

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KIPAHIT
(*Tithonia diversifolia*) TERHADAP BAKTERI
Aeromonas hydrophila, *Pseudomonas aeruginosa*
DAN *Vibrio alginolyticus***

OLEH

NURUL FAUZIANA
NPM: 174310421

SKRIPSI

*Diajukan Sebagai Syarat Untuk Memperoleh
Gelar Sarjana Perikanan*



**PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ISLAM RIAU
PEKANBARU
2021**

**UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KIPAHIT
(*Tithonia diversifolia*) TERHADAP BAKTERI
Aeromonas hydrophila, *Pseudomonas aeruginosa*
DAN *Vibrio alginolyticus***

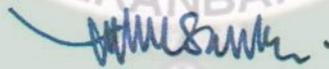
SKRIPSI

NAMA : NURUL FAUZIANA
NPM : 174310421
PROGRAM STUDI : BUDIDAYA PERAIRAN

KARYA ILMIAH INI TELAH DIPERTAHANKAN DALAM UJIAN KOMPREHENSIF YANG TELAH DILAKSANAKAN PADA TANGGAL 9 JULI 2021 DAN TELAH DISEMPURNAKAN SESUAI SARAN YANG TELAH DISEPAKATI, KARYA ILMIAH INI MERUPAKAN SYARAT PENYELESAIAN STUDI PADA FAKULTAS PERTANIAN UNIVERSITAS ISLAM RIAU

DISETUJUI OLEH:

DOSEN PEMBIMBING



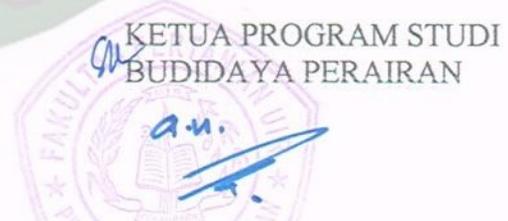
Dr. Jarod Setiaji, S.Pi, M.Sc
NIDN: 1016066802

DEKAN FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ISLAM RIAU



Dr. Ir. Hj. Siti Zahrah, MP
NIDN: 0013086004

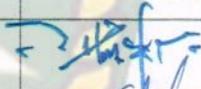
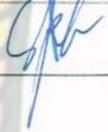
KETUA PROGRAM STUDI
BUDIDAYA PERAIRAN



Dr. Jarod Setiaji, S.Pi, M.Sc
NIDN: 1016066802

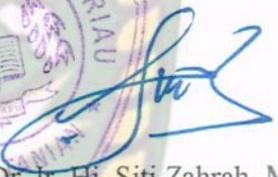
**KARYA ILMIAH INI TELAH DIPERTAHANKAN DALAM
UJIAN KOMPREHENSIF PROGRAM STUDI BUDIDAYA
PERAIRAN FAKULTAS PERTANIAN
UNIVERSITAS ISLAM RIAU**

TANGGAL, 9 Juli 2021

| No. | Nama | Jabatan | Tanda Tangan |
|-----|--------------------------------|---------|---|
| 1 | Dr. Jarod Setiaji, S.Pi., M.Sc | Ketua |  |
| 2 | Ir. T. Iskandar Johan, M.Si | Anggota |  |
| 3 | Muhammad Hasby, S.Pi., M.Si | Anggota |  |
| 4 | Hisra Melati, S.Pi., M.Si | Notulen |  |

