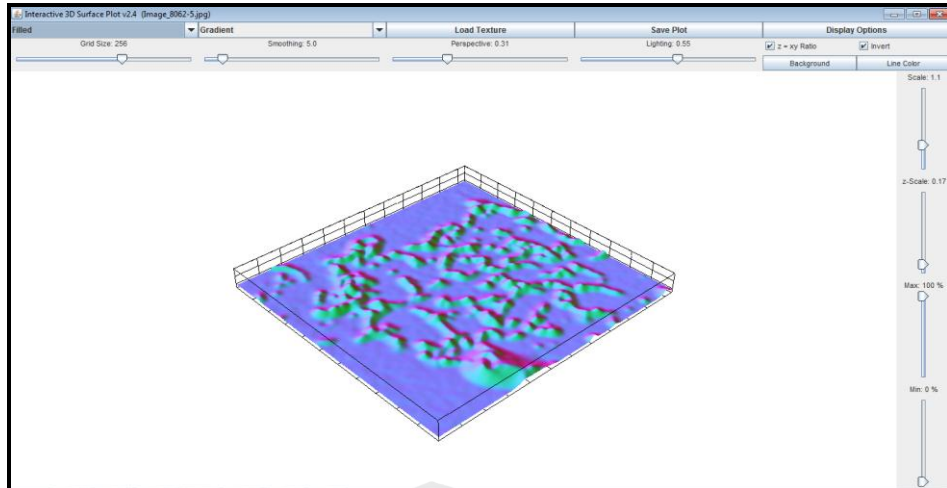
Gambar 11. Menampilkan Gambar Menjadi *Black and White*

- 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* (Gambar 12).



Gambar 12. Menampilkan Visualisasi 3D

- Hasil visualisasi gambar 3D akan ditampilkan seperti berikut (Gambar 13):



Gambar 13. Hasil Visualisasi 3D

3.4 Parameter Uji

3.4.1 Parameter Utama

Parameter utama yang digunakan dalam penelitian ini adalah zona hambat bakteri, konsentrasi minimum ekstrak dalam menghambat pertumbuhan bakteri, konsentrasi minimum ekstrak dalam membunuh bakteri dan nilai % inhibisi biofilm dan visualisasi 3D biofilm.

3.4.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang yang digunakan dalam penelitian ini adalah pewarnaan Gram dan TPC *F. columnare*, suhu inkubasi, panjang gelombang uji MIC, panjang gelombang uji biofilm.

3.5 Pengambilan Data

3.5.1 Data Primer

Observasi adalah pengamatan langsung di lapangan yang dilakukan oleh penulis dengan menggunakan teknik observasi tidak berstruktur yang dilaksanakan untuk mengumpulkan data dan dibantu dengan adanya pedoman observasi (Semiawan, 2010). Kegiatan observasi dalam penelitian adalah dengan cara mengamati, mempelajari, dan mencatat objek kegiatan penelitian.

3.5.2 Data Sekunder

Data sekunder merupakan struktur data historis mengenai variabel-variabel yang telah dikumpulkan dan dihimpun sebelumnya oleh pihak lain. Sumber data sekunder bisa diperoleh dari sumber internal yaitu internet, perpustakaan umum maupun lembaga pendidikan, atau membeli dari pihak-pihak yang mengkhususkan diri menyajikan data sekunder (Hermawan, 2005). Data yang telah dikumpulkan dari lapangan dan pustaka selanjutnya disusun, ditabulasi untuk selanjutnya dapat dianalisis guna penarikan kesimpulan. Analisis data bersifat kualitatif dan analisis kuantitatif (Atihuta, *et al.*, 2014).

3.6 Analisis Data

Data yang telah didapatkan kemudian akan dilakukan analisis secara statistik menggunakan analisis keragaman atau *Analysis of Varians* (ANOVA) dengan metode RAL pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan 99% ($\alpha = 0,01$). Perlakuan dikatakan memberikan pengaruh pada uji apabila nilai F hitung melebihi nilai F tabel yang digunakan. Jika perlakuan dinyatakan berpengaruh maka akan dilanjutkan dengan menggunakan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) yang dapat digunakan untuk menentukan perlakuan yang telah memberikan hasil terbaik.

4 HASIL DAN PEMBAHASAN

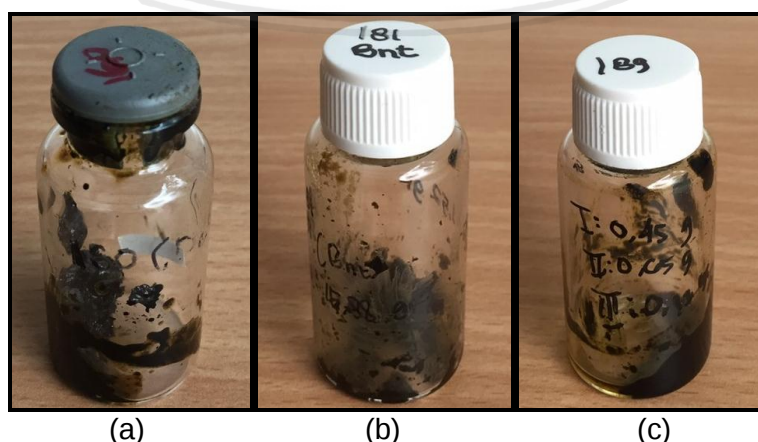
4.1 Ekstrak Kasar Tanaman Air dari Sulawesi Selatan

Tanaman air yang diperoleh dari Sulawesi Selatan telah diekstraksi di Fakultas Farmasi Universitas Indonesia disajikan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Rendemen Ekstrak Kasar Tanaman Air

Tanaman	Nama Lokal	Simplisia (gram)	Rendemen (%)
<i>Selaginella plana</i> (Desv. ex Poir.) Hieron	Ranu pane	48,04	17
<i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara	Krangkong	54,12	5
<i>Ephitema benthamii</i> C. B. Clarke	-	23,36	11

Hasil ketiga ekstrak berbentuk pasta dengan aroma yang khas. Karakteristik warna ekstrak kasar ketiga tanaman menunjukkan warna yang relatif sama yaitu hijau pekat. Ekstrak *S. plana* menghasilkan rendemen sebesar 17%. Ekstrak *L. adscendens* menghasilkan rendemen 5% dan ekstrak *E. benthamii* menghasilkan rendemen sebesar 11% disajikan pada Gambar 14. Dewatisari, *et al.* (2017) menyatakan bahwa nilai rendemen juga berkaitan dengan banyaknya kandungan bioaktif yang terkandung dalam tanaman. Senyawa bioaktif merupakan senyawa yang terkandung dalam hewan maupun tumbuhan. Senyawa inilah yang dijadikan sebagai sumber bahan antibakteri.



Gambar 14. Ekstrak Berbentuk Pasta. (a) *S. plana*, (b) *L. adscendens*, dan (c) *E. benthamii*

Penggunaan pelarut etanol 70% berpengaruh baik terhadap optimalisasi kandungan ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan. Senyawa bioaktif pada ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan sebagai bahan antibakteri terhadap pertumbuhan *F. columnare*. Azis, *et al.* (2014) menyatakan bahwa penggunaan pelarut etanol memiliki polaritas tinggi dibandingkan pelarut lain, memiliki titik didih rendah, cenderung aman, tidak beracun, dan tidak berbahaya. Sifat polar (gugus OH⁻) dan non polar (gugus CH₂CH₃) pada etanol yang mengekstrak suatu tanaman menyebabkan kandungan senyawa alkaloid dapat bekerja secara optimal.

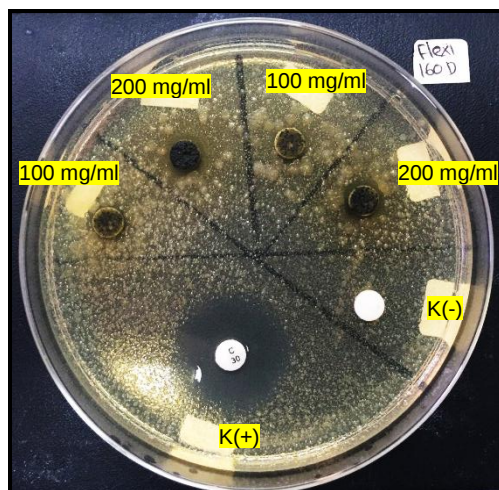
4.2 Uji Antibakteri Ekstrak Kasar Tanaman Air dari Sulawesi Selatan terhadap Pertumbuhan *F. columnare*

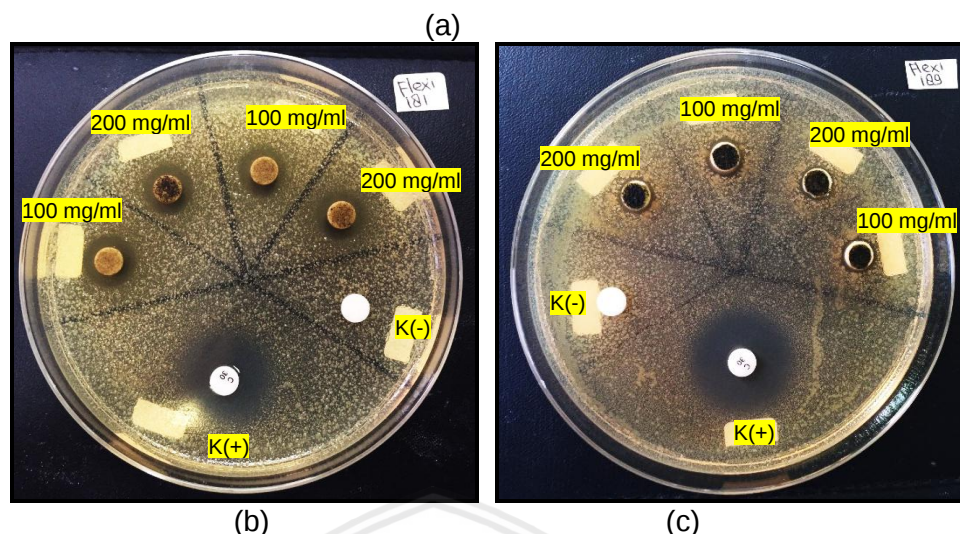
Uji antibakteri terhadap *F. columnare* menggunakan metode Kirby Baurer yaitu difusi ekstrak kasar tanaman air ke kertas cakram yang berukuran 6 mm di dalam media MHA. Konsentrasi ekstrak yang digunakan sebesar 0,1 gram dan 0,2 gram dalam pelarut DMSO 5% dengan kepadatan *F. columnare* sebesar 10⁸ CFU/ml. Hasil pengamatan diameter zona bening sebagai zona hambat *F. columnare* disajikan pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengamatan Diameter Zona Hambat

Tanaman	Konsentrasi (mg/ml)	Ulangan		Total (mm)	Rata-Rata (mm)
		1	2		
<i>Selaginella plana</i> (Desv. Ex. Hieron Poir)	100	1,2	1,2	2,4	1,2
	200	2,7	3,2	5,9	2,95
<i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara	100	2,3	4,8	7,1	5,05
	200	5,3	6,2	11,5	5,75
<i>Ephitema benthamii</i> B. Clarke	100	2,8	2,7	5,5	2,75
	200	4	3,7	7,7	3,85

Hasil pengamatan diameter zona hambat dengan pengamatan zona bening yang disajikan pada Gambar 15. Hasil rata-rata diameter zona hambat ekstrak kasar *S. plana* pada perlakuan konsentrasi 100 mg/ml ialah sebesar 1,2 mm maka respon daya hambatnya dikategorikan lemah, sedangkan hasil rata-rata pada perlakuan konsentrasi 200 mg/ml ialah sebesar 2,95 mm maka respon daya hambatnya dikategorikan lemah. Hasil rata-rata diameter zona hambat ekstrak kasar *L. adscendens* pada perlakuan konsentrasi 100 mg/ml ialah sebesar 5,05 mm maka respon daya hambatnya dikategorikan sedang, sedangkan hasil rata-rata pada perlakuan konsentrasi 200 mg/ml ialah sebesar 5,75 mm maka respon daya hambatnya dikategorikan sedang. Hasil rata-rata ekstrak kasar *E. benthamii* pada perlakuan konsentrasi 100 mg/ml ialah sebesar 2,75 mm maka respon daya hambatnya dikategorikan lemah, sedangkan hasil rata-rata pada perlakuan konsentrasi 200 mg/ml ialah sebesar 3,85 mm maka respon daya hambatnya dikategorikan lemah. Hasil pengamatan dibandingkan dengan standar respon hambat yang disajikan pada Tabel 5. Mulyadi, *et al.* (2017) menyatakan bahwa aktivitas bahan antibakteri yang menghambat pertumbuhan bakteri ditunjukkan dengan adanya zona bening yang berada disekitar *blank disc*. Faktor difusi ekstrak ke *blank disc* dan kandungan senyawa antibakteri mempengaruhi zona hambat yang terbentuk.





Gambar 15. Zona Hambat Ekstrak Kasar. (a) *S. plana*, (b) *L. adscendens*, (c) *E. benthamii*

Pada ketiga ekstrak kasar tersebut termasuk sebagai antibakteri bakterisidal dan bakteriostatik. Alakomi, *et al.* (2000) menyatakan bahwa bahan antibakteri bakterisidal bersifat asam organik. Asam organik tersebut menyebabkan sitoplasma sel bakteri patogen menjadi asam dan menghambat potensial transmembran dan transport substrat. Putri, *et al.* (2016) menyatakan bahwa alkaloid memiliki sifat dalam pengikatan senyawa dan berdampak spasmolitik. Dampak spasmolitik dapat mengerutkan dinding sel bakteri dan mengganggu permeabilitasnya. Kukreja dan Dodwad (2012) menyatakan bahwa saponin menyebabkan hemolisis sel karena meningkatkan permeabilitas sel sehingga menyebabkan membran sel menjadi tidak stabil.

