

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN BELIMBING WULUH  
(*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas  
fluorescens* SECARA IN VITRO**

**SKRIPSI**

Oleh:

**ETIKA DWI RAHMAWATI  
NIM. 155080500111019**



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

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN BELIMBING WULUH  
(*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas  
fluorescens* SECARA IN VITRO**

**SKRIPSI**

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

Oleh :  
**ETIKA DWI RAHMAWATI**  
**NIM. 155080500111019**



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

SKRIPSI

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN BELIMBING WULUH  
(*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP DAYA HAMBAT BAKTERI *Pseudomonas  
fluorescens* SECARA IN VITRO**

Oleh:  
**ETIKA DWI RAHMAWATI**  
NIM. 155080500111019

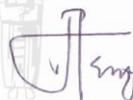
telah dipertahankan didepan penguji  
pada tanggal 16 April 2019  
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,  
Dosen Pembimbing I



(Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS)  
NIP. 19611106 198602 2 001  
TANGGAL : 06 MAY 2019

Dosen Pembimbing II



(Ir. Heny Suprastyani, MS)  
NIP. 19620904 198701 2 001  
TANGGAL : 06 MAY 2019

Mengetahui,  
Ketua Jurusan MSP



(Dr. Ir. M. Firdaus, MP)  
NIP. 19680919 200501 1 001  
TANGGAL : 06 MAY 2019

**IDENTITAS TIM PENGUJI**

Judul : **PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR DAUN BELIMBING  
WULUH (*Averrhoa bilimbi* L.) TERHADAP DAYA HAMBAT  
BAKTERI *Pseudomonas Fluorescens* SECARA IN VITRO**

Nama Mahasiswa : ETIKA DWI RAHMAWATI

NIM : 155080500111019

Program Studi : Budidaya Perairan

**PENGUJI PEMBIMBING**

Pembimbing 1 : PROF. DR. IR. SRI ANDAYANI, MS.

Pembimbing 2 : IR. HENY SUPRASTYANI, MS.

**PENGUJI BUKAN PEMBIMBING**

Dosen Penguji 1 : DR. IR. MAFTUCH, M.Si.

Dosen Penguji 2 : QURROTA A'YUNIN, S.Pi., MP., MSc.

Tanggal Ujian : 16 April 2019

## DAFTAR RIWAYAT HIDUP



Etika Dwi Rahmawati adalah nama penulis skripsi ini. Penulis lahir dari orang tua Eko Budhi Sasmito dan Rahayu Pancawati sebagai anak kedua dari dua bersaudara. Penulis dilahirkan di Jombang, 8 April 1997.

Penulis menempuh pendidikan mulai dari SD Negeri 2 Jombang (lulus tahun 2009), melanjutkan SMP Negeri 1 Tembelang, Jombang (lulus tahun 2012) dan kemudian ke SMA Negeri 1 Jombang (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 **“Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara In Vitro”**.

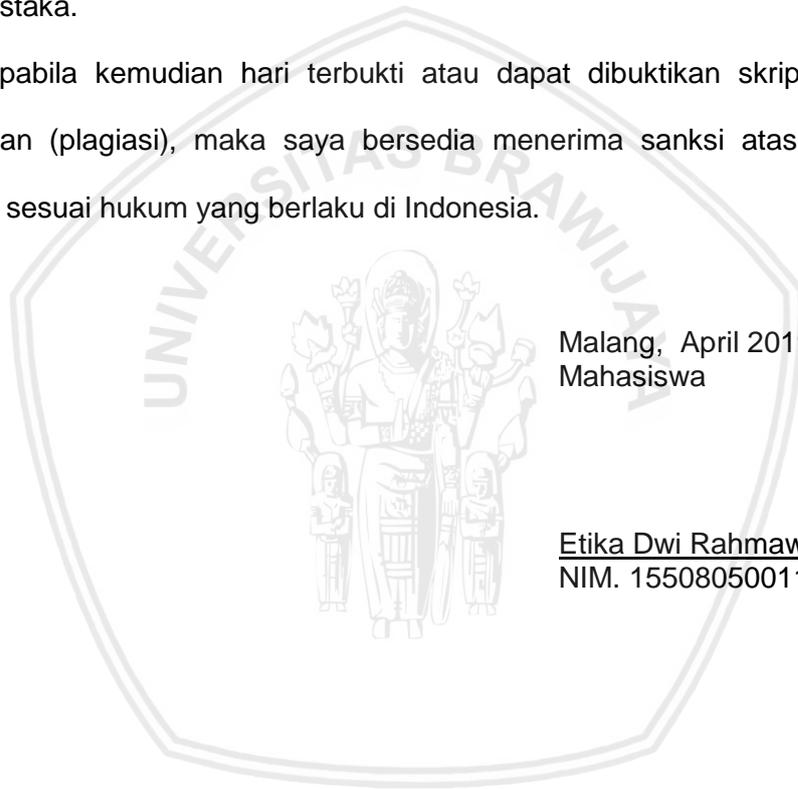
## PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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

Malang, April 2019  
Mahasiswa

Etika Dwi Rahmawati  
NIM. 155080500111019



## UCAPAN TERIMA KASIH

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

1. Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS selaku dosen pembimbing 1 dan Ir. Heny Suprastyani, MS. selaku dosen pembimbing 2 skripsi yang telah memberikan bimbingan dan arahan.
2. Orang tua tercinta yang selalu memberikan doa, cinta dan kasih sayang, semangat yang kuat dan kerja kerasnya yang menjadi motivasi saya dalam menjalani hidup ini.
3. Ibu Mega selaku laboran Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan (Devisi Keamanan Hasil Perikanan).
4. Ibu Titin selaku laboran Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan.
5. Rere, Dhea, Riska, Maylia, dan Rita yang selalu memberikan semangat dan membantu dukungan dalam skripsi.
6. Mas Adam yang selalu memberikan semangat dan dukungan.
7. Teman-teman Budidaya Perairan 2015 dan semua pihak yang turut membantu, yang tidak dapat disebutkan satu per satu.
8. Laboratorium uji BBPBAP Jepara dan UPT Materia Medica Batu yang sudah membantu dalam kelancaran skripsi.

## RINGKASAN

**ETIKA DWI RAHMAWATI.** Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* secara In Vitro. Dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Sri Andayani dan Ir. Heny Suprastyani, MS.**

---

---

Indonesia merupakan negara yang mempunyai sumber daya alam yang melimpah. Potensi pengembangan budidaya perikanan sangat besar yang menyebabkan intensifikasi semakin menjadi pilihan. Intensifikasi budidaya sering menyebabkan menurunnya kondisi lingkungan yang pada akhirnya menimbulkan penyakit. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri selain dapat menyebabkan kematian massal juga mengganggu kualitas ikan dengan menurunkan mutu daging ikan yang terinfeksi sehingga minat konsumen menurun. Bakteri yang menyebabkan penyakit pada ikan adalah *P. fluorescens*. Bakteri ini disebut sebagai agen penyebab penyakit bakterial *Hemorrhagic Septicemia* dari ikan budidaya. Penanganan penyakit ini diberbagai negara menggunakan antibiotik. Namun antibiotik dapat menyebabkan resistensi bakteri dan dampak buruk bagi lingkungan perairan. Pengobatan alternatif digunakan pada ikan yang terinfeksi penyakit yang disebabkan oleh bakteri adalah dengan menggunakan bahan – bahan alami yang mengandung zat anti bakteri yang lebih ramah lingkungan dan tidak menimbulkan resistensi terhadap bakteri. Salah satunya adalah daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.). Daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L) mengandung zat-zat aktif yang berperan sebagai zat anti bakteri. Senyawa-senyawa kimia tersebut diantaranya adalah Tanin, Flavonoid, Glukosida, Asam Formiat, Asam Sitrat, dan beberapa mineral (terutama Kalsium dan Kalium). Salah satu fungsi dari Flavonoid dan Tanin adalah kerjanya sebagai antibakteri. Zat-zat tersebut merupakan senyawa aktif dalam tanaman yang berkhasiat sebagai obat yang dapat menyembuhkan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Penelitian dilaksanakan pada bulan Desember 2018 - Februari 2019 di Laboratorium Ilmu Teknologi Hasil Perairan (Divisi Keamanan Hasil Perikanan), Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Penelitian ini menggunakan metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh dengan dosis 5 ppm (A), 25 ppm (B), 45 ppm (C), 65 ppm (D), 85 ppm (E) dan Kontrol Positif (K+) menggunakan 30 ppm antibiotik *tetracycline* serta Kontrol Negatif (K-) tanpa pemberian obat. Parameter uji dalam penelitian ini yaitu hasil zona bening yang terlihat disekitar kertas cakram yang telah ditumbuhi bakteri *P. fluorescens* dengan menggunakan dosis yang berbeda,

Hasil yang diperoleh dari penelitian ini adalah pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Adapun rerata zona bening pada uji cakram untuk perlakuan A (3,29 mm), B (4,09 mm), C (4,39 mm), D (4,83 mm), dan E (5,79). Hubungan antara penambahan dosis perlakuan ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap diameter zona hambat menunjukkan pola linear dengan persamaan  $y = 3,18733 + 0,0287x$  dan koefisien  $R^2 = 0,8401$ . Hubungan antara pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* menunjukkan

respon yang meningkat seiring dengan bertambahnya dosis ekstrak dari dosis 5 ppm, 25 ppm, 45 ppm, 65 ppm dan 85 ppm.



## KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Allah Yang Maha Esa atas berkah, karunia serta ridho-Nya sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan Skripsi dengan judul: “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas fluorescens* secara In Vitro”. Saya mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS beserta Ir. Heny Suprastyani, MS selaku dosen pembimbing dan semua pihak yang telah membantu penulis untuk menyusun laporan ini.

Saya menyadari bahwa masih banyak kekurangan pada penulisan ini. Oleh karena itu, penulis mengharapkan kritik dan saran dari pembaca untuk penyempurnaan tulisan selanjutnya, sehingga dapat bermanfaat bagi kita semua. Demikian penulis sampaikan terima kasih.

Malang, Januari 2019

Penulis

**DAFTAR ISI**

<b>RINGKASAN</b> .....	<b>v</b>
<b>KATA PENGANTAR</b> .....	<b>vii</b>
<b>DAFTAR ISI</b> .....	<b>viii</b>
<b>DAFTAR TABEL</b> .....	<b>x</b>
<b>DAFTAR GAMBAR</b> .....	<b>xi</b>
<b>DAFTAR LAMPIRAN</b> .....	<b>xii</b>
<b>1. PENDAHULUAN</b> .....	<b>1</b>
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah .....	3
1.3 Tujuan Penelitian .....	3
1.4 Hipotesis .....	4
1.5 Kegunaan Penelitian.....	4
1.6 Tempat dan Waktu.....	4
<b>2. TINJAUAN PUSTAKA</b> .....	<b>5</b>
2.1 Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	5
2.1.2 Habitat .....	6
2.1.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan.....	6
2.2 Daun Belimbing Wuluh ( <i>Averrhoa bilimbi</i> L.) .....	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi .....	8
2.2.2 Bahan Aktif .....	9
2.2.3 Aktivitas Antimikroba.....	10
2.3 Uji Efektivitas Antimikroba secara In Vitro .....	11
<b>3. METODE PENELITIAN</b> .....	<b>13</b>
3.1 Materi Penelitian .....	13
3.1.1 Alat Penelitian .....	13
3.1.2 Bahan Penelitian.....	14
3.2 Metode Penelitian .....	15
3.3 Pengambilan Data.....	16
3.4 Rancangan Penelitian .....	16
3.5 Prosedur Penelitian.....	19
3.5.1 Persiapan Penelitian .....	19
A. Sterilisasi Alat dan Bahan .....	19
B. Sterilisasi Tempat Perlakuan .....	19
C. Persiapan Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	20
D. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Belimbing Wuluh ( <i>Averrhoa bilimbi</i> L.) .....	21
E. Pembuatan Media.....	21
a. Pembuatan Media PSA untuk agar miring.....	21
b. Pembuatan Media NB untuk kultur bakteri .....	22
c. Pembuatan Media NB untuk uji MIC.....	22
d. Pembuatan Media PSA untuk uji cakram .....	23
F. Peremajaan Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	23
G. Kultur Bakteri.....	24
H. Pembuatan Dosis Ekstrak Kasar Daun Belimbing Wuluh ( <i>Averrhoa bilimbi</i> L.) .....	24

3.5.2 Pelaksanaan Penelitian.....	25
A. Uji MIC ( <i>Minimum Inhibition Concentration</i> ) .....	25
B. Uji Cakram .....	25
3.6 Parameter Uji .....	26
3.7 Analisis Data .....	27
<b>4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....</b>	<b>28</b>
4.1 Uji MIC ( <i>Minimum Inhibiting Concentration</i> ) .....	28
4.2 Uji Cakram .....	31
<b>5. KESIMPULAN DAN SARAN.....</b>	<b>38</b>
5.1 Kesimpulan .....	38
5.2 Saran .....	38
<b>DAFTAR PUSTAKA.....</b>	<b>39</b>
<b>LAMPIRAN.....</b>	<b>43</b>



## DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat yang Digunakan pada Penelitian .....	13
2. Bahan yang Digunakan pada Penelitian .....	14
3. Hasil Pengamatan Uji Pendahuluan Menggunakan Spektrofotometer .....	17
4. Larutan Standar Mc. Farland .....	20
5. Hasil Pengamatan Uji MIC Menggunakan Spektrofotometer.....	29
6. Klasifikasi Respon Hambatan .....	32
7. Hasil Rata-Rata Zona Bening Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	33
8. Tabel Analisa Sumber Keragaman .....	34
9. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil Zona Hambat Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	34



## DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>P. fluorescens</i> .....	5
2. Daun Belimbing Wuluh ( <i>Averrhoa bilimbi L.</i> ).....	8
3. Denah Penelitian .....	18
4. Hasil Uji MIC ( <i>Minimum Inhibition Concentration</i> ) .....	29
5. Hasil Uji Cakram .....	33
6. Hubungan Antara Dosis dan Diameter Zona Bening.....	35



## DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat Penelitian.....	43
2. Bahan Penelitian.....	48
3. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i> .....	51
4. Hasil Uji Fitokimia .....	52
5. Hasil Perhitungan Ekstrak Kasar Daun Belimbing Wuluh ( <i>A. bilimbi</i> L.) .....	54
6. Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh ( <i>A. bilimbi</i> L.) .....	55
7. Perhitungan Data Hasil Penelitian.....	57



## 1. PENDAHULUAN

### 1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan negara yang mempunyai sumber daya alam yang melimpah. Salah satu diantaranya adalah sumber daya perairan, baik tawar, laut maupun payau yang menunjang pembangunan perikanan sehingga dapat meningkatkan devisa negara. Pemanfaatan sumberdaya perikanan di Indonesia sudah mengarah ke perikanan budidaya dimana input teknologi dimasukan untuk mencapai hasil yang maksimal. Dampak dari adanya input tersebut adanya ketidakseimbangan ekosistem budidaya yang berakibat pada timbulnya penyakit pada komoditas yang dipelihara. Peningkatan usaha budidaya menyebabkan adanya arus perpindahan produk tersebut sehingga akan mengakibatkan perpindahan hama dan penyakit ikan dan tersebar ke daerah lain yang dapat menimbulkan kerugian yang sangat besar (Sukarni, *et al.* 2012).