Mengetahui

Dekan Fakultas Pertanian
Universitas Islam Riau


Dr. Ir. Hj. Siti Zahrah, MP

NIDN: 0013086004

BIOGRAFI PENULIS



Nurul Fauziana, 26 Maret 1999, merupakan seorang putri dari pasangan Tarmen dan Sugiaty. Penulis menyelesaikan pendidikan formal di Taman Kanak-Kanak (TK) Fathimah, Kecamatan Tilatang Kamang pada tahun 2005. Kemudian melanjutkan Sekolah Dasar Negeri 12 Koto Tengah, Kecamatan Tilatang Kamang pada tahun 2011. Kemudian melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Pertama di Sekolah Menengah Pertama Negeri (SMPN) 1 Tilatang Kamang selesai pada tahun 2014. Lalu melanjutkan pendidikan Sekolah Menengah Atas (SMA) di Sekolah Menengah Atas Negeri (SMAN) 1 Tilatang Kamang jurusan Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, selesai pada tahun 2017. Penulis melanjutkan pendidikan kejenjang perguruan tinggi Strata-1 (S1) dan diterima pada Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Pertanian, Universitas Islam Riau pada tahun 2017. Atas izin Allah SWT pada tanggal 09 Juli 2021 penulis berhasil menyelesaikan pendidikan Strata-1 (S1) yang dipertahankan dalam Ujian Komprehensif pada sidang meja hijau dan sekaligus berhasil meraih gelar Sarjana Perikanan Strata-1 (S1) dengan judul penelitian “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kipahit (*Tithonia diversifolia*) terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Vibrio alginolyticus*”. Dibimbing oleh Bapak Dr. Jarod Setiaji S.Pi., M.Sc.

NURUL FAUZIANA, S.Pi

UCAPAN TERIMAKASIH

Dalam penyusunan skripsi ini, penulis banyak mendapat dukungan dan juga saran dari berbagai pihak. Peneliti dan sekaligus penulis haturkan kehadiran Allah SWT berkat rahmat, taufik dan hidayah Nya, serta kesehatan dan kesempatan kepada penulis. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada :

1. Orang tua yaitu Ibu dan Ayah yang selalu mendoakan dan memberikan dukungan moril maupun materil demi kesuksesan penulis.
2. Bapak Prof. Dr. H. Syafrinaldi, S.H., M.CL selaku Rektor Universitas Islam Riau (UIR).
3. Ibu Dr. Ir. Hj. Siti Zahrah, MP selaku Dekan Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau.
4. Bapak Dr. Jarod Setiaji, S.Pi.,M.Sc selaku Ketua Program Studi Budidaya Perairan dan Dosen Pembimbing yang telah banyak membantu penulis.
5. Ibu Hj. Sri Ayu Kurniati, SP., M.Si selaku Sekretaris Program Studi Budidaya Perairan.
6. Bapak Ir. T. Iskandar Johan, M.Si., Bapak Ir. Fakrunnas M Jabbar, M.Ikom., Bapak Dr. Ir. Agusnimar, M.Sc., Bapak Ir. H. Rosyadi, M.Si., dan Bapak Muhammad Hasby, S.Pi, M.Si selaku dosen prodi Budidaya Perairan Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau.
7. Hisra Melati, S.Pi.,M.Si, Rahman Fauzi, S.Pi, F.A. Faza, S.Pi selaku Pengurus Balai Benih Ikan (BBI) UIR yang telah memberikan bantuan serta masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

8. Valentio F.P., S.Si selaku staff laboratoium Balai Benih Ikan (BBI) UIR yang telah memberikan bantuan serta masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian dan skripsi ini.
9. Alfyandri Junianto, A.md., Muhammad Ridwan, Nurfitriany, S.Pd dan Yulia Rahmi, S.E yaitu Keluarga dan saudara, yang telah memberikan dukungan moril dan materil kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan studi ini.
10. Sahabat tercinta yaitu Shintya Muharramah, A.md.T., Lisa Triana, A.md.T., Lenggo Sari E, A.md.T dan Rahmi BRH yang selalu memberikan dukungan kepada penulis sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
11. Apriansyah, Putri M, Rahmat H, Ahmed Bahri, S.Pi dan Johan yaitu kawan satu kelompok bimbingan yang telah sama-sama berjuang dan membantu penulis dalam penelitian dan masukan sehingga dapat menyelesaikan skripsi ini.
12. Keluarga Perikanan Angkatan 2016 terutama Dwi, Suhaimi *dkk* yang telah memberikan dorongan serta masukan sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
13. Mike O, Ristina, Nurman A.S, Andre S, Syawal M, Kevin M, dan Indra A.W yaitu teman-teman seperjuangan angkatan 2017 yang telah memberikan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.
14. Keluarga besar HIMAPIKAN UIR yang telah memberikan semangat sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini.

Semua pihak yang tidak dapat disebutkan namanya satu persatu, terimakasih atas segalanya.