Tabel 5. Standar Respon Daya Hambat Bakteri

Diameter Zona Hambat	Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri
0	Tidak ada
<5	Lemah
5-10 mm	Sedang
11-20 mm	Kuat
21-30 mm	Sangat kuat

Sumber: (Sambuaga, *et al.*, 2018)

Pada kontrol positif yaitu menggunakan *chloramphenicol antibiotic disc* 30 µg dan zona hambatnya sebesar 12,83 mm maka respon daya hambatnya

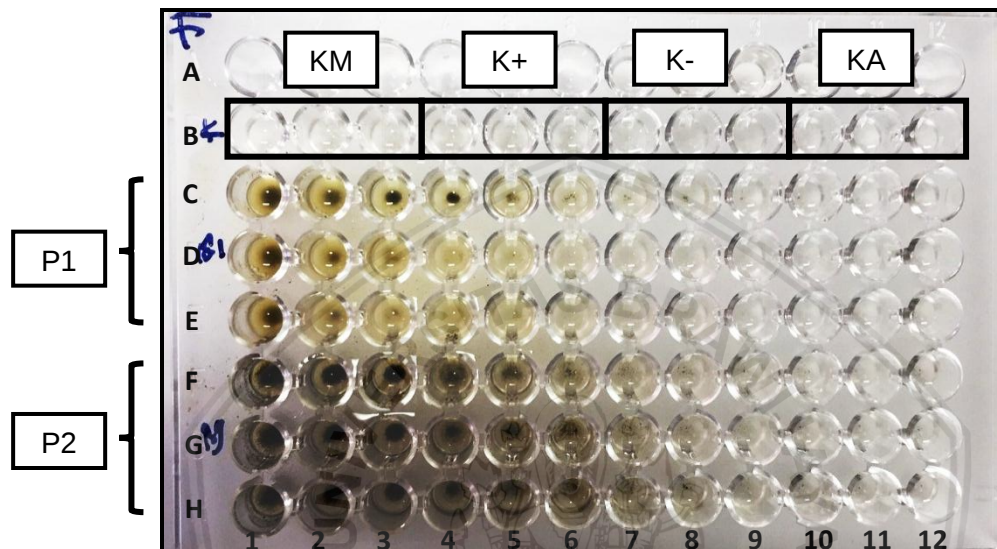
dikategorikan kuat. Tajik, *et al.* (2010) menyatakan bahwa antibiotik *chloramphenicol* sebagai agen antimikroba yang memiliki spektrum luas sehingga mampu membunuh bakteri gram negatif dan gram positif. Andrews dan Howe (2011) menyatakan bahwa jika diameter zona hambat antibiotik *chloramphenicol* sebesar <20 mm maka bakteri dikatakan resisten, apabila zona hambatnya ≥ 20 mm maka bakteri dikatakan sensitif.

Pada kontrol negatif yaitu menggunakan DMSO 5% bahwa pengamatan tidak ada zona bening yang artinya zona hambatnya nol atau respon daya hambatnya tidak ada. Penggunaan DMSO 5% membuktikan bahwa sifat pelarut ini tidak mempengaruhi hasil. Badan POM RI (2010) menyatakan bahwa DMSO merupakan senyawa organosulfur dengan rumus $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Cairan tidak berwarna ini termasuk pelarut polar aprotik yang dapat melarutkan baik senyawa polar dan nonpolar dan larut dalam berbagai pelarut organik maupun air. Menurut Zhou, *et al.* (2009) menyatakan bahwa pelarut DMSO 5% tidak memiliki aktivitas antimikroba yang signifikan.

4.3 Uji Minimum Inhibition Concentration (MIC) Terhadap *F. columnare*

Uji MIC terhadap pertumbuhan *F. columnare* menggunakan metode mikrodilusi. Uji MIC dilakukan setelah uji antibakteri dengan mengambil sampel dengan hasil zona hambat yang terbaik untuk dibandingkan. Uji MIC digunakan untuk mengetahui konsentrasi terendah dari ekstrak kasar tanaman air yang dapat menghambat pertumbuhan *F. columnare*. Pada penelitian ini uji MIC menggunakan 12 perlakuan konsentrasi ekstrak tanaman yang berbeda diencerkan menggunakan aquades di *microplate 96-well*, kontrol media, kontrol positif, kontrol negatif dan kontrol antibiotik. Kepadatan suspensi *F. columnare* yang digunakan sebesar 10^8 CFU/ml yang diperoleh dengan mengencerkan larutan stok bakteri hasil dari *Total Plate Count* (TPC) sebesar 10^{11} CFU/ml

sebanyak tiga kali menggunakan larutan PBS. Moyer dan Huniccut, *et al.* (2007) menyatakan bahwa kepadatan suspensi *F. columnare* sebesar $1-2 \times 10^8$ CFU/ml adalah fase logaritmik (pertumbuhan) bakteri dan patogenitas bakteri karena menyebabkan kerusakan jaringan insang ikan yang diinfeksi menggunakan metode perendaman pada ikan secara langsung.



Gambar 16. Hasil Uji MIC

Keterangan:

KM = Kontrol media

K (+) = Kontrol positif

K (-) = Kontrol negatif

KA = Kontrol antibiotik

P1 = Perlakuan ekstrak *L. adscendens* dengan *F. columnare*

P2 = Perlakuan ekstrak *E. benthamii* dengan *F. columnare*

Pengamatan hasil uji MIC yaitu dengan melihat nilai OD setelah diinkubasi selama 24 jam menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang sebesar 600 nm disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil pengamatan uji MIC *F. columnare*

No.	Perlakuan (mg/ml)	Nilai OD	
		<i>L. adscendens</i>	<i>E. benthamii</i>
1	200	4,394	2,324
2	100	1,888	1,561
3	50	0,864	1,038
4	25	0,634	0,723
5	12,5	0,445	0,730
6	6,25	0,366	0,782
7	3,125	0,397	0,587

No.	Perlakuan (mg/ml)	Nilai OD	
		<i>L. adscendens</i>	<i>E. benthamii</i>
8	1,5625	0,609	0,576
9	0,78125	0,663	0,592
10	0,390625	0,626	0,691
11	0,1953125	0,596	0,722
12	0,09765625	0,647	0,729
13	K. Media	0,060	0,060
14	K (+)	0,780	0,780
15	K (-)	0,051	0,051
16	K. Antibiotik	0,464	0,464

Hasil pengamatan uji MIC ditentukan dari nilai OD yang mendekati nilai OD kontrol antibiotik. Hasil pengamatan menunjukkan bahwa pada sampel ekstrak kasar *L. adscendens* dengan konsentrasi 12,5 mg/ml nilai ODnya sebesar 0,445 sedangkan sampel ekstrak kasar *E. benthamii* dengan konsentrasi 1,5 mg/ml nilai ODnya sebesar 0,576. Nilai MIC ditunjukkan pada ekstrak kasar *L. adscendens* dengan konsentrasi 12,5 mg/ml dan ekstrak kasar *E. benthamii* dengan konsentrasi 2 mg/ml memiliki aktivitas menghambat pertumbuhan *F. columnare*. Almurdani, et al. (2016) menyatakan bahwa jumlah sel bakteri dapat diukur melalui kekeruhan atau turbiditas pada media. Semakin keruh maka semakin banyak jumlah selnya. Nilai OD menunjukkan bahwa cahaya yang diserap oleh sel dinyatakan berbanding lurus dengan jumlah sel bakteri. Putri, et al. (2016) menyatakan bahwa nilai MIC dipengaruhi oleh beberapa faktor yaitu jumlah inokulum bakteri yang digunakan, media yang digunakan, dan kondisi inkubasi (suhu).

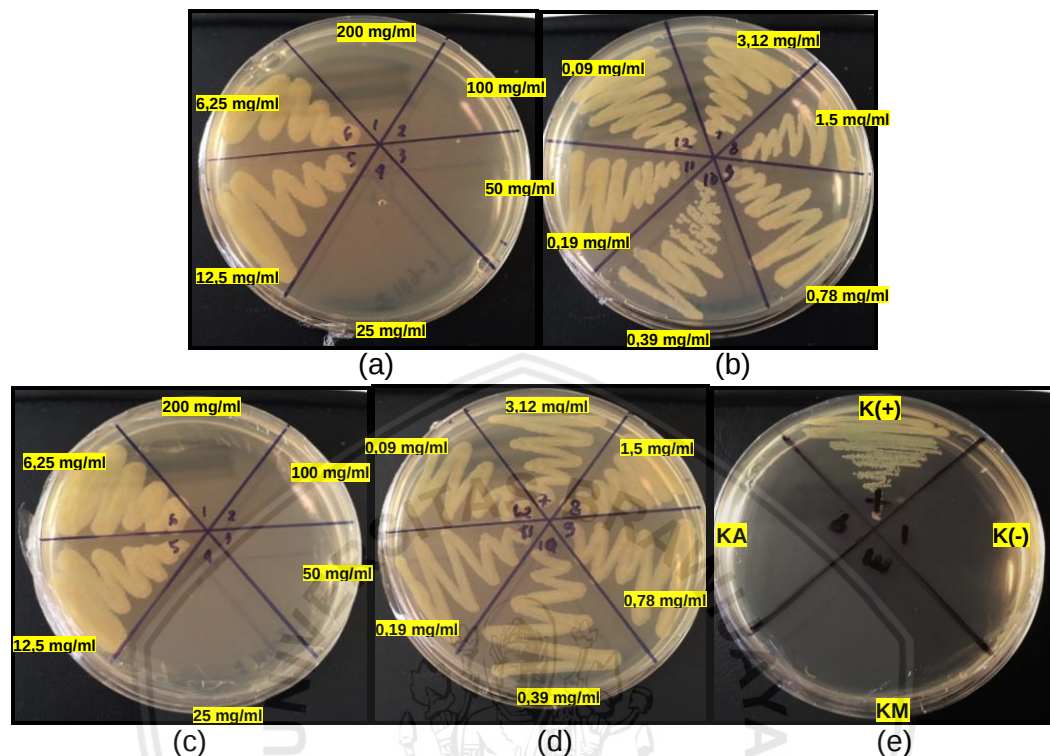
Kandungan senyawa antibakteri seperti alkaloid, fenol, tanin, terpenoid dan triterpenoid pada ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan berperan dalam menghambat pertumbuhan *F. columnare*. Robinson (1995) menyatakan bahwa alkaloid berperan dalam mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh. Juliantina, et al. (2009) menyatakan bahwa fenol meracuni protoplasma,

menembus dinding dan mengendapkan protein sel bakteri. Ajizah (2004) menyatakan bahwa kandungan tanin mengerutkan dinding sel sehingga mengganggu proses permeabilitas sel. Rosyidah, *et al.*, (2010) menyatakan bahwa terpenoid mudah larut dalam lipid sifat inilah yang mengakibatkan senyawa ini lebih mudah menembus dinding sel bakteri. Senyawa triterpenoid menghambat sintesis protein karena terakumulasi dan menyebabkan perubahan komponen-komponen penyusun sel bakteri itu sendiri.

4.4 Uji *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) Terhadap *F. columnare*

Sampel perlakuan hasil uji MIC masing-masing ditebar ke dalam media MHA untuk mengetahui ada tidaknya hasil koloni bakteri *F. columnare*, sehingga hasil yang didapatkan termasuk ke dalam MBC. Pada penelitian ini, MBC ekstrak kasar *L. adscendens* pada perlakuan dengan konsentrasi 25 mg/ml disajikan pada Gambar 17a, sedangkan MBC ekstrak kasar *E. benthamii* pada perlakuan dengan konsentrasi 25 mg/ml disajikan pada Gambar 17c. Pada kontrol media tidak ada koloni yang tumbuh artinya media yang digunakan tidak terkontaminasi, begitu juga dengan kontrol antibiotik dan kontrol negatif. Kontrol positif terdapat koloni yang tumbuh. Warnida, *et al.* (2018) menyatakan penentuan nilai MBC dilakukan dengan metode dilusi padat dilanjutkan dengan uji penegasan. Uji penegasan dilakukan dengan menggoreskan 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. Pangestuti, *et al.* (2017) menyatakan bahwa senyawa fitokimia yang bersifat bakterisidal yaitu senyawa yang dapat merusak pertahanan dan organ tubuh bakteri yang menyebabkan

kerusakan sel dan pada akhirnya menyebabkan kematian pada bakteri yang diserang. Kandungan senyawa fitokimia tersebut antara lain flavonoid.



Gambar 17. Hasil uji MBC. (a) Perlakuan ekstrak *L. adscendens* konsentrasi 200-6,25 mg/ml, (b) Perlakuan ekstrak *L. adscendens* konsentrasi 3,12-0,09 mg/ml, (c) Perlakuan ekstrak *E. benthamii* konsentrasi 200-6,25 mg/ml, (d) Perlakuan ekstrak *E. benthamii* konsentrasi 3,12-0,09 mg/ml, dan (e) Perlakuan kontrol positif, negatif, media dan antibiotik.

4.5 Uji Biofilm *F. columnare*

Uji biofilm menggunakan *microplate assay* memiliki kelebihan karena cepat, mudah, sederhana, dan akurat serta memiliki sensitivitas dan ketepatan yang tinggi dalam mendeteksi perekatan biofilm (Rachmawati, *et al.*, 2015).

4.5.1 Ekstrak Kasar *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara

Pada penelitian ini ekstrak diencerkan dengan akuades steril sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak kasar *L. adscendens* sebesar A (15,5 mg/ml), B (12,5 mg/ml), C (9,5 mg/ml), D (6,5 mg/ml). Hasil yang telah diinkubasi dan

diukur dengan spektrofotometer panjang gelombang 630 nm disajikan pada Tabel 7.

Tabel 7. Hasil Rata-Rata Penghambatan Biofilm *F. columnare*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	SD
	1	2	3			
A (15,5 mg/ml)	0,250	0,241	0,248	0,739	0,246	±0,005
B (12,5 mg/ml)	0,268	0,244	0,235	0,747	0,249	±0,017
C (9,5 mg/ml)	0,323	0,250	0,365	0,938	0,313	±0,058
D (6,5 mg/ml)	0,430	0,413	0,378	1,221	0,407	±0,027
TOTAL				3,645		

Kemudian untuk mengetahui pengaruh perlakuan ekstrak kasar *L. adscendens* terhadap pembentukan biofilm *F. columnare*, maka dilakukan analisa sumber keragaman. Berikut adalah tabel analisa sumber keragaman yang disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Analisa Sumber Keragaman

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,051	0,017	15,476**	4,07	7,59
Acak	8	0,009	0,001			
Total	11	0,059	0,005			

Keterangan:

** = berbeda sangat nyata

Hasil analisis sumber keragaman menunjukkan bahwa nilai F. Hitung sebesar 15,476 lebih besar dibandingkan dengan nilai F tabel 5% dan nilai F tabel 1%. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar *L. adscendens* berpengaruh sangat nyata terhadap pembentukan biofilm *F. columnare*. Oleh karena itu, untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata (BNT) disajikan pada Tabel 9.