Peningkatan permintaan produk perikanan untuk kebutuhan domestik maupun ekspor saat ini telah menempatkan sektor perikanan pada posisi yang penting. Potensi pengembangan budidaya perikanan sangat besar yang menyebabkan intensifikasi semakin menjadi pilihan. Intensifikasi budidaya sering menyebabkan menurunnya kondisi lingkungan yang pada akhirnya menimbulkan penyakit. Penyakit yang disebabkan oleh bakteri selain dapat menyebabkan kematian masal juga mengganggu kualitas ikan dengan menurunkan mutu daging ikan yang terinfeksi sehingga minat konsumen menurun. Beberapa kasus wabah penyakit akibat infeksi bakteri telah menyebabkan pembudidaya mengalami kerugian besar, oleh karena itu diperlukan penanganan penyakit yang serius (Gardenia, *et al.*, 2010).

Menurut Foysal, *et al.* (2011), Penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan masalah utama yang dihadapi para pembudidaya ikan. Bakteri yang

menyebabkan penyakit pada ikan adalah *P. fluorescens*. Bakteri ini disebut sebagai agen penyebab penyakit bakterial *Hemorrhagic Septicemia* dari ikan budidaya. Bakteri ini dianggap sebagai patogen utama ikan air tawar dan patogen oportunistik untuk spesies ikan yang berbeda yang dibudidayakan di perairan laut dan air payau di seluruh dunia. Penanganan penyakit ini diberbagai negara menggunakan antibiotik. Namun antibiotik dapat menyebabkan resistensi bakteri dan dampak buruk bagi lingkungan perairan.

Pengobatan alternatif digunakan pada ikan yang terserang penyakit yang disebabkan oleh bakteri adalah dengan menggunakan bahan – bahan alami yang mengandung zat anti bakteri yang lebih ramah lingkungan dan tidak menimbulkan resistensi terhadap bakteri. Salah satunya adalah daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.). Menurut Afifi, *et al.* (2018), daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L) mengandung zat-zat aktif yang berperan sebagai zat anti bakteri. Senyawa-senyawa kimia tersebut diantaranya adalah Tanin, Flavonoid, Glukosida, Asam Formiat, Asam Sitrat, dan beberapa mineral (terutama Kalsium dan Kalium). Salah satu fungsi dari Flavonoid dan Tanin adalah kerjanya sebagai antibakteri. Zat-zat tersebut merupakan senyawa aktif dalam tanaman yang berkhasiat sebagai obat yang dapat menyembuhkan penyakit infeksi yang disebabkan oleh bakteri. Sedangkan menurut Liantari (2014), Ekstrak daun belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin, triterpenoid dan tanin. Flavonoid bekerja dengan cara denaturasi protein. Proses ini juga menyebabkan gangguan dalam pembentukan sel sehingga merubah komposisi komponen protein. Fungsi membran sel yang terganggu dapat menyebabkan peningkatan permeabilitas sel, diikuti dengan terjadinya kerusakan sel bakteri. Kerusakan tersebut menyebabkan kematian sel bakteri.

Daun belimbing wuluh memiliki kandungan flavonoid, saponin, tanin, sulfur, asam format, peroksidase, kalsium oksalat, dan kalium sitrat. Daun

belimbing wuluh dapat dimanfaatkan sebagai obat rematik, stroke, obat batuk, anti radang, analgesik, anti hipertensi, anti diabetes. Tanin, flavonoid, dan saponin pada daun belimbing wuluh memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Pendit, *et al.*, 2016).

Berdasarkan hal tersebut perlu dilakukan penelitian bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) secara *in vitro* terhadap bakteri *P. fluorescens*.

## 1.2 Perumusan Masalah

Pengobatan ikan yang terserang bakteri biasanya menggunakan antibiotik atau bahan kimia. Penggunaan antibiotik atau bahan kimia dapat berdampak negatif bagi manusia yang mengkonsumsinya, karena antibiotik dapat menyebabkan resistensi bakteri dan dapat berdampak buruk bagi lingkungan. Oleh karena itu, diperlukan pengobatan alternatif berupa penggunaan bahan – bahan alami yang mengandung zat antimikroba yang dapat menghambat pertumbuhan atau membunuh bakteri. Berdasarkan uraian tersebut, dapat dirumuskan masalah dalam penelitian ini adalah Apakah pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) berpengaruh terhadap daya hambat dari bakteri *P. fluorescens*.

## 1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) terhadap daya hambat dari bakteri *P. fluorescens*.

## 1.4 Hipotesis

H<sub>0</sub> : Diduga pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) tidak mempengaruhi daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

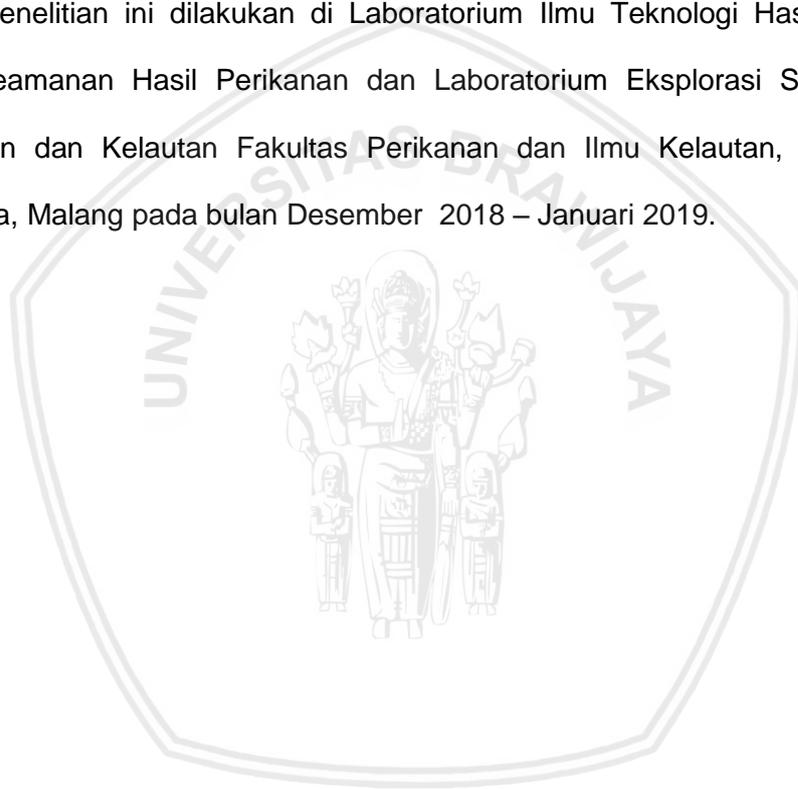
H<sub>1</sub> : Diduga pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) dapat mempengaruhi daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

### 1.5 Kegunaan

Penelitian ini berguna untuk mengetahui manfaat ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

### 1.6 Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Ilmu Teknologi Hasil Perairan Divisi Keamanan Hasil Perikanan dan Laboratorium Eksplorasi Sumberdaya Perikanan dan Kelautan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Desember 2018 – Januari 2019.



## 2. TINJAUAN PUSTAKA

### 2.1 Bakteri *P. fluorescens*

#### 2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Brenner, *et al.* (2005), klasifikasi bakteri *P. fluorescens* adalah sebagai berikut :

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



**Gambar 1.** *P. fluorescens* (Garcia, *et al.*, 2015)

Menurut Bajpai, *et al.* (2018), *P. fluorescens* merupakan bakteri gram negatif. Bakteri memiliki tubuh berbentuk batang. *P. fluorescens* memiliki flagella polar yang lebih dari satu. Bakteri ini memiliki sifat aerobik obligat. Bakteri memperlihatkan respon positif terhadap proses katalase dan oksidase. Warna koloni keruh kekuningan. Bakteri ini memiliki ciri yang sama dengan bakteri satu genusnya. Gambar bakteri *P. fluorescens* dapat dilihat pada Gambar 1.

### 2.1.2 Habitat

*P. fluorescens* adalah bakteri gram negatif yang memiliki metabolisme yang sederhana. Bakteri ini ditemukan di tanaman, tanah dan air. Beberapa isolat *P. fluorescens* menguntungkan tanaman dengan menekan patogen, membantu dalam penyerapan nutrisi, dan menurunkan polusi lingkungan. Isolat lainnya menghasilkan senyawa yang berpengaruh negatif terhadap pertumbuhan tanaman (Feng, *et al.*, 2015).

Menurut Trivedi, *et al.* (2015), *P. fluorescens* adalah Gram negatif, obligat aerobik, dan dianggap sebagai mikroorganisme psikrotrofik, tidak dapat tumbuh pada suhu di atas 32 ° C. Spesies *P. fluorescens*, awalnya dianggap tidak bersifat patogen bagi manusia. *P. fluorescens* adalah patogen oportunistik, dan mampu hidup di banyak lingkungan seperti tanaman, tanah, dan permukaan air. Beberapa strain ini ditemukan di saluran pencernaan manusia dengan tingkat komensal rendah sementara beberapa ditemukan dalam produk makanan didinginkan dengan karakter psikotropik. *P. fluorescens* menyebabkan berbagai penyakit manusia dan dianggap sebagai mikroorganisme patogen.

### 2.1.3 Infeksi dan Tanda Penyerangan

*P. fluorescens* adalah salah satu bakteri yang dapat penyebab berbagai jenis kerusakan bahan pangan. Bakteri dengan spesies ini dapat memproduksi enzim yang dapat memecah baik komponen lemak maupun protein dari bahan pangan. Bakteri golongan Pseudomonas dapat memecah rangkaian karbohidrat dengan enzim - enzim oksidase yang dihasilkan sehingga menimbulkan pewarnaan pada ikan. *P. flouescens* dapat menimbulkan noda - noda berwarna kuning atau kuning kehijauan pada ikan, sebelum ikan menjadi busuk (Rustanti,2016).

Menurut Austin (2007), Bakteri *P. fluorescens* dapat menyebabkan terjadi

pembengkakan dan kerusakan pada hati, ginjal dan limpa pada ikan dan juga menyebabkan kematian massal pada semua spesies ikan air tawar pada berbagai tahapan pertumbuhan. Bakteri patogen dapat menginfeksi ke dalam tubuh ikan melalui insang dan kulit yang terluka dan dapat menimbulkan gejala penyakit seperti pembengkakan pada kulit, pembengkakan perut, luka kemerahan, nekrosis, borok/luka, dan septicemia. Pada saat ikan berusia larva yang terinfeksi bakteri ini dapat menyebabkan tingkat kematian yang tinggi hingga 90% dari populasi yang ditandai dengan adanya luka pada bagian kulit dan sirip ekor.

Menurut Younes, *et al.* (2015), *P. fluorescens* adalah patogen budidaya yang dapat menginfeksi banyak spesies ikan, termasuk ikan *Indian carp*, ikan mas hitam, ikan mas, dan ikan *flounder* Jepang. Infeksi ikan oleh *P. fluorescens* menyebabkan penyakit yang disebut Penyakit Kulit Merah atau *Red skin disease*, yang dapat terjadi sepanjang tahun dan terutama pada ikan yang terluka yang disebabkan oleh penanganan dan proses transportasi yang tidak tepat. Ketika kondisi lingkungan normal berubah, penyakit ini sering menyebabkan kematian, sehingga menyebabkan kerugian ekonomi yang berat. *Pseudomonas* dianggap sebagai salah satu bakteri paling patogenik yang mempengaruhi budidaya ikan terutama *O. niloticus* dan *O. mossambicus* di Mesir.

Menurut Astan (2013), *P. fluorescens* adalah komponen dominan dari ekosistem air tawar. *P. fluorescens* telah dikaitkan dengan septicemia pada berbagai jenis ikan. Ini telah dianggap sebagai organisme pembasmi ikan atau organisme yang dapat menyebabkan kematian pada ikan serta sebagai patogen primer. *P. fluorescens* biasanya ditemukan di air, tanah dan di tubuh ikan. Ini adalah patogen akuakultur yang dapat menginfeksi banyak spesies ikan. Infeksi *P. fluorescens* pada ikan menyebabkan perkembangan yang disebut penyakit

kulit merah. Karena kurangnya sarana kontrol yang efektif, penyakit ini sering menyebabkan kematian yang tinggi, sehingga menyebabkan kerugian besar.