ABSTRAK

NURUL FAUZIANA (174310421) “UJI AKTIVITAS ANTIBAKTERI EKSTRAK DAUN KIPAHIT (*Tithonia diversifolia*) TERHADAP BAKTERI *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* DAN *Vibrio alginolyticus*” dibawah bimbingan Bapak Dr. Jarod Setiaji, S.Pi, M.Sc. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui aktivitas antibakteri ekstrak daun Kipahit untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* dan mengetahui konsentrasi ekstrak daun Kipahit yang terbaik untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*. Bahan yang digunakan pada penelitian ini adalah Ekstrak daun kipahit, bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*, metanol, NB, NA, kertas cakram dan aquades. Metode yang digunakan adalah metode eksperimen menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 5 perlakuan dan 2 kali ulangan yaitu: P1 konsentrasi ekstrak 10%, P2 konsentrasi ekstrak 20%, P3 konsentrasi ekstrak 30%, P4 konsentrasi ekstrak 40% dan P5 konsentrasi ekstrak 50%. Hasil penelitian ini adalah daun Kipahit (*T. diversifolia*) positif mengandung senyawa alkaloid, fenolik, terpenoid/steroid dan flavonoid. Kemudian daya hambat ekstrak daun Kipahit terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada konsentrasi 10% sampai 30% dengan kategori kuat dan konsentrasi 40% sampai 50% dengan kategori sangat kuat. Daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* pada konsentrasi 10% sampai 50% dengan konsentrasi sangat kuat.

Kata Kunci : Ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*), *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. Alginolyticus*

KATA PENGANTAR

Puji beserta syukur penulis ucapkan kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya penulis dapat menyelesaikan skripsi ini yang berjudul “Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Kipahit (*Tithonia diversifolia*) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophilia*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Vibrio alginolyticus*”. Pada kesempatan ini penulis mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing Bapak Dr. Jarod Setiaji, S.Pi., M.Sc., dan teman-teman yang telah memberi dukungan dalam menyelesaikan skripsi ini hingga selesai.

Penulis telah berusaha semaksimal mungkin dalam menulis skripsi ini, namun jika ditemukan kekurangan, penulis mengharapkan kritikan dan saran yang sifatnya membangun demi kesempurnaannya. Atas partisipasinya penulis mengucapkan terima kasih.

Akhir kata dengan diiringi doa penulis berharap mudah-mudahan maksud dan tujuan dari penyajian skripsi ini dapat tercapai. Aamiin.

Pekanbaru, Juli 2021

Penulis

DAFTAR ISI

| | Halaman |
|--|---------|
| LEMBAR PENGESAHAN | |
| ABSTRAK | i |
| KATA PENGANTAR | ii |
| DAFTAR ISI | iii |
| DAFTAR TABEL | v |
| DAFTAR GAMBAR | vi |
| DAFTAR LAMPIRAN | vii |
| I. PENDAHULUAN | 1 |
| 1.1. Latar Belakang..... | 1 |
| 1.2. Rumusan Masalah | 3 |
| 1.3. Batasan Masalah | 3 |
| 1.4. Tujuan..... | 4 |
| 1.5. Manfaat..... | 4 |
| II. TINJAUAN PUSTAKA | 5 |
| 2.1. Kipahit (<i>Tithonia diversifolia</i>) | 5 |
| 2.2.1. Klasifikasi dan Morfologi Tumbuhan Kipahit (<i>Tithonia diversifolia</i>) | 5 |
| 2.2.2. Habitat dan Penyebaran Tumbuhan Kipahit (<i>Tithonia diversifolia</i>) | 6 |
| 2.2.3. Kandungan Daun Kipahit (<i>T. diversifolia</i>) | 7 |
| 2.2. Proses Ekstraksi | 8 |
| 2.3. Pengujian Aktivitas Antibakteri | 12 |
| 2.4. Bakteri Patogen | 14 |
| 2.5.1. <i>Aeromonas hydrophila</i> | 15 |
| 2.5.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 16 |
| 2.5.3. <i>Vibrio alginolyticus</i> | 18 |
| III. METODE PENELITIAN | 20 |
| 3.1. Tempat dan Waktu Penelitian | 20 |
| 3.2. Alat dan Bahan Penelitian | 20 |
| 3.3.1. Alat Penelitian | 20 |
| 3.3.2. Bahan Penelitian | 21 |
| 3.3. Hasil Uji Pendahuluan Aktivitas Bakteri | 22 |
| 3.4. Rancangan Penelitian | 23 |
| 3.5. Prosedur Penelitian | 24 |