Tabel 9. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil Penghambatan Biofilm *F. columnare*

Perlakuan	D 0,246	C 0,249	B 0,313	A 0,407	Notasi
D = 0,246	-	-	-	-	a
C = 0,249	0,003 ^{ns}	-	-	-	a
B = 0,313	0,067*	0,064*	-	-	b
A = 0,407	0,161**	0,158**	0,094**	-	c

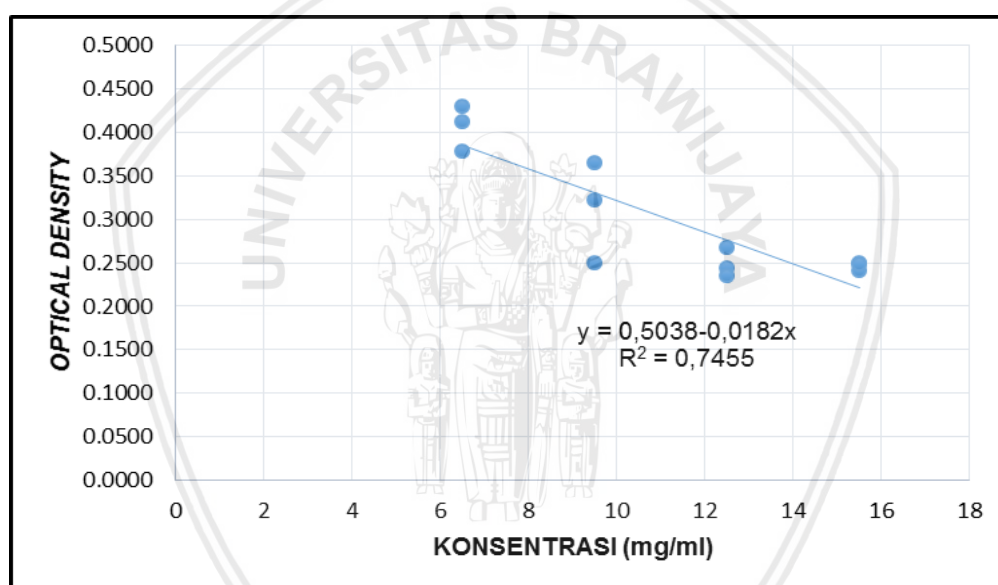
Keterangan:

ns = tidak berbeda nyata

* = berbeda nyata

** = berbeda sangat nyata

Pada tabel 9 dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak kasar tanaman *L. adscendens* hasil uji BNT mempengaruhi pembentukan biofilm *F. columnare*. Pada tabel 9 menunjukkan bahwa perlakuan C tidak berbeda nyata dengan perlakuan D. Perlakuan B berbeda nyata dengan perlakuan D dan perlakuan C. Perlakuan A berbeda sangat nyata dengan perlakuan D, perlakuan C, dan perlakuan B. Kemudian berdasarkan hasil penelitian didapatkan grafik regresi pembentukan biofilm yang dihasilkan dengan perlakuan berbeda disajikan pada Gambar 18.



Gambar 18. Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak kasar *L. adscendens* dengan nilai OD

Pada Gambar 18 menunjukkan bahwa hubungan antara pemberian ekstrak kasar *L. adscendens* terhadap pembentukan biofilm menunjukkan pola linear dengan persamaan $y = 0,5038 - 0,0182x$ dan koefisien $R^2 = 0,7455$.

4.5.2 Ekstrak Kasar *Ephitema benthamii* C. B. Clarke

Pada penelitian ini ekstrak diencerkan dengan akuades steril sehingga diperoleh konsentrasi ekstrak kasar *E. benthamii* sebesar A (2,5 mg/ml), B (2

mg/ml), C (1,5 mg/ml), D (1 mg/ml). Hasil yang telah diinkubasi dan diukur dengan spektrofotometer panjang gelombang 630 nm disajikan pada Tabel 10.

Tabel 10. Hasil Rata-Rata Penghambatan Biofilm *F. columnare*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	SD
	1	2	3			
A (2,5 mg/ml)	0,219	0,110	0,118	0,447	0,149	±0,061
B (2 mg/ml)	0,187	0,149	0,194	0,530	0,177	±0,024
C (1,5 mg/ml)	0,264	0,253	0,209	0,726	0,242	±0,029
D (1 mg/ml)	0,312	0,305	0,380	0,997	0,332	±0,041
TOTAL				2,700		

Kemudian untuk mengetahui pengaruh perlakuan ekstrak kasar tanaman *E. benthamii* terhadap pembentukan biofilm *F. columnare*, maka dilakukan analisa sumber keragaman. Berikut adalah tabel analisa sumber keragaman yang disajikan pada Tabel 11.

Tabel 11. Analisa Sumber Keragaman

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,060	0,020	11,648**	4,07	7,59
Acak	8	0,014	0,002			
Total	11	0,073	0,007			

Keterangan:

** = berbeda sangat nyata

Hasil analisis sumber keragaman menunjukkan bahwa nilai F. Hitung sebesar 11,648 lebih besar dibandingkan dengan nilai F tabel 5% dan nilai F tabel 1%. Hal ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar *E. benthamii* berpengaruh sangat nyata terhadap pembentukan biofilm *F. columnare*. Oleh karena itu, untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata (BNT) disajikan pada Tabel 12.

Tabel 12. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil Penghambatan Biofilm *F. columnare*

Perlakuan	D 0,149	C 0,177	B 0,242	A 0,332	Notasi
D = 0,149	-	-	-	-	a
C = 0,177	0,028 ^{ns}	-	-	-	a
B = 0,242	0,093**	0,065*	-	-	b
A = 0,332	0,183**	0,155**	0,090**	-	c

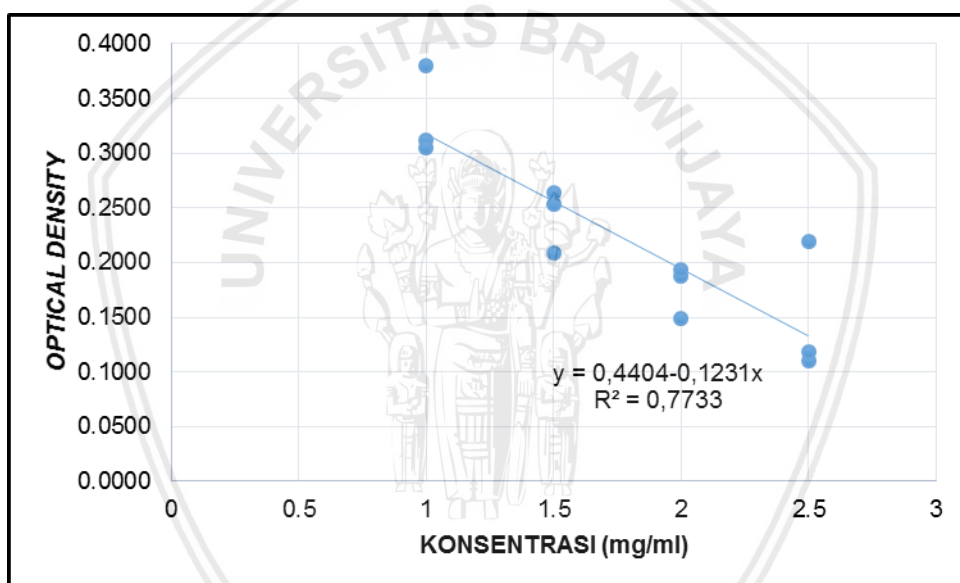
Keterangan:

ns = tidak berbeda nyata

* = berbeda nyata

** = berbeda sangat nyata

Pada tabel 12 dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak kasar *E. benthamii* hasil uji BNT mempengaruhi pembentukan biofilm *F. columnare*. Pada tabel 12 menunjukkan bahwa perlakuan C tidak berbeda nyata dengan perlakuan D. Perlakuan B berbeda sangat nyata dengan perlakuan D dan berbeda nyata dengan perlakuan C. Perlakuan A berbeda sangat nyata dengan perlakuan D, perlakuan C, dan perlakuan B. Kemudian berdasarkan hasil penelitian didapatkan grafik regresi pembentukan biofilm yang dihasilkan dengan perlakuan berbeda disajikan pada Gambar 19.



Gambar 19. Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak kasar *E. benthamii* dengan nilai OD

Pada Gambar 19 menunjukkan bahwa hubungan antara pemberian ekstrak kasar *E. benthamii* terhadap pembentukan biofilm menunjukkan pola linear dengan persamaan $y = 0,4404 - 0,1231x$ dan koefisien $R^2 = 0,7733$.

4.6 Persentase Inhibisi Biofilm *F. columnare*

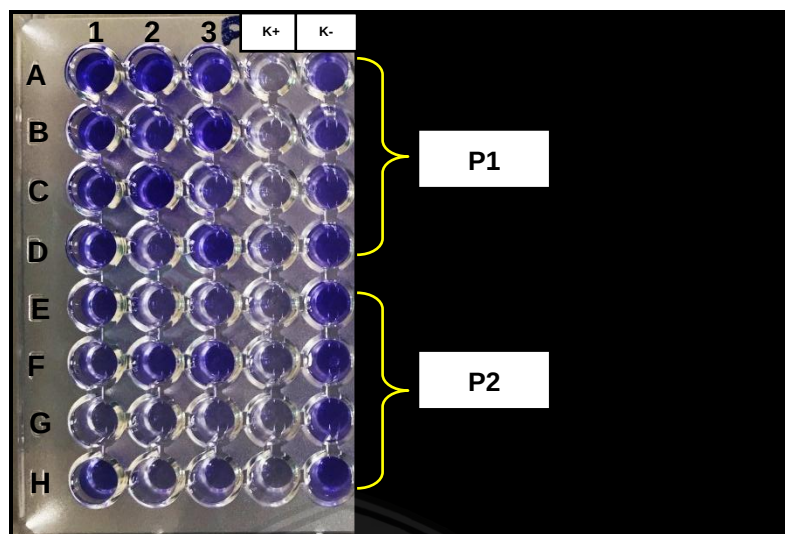
Perlakuan masing-masing ekstrak sebanyak 4 perlakuan, pertama ekstrak *L. adscendens* yaitu A (15,5 mg/ml), B (12,5 mg/ml), C (9,5 mg/ml), D (6,5 mg/ml) dan *E. benthamii* yaitu A (2,5 mg/ml), B (2 mg/ml), C (1,5 mg/ml), D

(1 mg/ml) dengan kepadatan bakteri 10^8 CFU/ml, kontrol positif berisi bakteri dan antibiotik *chloramphenicol* 30 μ g, kontrol negatif berisi bakteri dan akuades steril. Hasil penghambatan biofilm kemudian dilakukan pewarnaan dengan kristal violet disajikan pada Gambar 20. Kawarai, *et al.* (2016) menyatakan bahwa terbentuk dan stabilnya zat warna kistral violet pada biofilm yang menempel pada sumuran pada dasarnya mengikuti mekanisme pengecatan gram pada umumnya. Hasil pewarnaan kemudian diukur nilai OD menggunakan spektrofotometer panjang gelombang 630 nm. Nilai OD yang didapatkan disajikan pada Tabel 13.

Pengukuran persentase inhibisi dengan rumus: $(\text{OD kontrol negatif} - \text{OD sampel}) / \text{OD kontrol negatif} \times 100\%$. Hasil inhibisi bertujuan dalam mengetahui konsentrasi minimal ekstrak yang dibutuhkan dalam menghambat pembentukan biofilm bakteri uji (Wangi, *et al.*, 2017). Persentase inhibisi disajikan pada Tabel 14.

Tabel 13. Pengamatan Nilai OD Pewarnaan Biofilm

Ekstrak	Ulangan	Nilai OD					
		K-	K+	A	B	C	D
<i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara	1	0,478	0,085	0,250	0,268	0,323	0,430
	2	0,367	0,071	0,241	0,244	0,250	0,431
	3	0,375	0,073	0,248	0,235	0,365	0,378
	Total	1,220	0,229	0,739	0,747	0,938	1,236
	Rerata	0,419	0,076	0,246	0,249	0,313	0,407
<i>Ephitema benthamii</i> C.B. Clarke	1	0,301	0,071	0,219	0,187	0,264	0,312
	2	0,274	0,067	0,110	0,149	0,253	0,305
	3	0,323	0,089	0,118	0,194	0,209	0,380
	Total	0,898	0,227	0,447	0,530	0,726	0,997
	Rerata	0,323	0,075	0,149	0,177	0,242	0,332



Gambar 20. Pewarnaan Kristal Violet pada Biofilm *F. columnare*

Keterangan:

K (+) = Kontrol positif

K (-) = Kontrol negatif

P1 = Perlakuan ekstrak *L. adscendens* terhadap biofilm *F. columnare*

P2 = Perlakuan ekstrak *E. benthamii* terhadap biofilm *F. columnare*

Tabel 14. Persentase Inhibisi Biofilm *F. columnare*

Ekstrak	Ulangan	Inhibisi (%)					
		K-	K+	A	B	C	D
<i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara	1	0	82	48	27	14	6
	2	0	80	50	34	33	9
	3	0	76	48	36	3	17
	Rerata	0	80	48	32	17	11
<i>Ephitema benthamii</i> C. B. Clarke	1	0	76	27	32	18	20
	2	0	76	63	46	22	22
	3	0	76	61	29	35	3
	Rerata	0	76	50	35	25	15

Ekstrak kasar tanaman air dari *L. adscendens* menunjukkan bahwa pada konsentrasi 15,5 mg/ml memberikan penghambatan terbesar sebesar 48% dan konsentrasi 6,5 mg/ml memberikan penghambatan terkecil sebesar 11%. Pada ekstrak *E. benthamii* menunjukkan bahwa pada konsentrasi 2,5 mg/ml memberikan penghambatan terbesar sebesar 50%, dan konsentrasi 1 mg/ml memberikan penghambatan terkecil sebesar 15%. Menurut Wangi *et al.* (2017), semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka nilai OD yang dihasilkan semakin rendah dan persentase inhibisi yang didapatkan semakin tinggi. Hal ini

menunjukkan bahwa aktivitas penghambatan pembentukan biofilm semakin tinggi pula.

Mekanisme kerusakan biofilm dipengaruhi oleh aktivitas senyawa anibakteri ekstrak yang dihasilkan. Rachmawati, *et al.* (2015) menyatakan bahwa zat aktif seperti alkaloid, tanin, dan terpenoid memiliki kemampuan dalam mengganggu integritas membran sel bakteri sehingga terjadi lisis pada sel bakteri. Keadaan lisis tersebut diharapkan dapat mencegah pembentukan biofilm. Cowan (1999) menyatakan bahwa flavonoid dapat menghambat fungsi membran sel bakteri melalui ikatan kompleks dengan protein ekstraseluler yang bersifat larut sehingga dapat mengganggu integritas membran sel bakteri. Slobodníková, *et al.* (2016) menyatakan bahwa senyawa flavonoid memiliki tiga mekanisme terhadap pencegahan pembentukan biofilm yaitu dengan penghambatan sintesis asam nukleat. Kedua, merusak membran sitoplasma oleh mekanisme perforasi dan penurunan fluiditas membran, dan yang ketiga, penghambatan metabolisme energi. Respon aktivitas pencegahan biofilm tergantung konsentrasi agen antimikroba, sebagai ekspresi respon stres bakteri yang dimodulasi oleh konsentrasi rendah senyawa kimia.