## 2.2 Daun Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L.)

### 2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Kumar, *et al.* (2013) klasifikasi tanaman blimbing wuluh adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Plantae
Subkingdom	: Tracheobionta
Superdivision	: Spermatophyta
Division	: Magnoliophyta
Class	: Dicotyledonae
Subclass	: Rosidae
Order	: Oxalidales
Family	: Oxalidaceae
Genus	: <i>Averrhoa</i>
Species	: <i>A. bilimbi</i> L.



**Gambar 2.** Daun Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L.) (Wahyuni, *et al.* 2016)

Daun belimbing wuluh majemuk, menyirip ganjil dengan 21 sampai 45 pasang anak daun yang berselang-seling atau setengah berpasangan dan berbentuk oval. Anak daun bertangkai pendek, bentuknya bulat telur sampai jorong, ujung runcing, pangkal membulat, tepi rata, panjang sekitar 2-10 cm,

lebar sekitar 1-3 cm, warnanya hijau dan permukaan bawah warnanya lebih muda (Liantari, 2014). Gambar Daun Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L.) dapat dilihat pada Gambar 2.

### 2.2.2 Bahan Aktif

Ekstrak daun belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin, triterpenoid dan tanin. Bahan aktif pada daun belimbing wuluh yang dapat dimanfaatkan sebagai obat adalah tanin. Tanin merupakan suatu senyawa fenol yang memiliki berat molekul besar yang terdiri dari gugus hidroksi dan beberapa gugus yang bersangkutan seperti karboksil untuk membentuk kompleks kuat yang efektif dengan protein dan beberapa makromolekul. Tanin terdiri dari dua jenis yaitu tanin terkondensasi dan tanin terhidrolisis. Kedua jenis tanin initerdapat dalam tumbuhan, tetapi paling dominan terdapat dalam tanaman adalah tanin terkondensasi. Kadar tanin yang tinggi pada daun belimbing wuluh muda sebesar 10,92% (Hayati, *et al.*, 2010)

Daun belimbing wuluh memiliki kandungan flavonoid, saponin, tanin, sulfur, asam format, peroksidase, kalsium oksalat, dan kalium sitrat. Daun belimbing wuluh dapat dimanfaatkan sebagai obat rematik, stroke, obat batuk, anti radang, analgesik, anti hipertensi, anti diabetes. Tanin, flavonoid, dan saponin pada daun belimbing wuluh memiliki aktivitas antibakteri terhadap bakteri *Escherichia coli* dan *Staphylococcus aureus* (Pendit, *et al.*, 2016).

Ekstrak daun belimbing wuluh mengandung senyawa fitol (senyawa diterpen alkohol asiklik), dietil - ftalat, flavonoid, tanin, sulfur, asam format, asam sitrat, kalium sitrat, saponin, kalium oksalat. Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa fenolik yang banyak terdapat pada jaringan tanaman. Flavonoid sebenarnya terdapat pada semua bagian tumbuhan termasuk daun, akar, kayu, kulit, tepung sari, nektar, bunga, daun buni dan biji. Penyebaran jenis

flavonoid pada golongan tumbuhan yang terbesar, yaitu pada angiospermae. Berbagai jenis senyawa, kandungan dan aktivitas antioksidatif flavonoid sebagai salah satu kelompok antioksidan alami yang terdapat pada sereal, sayur – sayuran dan buah. Flavonoid dalam ekstrak daun belimbing wuluh adalah luteolin dan apigenin. Tanaman ini secara tradisional dipercaya dapat mengobati hipertensi, diabetes melitus, demam, radang porous usus, batuk, encok, dan menghilangkan jerawat (Yulianingtyas dan Kusmantoro, 2016).

### 2.2.3 Aktivitas Antimikroba

Antimikroba diartikan sebagai bahan yang dapat mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri. Cara kerja antimikroba antara lain dengan merusak dinding sel, merubah permeabilitas sel, menghambat kerja enzim, merubah molekul protein dan asam nukleat, serta menghambat sintesis asam nukleat dan protein. Salah satu jenis zat antimikroba yaitu flavonoid. Flavonoid memberikan aktifitas antibakteri dengan jalan menghambat metabolisme energi, mekanisme penghambatan metabolisme energi yang dilakukan oleh flavonoid yaitu seperti antibiotik yang menghambat respirasi oksigen dan dapat menyebabkan kematian bakteri (Mahardika, *et al.*, 2014).

Zat yang bersifat antimikroba adalah flavanoid, fenol, terpenoid, asetoksikavikol, asetat, dan minyak atsiri lainnya. Senyawa tersebut dapat menekan pertumbuhan mikroba karena dapat bersifat koagulator enzim sehingga pembentukan dinding sel terhambat. Mekanisme penghambatan mikroorganisme oleh senyawa antimikroba dapat disebabkan oleh beberapa faktor, antara lain: gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan cairan sel, menginaktivasi enzim, dan destruksi atau fungsi material genetik (Sitepu, *et al.*, 2012)

Pemanfaatan tanaman obat sebagai bahan alternatif antimikroba biasanya menggunakan beberapa jenis flavonoid yang terkandung dalam tanaman. Mekanisme flavonoid sebagai zat antimikroba adalah dengan cara meracuni protoplasma, merusak dan menembus dinding sel, serta mengendapkan protein sel mikroba. Komponen fenol pada flavonoid juga dapat mendenaturasi enzim yang bertanggung jawab terhadap germinasi spora atau berpengaruh terhadap asam amino yang terlibat dalam proses germinasi. Senyawa fenolik bermolekul besar mampu menginaktifkan enzim esensial di dalam sel mikroba meskipun pada konsentrasi yang sangat rendah (Darmawi, *et al.*, 2013)

Ekstrak daun belimbing wuluh mengandung flavonoid, saponin, triterpenoid dan tanin. Flavonoid bekerja dengan cara denaturasi protein. Proses ini juga menyebabkan gangguan dalam pembentukan sel sehingga merubah komposisi komponen protein. Fungsi membran sel yang terganggu dapat menyebabkan peningkatan permeabilitas sel, diikuti dengan terjadinya kerusakan sel bakteri. Kerusakan tersebut menyebabkan kematian sel bakteri. Flavonoid berfungsi untuk menjaga pertumbuhan normal, pertahanan terhadap pengaruh infeksi dan kerusakan (Liantari, 2014).

### **2.3 Uji Efektifitas Antimikroba secara In Vitro**

MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) merupakan suatu cara untuk menentukan konsentrasi terendah bakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan hasil yang dilihat dari pertumbuhan koloni pada agar atau kekeruhan pada pembiakan cair. Secara umum untuk penentuan MIC, pengenceran antimikroba dilakukan penurunan konsentrasi setengahnya misalnya mulai dari 16, 8, 4, 2, 1, 0.5, 0,25 µg/ml. Konsentrasi terendah menunjukkan hambatan pertumbuhan dengan jelas baik (Soleha,2015).

Selain metode MIC digunakan juga metode difusi cakram. Menurut Mulyadi, *et al.* (2013), metode yang digunakan dalam uji antibakteri ini yaitu metode difusi cakram kertas. Metode ini dilakukan dengan meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Pencelupan cakram pada larutan uji hingga seluruh permukaan cakram basah. Pengamatan dilakukan setelah bakteri diinokulasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat zona bening disekitar cakram. Pemilihan metode ini karena mudah dan sederhana untuk menentukan aktivitas antibakteri sampel yang di uji. Kertas cakram yang digunakan berdiameter 0,5 cm.



### 3. METODE PENELITIAN

#### 3.1 Materi Penelitian

##### 3.1.1 Alat Penelitian

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 1 dan gambar alat dapat dilihat pada Lampiran 1.

**Tabel 1.** Alat yang Digunakan pada Penelitian

No.	Alat	Fungsi
1.	Cawan petri	Sebagai wadah perlakuan uji difusi cakram
2.	Tabung reaksi	Sebagai wadah peremajaan bakteri pada agar miring dan pada media cair, sebagai wadah NaFis 0,9% saat pengenceran dan sebagai uji MIC
3.	Pipet volume	Sebagai alat untuk mengambil larutan dengan volume 1 – 10 ml
4.	Bola hisap	Sebagai alat penghisap larutan saat pengambilan dengan pipet volume
5.	Jangka sorong	Sebagai alat untuk mengukur zona hambat
6.	<i>Rotary Vacum Evaporator</i>	Sebagai alat untuk mendapatkan ekstrak kasar bahan uji
7.	Spatula	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
8.	Gunting	Sebagai alat untuk memotong
9.	<i>Vortex mixer</i>	Sebagai alat menghomogenkan larutan
10.	Blue tip	Sebagai alat untuk mengambil larutan dalam volume tertentu menggunakan Mikropipet 100 – 1000 $\mu\text{m}$ .
11.	<i>Laminary Air Flow (LAF)</i>	Sebagai tempat perlakuan dalam kondisi steril
12.	<i>Hot plate</i>	Sebagai pemanas saat pembuatan media
13.	Lemari pendingin	Sebagai tempat penyimpanan bakteri dan bahan penelitian
14.	Jarum ose	Sebagai alat untuk pengambilan dan peletakkan bakteri pada media
15.	Oven	Sebagai alat pengering alat dan bahan
16.	Autoklaf	Sebagai alat untuk sterilisasi alat dan bahan dengan suhu 121°C dan tekanan 1 atm
17.	Inkubator	Sebagai alat inkubasi bakteri pada suhu ruang

18.	Mikropipet 100 -1000 $\mu\text{m}$	Sebagai alat untuk mengambil larutan sebanyak 100 -1000 $\mu\text{m}$
19.	Rak tabung reaksi	Sebagai tempat untuk meletakkan tabung reaksi
20.	Gelas ukur	Sebagai alat untuk menakar bahan cair
21.	<i>Beaker glass</i>	Sebagai wadah tabung reaksi, blue tip, yellow tip saat sterilisasi
22.	Pinset	Sebagai alat untuk mengambil kertas cakram
23.	Sprayer	Sebagai wadah alkohol 70%
24.	Nampan	Sebagai wadah alat dan bahan
25.	Corong kaca	Sebagai alat penyaringan larutan maserasi
26.	Spatula kaca	Sebagai alat pengaduk bahan
27.	Erlenmeyer	Sebagai wadah hasil maserasi yang sudah disaring dan sebagai wadah pembuatan media.
28.	<i>Cotton swab</i>	Sebagai alat untuk meratakan bakteri pada media.
29.	Bunsen	Sebagai alat pembakaran dalam pengkondisian aseptis.
30.	Botol film	Sebagai wadah ekstrak
31.	Toples kaca 15 liter	Sebagai wadah maserasi daun Belimbing Wuluh ( <i>A. bilimbi</i> L.)
32.	Timbangan digital	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian $10^{-3}$
33.	Blender	Sebagai penghalus daun belimbing wuluh
34.	Spektrofotometer	Sebagai alat untuk mengukur kekeruhan melalui panjang gelombang
35.	Lap kering	Sebagai alat untuk mengeringkan alat

### 3.1.2 Bahan Penelitian

Adapun alat yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2 dan gambar alat dapat dilihat pada Lampiran 2.

**Tabel 2.** Bahan yang Digunakan pada Penelitian

No.	Bahan	Fungsi
1.	Daun Belimbing Wuluh ( <i>A. bilimbi</i> L.)	Sebagai bahan yang diuji kemampuan daya hambatnya
2.	Bakteri <i>P. fluorescens</i>	Sebagai bakteri yang akan digunakan dalam uji daya hambat

3.	Ethanol 96%	Sebagai bahan pelarut daun belimbing wuluh pada proses maserasi
4.	Media NB ( <i>Nutrient Broth</i> )	Sebagai media tumbuh bakteri dalam bentuk cair
5.	Media PSA ( <i>Pseudomonas Selective Agar</i> )	Sebagai media tumbuh bakteri dalam bentuk agar
6.	DMSO 10%	Sebagai pelarut ekstrak saat pembuatan dosis
7.	Alkohol 70%	Sebagai cairan aseptis sebelum perlakuan
8.	Akuades	Sebagai bahan pelarut pembuatan media dan Nafis 0,9%
9.	Kertas saring	Sebagai bahan untuk menyaring larutan hasil maserasi
10.	Masker	Sebagai bahan untuk melindungi mulut dan hidung agar terhindar dari kontaminasi.
11.	Spirtus	Sebagai bahan bakar bunsen.
12.	Kertas label	Sebagai pemberi tanda alat dan bahan.
13.	Kapas	Sebagai penutup lubang alat pada proses sterilisasi.
14.	<i>Aluminium foil</i>	Sebagai penutup badan toples saat proses sterilisasi
15.	<i>Plastic wrap</i>	Sebagai penutup cawan petri setelah diberiperlakukan saat dinkubasi.
16.	Benang kasur	Sebagai pengikat alat saat proses sterilisasi
17.	<i>Tissue</i>	Sebagai bahan untuk mengeringkan alat.
18.	Kertas cakram	Sebagai bahan penyerap ekstrak untuk mengetahui zona hambatan dari ekstrak yang digunakan.
19.	<i>Vaseline</i>	Sebagai pelumas penutup Rotary Vacum Evaporator
20.	Kertas bekas	Sebagai bahan pembungkus alat kaca yang akan disterilisasi.
21.	Sarung tangan	Sebagai bahan untuk melindungi tangan dari kontaminasi
22.	Korek api	Sebagai sumber api untuk menyalakan bunsen

### 3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Menurut Muktiono, *et al.* (2013), metode *eksperimental* adalah metode yang dapat dilakukan apabila data yang ingin diperoleh belum tersedia sehingga variabel yang akan diukur harus dibangkitkan datanya melalui percobaan, observasi

terhadap data baru bisa dijalankan setelah dilakukan percobaan tersebut. Langkah untuk mendukung metode *eksperimental* ini adalah pengumpulan data - data yang dibutuhkan melalui wawancara, observasi langsung, studi pustaka, dan dokumentasi.