| | |
|--|----|
| 3.5.1. Pengambilan Sampel Daun Kipahit (<i>T. diversifolia</i>) | 24 |
| 3.5.2. Ekstraksi Daun Kipahit (<i>T. diversifolia</i>) | 24 |
| 3.5.3. Pembuatan Konsentrasi Suspensi Ekstraksi Daun Kipahit (<i>T. diversifolia</i>) | 25 |
| 3.5.4. Sterilisasi Alat dan Bahan | 25 |
| 3.5.5. Peremajaan Bakteri Patogen | 26 |
| 3.5.6. Kultur Bakteri Patogen pada Nutrient Broth (NB) | 27 |
| 3.5.7. Uji Aktivitas Antibakteri | 28 |
| 3.5.8. Uji Fitokimia | 30 |
| 3.5.8.1. Uji Alkanoid | 31 |
| 3.5.8.2. Uji Fenolik, Flavonoid, Saponin dan Terpenoid /Steroid | 31 |
| 3.6. Hipotesis dan Asumsi | 33 |
| 3.7. Analisis Data | 33 |
| IV. HASIL DAN PEMBAHASAN | 34 |
| 4.1. Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kipahit (<i>T. diversifolia</i>)..... | 34 |
| 4.2. Uji Aktivitas Antibakteri Daun Kipahit (<i>T. diversifolia</i>) | 37 |
| 4.2.1. <i>Aeromonas hydrophila</i> | 37 |
| 4.2.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | 39 |
| 4.3.3. <i>Vibrio alginolyticus</i> | 41 |
| 4.3. Mekanisme Senyawa Aktif Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Kipahit | 42 |
| V. KESIMPULAN DAN SARAN | 45 |
| 5.1. Kesimpulan | 45 |
| 5.2. Saran | 45 |
| DAFTAR PUSTAKA | 46 |
| LAMPIRAN | 52 |

DAFTAR TABEL

| Tabel | Halaman |
|--|---------|
| 3.1. Alat Penelitian | 20 |
| 3.2. Bahan Penelitian | 21 |
| 3.3. Klasifikasi Respon hambatan Pertumbuhan Bakteri | 30 |
| 4.1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kipahit (<i>T. diversifolia</i>) | 34 |



DAFTAR GAMBAR

| Gambar | Halaman |
|--|---------|
| 1. Daun Kipahit (<i>T. diversifolia</i>) | 5 |
| 2. <i>A. hydrophila</i> | 15 |
| 3. <i>P. aeruginosa</i> | 17 |
| 4. <i>V. alginolyticus</i> | 19 |
| 5. Metode Difusi Cakram | 30 |
| 6. Rata-rata Diameter Zona Hambat pada Bakteri <i>A. hydrophila</i> | 38 |
| 7. Rata-rata Diameter Zona Hambat pada Bakteri <i>P. aeruginosa</i> | 39 |
| 8. Rata-rata Diameter Zona Hambat pada Bakteri <i>V. alginolyticus</i> | 41 |

DAFTAR LAMPIRAN

| Lampiran | Halaman |
|--|---------|
| 1. Alat dan Bahan Penelitian..... | 53 |
| 2. Pembuatan Konsentrasi Suspensi Ekstraksi Daun Kipahit | 54 |
| 3. Uji Aktivitas Bakteri Patogen | 55 |
| 4. Data Diameter Zona Hambat Bakteri Patogen | 57 |
| 5. Hasil Uji Fitokimia | 58 |
| 6. Hasil Uji Aktivitas Antibakteri | 59 |
| 7. Surat Selesai Penelitian | 62 |

I. PENDAHULUAN

1.1. Latar Belakang

Indonesia memiliki potensi perikanan yang sangat besar, baik budidaya di air tawar, air payau maupun air laut. Potensi kekayaan dibidang perikanan ini salah satunya adalah budidaya ikan. Salah satu kendala yang sering terjadi dalam usaha budidaya ikan ialah serangan penyakit bakterial. Afrianto dan Liviawaty (1992) menyatakan bahwa penyakit ikan merupakan segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Gangguan terhadap ikan ini dapat disebabkan oleh organisme lain, pakan maupun kondisi lingkungan yang kurang menunjang kehidupan ikan.