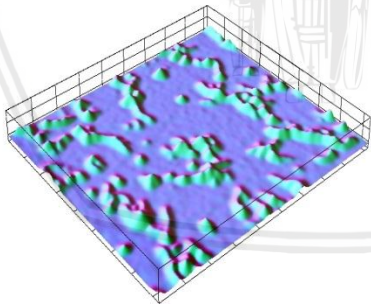
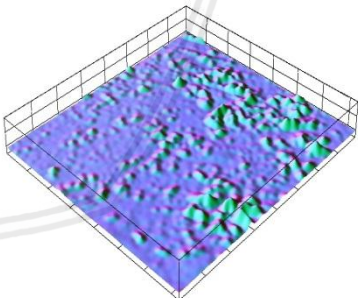
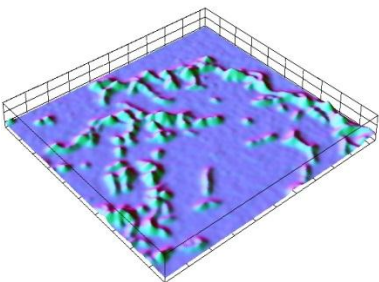
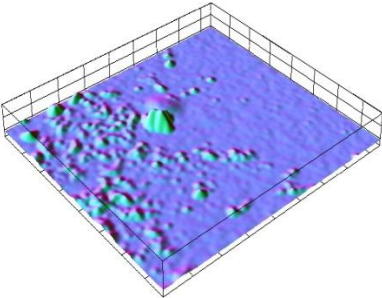
4.7 Visualisasi 3 Dimensi (3D)

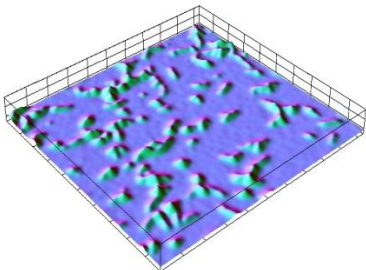
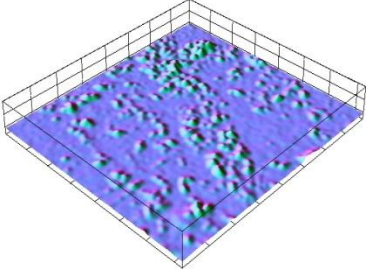
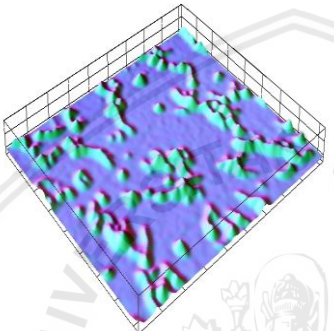
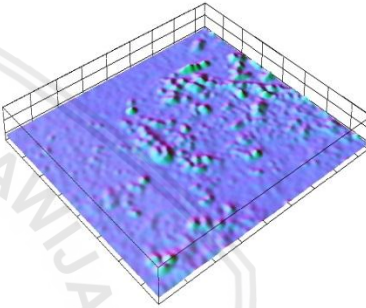
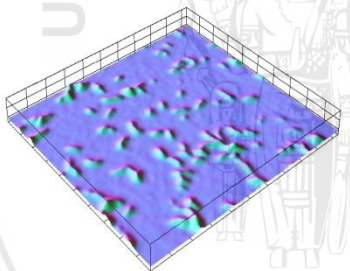
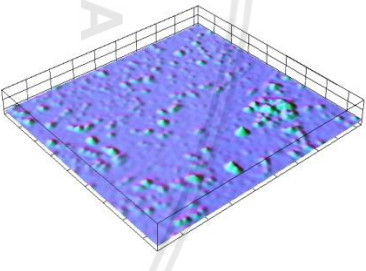
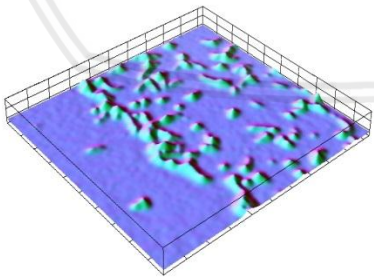
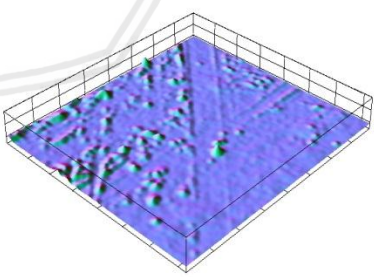
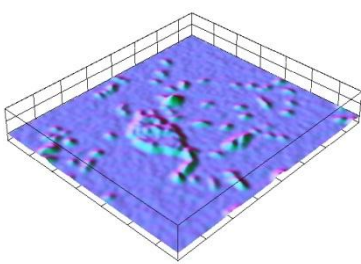
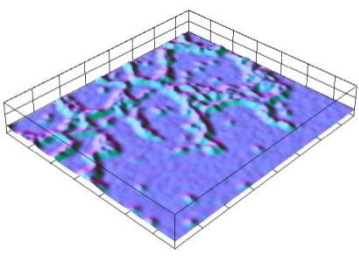
Metode visualisasi biofilm kebanyakan membutuhkan harga dan waktu yang tidak efisien. Penyajian biofilm dalam bentuk tiga dimensi (3D) menggunakan *Confocal Laser Scanning Microscopy* (CLSM), *Scanning Electron Microscopy* (SEM) dan *Transmission Electron Microscopy* (TEM) meskipun mampu menghasilkan visualisasi yang baik tetapi metode tersebut tergolong mahal dan mempunyai kelemahan pada penetrasi sampel dan keharusan sampel dalam keadaan kering yang dikhawatirkan dapat mengacaukan hasil analisis yang disebabkan penyusutan biofilm karena lamanya reparasi sampel (Prihanto,

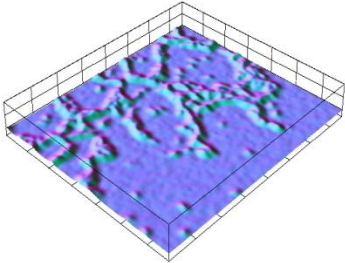
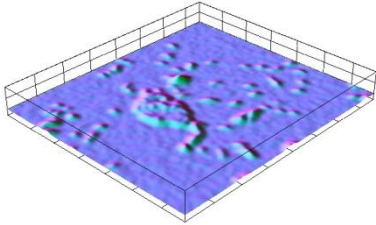
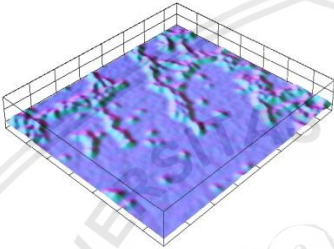
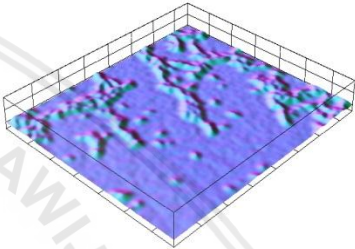
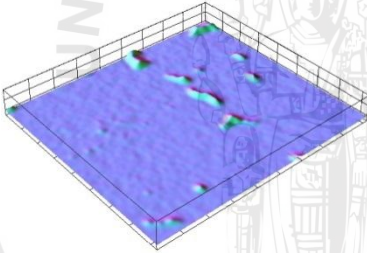
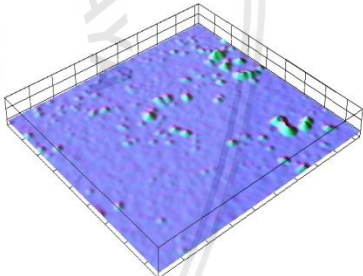
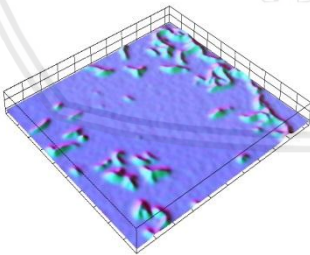
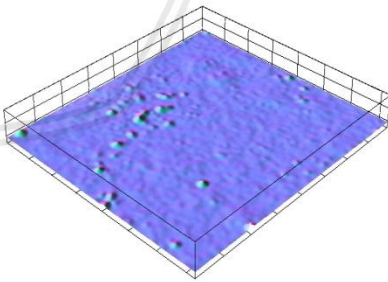
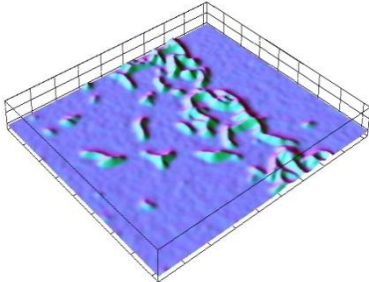
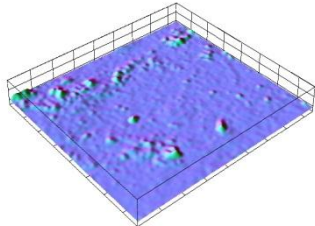
2011). Prihanto, *et al.* (2015) menyatakan bahwa *Image-J* adalah *software* pemrosesan gambar yang dapat diunduh secara gratis dari “*National Institute of Health*”, USA. Secara keseluruhan metode ini hanya dengan memanfaatkan peralatan mikroskop cahaya yang terintegrasi dengan kamera mampu menggambarkan kondisi pembentukan biofilm.

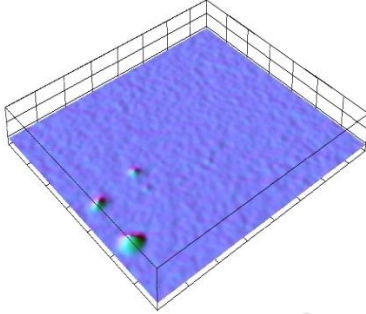
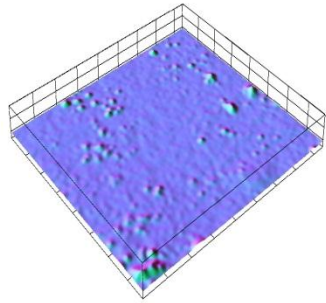
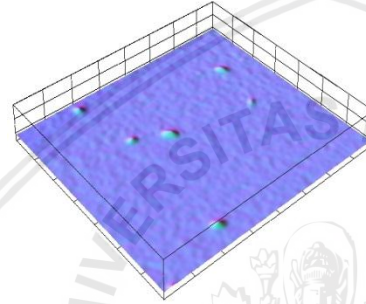
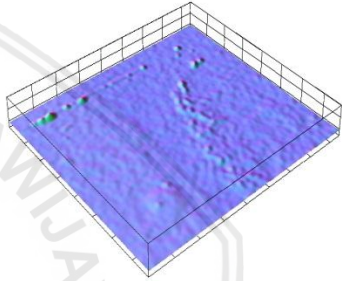
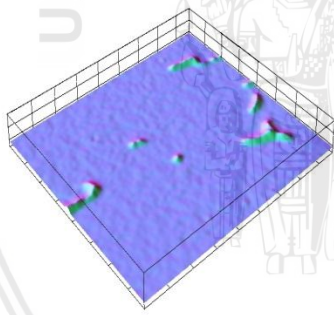
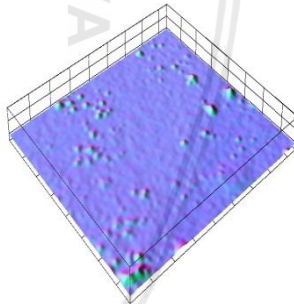
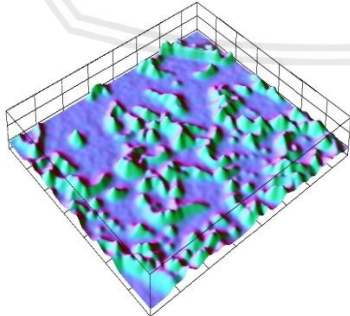
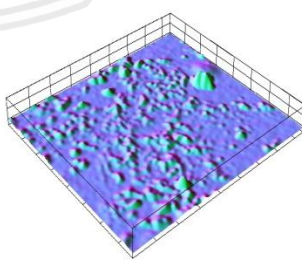
Visualisasi 3 dimensi (3D) untuk mengetahui bentukan biofilm yang dihasilkan oleh *F. columnare*. Cara menampilkan visual 3D menggunakan *software Image-J*. Hasil dari visualisasi 3D perlakuan ekstrak kasar *L. adscendens* konsentrasi A (15,5 mg/ml), B (12,5 mg/ml), C (9,5 mg/ml), D (6,5 mg/ml), dan perlakuan ekstrak kasar *E. benthamii* konsentrasi A (2,5 mg/ml), B (2 mg/ml), C (1,5 mg/ml), D (1 mg/ml), K+ (perlakuan antibiotik), K- (perlakuan tanpa ekstrak) disajikan pada Tabel 15.