Menurut Lestari, *et al.* (2017), Metode eksperimental merupakan metode yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap objek dan adanya suatu kontrol. Tujuan metode eksperimental adalah untuk menyelidiki ada tidaknya hubungan sebab akibat dan berapa besar hubungan sebab akibat tersebut dengan cara memberikan perlakuan - perlakuan tertentu dan menyediakan kontrol untuk perbandingan.

### 3.3 Pengambilan Data

Teknik pengambilan data pada penelitian ini dengan cara observasi langsung. Menurut Susilowati dan Purnama (2011), Observasi merupakan salah satu teknik pengumpulan data yang cukup efektif untuk mempelajari suatu sistem. Observasi adalah pengamatan langsung terhadap suatu kegiatan yang sedang dilakukan. Pada waktu melakukan observasi, analis sistem dapat ikut juga berpartisipasi atau hanya mengamati saja orang-orang yang sedang melakukan suatu kegiatan tertentu yang diobservasi.

Menurut Hartono, *et al.* (2010), metode observasi merupakan metode penelitian dimana, peneliti melakukan pengamatan/melihat dan meneliti langsung ke obyek penelitian tentang seluruh aktifitas yang berhubungan dengan maksud penelitian, Dengan menganalisa mengevaluasi sistem yang sedang berjalan dan memberikan solusi melalui sistem informasi yang akan dibangun sehingga dapat lebih bermanfaat.

### 3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan yang digunakan pada penelitian pengaruh pemberian ekstrak

kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) terhadap bakteri *P. fluorescens* secara in vitro ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Menurut Persulesy, *et al.* (2016), metode Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan rancangan yang paling sederhana diantara rancangan-rancangan percobaan yang lain. Dalam rancangan ini perlakuan dikenakan sepenuhnya secara acak terhadap satuan-satuan percobaan atau sebaliknya. Pola ini dikenal sebagai pengacakan lengkap atau pengacakan tanpa pembatasan. Pada umumnya, rancangan ini biasa digunakan untuk percobaan yang memiliki media atau lingkungan percobaan yang seragam atau homogen.

Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat yang tepat dalam penggunaan ekstrak kasar daun belimbing wuluh, dimana menggunakan dosis 0,01 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm serta kontrol positif dan kontrol negatif. Kemudian setiap tabung diberi isolat bakteri sebanyak 1ml, lalu diinkubasi dengan suhu 30 °C selama 24 jam. Media dilihat kekeruhannya dan diukur nilai absorbansinya menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600nm. Hasil uji pendahuluan dapat dilihat pada Tabel 3.

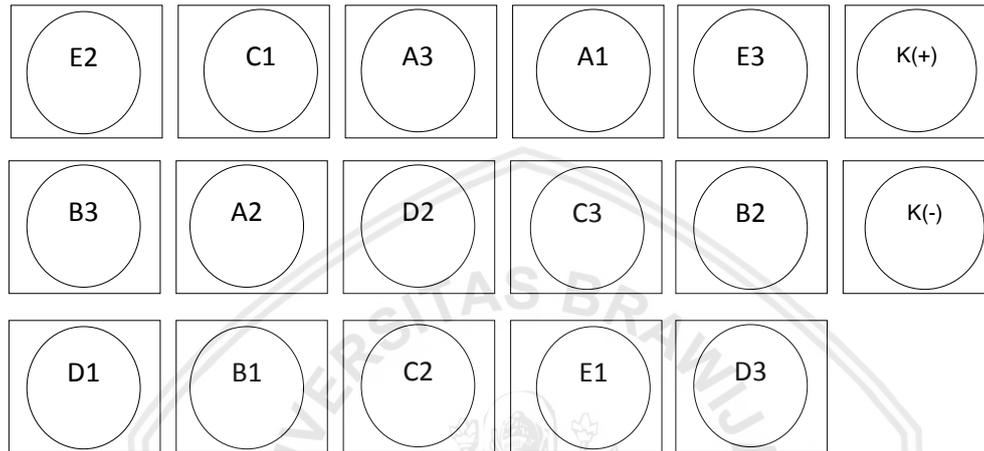
**Tabel 3.** Hasil Uji Pendahuluan menggunakan Spektrofotometer

No.	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Warna
1.	1000	0,146	Bening
2.	100	0,153	Bening
3.	10	0,173	Bening
4.	1	0,216	Agak Bening
5.	0,1	0,232	Agak Bening
6.	0,01	0,245	Keruh
9.	K(+)	0,193	Bening
10.	K(-)	0,258	Keruh

Hasil diatas menunjukkan bahwa ekstrak daun belimbing wuluh dengan dosis 10 ppm sudah dapat menghambat bakteri *P. fluorescens*. kemudian dilakukan uji mic dengan dosis 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm, 7 ppm, 8

ppm, dan 9 ppm. Hasil uji mic didapatkan dosis 5 ppm dikarenakan dosis tersebut mendekati nilai kontrol positif. Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, sedangkan perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 5 perlakuan dan 2 kontrol, kontrol positif dan kontrol negatif.

Denah penelitian disajikan pada Gambar 3 dibawah ini :



**Gambar 3.** Denah Penelitian

Keterangan :

- K (+) : Perlakuan kontrol (+) diberi antibiotik *tetracycline* 30 ppm.
- K (-) : Perlakuan kontrol (-) tanpa diberi dosis ekstrak kasar daun belimbing wuluh.
- Perlakuan A : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun belimbing wuluh 5 ppm.
- Perlakuan B : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun belimbing wuluh 25 ppm.
- Perlakuan C : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun belimbing wuluh 45 ppm.
- Perlakuan D : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun belimbing wuluh 65 ppt.
- Perlakuan E : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun belimbing wuluh

85 ppt.

1,2, dan 3 : sebagai ulangan

### 3.5 Prosedur Penelitian

#### 3.5.1 Persiapan Penelitian

##### A. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dapat digunakan dengan menggunakan autoklaf, dengan cara penggunaan sebagai berikut :

- Alat - alat yang akan digunakan dicuci terlebih dahulu menggunakan sabun cuci, kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan menggunakan kertas bekas dan diikat dengan menggunakan benang kasur. Kemudian bahan – bahan yang akan digunakan ditutup dengan menggunakan kapas dan *plastic wrap*.
- Dimasukkan akuades ke dalam autoklaf.
- Dimasukkan alat dan bahan kedalam autoklaf kemudian ditutup secara simetris dan dikencangkan bautnya, pastikan klep pada tutup autoklaf tertutup. Lalu kompor dinyalakan.
- Ditunggu hingga suhu mencapai 121 °C, kemudian pengatur suhu dikecilkan dan ditunggu hingga 15 menit.
- Ditunggu proses sterilisasi selesai. Kemudian kompor dimatikan ditunggu hingga 0°C dan autoklaf dapat dibuka.

##### B. Sterilisasi Tempat Perlakuan

Sterilisasi tempat perlakuan dilakukan untuk menghindari kontaminan karena mengingat tempat digunakan secara bergantian. Sterilisasi dilakukan secara kimia dengan cara memberikan semprotan berupa alkohol 70% disekitar tempat penelitian. Selain itu, dilakukan sterilisasi fisika dengan menggunakan penyinaran UV sebelum menggunakan LAF (Laminary Air Flow) selama 15 menit

sebelum dan sesudah dilakukan penelitian untuk memtaikan semua baktri dan meghindari terjadinya kontaminasi.

### C. Persiapan Bakteri *P. fluorescens*

Bakteri *P. fluorescens* diperoleh dari Balai Besar Perikanan Budidaya Air Payau (BBPBAP) Jepara, Jawa Tengah dan hasil uji Biokimia dapat dilihat pada Lampiran 3. Bakteri diperoleh dengan kepadatan  $6 \times 10^8$  sel/ml hasil pengukuran pada media *Nutrient Broth* yang sudah dicocokkan dengan metode Mc Farland.

Perhitungan jumlah bakteri yang ada pada media NB dapat dilakukan menggunakan metode Mc Farland dengan cara:

- Menyediakan 11 tabung reaksi yang bersih;
- Membuat larutan  $H_2SO_4$  murni dalam 1% dan membuat larutan  $BaCl_2$  dalam 1%;
- Mencampurkan kedua jenis larutan tersebut dalam tabung berdasarkan perbandingan pada ketentuan metode Mc Farland. Sehingga isi dari satu tabung tersebut menjadi 10 ml larutan. Kemudian tabung-tabung tersebut ditutup.
- Dicocokkan warna suspense bakteri pada media cair dengan tabung larutan standar Mc.farland. Tabel standar Mc. Farland menurut Sutton (2011), dapat dilihat pada Tabel 4.

**Tabel 4.** Larutan Standar Mc. Farland

Nomor Larutan Mc. Farland	CFU ( $\times 10^8$ /ml)	1% $BaCl_2$ (ml)	1% $H_2SO_4$ (ml)
0.5	<3	0.05	9.95
1	3	0.1	9.9
2	6	0.2	9.8
3	9	0.3	9.7
4	12	0.4	9.6
5	15	0.5	9.5
6	18	0.6	9.4
7	21	0.7	9.3

8	24	0.8	9.2
9	27	0.9	9.1
10	30	1.0	9.0

#### **D. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L.)**

Pembuatan ekstrak kasar daun belimbing wuluh dimulai dengan menyiapkan daun Belimbing Wuluh basah yang didapatkan dari daerah Jombang, Jawa Timur sebanyak 5 kg. Daun belimbing wuluh yang basah dikeringkan selama 7 hari dan didapatkan daun kering sebanyak 1000 gram sehingga didapatkan presentase berat kering sebesar 20%. Daun belimbing wuluh tersebut kemudian di haluskan dengan menggunakan blender dan didapatkan hasil berupa serbuk yang kemudian dilakukan proses untuk menghasilkan ekstrak kasar menggunakan metode maserasi dengan perbandingan 1:6, dimana serbuk daun belimbing wuluh sebanyak 250 gram direndam dengan menggunakan larutan etanol 96% sebanyak 1500 ml selama 3 x 24 jam dalam suhu ruang. Larutan yang diperoleh dari hasil maserasi dilakukan evaporasi menggunakan *Rotary Vacum Evaporator* hingga menghasilkan ekstrak dalam bentuk pasta sebanyak 21,52 gram sehingga didapatkan hasil rendemen sebesar 8,6 %. Hasil dari ekstrak kemudian disimpan dalam lemari pendingin dengan wadah botol film untuk mencegah rusaknya ekstrak. Hasil perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 5.

#### **E. Pembuatan Media**

##### **a. Media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) untuk agar miring**

Penelitian ini menggunakan bakteri *P. fluorescens*, sehingga media yang digunakan untuk peremajaan bakteri yaitu PSA (*Pseudomonas Selective Agar*). Adapun proses pembuatan agar miring adalah sebagai berikut:

- Ditimbang media PSA sebanyak 0,48 gram.
- Media PSA dilarutkan ke dalam erlenmeyer yang berisi aquades

sebanyak 10 ml.

- PSA diaduk dengan menggunakan spatula hingga benar – benar larut secara homogen.
- Setelah larut sempurna, erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas sampai rapat, lalu ditutup lagi dengan *plastic wrap*.
- Media yang sudah tertutup kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.
- Media ditunggu hingga hangat kemudian dituang ke dalam tabung reaksi dalam kondisi steril.
- Media yang sudah dituang dimiringkan 30° ditunggu hingga mengeras dan kemudian dilakukan *strike* secara zig zag dalam keadaan steril.

#### **b. Media NB (*Nutrient Broth*) untuk kultur bakteri**

- Ditimbang NB sebanyak 0,08 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100ml.
- Ditambahkan akuades sebanyak 10 ml, diaduk hingga larut sempurna.
- Media dituang pada tabung reaksi, kemudian ditutup dengan menggunakan kapas hingga rapat kemudian ditutup dengan *plastic wrap* .
- Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.
- Setelah sterilisasi selesai, media dibiarkan dingin agar bakteri tidak mati apabila diinokulasi pada saat dalam keadaan media panas.

#### **c. Media NB (*Nutrient Broth*) untuk Uji MIC (*Minimum Inhibition Concentration*)**

- Ditimbang NB sebanyak 0,4 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml.
- Ditambahkan akuades sebanyak 50 ml, diaduk hingga larut sempurna.

- Media dituang ke dalam 10 tabung reaksi yang masing – masing berisi 5 ml media. Kemudian ditutup dengan menggunakan kapas dan *plastic wrap*.
- Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf dengan suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.

#### **d. Media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*) untuk Uji Cakram**

Adapun prosedur pembuatan media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)

untuk Uji Cakram adalah sebagai berikut:

- Ditimbang media PSA sebanyak 4,84 gram.
- PSA dilarutkan ke dalam erlenmeyer yang berisi akuades sebanyak 100 ml.
- PSA diaduk dengan menggunakan spatula hingga benar – benar larut secara homogen.
- Setelah larut sempurna, erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas sampai rapat, lalu ditutup lagi dengan *plastic wrap*.
- Media yang sudah tertutup kemudian disterilisasi dengan menggunakan autoclave dengan suhu 121 °C dan tekanan 1 atm selama 15 menit.
- Media ditunggu hingga hangat kemudian dituang ke dalam 4 cawan petri.

#### **F. Peremajaan Bakteri *P. fluorescens***

Penelitian ini menggunakan bakteri *P. fluorescens* yang didapat dari isolat murni yang berasal dari Balai Besar Budidaya Air Payau Jepara. Isolat murni dilakukan peremajaan untuk menginokulasi kembali bakteri. Peremajaan dilakukan dengan menggunakan jarum ose yang sebelumnya dipanaskan di atas bunsen, kemudian digores secara zig-zag pada agar miring dalam kondisi steril. Media yang sudah digores diinkubasi dengan suhu 30 °C selama 24 jam. Menurut Dahlan, *et al.* (2017), Isolat bakteri tumbuh dengan cepat, sehingga

harus diremajakan dalam satu medium yang mengandung nutrisi untuk kebutuhan pertumbuhannya. Caranya dengan memindahkan ulang isolat kedalam medium agar miring steril secara aseptis dengan jarum ose kemudian diinkubasi pada suhu sesuai habitat asal.

### **G. Kultur Bakteri**

Kultur bakteri pada penelitian ini menggunakan media cair NB (*Nutrient Broth*). Bakteri pada media agar miring diambil dengan menggunakan jarum ose sebanyak 1 gores dalam keadaan steril kemudian dicelupkan pada media NB steril. Media dimasukkan kedalam inkubator untuk diinkubasi dengan suhu 30 °C selama 24 jam. Menurut Mahmudah dan Atun (2017), penanaman bakteri pada media cair dilakukan dengan cara mengambil satu koloni bakteri yang telah ditumbuhkan pada media miring menggunakan jarum ose steril. Selanjutnya koloni bakteri dimasukkan kedalam media cair. Kemudian bakteri pada media cair diinkubasi selama 24 jam.

### **H. Pembuatan Dosis Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L.)**

Ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) dalam bentuk pasta diencerkan dengan pelarut DMSO 10% dan hasil perhitungan dapat dilihat pada Lampiran 6. Adapun pembuatan dosis ekstrak kasar adalah sebagai berikut

- Ekstrak dan DMSO 10% disiapkan, lalu ditentukan dosis yang diinginkan dalam satuan ppm. Adapun perhitungan ppm adalah mg ekstrak : liter DMSO 10%.
- Dikonversikan liter menjadi mililiter, dibuat dosis ekstrak tertinggi sebanyak 10ml sebagai induk.
- Selanjutnya dosis ekstrak yang lebih kecil dibuat dengan cara pengenceran dari dosis tertinggi dengan rumus :

$$V_1N_1=V_2N_2$$

Keterangan:

$V_1$  = Volume larutan stok (ml)

$N_1$  = Konsentrasi larutan stok (ppm)

$V_2$  = Volume larutan yang diinginkan (ml)

$N_2$  = Konsentrasi larutan yang diinginkan (ppm)

- Disimpan konsentrasi ekstrak dalam lemari pendingin.

### 3.5.2 Pelaksanaan Penelitian

#### A. Uji MIC

Prosedur pelaksanaan uji MIC adalah sebagai berikut :

- Disiapkan 10 tabung reaksi yang masing – masing sudah berisi media NB (*Nutrient Broth*) steril sebanyak 5 ml.
- 10 tabung reaksi tersebut diberi bakteri yang sudah dikultur pada NB (*Nutrient Broth*) masing – masing 1 ml. Kemudian ekstrak daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) diberikan pada 8 tabung reaksi dengan dosis yang berbeda setiap tabungnya. Adapun dosisnya terdiri dari 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm, 7ppm, 8 ppm, dan 9 ppm. Pada 2 tabung reaksi dijadikan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif diberi antibiotik *tetracycline* 30 ppm dan kontrol negatif tanpa ekstrak.
- Lalu dilakukan inkubasi dengan suhu 30 °C selama 24 jam.
- Setelah masa inkubasi, dilakukan pengukuran absorbansi tiap perlakuan menggunakan spektrofotometer dengan panjang gelombang 600  $\mu\text{m}$ .
- Nilai absorbansi antar perlakuan dicocokkan dengan nilai absorbansi kontrol positif. Nilai absorbansi yang mendekati kontrol positif artinya memberikan pengaruh sehingga dapat digunakan untuk penentuan dosis pada uji cakram.

#### B. Uji Cakram

Prosedur pelaksanaan uji cakram adalah sebagai berikut :

- Disiapkan cawan petri yang sudah terdapat media PSA sebanyak 25 ml.
- Disiapkan berbagi konsentrasi ekstrak kasar daun belimbing wuluh yang akan diujikan untuk mengetahui daya hambatnya.
- Disiapkan bakteri yang telah diinokulasi pada media NB.
- Penanaman bakteri pada media PSA dilakukan dengan mencelupkan *cotton swap* pada bakteri.
- Bakteri digoreskan pada media PSA dengan metode sebar. Penanaman bakteri ini dilakukan pada *Laminary Air Flow* dengan kondisi yang tetap steril agar tidak terkontaminasi.
- Merendam kertas cakram pada masing – masing konsentrasi yang ditentukan selama 15 menit.
- Kertas cakram ditiriskan dan diletakkan pada lempeng agar yang sebelumnya sudah ditanami bakteri.
- Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu ruang yaitu 30°C.
- Diukur diameter zona bening yang ada disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong untuk menentukan konsentrasi optimum yang dapat menghambat bakteri.

### 3.6 Parameter Uji

Parameter yang diamati pada penelitian ini yaitu melakukan pengamatan terhadap zona daya hambat bakteri yang dilakukan dengan cara mengukur diameter zona bening di sekeliling kertas cakram dari masing – masing perlakuan yaitu konsentrasi maksimum yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

### 3.7 Analisa Data

Data hasil zona hambatan dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan diameter zona hambat atau perlakuan. Semua analisa akan

diulang sebanyak tiga kali dari masing – masing perlakuan dan diuji secara statistik dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) sesuai rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 95% ( $\alpha=0,05$ ) dan 99% ( $\alpha=0,01$ ). Analisis digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variable bebas) terhadap parameter yang diukur. Apabila nilai uji F memiliki hasil berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka akan dilanjutkan dengan Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan.



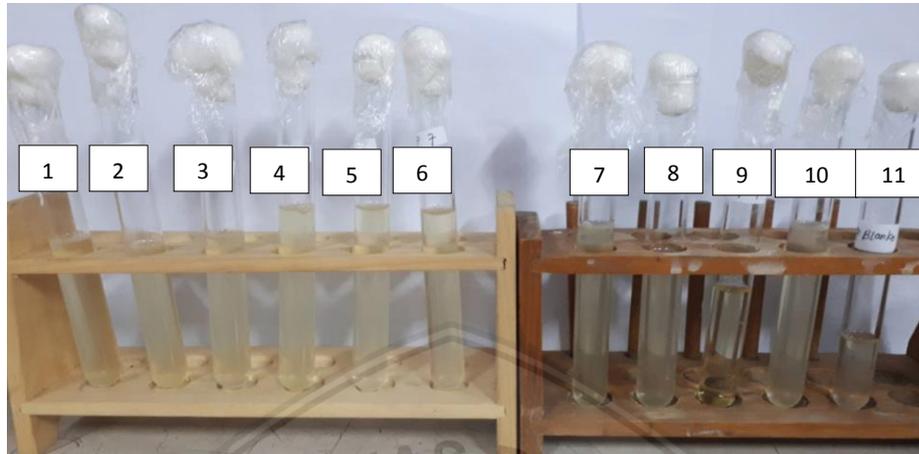
## 4. HASIL DAN PEMBAHASAN

### 4.1 Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) dilakukan dengan berbagai macam dosis menggunakan ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) dengan menggunakan pelarut akuades dan DMSO yang bertujuan untuk mengetahui dosis terkecil dalam menghambat bakteri *P. fluorescens*. Pada penelitian pendahuluan dilakukan dengan skala log yang menggunakan dosis yang berbeda – beda yaitu 0,01 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, dan 1000 ppm, dari penelitian tersebut didapatkan hasil yang berbeda setiap dosisnya. Hasil yang diperoleh dari penelitian pendahuluan yaitu sebesar 10 ppm yang dapat menghambat bakteri *P. fluorescens*. Maka dari dosis tersebut dilakukan uji MIC dengan dosis yang rangenya lebih kecil karena dimungkinkan dengan dosis yang rangenya lebih kecil tersebut masih dapat menghambat bakteri *P. fluorescens* sehingga didapat dosis yaitu 2 ppm, 3 ppm, 4 ppm, 5 ppm, 6 ppm, 7 ppm, 8 ppm, dan 9 ppm.

Hasil uji MIC menunjukkan adanya perbedaan setiap perlakuannya setelah dilakukan pengamatan dengan menggunakan spektrofotometer yang dilihat dari nilai absorbansinya. Pada uji MIC tidak hanya dilakukan dengan menggunakan indikator absorbansi namun juga dapat dilihat dari perubahan warna. Menurut Putri, *et al.* (2008), Penentuan MIC dapat dilihat berdasarkan pengamatan kekeruhan atau kejernihan sampel pada seluruh tabung reaksi dan membandingkannya dengan kontrol. Kejernihan sampel yang mendekati kontrol positif mengindikasikan bahwa ekstrak mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Dari hasil spektrofotometer didapatkan bahwa konsentrasi 5 ppm menghasilkan nilai absorbansi dibawah kontrol negatif dan mendekati kontrol

positif dan juga saat pengontrolan warna. Hasil uji MIC dapat dilihat pada Gambar 4.



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

Keterangan :

Hasil Uji MIC dari dosis terendah dari tabung nomor 1 sampai dosis tertinggi pada tabung nomor 8, kemudian pada tabung nomor 9 sebagai kontrol positif, tabung nomor 10 sebagai kontrol negatif dan tabung nomor 11 sebagai blanko.

Hasil pengamatan indikator warna diatas menunjukkan bahwa dosis 5 ppm dapat menghambat bakteri *P. fluorescens* yang ditunjukkan dengan warna agak bening. Hasil Uji MIC juga dapat dilihat dengan pengukuran nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer dan didapatkan hasil yang berbeda pada setiap perlakuan yang ditunjukkan pada Tabel 5.

**Tabel 5.** Hasil Pengamatan Uji MIC menggunakan Spektrofotometer

No.	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Warna
1.	2	0,214	Keruh
2.	3	0,210	Keruh
3.	4	0,205	Agak Bening
4.	5	0,191	Bening
5.	6	0,189	Bening
6.	7	0,183	Bening
7.	8	0,178	Bening
8.	9	0,175	Bening
9.	K(+)	0,193	Bening
10.	K(-)	0,258	Keruh

Keterangan :

Tabung nomor 5 : konsentrasi 5 ppm yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*

Kontrol + : perlakuan menggunakan antibiotik tetracycline 30 ppm.

Kontrol - : perlakuan tanpa menggunakan ekstrak.

Hasil diatas menunjukkan bahwa dosis 5 ppm dapat menghambat bakteri *P. fluorescens*, dikarenakan dosis tersebut memiliki nilai absorbansi yang mendekati kontrol positif.

Hasil Uji MIC didapatkan dari pengukuran nilai absorbansi menggunakan spektrofotometer. Dosis MIC yang digunakan adalah 5 ppm karena nilai yang dihasilkan mendekati kontrol positif dan warna media dalam tabung menjadi bening. Hal ini dikarenakan ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) memiliki senyawa antibakteri yang mampu menghambat bakteri *P. fluorescens*. Berdasarkan hasil Uji Fitokimia bahan aktif pada Lampiran 4 disebutkan bahwa ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) mengandung flavonoid, tanin, alkaloid dan saponin. Hal ini sesuai dengan Liantari (2014), Daun belimbing wuluh dijadikan obat tradisional karena di dalamnya terdapat zat-zat aktif yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri atau disebut zat antiseptik. Zat-zat aktif yang terkandung dalam daun belimbing wuluh adalah tanin, sulfur, asam format dan flavonoid. Zat-zat aktif ini berdasarkan beberapa hasil penelitian mempunyai kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut Afifi, *et al.* (2018), flavonoid dalam ekstrak belimbing wuluh dapat merusak membran sitoplasma yang menyebabkan bocornya metabolit penting yang menginaktifkan sistem enzim bakteri. Menurut Yonanda *et al.* (2016), mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar, sedangkan mekanisme kerja tanin sebagai

antibakteri adalah menghambat enzim reversetranskriptase dan DNA topoisomerase sehingga sel bakteri tidak dapat terbentuk. Menurut Maliana, *et al.* (2013), Ketersediaan alkaloid dapat mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga dapat mengakibatkan sel bakteri menjadi lisis.

#### 4.2 Uji Cakram

Ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) digunakan sebagai zat antibakteri untuk menghambat bakteri *P. fluorescens*. Untuk mengetahui kemampuan daya hambat ekstrak kasar daun belimbing wuluh maka diperlukan uji cakram. Menurut Kusmiyati dan Agustini (2007), Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram.

Uji cakram dilakukan dengan menggunakan perlakuan dosis 5 ppm, 25 ppm, 45 ppm, 65 ppm, 85 ppm, kontrol positif dan kontrol negatif. Dosis tersebut diperoleh dari uji MIC sebesar 5 ppm yang mana sudah mampu menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.

Berdasarkan hasil pengamatan selama penelitian mengenai uji daya hambat ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) terhadap bakteri *P. fluorescens* didapatkan hasil berupa zona bening yang terbentuk. Hasil diameter zona bening yang terbentuk selama penelitian dipengaruhi oleh jumlah dosis ekstrak yang digunakan, semakin tinggi ekstrak yang digunakan maka semakin besar zona bening yang terbentuk dan sebaliknya jika semakin rendah dosis ekstrak yang digunakan maka semakin kecil zona bening yang terbentuk. Hal ini sesuai dengan Lestari, *et al.* (2016), semakin tinggi konsentrasi ekstrak antibakteri maka diameter zona hambat yang terbentuk semakin besar.