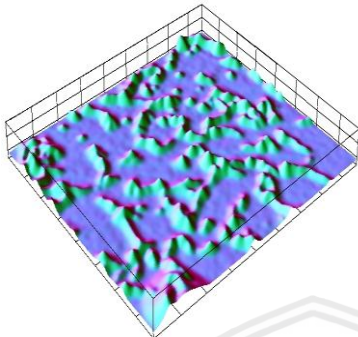
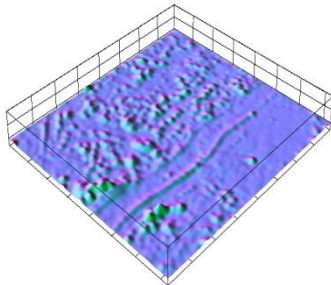
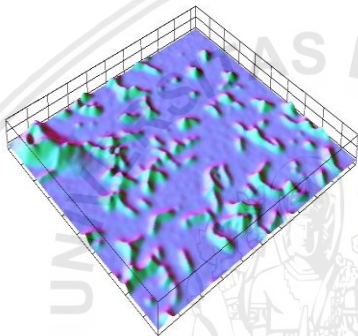
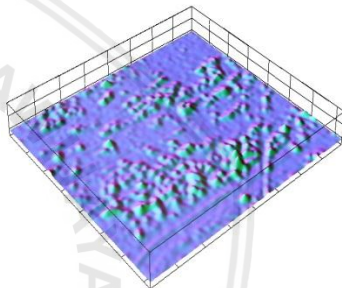
Tabel 15. Hasil Visualisasi 3D Biofilm

Perlakuan	Visualisai 3D	
	<i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara	<i>Ephitema benthamii</i> C. B. Clarke
D1		
D2		

Perlakuan	Visualisai 3D	
	<i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara	<i>Ephitema benthamii</i> C. B. Clarke
D3		
C1		
C2		
C3		
B1		

Perlakuan	Visualisai 3D	
	<i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara	<i>Ephitema benthamii</i> C. B. Clarke
B2		
B3		
A1		
A2		
A3		

Perlakuan	Visualisai 3D	
	<i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara	<i>Ephitema benthamii</i> C. B. Clarke
K+1		
K+2		
K+3		
K-1		

Perlakuan	Visualisai 3D	
	<i>Ludwigia adscendens</i> (L.) H. Hara	<i>Ephitema benthamii</i> C. B. Clarke
K-2		
K-3		

Pengamatan pada Tabel 15 menunjukkan bahwa bukit yang terbentuk pada gambar menunjukkan banyaknya biofilm yang terbentuk pada suatu substrat setara dengan banyak sedikitnya densitas dan warna yang dihasilkan. Hasil tutupan biofilm *F. columnare* terluas secara berurutan oleh ekstrak kasar *L. adscendens* yaitu kontrol negatif (tanpa perlakuan ekstrak), A (15,5 mg/ml), B (12,5 mg/ml), C (9,5 mg/ml), D (6,5 mg/ml), dan kontrol positif (perlakuan antibiotik) sedangkan ekstrak kasar *E. benthamii* yaitu kontrol negatif (perlakuan tanpa ekstrak), A (2,5 mg/ml), B (2 mg/ml), C (1,5 mg/ml), D (1 mg/ml), kontrol positif (perlakuan antibiotik). Semakin banyak bukit yang terbentuk maka nilai inhibisi semakin rendah, namun semakin sedikit bukit yang terbentuk maka nilai inhibisi semakin besar.

5 KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil yang diperoleh dari penelitian ini adalah:

- Ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan berpotensi dalam menghambat pertumbuhan *Flavobacterium columnare*. Semakin tinggi konsentrasi ekstrak kasar yang diberikan maka semakin tinggi pula aktivitas antibakteri yang dihasilkan. Ekstrak kasar *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara memiliki aktivitas antibakteri tertinggi daripada ekstrak kasar *Selaginella plana* (Desv. Ex. Poir) Hieron dan *Ephitema benthamii* C. B. Clarke.
- Pada pengamatan hasil biofilm diketahui bahwa nilai inhibisi ekstrak kasar *Ephitema benthamii* C. B. Clarke yang dihasilkan lebih besar daripada ekstrak *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara. Ekstrak *Ephitema benthamii* C. B. Clarke paling efektif dalam menghambat pembentukan biofilm *F. columnare* karena dengan konsentrasi terendah yaitu 2,5 mg/ml sudah mampu menghambat pembentukan biofilm sebesar 50%.

5.2 Saran

Saran yang dapat diberikan dalam penelitian ini adalah hendaknya dilakukan pengujian fitokimia terhadap ekstrak kasar tanaman air dari Sulawesi Selatan untuk mengetahui lebih lanjut senyawa bioaktif dan melakukan pengujian pengaruh ekstrak kasar terhadap ikan untuk mendapatkan hasil yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Ahmed, F., M.S.T. Selim, dan J.A. Shilpi. 2005. Antibacterial activity of *Ludwigia adscendens*. *Fitoterapia*. **76** :473-475.
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* terhadap ekstrak daun *Psidium guajava* l. *BIOSCIENTIAE*. **1** (1):31-38.
- Alakomi, E. Skytta, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala, dan I.M. Helander. 2000. Lactic Acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane H.-L. *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY*. **66** (5):2001-2005.
- Almurdani, M., H.Y. Teruna, A. Zamri, dan C.Jose. 2016. Skrining fitokimia dan aktivitas antimikroba ekstrak akar tanaman bayam berduri (*Amaranthus spinosus*). Prosiding Seminar Nasional POKJANAS TOI ke-52. STFIR. Pekanbaru: hlm 33-41.
- Andrews, J.M. dan R.A. Howe. 2011. BSAC standardized disc susceptibility testing method (Version 10). *Journal Antimicrob Chemother*. **66** :2726-2757.
- Astawan, M. dan A.L. Kasih. 2008. Khasiat Warna-Warni Makanan. PT Gramedia. 323 hlm.
- Atihuta, V.M.D., D.R.R. Aling, dan V. Lumenta. 2014. Keadaan sosial ekonomi nelayan Soma Giop di desa Leleoto kecamatan Tobelo Selatan kabupaten Halmahera Utara provinsi Maluku Utara. *Akulturas*. **2** (3):123-130.
- Azis, T., S. Febrizky, dan A.D. Mario. 2014. Pengaruh jenis pelarut terhadap persen *yield alkaloid* dari daun Salam India (*Murraya koenigii*). *Teknik Kimia*. **20** (2):1-6.
- Badan Pengawas Obat dan Makanan Republik Indonesia. 2010. Acuan Sediaan Herbal. Direktorat Obat Asli Indonesia. Jakarta. 145 hlm.
- Beck, B.H., B.D. Farmer, D.L Straus, C. Li, dan E. Peatman. 2012. *Putative roles for a rhamnose binding lectin in Flavobacterium columnare* pathogenesis in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Fish & Shellfish Immunology*. **33** (4):1008-1015.
- Bernardet, J.F. dan P.A. D. Grimont. 1989. Deoxyribonucleic acid relatedness and phenotypic characterization of *Flexibacter columnaris* sp. nov., norn. rev., *Flexibacter psychrophilus* sp. nov., nom. rev., and *Flexibacter maritimus* Wakabayashi, Hikida, and Masumura 1986. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **39** (9):346-354.
- . dan J.P. Bowman. 2006. The genus *Flavobacterium*. *Prokaryotes*. **7** :481-531.

- Bransgrove, K. dan D.J. Middleton. 2015. A revision of *Epithema* (Gesneriaceae). *Gardens' Bulletin Singapore*. **67** (1):159–229.
- Brooks, G.F., J.S. Butel, dan L.N. Ornston. 2008. Mikrobiologi Kedokteran. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 627-629 hlm.
- Caton, B.P., M. Mortimer dan J.E. Hill. 2004. Practical Field Guide to Weeds of Rice in Asia. International Rice Research Institute. Philippines. 116 hlm.
- Chikmawati, T., A.D. Setyawan, dan Miftahudin. 2012. Phytochemical composition of *Selaginella* spp. from Java Island Indonesia. *Makara Journal of Science*. **16** (2):129-133.
- Cowan, M.M. 1999. Plant products as antimicrobial agents. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS*. **12** (4):564-582.
- Declercq, A.M., F. Haesebrouck, W. V. D. Broeck, P. Bossier, dan A. Decostere. 2013. Columnaris disease in fish: a review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary Research*. **44** (27):1-17.
- Dewatisari, W.K., L. Rumiyantri, dan I. Rakhmawati. 2017. Rendemen dan skrining fitokimia pada ekstrak daun *Sansevieria* sp. *Jurnal Penelitian Pertanian Terapan*. **17** (3):197-202.
- Dewi, Z.Y., A. Nur, dan T. Hertriani. 2015. Efek antibakteri dan penghambatan biofilm ekstrak sereh (*Cymbopogon nardus* L.) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. *Majalah Kedokteran Gigi Indonesia*. **1** (2):136-141.
- Dong, H.T., S. Senapin, B. LaFrentz, dan C. Rodkhum. 2016. Virulence assay of rhizoid and non-rhizoid morphotypes of *Flavobacterium columnare* in red tilapia, *Oreochromis sp.*, fry. *Journal of Fish Diseases*. **39**: 649-655.
- Durborow, R.M., R.L. Thune, J.P. Hawke, dan A.C. Camus. 1998. Columnaris disease a bacterial infection caused by *Flavobacterium columnare*. *Southern Regional Aquaculture Centre Publication*. **479** :1-4.
- Eissa, A.E., M.M. Zaki, dan A.A. Aziz. 2010. *Flavobacterium columnare*/Myxobolus *tilapiae* concurrent infection in the earthen pond reared Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) during the early summer. *Interdisciplinari Bio Central*. **2** (5):1-9.
- Faizal, A. dan D. Geelen. 2013. Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochem Rev*. **12** :877-893.
- Fasolato, L., B. Cardazzo, S. Balzan, L. Carraro, A. Taticchi, F. Montemurro, dan E. Novelli. 2015. Minimum bactericidal concentration of phenols extracted from oil vegetation water on spoilers, starters and food-borne bacteria. *Italian Journal of Food Safety*. **4** :75-77.
- Frick, H. 2008. Pedoman Karya Ilmiah. Kanisius. Yogyakarta. 23 hlm.

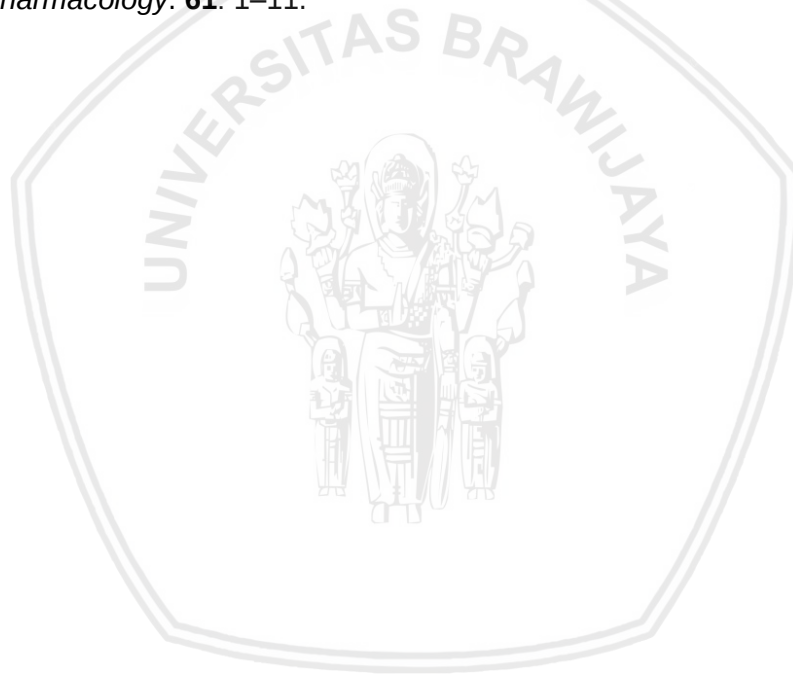
- Gunardi, W.D. 2017. Peranan biofilm dalam kaitannya dengan penyakit infeksi. *Jurnal Kedokteran Meditek*. **15** (39):1-9.
- Global Biodiversity Information Facility (GBIF). 2019. Catalogue of Life. Indonesia. www.gbif.org diakses pada tanggal 27 April 2019 pukul 18:00 WIB.
- Hariana, A. 2013. 262 Tumbuhan Obat dan Khasiatnya. Penebar Swadaya. Jakarta. 412 hlm.
- Hayati, E.K., A.G. Fasyah, dan L. Sa'adah. 2010. Fraksinasi dan identifikasi senyawa tanin pada daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). *Jurnal Kimia*. **4** (2):193-200.
- Hayrapetyan, H., W. C. Hazeleger, dan R. R. Beumer. 2012. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by pomegranate (*Punica granatum*) peel extract in meat paté at different temperatures. *Food Control*. **23**: 66-72.
- Hermawan, A. 2005. Penelitian Bisnis Paradigma Kuantitatif. PT Grasindo. Jakarta. 259 hlm.
- _____, A., S. Amanah, dan A. Fatchiya. 2017. Partisipasi pembudidaya ikan dalam kelompok usaha akuakultur di Kabupaten Tasikmalaya, Jawa Barat. *Jurnal Penyuluhan*. **13** (1):1-13.
- Holm, L., J. Doll, E. Holm, J. Pancho dan J. Herberger. 1997. World Weeds: Natural Histories and Distribution. John Wiley and Sonc Inc. USA. 632 hlm.
- Homenta, H. 2016. Infeksi biofilm bakterial. *Jurnal e-Biomedik*. **4** (1):1-11.
- Hudzicki, J. 2016. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. American Society for Microbiology. 1-23 hlm.
- Jamal, M., U. Tasneem, T. Hussain, dan S. Andleeb. 2015. Bacterial biofilm: its composition, formation and role in human Infections. *Research & Reviews: Journal of Microbiology and Biotechnology*. **4** :1-14.
- Juliantina, D.A., B. Citra, T. Nirwani, E.T. Nurmasitoh, dan Bowo. 2009. Manfaat sirih merah (*Piper crocatum*) sebagai agen antibakterial terhadap gram positif dan gram negatif. *Jurnal Kedokteran dan Kesehatan Indonesia* I. **5** (1):1-10.
- Jumria, A., N.C. Prihartini, dan Alfiyah. 2017. Identifikasi dan hispatologi *Flavobacterium columnare* pada ikan nila (*Oreochromis niloticus*). *Jurnal Ilmu Perikanan*. **8** (2):12-22.
- Kawarai, T., N. Narisawa, S. Yoneda, Y. Tsutsumi, Y. Hoshino, dan H. Senpuku. 2016. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation using extracts from Assam tea compared to green tea. *Archives of Oral Biology*. **68**: 73–82.