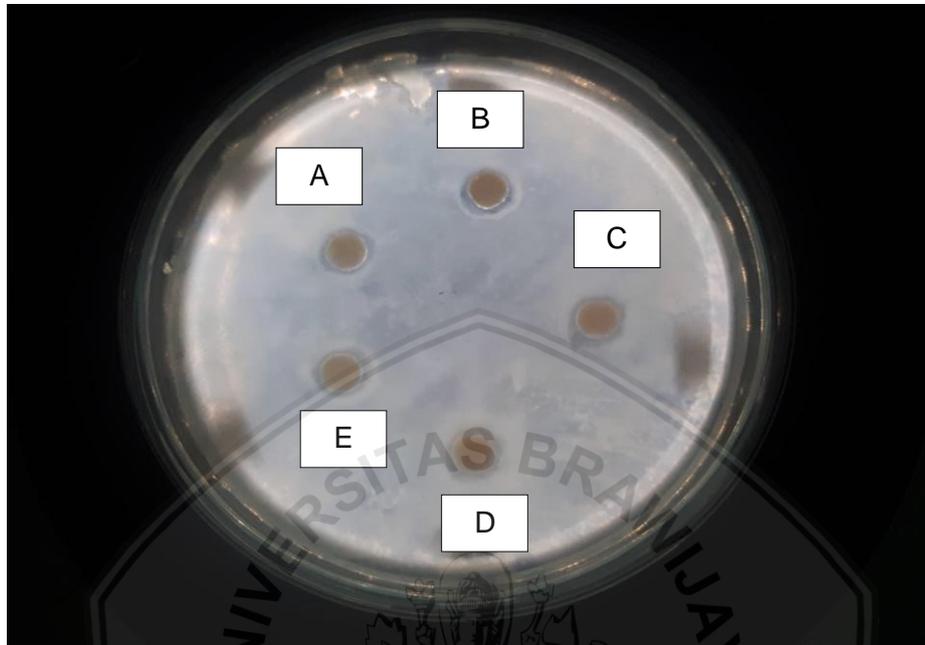
Perbedaan besarnya zona hambat yang terbentuk pada masing-masing konsentrasi disebabkan karena adanya perbedaan besar kecilnya konsentrasi atau kandungan zat aktif antibakteri yang terkandung didalamnya serta kecepatan difusi bahan antibakteri kedalam medium agar. Klasifikasi respon hambatan menurut Pan, *et al.* (2009) dapat dilihat pada Tabel 6.

**Tabel 6.** Klasifikasi Respon Hambatan

Diameter zona bening	Respon hambat pertumbuhan
0 - 3 mm	Lemah
2 - 6 mm	Sedang
>6 mm	Kuat

Berdasarkan pada Tabel 6, maka dapat ditentukan respon hambat ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) terhadap bakteri *P. fluorescens* pada tiap perlakuan. Pada perlakuan A dengan dosis 5 ppm dengan hasil rata-rata diameter zona hambat yang terbentuk sebesar 3,29 mm termasuk dalam kategori sedang dikarenakan hasilnya diantara 2 - 6 mm. Pada perlakuan B dengan dosis 25 ppm dengan hasil rata-rata diameter zona yang terbentuk sebesar 4,09 mm, hasil tersebut termasuk dalam kategori sedang dikarenakan hasilnya diantara 2 - 6 mm. Pada perlakuan C dengan dosis 45 ppm dengan hasil rata-rata diameter zona bening yang terbentuk sebesar 4,39 mm, hasil tersebut termasuk dalam kategori sedang dikarenakan hasilnya diantara 2 - 6 mm. Pada perlakuan D dengan dosis 65 ppm dengan hasil rata-rata zona bening yang terbentuk sebesar 4,83 mm, hasil tersebut termasuk dalam kategori sedang dikarenakan hasilnya diantara 2 - 6 mm. Pada perlakuan E dengan dosis 85 ppm dengan hasil rata-rata zona bening yang terbentuk sebesar 5,79 mm, hasil tersebut termasuk dalam kategori sedang dikarenakan hasilnya diantara 2 - 6 mm. Adapun gambar hasil uji daya hambat bakteri *P. fluorescens* setelah

pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) disajikan pada Gambar 5.



**Gambar 5.** Hasil Uji Cakram

Hasil uji cakram dari ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) dengan lima perlakuan dosis dan tiga kali ulangan yang digunakan, didapatkan diameter zona bening setelah dilakukan pengamatan selama 24 jam seperti yang disajikan pada Tabel 7.

**Tabel 7.** Hasil Rata-Rata Zona Bening Bakteri *P. fluorescens*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata $\pm$ SD
	1	2	3		
A	3,75	3,33	2,80	9,88	3,29 $\pm$ 0,47
B	4,10	4,01	4,16	12,27	4,09 $\pm$ 0,07
C	4,39	4,35	4,43	13,17	4,39 $\pm$ 0,04
D	4,91	5,03	4,55	14,49	4,83 $\pm$ 0,25
E	4,94	6,53	5,91	17,38	5,79 $\pm$ 0,80
<b>Total</b>				67,19	

Kemudian untuk mengetahui pengaruh perlakuan ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) terhadap zona bening, 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	4	10,25	2,56	13,47**	3,48	5,99
Acak	10	1,88	0,19			
<b>Total</b>	14	12,12				

Keterangan :

\*\* ) : berbeda sangat nyata

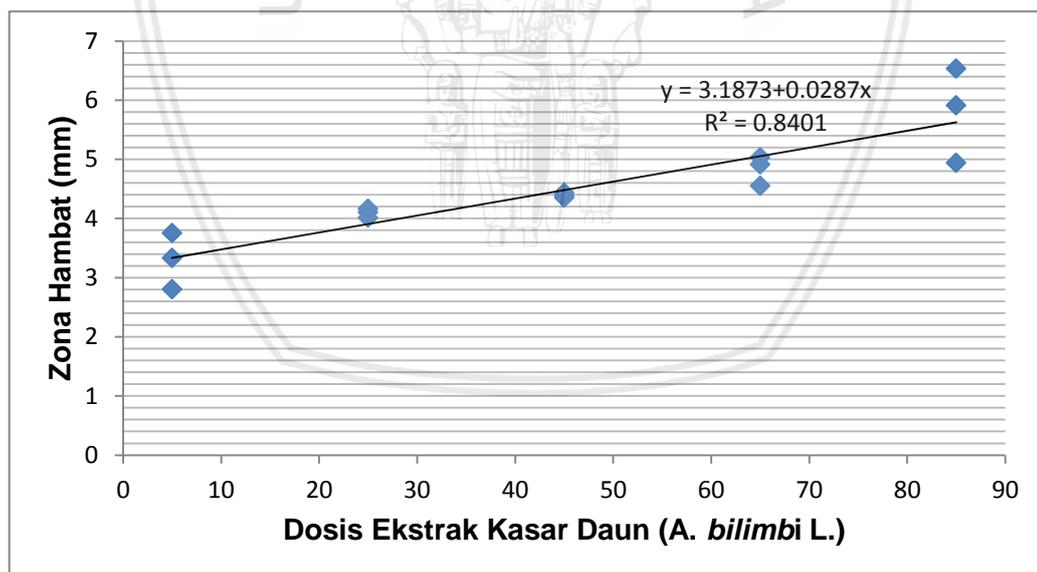
Hasil analisis sumber keragaman diatas menunjukkan bahwa nilai F Hitung sebesar 13,63 lebih besar dibandingkan dengan nilai F tabel 5% dan nilai F tabel 1%. Hal tersebut menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*. Untuk mengetahui perbedaan dari masing-masing perlakuan, maka dilanjutkan dengan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT). Adapun hasil uji BNT disajikan pada Tabel 9.

**Tabel 9.** Hasil Uji Beda Nyata Terkecil Zona Hambat Bakteri *P. fluorescens*

Rerata Perlakuan	A	B	C	D	E	Notasi
	3.29	4.09	4.39	4.83	5.79	
<b>A =</b>	3,29	-	-	-	-	a
<b>B =</b>	4,09	0,80*	-	-	-	b
<b>C =</b>	4,39	1,10*	0,30 <sup>ns</sup>	-	-	bc
<b>D =</b>	4,83	1,54**	0,74 <sup>ns</sup>	0,44 <sup>ns</sup>	-	cd
<b>E =</b>	5,79	2,50**	1,70**	1,40**	0,96*	e

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

Pada Tabel 8 dapat diketahui bahwa pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) hasil uji BNT mempengaruhi terhadap bakteri *P. fluorescens*. Pada tabel diatas menunjukkan bahwa perlakuan A berbeda nyata dengan perlakuan B dan C, tetapi berbeda sangat nyata dengan perlakuan D dan E. Perlakuan B tidak berbeda nyata dengan perlakuan C dan D, tetapi berbeda sangat nyata dengan perlakuan E. Perlakuan C tidak berbeda nyata dengan perlakuan D, tetapi berbeda sangat nyata dengan perlakuan E. Perlakuan D berbeda nyata dengan perlakuan E. Kemudian berdasarkan hasil penelitian didapatkan grafik regresi diameter zona bening yang dihasilkan dengan perlakuan berbeda yang disajikan pada Gambar 6.



**Gambar 6.** Hubungan antara dosis dan diameter zona bening

Berdasarkan Gambar 6 dapat dilihat hubungan antara penambahan dosis perlakuan ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) terhadap diameter zona hambat menunjukkan pola linear dengan persamaan  $y = 3,18733 + 0,0287x$  dan koefisien  $R^2 = 0,8401$ . Hubungan antara pemberian ekstrak kasar

daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* menunjukkan respon yang meningkat seiring dengan bertambahnya dosis ekstrak dari dosis 5 ppm, 25 ppm, 45 ppm dan 65 ppm. Hasil perhitungan dari uji statistik dapat dilihat pada Lampiran 6.

Berdasarkan hasil uji fitokimia, ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) mengandung bahan aktif flavonoid, alkaloid, saponin dan tanin. Menurut Saputra dan Anggraini *et al.* (2016), Flavonoid bekerja dengan cara denaturasi protein. Proses ini juga menyebabkan gangguan dalam pembentukan sel sehingga merubah komposisi komponen protein. Fungsi membran sel yang terganggu dapat menyebabkan peningkatan permeabilitas sel, diikuti dengan terjadinya kerusakan sel bakteri. Kerusakan tersebut menyebabkan kematian sel bakteri. Senyawa tanin merupakan senyawa turunan fenol yang secara umum mekanisme antimikrobanya dari senyawa fenol. Tanin merupakan *growth inhibitor*, sehingga banyak mikroorganisme yang dapat dihambat pertumbuhannya oleh tanin. Tanin mempunyai target pada polipeptida dinding sel. Senyawa ini merupakan zat kimia yang terdapat dalam tanaman yang memiliki kemampuan menghambat sintesis dinding sel bakteri dan sintesis protein sel kuman gram positif maupun gram negatif. Menurut Maliana, *et al.* (2013), Ketersediaan alkaloid dapat mengganggu terbentuknya komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga dapat mengakibatkan sel bakteri menjadi lisis. Menurut Wila, *et al.* (2018), Aktivitas saponin dalam menghambat pertumbuhan bakteri yaitu dengan mengganggu kerja enzim dan merusak membrane sitoplasma yang berakibat pada terhambatnya transport nutrisi yang pada akhirnya menyebabkan kematian bakteri.

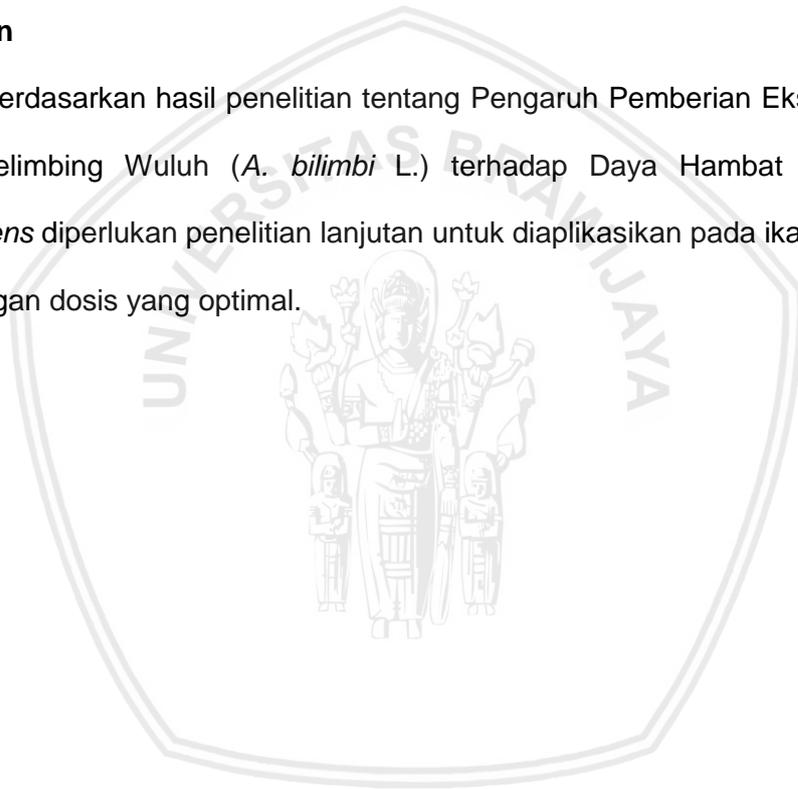
## 5. KESIMPULAN DAN SARAN

### 5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian mengenai Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L.) terhadap Daya Hambat Bakteri *P. fluorescens* dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak kasar daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.) berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens*.

### 5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian tentang Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L.) terhadap Daya Hambat Bakteri *P. fluorescens* diperlukan penelitian lanjutan untuk diaplikasikan pada ikan secara in vivo dengan dosis yang optimal.