- Khunaifi, M. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Binahong (*Anredera cordifolia* (Ten.) Steenis) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* dan *Pseudomonas aeruginosa*. *SKIRPSI*. UIN. Malang.
- Klesius, P.H., C.A. Shoemaker, dan J.J. Evans. 2008. *Flavobacterium columnare* chemotaxis to channel cat fish mucus. *Federation of European Microbiological Societies*. **288** :216-220.
- Kukreja, B. J., V. Dodwad. 2012. Herbal mouthwashes-a gift of nature. *International Journal of Pharm and Bio Science*. **3** (2): 46-52.
- Liu, G.Y., P. Nie, J. Zhang, dan N. Li. 2008. Proteomic analysis of the sarcosine-insoluble outer membrane fraction of *Flavobacterium columnare*. *Journal of Fish Diseases*. **31** :269-276.
- Marista, A., S. Khotimah, dan R. Linda. 2013 .Bakteri pelarut fosfat hasil isolasi dari tiga jenis tanah rizosfer tanaman pisang nipah (*Musa paradisiaca* var. nipah) di kota Singkawang. *Probiot*. **2** (2):93-101.
- Massinai, A., A. Tahir, J. Jompa, dan A. Rantetondok. 2017. Bakteri assosiasi di karang batu (*Skleractinian*) yang terinfeksi penyakit tumor (*Growth anomalies*) yang berasal dari pulau Salemo kabupaten Pangkep. *Jurnal Ilmu Kelautan Spermonde*. **3** (1):7-12.
- Mulyadi, M., Wuryanti, dan P.R. Sarjono. 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.
- Moyer, T.R., D.W. Hunnicutt. 2007. *Susceptibility* of zebra fish *Danio rerio* to infection by *Flavobacterium columnare* and *F. johnsoniae*. *DISEASES OF AQUATIC ORGANISMS*. **76** :39-44.
- Oziegbe, M. dan J.O. Faluyi. 2012. Reproductive biology of *Ludwigia leptocarpa* and *L. adscendens* subsp. *diff* USA in Ile Ife Nigeria. *TUBITAK*. **36** :167-173.
- Pangestusti, I. E., Sumardianto, dan U. Amalia. 2017. Skrining senyawa fitokimia rumput laut *Sargassum* sp. dan aktivitasnya sebagai antibakteri terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Eschericia coli*. *Indonesian Journal of Fisheries Science and Technology*. **12** (2):98-102.
- Panjaitan, H. 2013. Keanekaragaman *Selaginella* di Jawa Tengah. *SKRIPSI*. IPB. 1-36.
- Pratisto, A. 2004. Cara Mudah Mengatasi Masalah Statistik dan Rancangan Percobaan dengan SPSS 12. PT Elex media Komputindo. Jakarta. 281 hlm.
- Pratiwi, S.T. 2008. Mikrobiologi Farmasi. Erlangga. Jakarta. 256 hlm.
- Prihanto, A.A. 2011. Penggunaan *Software Image-J* untuk penghitungan dan visualisasi 3D tutupan biofilm *Vibrio Cholerae* El Tor pada kondisi tumbuh berbeda. *Rekayasa*. **4** (2):113-118.

- 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.
- Putri, S.D.K., A. Susilowati, dan R. Setyaningsih. 2016. Uji aktivitas antibakteri ekstrak biji kapulaga (*Amomum compactum*) terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*. *Biofarmasi*. **14** (1):10-18.
- Rachmawati, H.D., Aprilia, dan K. Parisihni. 2015. Efektivitas antibakteri ekstrak daun mangrove *Acanthus ilicifolius* terhadap biofilm *Enterococcus faecalis*. Laporan Penelitian. Universitas Hang Tuah. 1-6.
- Rahayu, M. dan Rugayah, 2007, Pengetahuan tradisional dan pemanfaatan tumbuhan oleh masyarakat lokal pulau Wawonii Sulawesi Utara Tenggara. *Berita Biologi*. **8** (6):489-499.
- Rijayanti, R.P., S. Luliana, dan H.R. Trianto. 2014. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun mangga bacang (*Mangifera foetida* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* secara *in vitro*. *Jurnal Mahasiswa PSPD Universitas Tanjungpura*. 1-18.
- Rinawati, N.D. 2011. Daya antibakteri tumbuhan majapahit (*Crescentia cujete* L.) terhadap bakteri *Vibrio alginoliticus*. Artikel Ilmiah. ITS. 12 hlm.
- Robinson, T. 1995. Kandungan Organik Tumbuhan Tinggi. ITB. Bandung. 367 hlm.
- Rohde, H., S. Frankenberger, U.Zahringer, dan D.Mack. 2010. Structure, function and contribution of polysaccharide intercellular dhesin (PIA) to *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation and pathogenesis of biomaterial-associated infections. *European Journal of Cell Biology*. **89**: 103-111.
- Rosyidah, K., Nurmuhaimina, Komari, dan M.D. Astuti. 2010. Aktivitas antibakteri fraksi saponin dari kulit batang tumbuhan kasturi *Mangifera casturi*. *Bioscientiae*. **7** (2):25-31.
- Sambuaga, M.E., S. N.J. Longdong, dan H. Manoppo. 2018. Sensitivitas ekstrak tanaman kemangi (*Ocimum sanctum*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Budidaya Perairan*. **6** (1):1-7.
- Santoso. 2010. Statistik Parametrik. PT Elex Media Komputindo. Jakarta. 227 hlm.
- . 2010. Statistik Non Parametrik. PT Elex Media Komputindo. Jakarta. 297 hlm
- Sari, S.P.W., F. Rahmapuspita, N. Iriyani, S.U.T. Pratiwi, dan T. Hertiani. 2014. Penelusuran potensi kapulaga, temu putri dan senggugu sebagai penghambat pembentukan biofilm. *JURNAL ILMU KEFARMASIAN INDONESIA*. **12** (1):17-24.

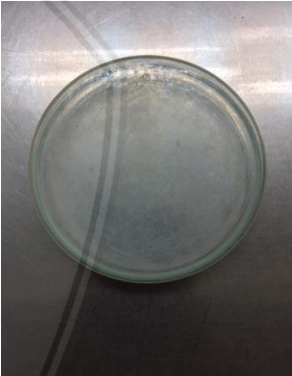
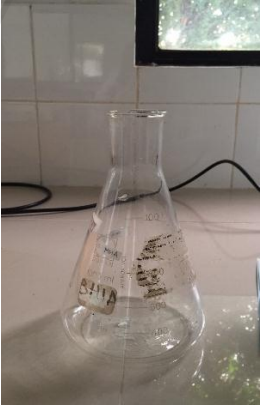
- Sastrosupadi, A. 2007. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Yogyakarta. 277 hlm.
- Sharma, A., A. Sharma, V. R. Kumar, and A. Kumar. 2015. Selected medicinal plants of order Lamiales used in traditional medicine. *American Journal of Pharmacy and Health Research*. **3**(1): 32-38.
- Semiawan, C.R. 2010. Metode Penelitian Kualitatif. Grasindo. 145 hlm.
- Setyawan, A.D., J. Supriatna, D. Darnaedi, Rokhmatuloh, Sutarno, dan Sugiyarto. 2016. Diversity of *Selaginella* across altitudinal gradient of the tropical region. *BIODIVERSITAS*. **17** (1):384-400.
- Slobodníková, L, S. Fialová, K. Rendeková, J. Kováč dan p. Mučaji. 2016. Antibiofilm activity of plant polyphenols. *Molecules*. **21** :1-15.
- Sugiyarto. 2016. Diversity of *Selaginella* across altitudinal gradient of the tropical region. *BIODIVERSITAS*. **17** (1): 384-400.
- Singh, S., S.K. Singh, I. Chowdhury, dan R. Singh. 2017. Understanding the mechanism of bacterial biofilms resistance to antimicrobial agents. *The Open Microbiology Journal*. **11** :53-62.
- Soleha, T.U. 2015. Uji kepekaan terhadap antibiotik. *Jurnal Kedokteran Unila*. **5** (9):119-123.
- Tajik, H., H. Malekinejad, S.M. Razavi-Rouhani, M.R. Pajouhi, R. Mahmoudi, dan A. Haghnazari. 2010. Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney and muscle: A comparison among the antibacterial residues monitoring methods of Four Plate Test, ELISA and HPLC. *Food and Chemical Toxicology*. **48**: 2464-2468.
- Taufiq, R. dan Najmudin. 2017. Rancang bangun sistem informasi sterilisasi alat pada unit CSSD berbasis Java di RSUD Tangerang. *Jurnal Pengembangan IT (JPIT)*. **2** (1):42-49.
- Trisia, A., R. Philyria, dan A. N. Toemon. 2018. Uji aktivitas antibakteri ekstrak etanol daun kalanduyung (*Guazuma ulmifolia* Lam.) terhadap pertumbuhan *Staphylococcus aureus* dengan metode difusi cakram (Kirby-Bauer). *AnteriorJurnal*. **17** (2):136 – 143.
- 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.
- Wagner, W.L., P.C. Hoch, dan P.H. Raven. 2007. Revised Classification Of The Onagraceae. The American Society of Plant Taxonomists. USA. 243 hlm.
- Walker, J.N. dan A. R. Horswill. 2012. A cover slip based technique for evaluating *Staphylococcus aureus* biofilm formation on human plasma. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. **2** :1-6.

- Wangi, R.P.L., E. Suswati, dan D.D. Wisudanti. 2017. Aktivitas ekstrak metanol bawang putih (*Allium sativum*) sebagai penghambat pembentukan biofilm pada *Pseudomonas aeruginosa*. *Jurnal Pustaka Kesehatan*. **5** (3):537-543.
- Wenxing, Z., Y. Guiwen, Z. Yuyu, Y. Jinduo, dan A. Ligu. 2012. Generation of biotechnology-derived *Flavobacterium columnare* ghosts by phix174 gene e-mediated inactivation and the potential as vaccine candidates against infection in grass carp. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1-8.
- 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.
- Zhou, Y., B. Taylor, T.J. Smith, Zhong-ping Liu, M. Clench, N.W. Davies, dan K.D. Rainsford. 2009. A novel compound from celery seed with a bactericidal effect against *Helicobacter pylori*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. **61**: 1–11.



LAMPIRAN

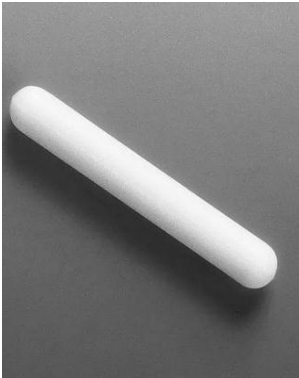
Lampiran 1. Alat Penelitian

 Autoklaf	 Beaker glass	 Bubble
 Botol kaca	 Bunsen	 Cawan petri
 Corong	 50 st./pcs. Deckgläser Cover Glasses 22x22mm Cover glass	 Erlenmeyer

Lampiran 1. (Lanjutan)

 Gelas ukur	 Gunting	 Hot plate
 Inkubator	 Jarum ose	 Jerigen
 Laminary Air Flow (LAF)	 Lemari pendingin	 L glass

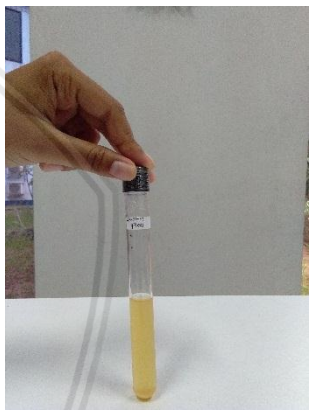
Lampiran 1. (Lanjutan)

 <i>Magnetic stirrer</i>	 <i>Mikropipet</i>	 <i>Mikroplate 96 well</i>
 <i>Mikroskop cahaya</i>	 <i>Nampan</i>	 <i>Objek glass</i>
 <i>Oven</i>	 <i>Pinset</i>	 <i>Pipet 10 ml</i>

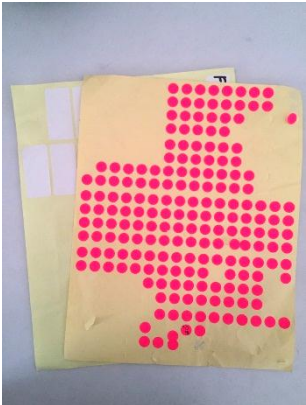
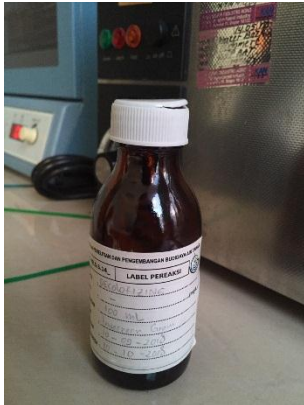
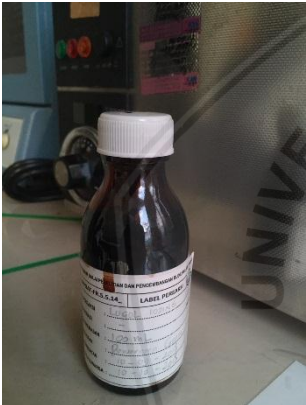
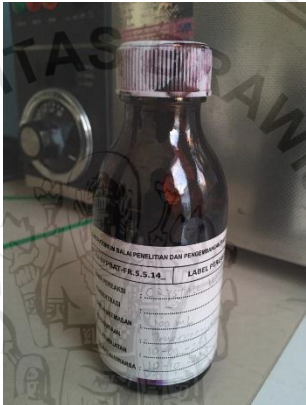
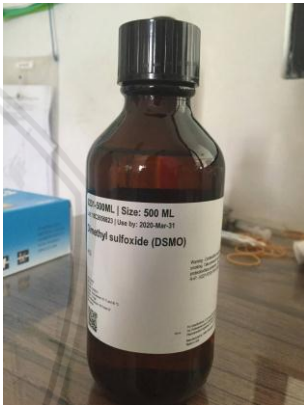
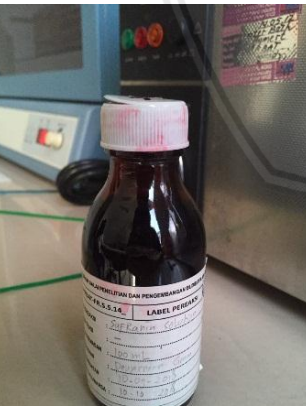
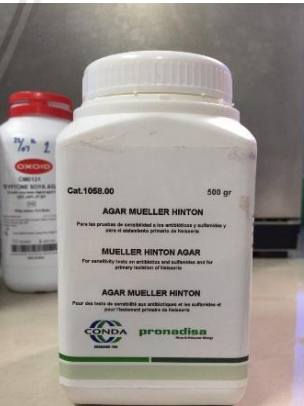
Lampiran 1. (Lanjutan)

 Rak tabung	 Sendok media	 Spektrofotometer
 Sprayer	 Syringe 10 ml	 Tabung reaksi
 Timbangan analitik	 Tube	 Vortex mixer