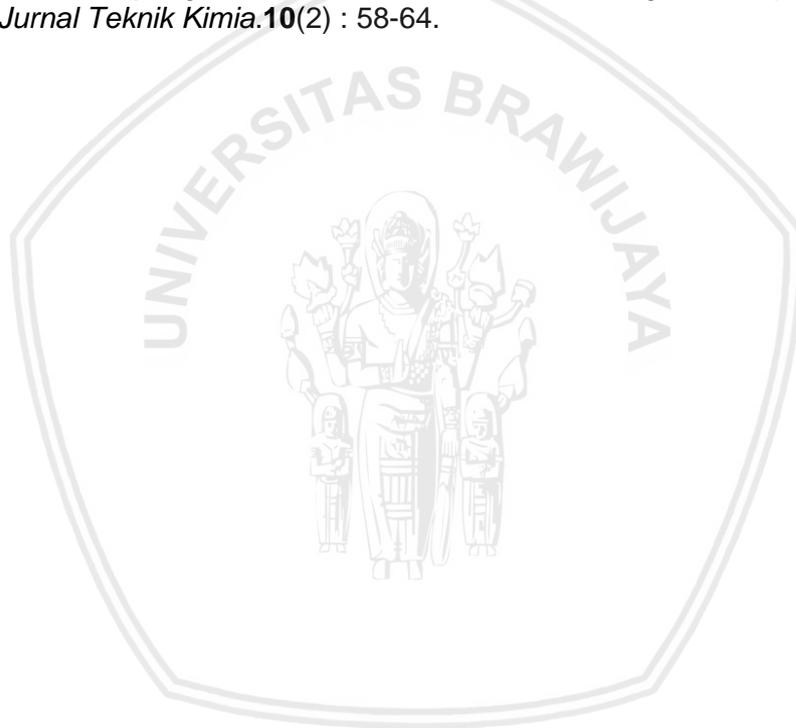
## DAFTAR PUSTAKA

- Afifi,R., E. Erlin, dan J. Rachmawati. 2018. Uji anti bakteri ekstrak daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L) terhadap zona hambat bakteri jerawat *Propionibacterium acnes* secara in vitro. *Quangga*. **10**(1):11-18.
- Astan, S.A.M. 2013. *P. septicemia* in *Labeo rohita* (HAM.) and *Cyprinus carpio* (LINN.) in andhra pradesh - natural occurrence and artificial challenge. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. **5**(2):1-5.
- Austin, B. and D.A. Austin. 2007. *Bacterial Fish Pathogens Disease in Farmed and Wild Fish*, 4th Ed. Chichester, England. *Springer : Praxis Publishing Ltd*. p. 483-484.
- Bajpai, R., P. Masurkar, J. Meher and R. S. Rajput. 2018. A changing view of *P.* from being human pathogen, coming to phytopathogen and finally as biocontrol agent. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*.**7**(2): 863 – 867.
- Brenner, D.J., N.R. Krieg, and J.T. Staley. 2005. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Second Edition, Volume Two the Proteobacteria*. *Springer*. USA. p. 365.
- Dahlan, A., S. Wahyuni dan Ansharullah. 2017. Morfologi dan karakterisasi pertumbuhan bakteri asam laktat (um 1.3a) dari proses fermentasi *wikau maombo* untuk studi awal produksi enzim amilase. *J. Sains dan Teknologi Pangan*. **4**(2): 657-663.
- Darmawi, Z., H. Manaf dan F. Putranda. 2013. Daya hambat getah jarak cina (*Jatropha multifida* L.) terhadap *Staphylococcus aureus* secara in vitro. *Jurnal Medika Veterinaria*. **7** (2): 113-115.
- Feng, K. R. Li, Y. Chen, B. Zhao and T. Yin. 2015. Sequencing and Analysis of the *P. fluorescens* GcM5-1A Genome:A Pathogen Living in the Surface Coat of *Bursaphelenchus xylophilus*. *Plos One*:1-14.
- Foysal M.J., M.M. Rahman.and M Alam. 2011. Antibiotic sensitivity and in vitro antimicrobial activity of plant extracts to *P.fluorescens* isolates collected from diseased fish. *International Journal of Natural Sciences* .**1**(4):82-88.
- García, P. M. M., D. R.Rosa, E. S. P. Prieto, C. Ramos, P. R.Palenzuela and J. M. Blanco. 2015. Complete genome sequence of *P. fluorescens* strain PICF7, an indigenous root endophyte from olive (*Olea europaea*L.) and effective biocontrol agent against *Verticillium dahliae* standards. *Genomic Sciences*.**10** (10):1-7.
- Gardenia, L., I. Koesharyani, H. Supriyadi, dan T. Mufidah. 2010. Aplikasi deteksi aeromonas hydrophila penghasil aerolysin dengan menggunakan polymerase chain reaction (pcr). *Prosiding forum inovasi teknologi akualultur*. 877-883.

- Hartono, D. Utomo dan E. Mulyanto. 2010. Electronic government pemberdayaan pemerintahan dan potensi desa berbasis web. *Jurnal Teknologi Informasi*. **6**(1):9-21
- Hayati, E. K., A. G. Fasyah dan L. Sa'adah. 2010. Fraksinasi dan identifikasi senyawa tanin pada daun belimbing wuluh (*A. bilimbi* L.). *Jurnal Kimia*. **4**(2) : 193 – 200.
- Kumar, K. A., S.K. Gousia, M. Anupama and J. N. L. Latha. 2013. A Review On Phytochemical and Biological Assays of *Averrhoa bilimbi*. *International Journal Pharmacy and Pharmaceutical Science Research*. **3**(4):136 – 139.
- Kusmiyati, N. W. S. Agustin. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. **8**(1): 48-53.
- Lestari, A. P., A. Rosyid, I. Wahyudin. 2016. Aktivitas ekstrak daun cabe rawit (*Capsicum frutescens* L.) terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Escherichia coli* secara *invitro*. *Jurnal Farmasi Sains dan Praktis*. **1**(2) : 1-6.
- Lestari N. L. T. D., Murad, A. Priyati. 2017. Uji performansi rice transplanter tipe walking model PF48 (2 ZS - 4A) di desa tanjung kecamatan tanjung kabupaten lombok utara – NTB. *Jurnal Ilmiah Rekayasa Pertanian dan Biosistem*. **5**(2):395 – 407.
- Liantari, D. S. 2014. Effect of wuluh starfruit leaf extract for *Streptococcus mutans* growth. *J Majority*. **3**(7) :27-33.
- Mahardika H. A., Sarwiyono dan P. Surjowardojo. 2014. Ekstrak metanol daun kersen (*Muntingia calabura* L) sebagai antimikroba alami terhadap bakteri *Staphylococcus aureus* penyebab mastitis subklinis pada sapi perah. *J. Ternak Tropika*. **15**(2):15-22.
- Maliana, Y., S. Khotimah, F. Diba. 2013. Aktivitas antibakteri kulit *Garcinia mangostana* Linn. Terhadap pertumbuhan *Flavobacterium* dan *Enterobacter* dari *Coptotermes curvignathus* Holmgren. *Protobiont*. **2**(1): 7 – 11.
- Mahmudah, F.L. dan S. Atun. 2017. Uji aktivitas antibakteri dari ekstrak etanol temukunci (*Boesenbergia pandurata*) terhadap bakteri *Streptococcus mutans*. *Jurnal Penelitian Saintek*. **22** (1) : 59 – 66.
- Muktiono G. S., H. Boesono dan A. Dian. 2013. Pengaruh perbedaan umpan dan mata pancing terhadap hasil tangkapan ikan layur (*Trichiurus* sp) di Palabuhanratu, Jawa Barat. *Journal of Fisheries Resources Utilization Management and Technology*. **2**(1):76-84.
- Mulyadi, M., Wuryanti dan R.S. Purbowatiningrum. 2013. konsentrasi hambat minimum (KHM) kadar sampel alang-alang (*Imperata cylindrica*) dalam etanol melalui metode difusi cakram. *Chem Info*. **1**(1): 35 – 42.

- Pan, X., F. Chen, T. Wu, H. Tang and Z. Zhao. 2009. The acid, bile tolerance and antimicrobial property of *Lactobacillus acidophilus* NIT. *Jurnal Food Control* .1(20): 598-602.
- Pendit P. A. C. D., E. Zubaidah, F. H. Sriherfyna. 2016. Karakteristik fisik kimia dan aktivitas antibakteri ekstrak daun belimbing wuluh (*A. bilimbi*L.). *Jurnal Pangan dan Agroindustri*.4(1): 400-409.
- Persulesy, E. R., F. K. Lembang dan H. Djidin. 2016. Penilaian cara mengajar menggunakan rancangan acak lengkap (studi kasus: jurusan matematika fmipa unpatti). *Jurnal Ilmu Matematika dan Terapan*. 10(1): 9 – 16.
- Putri, R. W., W, Tjajaningsih dan D, Handijatno. 2008. Daya antibakteri pigmen pyocyanin dari isolate *Pseudomonas aeruginosa* terhadap *Aeromonas hydrophila* secara *in vitro*. *Jurnal berkala ilmiah perikanan*. 3(1): 65-73.
- Rustanti, E. 2016. Efektivitas antibakteri senyawa katekin dari ekstrak daun teh (*Camelia sinensis* L. var *assamica*) terhadap bakteri *P. fluorescens*. *Journal of Chemistry*. 5(1):19-25.
- Saputra,O., N. Anggraini. 2016 Khasiat belimbing wuluh(*A. bilimbi* L.) terhadap penyembuhan *Acne Vulgaris*. *Majority*.5(1):76-80.
- Sitepu, I. S. Br., I K. Suada dan I. G. K. Susrama .2012. Uji aktivitas antimikroba beberapa ekstrak bumbu dapur terhadap pertumbuhan jamur *Curvularia lunata* (Wakk.) Boed dan *Aspergillus flavus* . *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. 1(2):107-114.
- Soleha, T.M. 2015. Uji Kepekaan terhadap antibiotik. *Juke Unila*. 5(9):119-123.
- Sukarni, Maftuch dan H.Nursyam. 2012. Kajian Penggunaan Ciprofloxacin terhadap Histologi Insang dan Hati Ikan Botia (*Botia macracanthus*, Bleeker) yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *J.Exp. Life Sci*. 2(1): 6-12.
- Susilowati, E. B. dan B. E. Purnama. 2011. Analisis dan perancangan sistem informasi pasien rumah sakit umum nirmala suri sukoharjo. *Journal Speed – Sentra Penelitian Engineering dan Edukasi* . 3(4):10-17.
- Sutton,S. 2011. Measurement of microbial cells by optical density. *Journal of Validation technology* : 46 – 49.
- Trivedi, M.K., S. Patil, H . Shettigar, M. Gangwar and S.Jana. 2015. Antimicrobial sensitivity pattern of *P. fluorescens* after biofield treatment. *J Infect Dis Ther*.3(3):1-5.
- Wahyuni, D. K., W. Ekasari, J. R. Witono dan H. Purnobasuki. 2016. Toga Indonesia. Airlangga University Press. Surabaya. 442 hlm.

- Wila, H., F. Yusro, Y. Mariani. 2018. Skrining fitokimia dan aktivitas antibakteri ekstrak kulit batang (*Eusideroxylon zwageri*) terhadap *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. *Jurnal Tengawang*. **8**(1) : 38 – 49.
- Yonanda, C.R., D. Wahyuni, dan S. Murdiah. 2016. Pengaruh ekstrak etanol daun belimbing wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap daya hambat *Staphylococcus epidermidis*. *Prosiding Seminar Nasional Pendidikan Biologi II*: hlm 91-97
- Younes A.M., L.A. Mohamed, Eida, M.F. and Gaafar A.Y.2015. Characterization and Pathogen Challenge of *P. Species* from *Oreochromis niloticus* in Egypt. *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*.**6**(1): 312-317.
- Yulianingtyas, A. dan B. Kusmartono. Optimasi volume pelarut dan waktu maserasi pengambilan flavonoid daun belimbing wuluh (A. bilimbi l.) *Jurnal Teknik Kimia*.**10**(2) : 58-64.



## LAMPIRAN

### Lampiran 1. Alat Penelitian



Autoclave



Beaker glas



Bola hisap



Botol film



Bunsen



Cawan Petri

Lampiran 1. (Lanjutan)



Corong Kaca



Cotton Swab



Erlenmeyer



Gelas Ukur



Inkubator

Lampiran 1. (Lanjutan)



Jangka Sorong



Laminary Air Flow



Jarum Ose



Lemari Pendingin



Mikro pipet



Mortal Alu

## Lampiran 1. (Lanjutan)



Pinset



Rak Tabung



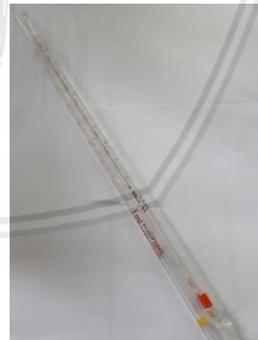
Pipet Volume



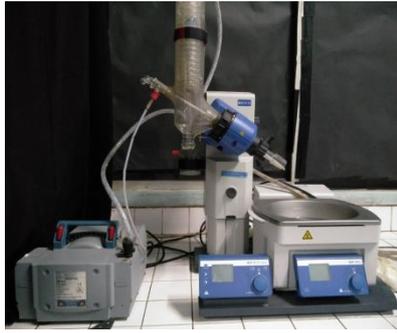
Sprayer



Timbangan Digital



Pipet volume



Evaporator



### Lampiran 2. Bahan Penelitian



Alkohol 70%



Latex



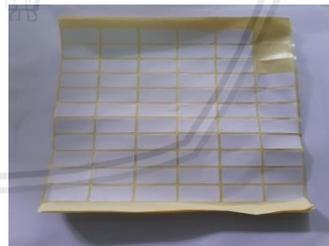
Masker



Media



Spiritus



Kertas Label

## Lampiran 2. (Lanjutan)



Kertas Cakram



Alumunium Foil



Tisu



Akuades



DMSO



Benang Kasur



Kertas Saring



Kapas



Plastik Wrap

### Lampiran 3. Hasil Uji Biokimia Bakteri *P. fluorescens*



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

---

**HASIL UJI BOKIMIA**

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

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

Lab. Mikrobiologi BBPBAP Jepara  
 Penyelia  
  
 Sri Murti Astuti, SP.



Lampiran 4. Hasil Uji Fitokimia Daun Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L.)