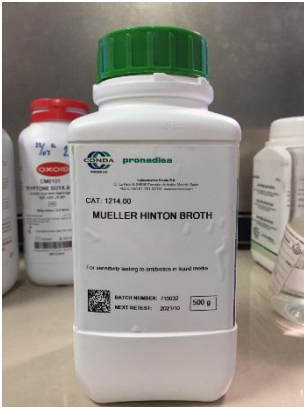
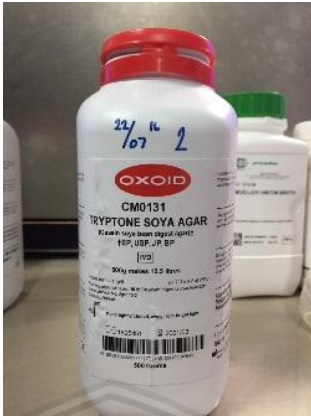
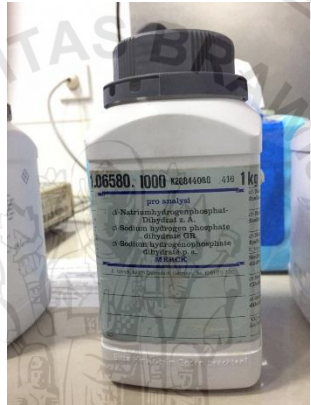
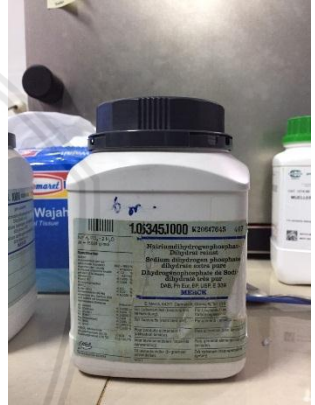
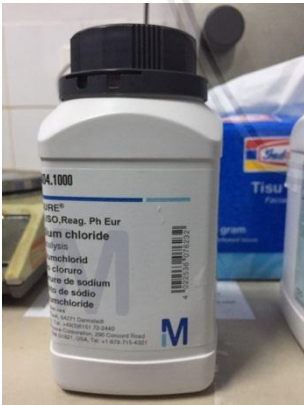
Lampiran 2. Bahan Penelitian

 Akuades steril	 Alkohol 70%	 Aluminium foil
 Antibiotic disc	 Asam asetat glasial 33%	 Bakteri F.columnare
 Blank disc	 Ekstrak kasar tanaman air	 Kapas

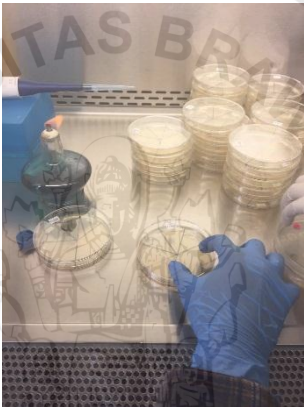
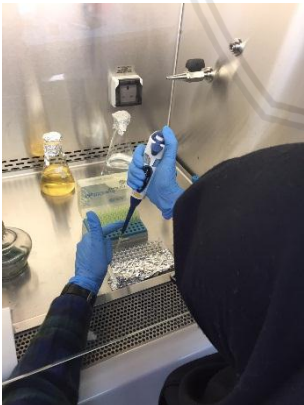
Lampiran 2. (Lanjutan)

 Kertas label	 Korek api	 Larutan alkohol aseton
 Larutan iodin lugol	 Larutan kristal violet	 Larutan DMSO
 Larutan safranin	 Mikrotube	 Media MHA

Lampiran 2. (Lanjutan)

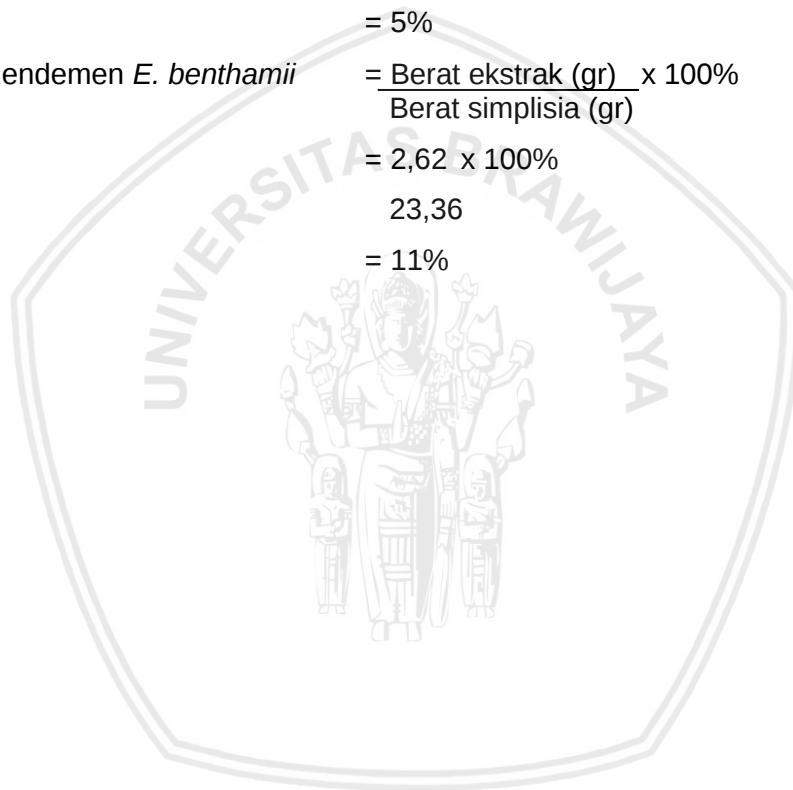
 Media MHB	 Media TSA	 Media TSB
 Mikrotip	 Na₂HPO₄	 NaH₂PO₄
 NaCl	 Plastic wrap	 Spirtus

Lampiran 3. Dokumentasi Kegiatan Penelitian

 Pembuatan Media	 Pengenceran bakteri	 Meratakan bakteri di media MHA
 Pengenceran bakteri di PBS	 Penuangan media MHA cair di cawan petri	 Peletkan <i>blank disc</i> di MHA
 Pengenceran ekstrak di <i>microplate 96 well</i>	 Pewarnaan biofilm	 Pengamatan biofilm

Lampiran 4. Perhitungan Persentase Rendemen

- Rendemen *S. plana* $= \frac{\text{Berat ekstrak (gr)}}{\text{Berat simplisia (gr)}} \times 100\%$
 $= \frac{2,78}{48,04} \times 100\%$
 $= 17\%$
- Rendemen *L. adscendens* $= \frac{\text{Berat ekstrak (gr)}}{\text{Berat simplisia (gr)}} \times 100\%$
 $= \frac{2,84}{54,2} \times 100\%$
 $= 5\%$
- Rendemen *E. benthamii* $= \frac{\text{Berat ekstrak (gr)}}{\text{Berat simplisia (gr)}} \times 100\%$
 $= \frac{2,62}{23,36} \times 100\%$
 $= 11\%$



Lampiran 5. Perhitungan Konsentrasi Ekstrak Kasar Tanaman Air

- Perhitungan Larutan Stok Ekstrak *L. adscendens*

$$\begin{aligned}
 \text{- Konsentrasi Ekstrak} &= 200 \text{ mg/ml} \\
 &= \frac{200 \text{ mg (ekstrak)}}{1 \text{ ml (larutan pengencer)}} \\
 &= \frac{0,2 \text{ gr (ekstrak)}}{1000 \text{ } \mu\text{l (larutan pengencer)}}
 \end{aligned}$$

- Pengenceran Larutan Ekstrak Kasar *L. adscendens*

Pengenceran larutan dilakukan dari konsentrasi 200 mg/ml ke konsentrasi 15,5 mg/ml; 12,5 mg/ml; 9,5 mg/ml; 6,5 mg/ml. Volume yang diinginkan sebesar 200 μl (0,2 ml).

- Konsentrasi 15,5 mg/ml

$$\begin{aligned}
 V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\
 V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} &= 0,2 \text{ ml} \cdot 15,5 \text{ mg/ml} \\
 V_1 &= 0,0155 \text{ ml} \\
 V_1 &= 15,5 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan stok} + 184,5 \text{ } \mu\text{l} \text{ akuades}
 \end{aligned}$$

- Konsentrasi 12,5 mg/ml

$$\begin{aligned}
 V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\
 V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} &= 0,2 \text{ ml} \cdot 12,5 \text{ mg/ml} \\
 V_1 &= 0,0125 \text{ ml} \\
 V_1 &= 12,5 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan stok} + 187,5 \text{ } \mu\text{l} \text{ akuades}
 \end{aligned}$$

- Konsentrasi 9,5 mg/ml

$$\begin{aligned}
 V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\
 V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} &= 0,2 \text{ ml} \cdot 9,5 \text{ mg/ml} \\
 V_1 &= 0,0095 \text{ ml} \\
 V_1 &= 9,5 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan stok} + 190,5 \text{ } \mu\text{l} \text{ akuades}
 \end{aligned}$$

- Konsentrasi 6,5 mg/ml

$$\begin{aligned}
 V_1 \cdot N_1 &= V_2 \cdot N_2 \\
 V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} &= 0,2 \text{ ml} \cdot 6,5 \text{ mg/ml} \\
 V_1 &= 0,0065 \text{ ml} \\
 V_1 &= 6,5 \text{ } \mu\text{l} \text{ larutan stok} + 193,5 \text{ } \mu\text{l} \text{ akuades}
 \end{aligned}$$

- Perhitungan Larutan Stok Ekstrak Kasar *E. benthamii*

$$\text{- Konsentrasi Ekstrak} = 200 \text{ mg/ml}$$

Lampiran 5. (Lanjutan)

$$= \frac{200 \text{ mg (ekstrak)}}{1 \text{ ml (larutan pengencer)}}$$

$$= \frac{0,2 \text{ gr (ekstrak)}}{1000 \text{ (larutan pengencer)}}$$

- Pengenceran Larutan Ekstrak Kasar *E. benthamii*

Pengenceran larutan dilakukan dari konsentrasi 200 mg/ml ke konsentrasi 2,5 mg/ml; 2 mg/ml; 1,5 mg/ml; 1 mg/ml. Volume yang diinginkan sebesar 200 µl (0,2 ml).

a. Konsentrasi 2,5 mg/ml

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

$$V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} = 0,2 \text{ ml} \cdot 2,5 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 0,0025 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2,5 \text{ µl} + 197,5 \text{ µl akuades}$$

b. Konsentrasi 2 mg/ml

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

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

$$V_1 = 0,002 \text{ ml}$$

$$V_1 = 2 \text{ µl larutan stok} + 198 \text{ µl akuades}$$

c. Konsentrasi 1,5 mg/ml

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

$$V_1 \cdot 200 \text{ mg/ml} = 0,2 \text{ ml} \cdot 1,5 \text{ mg/ml}$$

$$V_1 = 0,0015 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1,5 \text{ µl larutan stok} + 198,5 \text{ µl akuades}$$

d. Konsentrasi 1 mg/ml

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

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

$$V_1 = 0,001 \text{ ml}$$

$$V_1 = 1 \text{ µl larutan stok} + 199 \text{ µl akuades}$$

Lampiran 6. Perhitungan Persentase Inhibisi Biofilm *F. columnare*

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

• Inhibisi Ekstrak Kasar *L. adscendens*

a. Konsentrasi 15,5 mg/ml

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi } a_1 &= \frac{(0,478 - 0,250)}{0,478} \times 100\% \\ &= 0,48 \times 100\% \\ &= 48\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi } a_2 &= \frac{(0,478 - 0,241)}{0,478} \times 100\% \\ &= 0,48 \times 100\% \\ &= 50\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi } a_3 &= \frac{(0,478 - 0,248)}{0,478} \times 100\% \\ &= 0,48 \times 100\% \\ &= 48\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Rata-rata} &= \frac{(0,478 - 0,246)}{0,478} \times 100\% \\ &= 0,48 \times 100\% \\ &= 48\% \end{aligned}$$

b. Konsentrasi 12,5 mg/ml

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi } b_1 &= \frac{(0,367 - 0,268)}{0,367} \times 100\% \\ &= 0,27 \times 100\% \\ &= 27\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi } b_2 &= \frac{(0,367 - 0,244)}{0,367} \times 100\% \\ &= 0,34 \times 100\% \\ &= 34\% \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Inhibisi } b_3 &= \frac{(0,367 - 0,235)}{0,367} \times 100\% \\ &= 0,36 \times 100\% \\ &= 36\% \end{aligned}$$

Lampiran 6. (Lanjutan)

$$\begin{aligned}
 \text{Rata-rata} &= \frac{(0,367 - 0,249)}{0,367} \times 100\% \\
 &= 0,32 \times 100\% \\
 &= 32\%
 \end{aligned}$$

c. Konsentrasi 9,5 mg/ml

$$\begin{aligned}
 \text{Inhibisi } c_1 &= \frac{(0,375 - 0,268)}{0,375} \times 100\% \\
 &= 0,14 \times 100\% \\
 &= 14\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Inhibisi } c_2 &= \frac{(0,375 - 0,250)}{0,375} \times 100\% \\
 &= 0,33 \times 100\% \\
 &= 33\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Inhibisi } c_3 &= \frac{(0,375 - 0,235)}{0,375} \times 100\% \\
 &= 0,03 \times 100\% \\
 &= 3\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Rata-rata} &= \frac{(0,375 - 0,313)}{0,375} \times 100\% \\
 &= 0,17 \times 100\% \\
 &= 17\%
 \end{aligned}$$

d. Konsentrasi 6,5 mg/ml

$$\begin{aligned}
 \text{Inhibisi } d_1 &= \frac{(0,456 - 0,430)}{0,456} \times 100\% \\
 &= 0,06 \times 100\% \\
 &= 6\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Inhibisi } d_2 &= \frac{(0,456 - 0,413)}{0,456} \times 100\% \\
 &= 0,09 \times 100\% \\
 &= 9\%
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{Inhibisi } d_3 &= \frac{(0,456 - 0,413)}{0,456} \times 100\% \\
 &= 0,17 \times 100\% \\
 &= 17\%
 \end{aligned}$$

Lampiran 6. (Lanjutan)

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata} &= \frac{(0,456 - 0,407)}{0,456} \times 100\% \\ &= 0,11 \times 100\% \\ &= 11\%\end{aligned}$$

• Inhibisi Ekstrak Kasar *E. benthamii*

a. Konsentrasi 2,5 mg/ml

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } a_1 &= \frac{(0,301 - 0,219)}{0,301} \times 100\% \\ &= 0,27 \times 100\% \\ &= 27\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } a_2 &= \frac{(0,301 - 0,110)}{0,301} \times 100\% \\ &= 0,63 \times 100\% \\ &= 63\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } a_3 &= \frac{(0,301 - 0,118)}{0,301} \times 100\% \\ &= 0,61 \times 100\% \\ &= 61\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata} &= \frac{(0,301 - 0,149)}{0,301} \times 100\% \\ &= 0,50 \times 100\% \\ &= 50\%\end{aligned}$$

b. Konsentrasi 2 mg/ml

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } b_1 &= \frac{(0,274 - 0,187)}{0,274} \times 100\% \\ &= 0,32 \times 100\% \\ &= 32\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } b_2 &= \frac{(0,274 - 0,149)}{0,274} \times 100\% \\ &= 0,46 \times 100\% \\ &= 46\%\end{aligned}$$