**PEMERINTAH PROVINSI JAWA TIMUR**  
**DINAS KESEHATAN**  
**UPT MATERIA MEDICA BATU**  
 Jalan Lahor No.87 Telp/Fax (0341) 593396. Batu  
**KOTA BATU** 65313

Nomor : 074 / 132D / 102.7 / 2018  
 Sifat : Biasa  
 Perihal : Surat Keterangan Analisa Kualitatif

Bersama ini kami sampaikan hasil analisa berikut ini :

1. Identitas Pemohon

Nama	NIM	Program Studi
Etika Dwi Rahmawati	155080500111019	Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya
Fauziah Rizqo Masturoh	155080500111017	
Fatimatuz Zahro	155080500111031	
Maylia Rasendriya Kiswandari	155080500111023	

2. Identitas Sampel

Nama daerah sampel : Belimbing Wuluh  
 Nama latin : *Averrhoa bilimbi* L.  
 Bagian sampel : Daun  
 Bentuk sampel : Ekstrak  
 Pelarut : Etanol 96%  
 Asal sampel : -  
 Tanggal penerimaan : 30 November 2018  
 Tanggal pemeriksaan : 06 Desember 2018

3. Hasil

No	Identifikasi Senyawa	Parameter	Hasil
1.	Flavonoid	Merah Bata, Merah Muda, Merah Tua	Positif
2.	Alkaloid	Meyer	Endapan Putih
		Dragendrof	Endapan Jingga
		Bouchardat	Endapan Cokelat
3.	Tanin	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman, Coklat Kehitaman	Positif
4.	Tanin Galat	Hijau Kehitaman, Biru Kehitaman, Coklat Kehitaman	Positif
5.	Tanin Katekol	Endapan Merah	Positif
6.	Saponin	Busa Permanen	Positif

## Lampiran 4. (Lanjutan)



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

65313

4. Lampiran

Nama Sampel	Flavonoid	Alkaloid		
		Meyer	Dragendrof	Bouchardat
Belimbing Wuluh ( <i>Averrhoa bilimbi L.</i> )				

Nama Sampel	Tanin	Tanin Galat	Tanin Katekol	Saponin

5. Pustaka

- Departemen Kesehatan Republik Indonesia, 1978. "Materia Medika Indonesia", Direktorat Jenderal Pengawasan Obat dan Makanan, Jakarta.

Demikian disampaikan untuk dapat dipergunakan sebagaimana mestinya.

Batu, 06 Desember 2018  
 Kepala UPT Materia Medica Batu



Dr. Hurni B.M.Drs., Apt., MKes.  
 NIP. 19611021991031003

**Lampiran 5. Hasil Perhitungan Ekstrak Kasar Daun Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L.)**

- Perhitungan Persentase Berat Kering

$$\text{Persentase Berat Kering} = \frac{\text{Berat Kering Daun (kg)}}{\text{Berat Basah Daun (kg)}} \times 100\%$$

$$= \frac{1}{5} \times 100\%$$

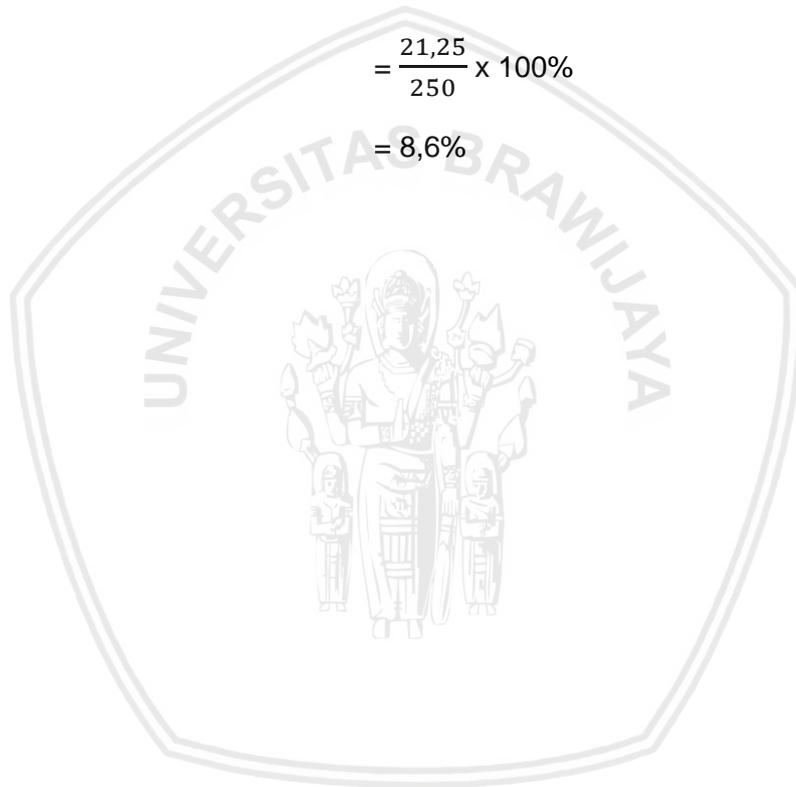
$$= 20\%$$

- Perhitungan Persentase Rendemen

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

$$= \frac{21,25}{250} \times 100\%$$

$$= 8,6\%$$



### Lampiran 6. Pembuatan Larutan Ekstrak Daun Belimbing Wuluh (*A. bilimbi* L.)

- Perhitungan Larutan Stok Ekstrak

$$\begin{aligned} \text{Larutan Ekstrak } 100 \text{ ppm} &= 100 \text{ mg/l} \\ &= \frac{100 \text{ mg (ekstrak)}}{1000 \text{ ml (larutan pengencer)}} \\ &= \frac{0,01 \text{ gr (ekstrak)}}{100 \text{ ml (larutan pengencer)}} \end{aligned}$$

- Pengenceran larutan

Pengenceran larutan dilakukan dari larutan dosis 100 ppm ke larutan 5 ppm, 25 ppm, 45 ppm, 65 ppm, dan 85 ppm.

- 5 ppm

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

$$V_1 \cdot 100 = 10 \cdot 5$$

$$V_1 = 0,5 \text{ ml larutan stok } 100 \text{ ppm} + 9,5 \text{ ml larutan pengencer}$$

- 25 ppm

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

$$V_1 \cdot 100 = 10 \cdot 25$$

$$V_1 = 2,5 \text{ ml larutan stok } 100 \text{ ppm} + 7,5 \text{ ml larutan pengencer}$$

- 45 ppm

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

$$V_1 \cdot 100 = 10 \cdot 45$$

$$V_1 = 4,5 \text{ ml larutan stok } 100 \text{ ppm} + 5,5 \text{ ml larutan pengencer}$$

- 65 ppm

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

$$V_1 \cdot 100 = 10 \cdot 65$$

$$V_1 = 6,5 \text{ ml larutan stok } 100 \text{ ppm} + 3,5 \text{ ml larutan pengencer}$$

**Lampiran 6. (Lanjutan)**

e. 85 ppm

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

$$V_1 \cdot 100 = 10 \cdot 10$$

$$V_1 = 8,5 \text{ ml larutan stok } 100 \text{ ppm} + 1,5 \text{ ml larutan pengencer}$$



## Lampiran 7. Perhitungan Data Hasil Penelitian

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata	SD
	1	2	3			
A	3,75	3,33	2,80	9,88	3,29	±0,47
B	4,10	4,01	4,16	12,27	4,09	±0,07
C	4,39	4,35	4,43	13,17	4,39	±0,04
D	4,91	5,03	4,55	14,49	4,83	±0,25
E	4,94	6,53	5,91	17,38	5,79	±0,80
<b>Total</b>				67,19		

- **Perhitungan Sidik Ragam**

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

$$= \frac{67,19^2}{15}$$

$$= 300,97$$

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

$$= (3,75^2 + 3,33^2 + \dots + 5,91^2) - 300,97$$

$$= 313,09 - 300,97$$

$$= 12,12$$

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

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

$$= \frac{9,88^2 + 12,27^2 + 13,17^2 + 14,49^2 + 17,38^2}{3} - 300,97$$

$$= 10,25$$

- JK Acak = JK Total – JK Perlakuan

$$= 12,12 - 10,25$$

$$= 1,88$$

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

$$= (5 \times 3) - 1 = 14$$

**Lampiran 7. (Lanjutan)**

- Derajat Bebas (db) Perlakuan =  $n - 1$   
 $= 5 - 1$   
 $= 4$
- Derajat Bebas (db) Acak =  $n \times (r - 1)$   
 $= 5 \times (3 - 1) = 10$
- Kuadrat Tengah (KT) Perlakuan = JK Perlakuan/db Perlakuan  
 $= 10,25 / 4$   
 $= 2,56$
- Kuadrat Tengah (KT) Acak = JK Acak/db Acak  
 $= 1,88 / 10$   
 $= 0,19$
- F.Hitung = KT Perlakuan / KT Acak  
 $= 2,56 / 0,19$   
 $= 13,47$

- **Analisa Sidik Ragam**

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hit.	F5%	F1%
Perlakuan	4	10,25	2,56	13,47**	3,48	5,99
Acak	10	1,88	0,19			
<b>Total</b>	14	12,12				

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)**

$$\begin{aligned}
 - \text{SED} &= \sqrt{\frac{2 \times \text{KT Acak}}{r}} \\
 &= \sqrt{\frac{2 \times 0,19}{3}} = 0,35
 \end{aligned}$$

### Lampiran 7. (Lanjutan)

- BNT 5% = T tabel 5% (db acak) x SED  
= 2,228 x 0,35  
= 0,79
- BNT 1% = T tabel 1% (db acak) x SED  
= 3,355 x 0,35  
= 1,12

#### • Tabel BNT

Rerata Perlakuan	A	B	C	D	E	Notasi
	3.29	4.09	4.39	4.83	5.79	
<b>A =</b>	3,29	-	-	-	-	a
<b>B =</b>	4,09	0,80*	-	-	-	b
<b>C =</b>	4,39	1,10*	0,30 <sup>ns</sup>	-	-	bc
<b>D =</b>	4,83	1,54**	0,74 <sup>ns</sup>	0,44 <sup>ns</sup>	-	cd
<b>E =</b>	5,79	2,50**	1,70**	1,40**	0,96*	e

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata  
(\* ) = berbeda nyata  
(\*\* ) = berbeda sangat nyata

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

#### • Tabel Polynomial Orthogonal

Perlakuan	Total Data (Ti)	Perbandingan (Ci)			
		linier	kuadratik	kubik	kuartik
<b>A</b>	9,88	-2	2	-1	1
<b>B</b>	12,27	-1	-1	2	-4
<b>C</b>	13,17	0	-2	0	6
<b>D</b>	14,49	1	-1	-2	-4
<b>E</b>	17,38	2	2	1	1

$Q = \sum ci.Ti$	17,22	1,42	3,06	-0,76
$Kr = (\sum ci^2) \cdot R$	30	42	30	210
<b>JK Regresi = <math>Q^2/Kr</math></b>	9,8843	0,0480	0,3121	0,0028

- JK Regresi Total = JK Linier + JK Kuadratik + JK Kubik + JK Kuartik  
 $= 9,8843 + 0,0480 + 0,3121 + 0,0028$   
 $= 10,25$

• Analisis Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hit.	F5%	F1%
<b>Perlakuan</b>	4	10.25			3.48	5.99
<b>Linier</b>	1	9.8843	9.8843	52.5761**		
<b>Kuadratik</b>	1	0.0480	0.0480	0.25532 ns		
<b>Kubik</b>	1	0.3121	0.3121	1.66011 ns		
<b>Kuartik</b>	1	0.0028	0.0028	0.01489		
<b>Acak</b>	10	1.88	0.1880			
<b>Total</b>	14	12.12				

Keterangan: ns = tidak berbeda nyata  
 (\*\*) = sangat berbeda nyata

### Lampiran 7. (Lanjutan)

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

$$\begin{aligned} R^2 \text{ Linier} &= \frac{\text{JK Linier}}{\text{JK Linier} + \text{JK Acak}} \\ &= \frac{9,8843}{9,8843 + 1,88} \\ &= 0,840194 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R^2 \text{ Kuadrat} &= \frac{\text{JK Kuadrat}}{\text{JK Kuadrat} + \text{JK Acak}} \\ &= \frac{0,0480}{0,0480 + 1,88} \\ &= 0,024896 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R^2 \text{ Kubik} &= \frac{\text{JK Kubik}}{\text{JK Kubik} + \text{JK Acak}} \\ &= \frac{0,3121}{0,3121 + 1,88} \\ &= 0,142375 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} R^2 \text{ Kuartik} &= \frac{\text{JK Kuartik}}{\text{JK Kuartik} + \text{JK Acak}} \\ &= \frac{0,0028}{0,0028 + 1,88} \\ &= 0,001487 \end{aligned}$$

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

## Lampiran 7. (Lanjutan)

Tabel Sumbu x dan y

Perlakuan	x	y	Xy	x <sup>2</sup>
A1	5	3,75	18,75	25
A2	5	3,33	16,65	25
A3	5	2,8	14	25
B1	25	4,1	102,5	625
B2	25	4,01	100,25	625
B3	25	4,16	104	625
C1	45	4,39	197,55	2025
C2	45	4,35	195,75	2025
C3	45	4,43	199,35	2025
D1	65	4,91	319,15	4225
D2	65	5,03	326,95	4225
D3	65	4,55	295,75	4225
E1	85	4,94	419,9	7225
E2	85	6,53	555,05	7225
E3	85	5,91	502,35	7225
<b>Total</b>	<b>675</b>	<b>67,19</b>	<b>3367,95</b>	<b>42375</b>

$$B1 = \frac{n(\sum xy) - (\sum x)(\sum y)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 0,0287$$

$$B0 = \frac{(\sum y)(\sum x^2) - (\sum x)(\sum xy)}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} = 3,18733$$

Berdasarkan perhitungan b0 dan b1, maka didapat persamaan linier sebagai berikut:  $y = 3,18733 + 0,0287x$