Lampiran 6. (Lanjutan)

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } b_3 &= \frac{(0,274 - 0,194)}{0,274} \times 100\% \\ &= 0,29 \times 100\% \\ &= 29\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata} &= \frac{(0,274 - 0,177)}{0,274} \times 100\% \\ &= 0,25 \times 100\% \\ &= 25\%\end{aligned}$$

c. Konsentrasi 1,5 mg/ml

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } c_1 &= \frac{(0,323 - 0,264)}{0,323} \times 100\% \\ &= 0,18 \times 100\% \\ &= 18\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } c_2 &= \frac{(0,323 - 0,149)}{0,323} \times 100\% \\ &= 0,22 \times 100\% \\ &= 22\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } c_3 &= \frac{(0,323 - 0,209)}{0,323} \times 100\% \\ &= 0,35 \times 100\% \\ &= 35\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata} &= \frac{(0,323 - 0,242)}{0,323} \times 100\% \\ &= 0,25 \times 100\% \\ &= 25\%\end{aligned}$$

d. Konsentrasi 1 mg/ml

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } d_1 &= \frac{(0,391 - 0,312)}{0,391} \times 100\% \\ &= 0,24 \times 100\% \\ &= 20\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } d_2 &= \frac{(0,391 - 0,305)}{0,391} \times 100\% \\ &= 0,22 \times 100\% \\ &= 22\%\end{aligned}$$

Lampiran 6. (Lanjutan)

$$\begin{aligned}\text{Inhibisi } d_3 &= \frac{(0,391 - 0,380)}{0,391} \times 100\% \\ &= 0,03 \times 100\% \\ &= 3\%\end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Rata-rata} &= \frac{(0,391 - 0,332)}{0,391} \times 100\% \\ &= 0,15 \times 100\% \\ &= 15\%\end{aligned}$$



Lampiran 7. Analisis Data Hasil Penelitian

1. *Ludwigia adscendens* (L.) H. Hara

Hasil Rata-Rata Penghambatan Biofilm *F. columnare*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	SD
	1	2	3			
A (15,5 mg/ml)	0,250	0,241	0,248	0,739	0,246	±0,005
B (12,5 mg/ml)	0,268	0,244	0,235	0,747	0,249	±0,017
C (9,5 mg/ml)	0,323	0,250	0,365	0,938	0,313	±0,058
D (6,5 mg/ml)	0,430	0,413	0,378	1,221	0,407	±0,027
TOTAL				3,645		

• Perhitungan Sidik Ragam

- Faktor Koreksi (FK) $= \frac{G^2}{N}$
 $= \frac{(3,645)^2}{12}$
 $= 1,1072$
- JK Total $= (A1^2 + A2^2 + \dots + D3^2) - FK$
 $= (0,250^2 + 0,241^2 + \dots + 0,378^2) - 1,107$
 $= 1,167 - 1,107$
 $= 0,0599$
- JK Perlakuan $= \frac{\sum (\sum x_i)^2}{r} - FK$
 $= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2}{r} - FK$
 $= \frac{0,739^2 + 0,747^2 + 0,938^2 + 1,221^2}{3} - 1,1072$
 $= 0,0511$
- JK Acak $= JK \text{ Total} - JK \text{ Perlakuan}$
 $= 0,0599 - 0,0511$
 $= 0,0088$
- 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 $= JKP/db \text{ Perlakuan}$
 $= 0,0511/3$
 $= 0,0170$

Lampiran 7. (Lanjutan)

- Kuadrat Tengah (KT) Acak = JKA/db Acak
= 0,0088/8
= 0,0011
- F.Hitung = KTP/KTA
= 0,0170/0,0011
= 15,4764

Tabel Analisis Sidik Ragam

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,0511	0,0170	15,4764**	4,07	7,59
Acak	8	0,0088	0,0011			
Total	11	0,0585	0,0053			

Keterangan: (**) berbeda sangat 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 = $\sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{r}}$
= $\sqrt{\frac{2 \times 0,0011}{3}} = 0,0271$
- BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED
= 2,306 x 0,0271
= 0,06249
- BNT 1% = T tabel 1% (db acak) x SED
= 3,355 x 0,0271
= 0,09092

Tabel BNT

Perlakuan	D 0,246	C 0,249	B 0,313	A 0,407	Notasi
D = 0,246	-	-	-	-	a
C = 0,249	0,003 ^{ns}	-	-	-	a
B = 0,313	0,067**	0,064**	-	-	b
A = 0,407	0,161**	0,158**	0,094**	-	c

Keterangan:

- ns = tidak berbeda nyata
- * = berbeda nyata
- ** = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), perlakuan C tidak berbeda nyata dengan perlakuan D. Perlakuan B berbeda nyata dengan

Lampiran 7. (Lanjutan)

perlakuan D dan perlakuan C. Perlakuan A berbeda sangat nyata dengan perlakuan D, perlakuan C, dan perlakuan B.

Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total Data (Ti)	Perbandingan (Ci)		
		Linier	kuadratik	kubik
A	0,739	-3	1	-1
B	0,747	-1	-1	3
C	0,938	1	-1	-3
D	1,221	3	1	1
$Q = \sum ci.Ti$		1,6370	0,2750	-0,0910
$Kr = (\sum ci^2). R$		60	12	60
$JK \text{ Regresi} = Q^2/Kr$		0,0447	0,0063	0,0001

$$\begin{aligned}
 JK \text{ Regresi Total} &= JK \text{ Linier} + JK \text{ Kuadratik} + JK \text{ Kubik} + JK \text{ Kuartik} \\
 &= 0,0447 + 0,0063 + 0,0001 \\
 &= 0,0511
 \end{aligned}$$

Tabel Analisa Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hit.	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,0510	0,0170	15,1111	4,07	7,59
Linier	1	0,0447	0,0447	40,6363**		
Kuadratik	1	0,0063	0,0063	5,7272*		
Kubik	1	0,0001	0,0001	0,0909 ^{ns}		
Acak	8	0,0090	0,0011			
Total	11	0,0590	0,0054			

Keterangan:

ns = tidak berbeda nyata

* = berbeda nyata

** = berbeda sangat nyata

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

$$\begin{aligned}
 - R^2 \text{ Linier} &= \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}} \\
 &= \frac{0,0447}{0,0447 + 0,0090} \\
 &= \frac{0,0447}{0,0537} \\
 &= 0,8324
 \end{aligned}$$

Lampiran 7. (Lanjutan)

$$\begin{aligned}
 - R^2 \text{ Kuadrat} &= \frac{\text{JK Kuadrat}}{\text{JK Kuadrat} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,0063}{0,0063+0,0090} \\
 &= \frac{0,0063}{0,0153} \\
 &= 0,4117 \\
 \\
 - R^2 \text{ Kubik} &= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}} \\
 &= \frac{0,0001}{0,0001+0,0090} \\
 &= \frac{0,0001}{0,0100} \\
 &= 0,0100
 \end{aligned}$$

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. Konsentrasi 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 ²
A1	15,5	0,250	3,875	240,250
A2	15,5	0,241	3,736	240,250
A3	15,5	0,248	3,844	240,250
B1	12,5	0,268	3,350	156,250
B2	12,5	0,244	3,050	156,250
B3	12,5	0,235	2,938	156,250
C1	9,5	0,323	3,069	90,250
C2	9,5	0,250	2,375	90,250
C3	9,5	0,365	3,468	90,250
D1	6,5	0,430	2,795	42,250

Lampiran 7. (Lanjutan)

Perlakuan	X	Y	Xy	x ²
D2	6,5	0,413	2,85	42,250
D3	6,5	0,378	2,457	42,250

$$- B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = -16983,326$$

$$- B0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 0,503827778$$

Berdasarkan perhitungan B0 dan B1, maka didapat persamaan linier sebagai berikut: pola linear dengan persamaan $y = 0,5038 - 0,0182x$ dan koefisien $R^2 = 0,7455$.

2. *Ephitema benthamii* C. B. Clarke

Hasil Rata-Rata Penghambatan Biofilm *F. columnare*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	SD
	1	2	3			
A (2,5 mg/ml)	0,219	0,110	0,118	0,447	0,149	±0,061
B (2 mg/ml)	0,187	0,149	0,194	0,530	0,177	±0,024
C (1,5 mg/ml)	0,264	0,253	0,209	0,726	0,242	±0,029
D (1 mg/ml)	0,312	0,305	0,380	0,997	0,332	±0,041
TOTAL				2,700		

• Perhitungan Sidik Ragam

$$\begin{aligned} - \text{Faktor Koreksi (FK)} &= \frac{G^2}{N} \\ &= \frac{(2,700)^2}{12} \\ &= 0,6075 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{JK Total} &= (A1^2 + A2^2 + \dots + D3^2) - FK \\ &= (0,219^2 + 0,110^2 + \dots + 0,380^2) - 0,6075 \\ &= 1,167 - 0,6075 \\ &= 0,0734 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{JK Perlakuan} &= \frac{\sum (\sum x_i)^2}{r} - FK \\ &= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2}{3} - FK \\ &= \frac{0,477^2 + 0,530^2 + 0,726^2 + 0,997^2}{3} - 0,6075 \\ &= 0,0598 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - \text{JK Acak} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\ &= 0,0734 - 0,0598 \end{aligned}$$

Lampiran 7. (Lanjutan)

$$= 0,0137$$

- 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 = $JKP/db \text{ Perlakuan}$
= $0,0598/3$
= $0,0199$
- Kuadrat Tengah (KT) Acak = $JKA/db \text{ Acak}$
= $0,0137/8$
= $0,0017$
- F.Hitung = KTP/KTA
= $0,0199/0,0017$
= $11,6489$

Tabel Analisis Sidik Ragam

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hit	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,0598	0,0199	11,6489**	4,07	7,59
Acak	8	0,0137	0,0017			
Total	11	0,0734	0,0067			

Keterangan: (**) berbeda sangat 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)

$$\begin{aligned}
 \text{– SED} &= \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{r}} \\
 &= \sqrt{\frac{2 \times 0,0017}{3}} \\
 &= 0,0195
 \end{aligned}$$

- BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED
= $2,306 \times 0,0195$
= $0,04497$
- BNT 1% = T tabel 1% (db acak) x SED
= $3,355 \times 0,0195$
= $0,06542$

Lampiran 7. (Lanjutan)

Tabel BNT

Perlakuan	D 0,149	C 0,177	B 0,242	A 0,332	Notasi
D = 0,149	-	-	-	-	a
C = 0,177	0,028 ^{ns}	-	-	-	a
B = 0,242	0,093**	0,065*	-	-	b
A = 0,332	0,183**	0,155**	0,090**	-	c

Keterangan:

ns = tidak berbeda nyata

* = berbeda nyata

** = berbeda sangat nyata

Berdasarkan hasil perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT), perlakuan C tidak berbeda nyata dengan perlakuan D. Perlakuan B berbeda sangat nyata dengan perlakuan D dan berbeda nyata dengan perlakuan C. Perlakuan A berbeda sangat nyata dengan perlakuan D, perlakuan C, dan perlakuan B.

Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total Data (Ti)	Perbandingan (Ci)		
		Linier	kuadratik	kubik
A	0,447	-3	1	-1
B	0,530	-1	-1	3
C	0,726	1	-1	-3
D	0,997	3	1	1
Q = $\sum ci.Ti$		1,846	0,188	-0,038
Kr = $(\sum ci^2). R$		60	12	60
JK Regresi = Q^2/Kr		0,05680	0,00290	0,00002

JK Regresi Total = JK Linier + JK Kuadratik + JK Kubik + JK Kuartik
 = 0,05680 + 0,00295 + 0,00002
 = 0,05976

Tabel Analisa Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hit.	F5%	F1%
Perlakuan	3	0,0598	0,0199	11,6558	4,07	7,59
Linier	1	0,0568	0,0568	34,4705**		
Kuadratik	1	0,0029	0,0029	1,7058 ^{ns}		
Kubik	1	0,00002	0,00002	0,0011 ^{ns}		
Acak	8	0,0137	0,0017			
Total	11	0,0734	0,0067			

Keterangan:

ns = tidak berbeda nyata

* = berbeda nyata

Lampiran 7. (Lanjutan)

** = berbeda sangat nyata

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

$$\begin{aligned} - R^2 \text{ Linier} &= \frac{JK \text{ Linier}}{JK \text{ Linier} + JK \text{ Acak}} \\ &= \frac{0,0568}{0,0568 + 0,0137} \\ &= \frac{0,0568}{0,0658} \\ &= 0,8632 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - R^2 \text{ Kuadrat} &= \frac{JK \text{ Kuadrat}}{JK \text{ Kuadrat} + JK \text{ Acak}} \\ &= \frac{0,0029}{0,0029 + 0,0137} \\ &= \frac{0,0029}{0,0166} \\ &= 0,1746 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} - R^2 \text{ Kubik} &= \frac{JK \text{ Kubik}}{JK \text{ Kubik} + JK \text{ Acak}} \\ &= \frac{0,00002}{0,00002 + 0,0137} \\ &= \frac{0,00002}{0,01372} \\ &= 0,0014 \end{aligned}$$

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. Konsentrasi yang digunakan tiap perlakuan dijadikan sebagai sumbu x sedangkan nilai rerata skoring dijadikan sebagai sumbu y, sehingga akan didapatkan garis linier pada grafik.

Lampiran 7. (Lanjutan)

Perlakuan	X	Y	Xy	x ²
A1	2,5	0,219	0,548	6,250
A2	2,5	0,110	0,275	6,250
A3	2,5	0,118	0,295	6,250
B1	2,0	0,187	0,374	4,000
B2	2,0	0,149	0,298	4,000
B3	2,0	0,194	0,388	4,000
C1	1,5	0,264	0,396	2,250
C2	1,5	0,253	0,380	2,250
C3	1,5	0,209	0,314	2,250
D1	1,0	0,312	0,312	1,000
D2	1,0	0,305	0,305	1,000
D3	1,0	0,380	0,380	1,000

$$- B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = -391,588$$

$$- B0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 0,440366667$$

Berdasarkan perhitungan B0 dan B1, maka didapat persamaan linier sebagai berikut: pola linear dengan persamaan $y = 0,4404 - 0,1231x$ dan koefisien $R^2 = 0,7733$.