Kondisi sakit pada ikan terjadi sebagai akibat suatu keadaan yang mengakibatkan kondisi fisik, morfologi dan fungsi tubuh dari seekor ikan mengalami perubahan, disebabkan oleh faktor internal maupun eksternal. Ikan mudah terinfeksi oleh patogen, seperti parasit, jamur, virus dan bakteri, terutama melalui air pada area budidaya (Nurchahyo, 2014).

Organisme yang sering dijumpai di lingkungan akuatik serta memiliki keragaman morfologi, ekologi dan fisiologis yang jelas, salah satunya yaitu bakteri patogen. Bakteri patogen pada budidaya ikan memiliki sel berbentuk batang pendek dan bersifat gram negatif. Menurut Novriadi *et al.* (2014) penyakit yang ditimbulkan umumnya menunjukkan gejala septikemia dan borok. Adapun sebagian bakteri lainnya bervariasi antara lain memiliki sifat gram positif dan memiliki bentuk sel kokus atau batang. Genus bakteri penyebab utama penyakit infeksi bakterial pada ikan antara lain: *Mycobacterium*, *Aeromonas*, *Flavobacterium*, *Pseudomonas* dan *Vibrio*.

Penyakit yang disebabkan oleh bakteri ini merupakan salah satu tantangan yang dihadapi produksi perikanan budidaya. Menurut Yogananth *et al.* (2009) *Aeromonas hydrophila* merupakan bakteri Gram negatif yang bersifat patogen. Bakteri ini menginfeksi ikan dan menyebabkan penyakit penyakit bercak merah. Kemudian menurut Brooks *et al.* (2005) bakteri *Pseudomonas aeruginosa* ialah bakteri pembusukkan ikan yang merupakan bakteri gram negatif dan ditemukan di air, tanah, tumbuh-tumbuhan, manusia dan hewan. Sedangkan menurut Murdjani (2002) bakteri *Vibrio alginolyticus* merupakan bakteri patogen yang menyerang ikan yang menyebabkan kematian 100% pada ikan.

Upaya pengobatan terhadap penyakit bakterial yang menyerang ikan ini sering dilakukan dengan menggunakan antibiotik. Sudarmono (1986) mengatakan bahwa penggunaan terus menerus meningkat dapat menimbulkan berbagai masalah. Masalah terpenting adalah timbulnya galur bakteri resisten terhadap berbagai jenis antibiotik yang dapat menyebabkan pengobatan penyakit infeksi dengan antibiotik tidak lagi efisien atau bahkan menjadi lebih mahal.

Namun penggunaan antibiotik dapat menimbulkan dampak negatif pada ikan dan di lingkungan budidaya, sehingga perlu dicari alternatif menggunakan bahan-bahan dari alam. Menurut Foysal *et al.* (2011) penggunaan bahan alami sebagian besar dikenal mengandung senyawa antibakteri yang kuat dan dapat digunakan untuk mengendalikan ikan yang terinfeksi penyakit.

Salah satu tanaman alami yang dapat dijadikan sebagai antibakteri adalah tanaman kipahit. Aktivitas antibakteri dari ekstrak daun Kipahit ini terbukti dapat menghambat bakteri *Pseudomonas fluorescens* (Dana, 2019). Menurut Wardhana dan Diana (2014) tanaman Kipahit (*Tithonia diversifolia*) memiliki aktivitas antibakteri. Tanaman Kipahit mengandung senyawa flavanoid, glikosida, saponin dan tanin.

Berdasarkan hal tersebut, penulis tertarik ingin meneliti aktivitas antibakteri daun Kipahit terhadap bakteri patogen pada ikan yaitu *Aeromonas hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* dan *Vibrio alginolyticus*.

1.2. Rumusan Masalah

Berdasarkan uraian diatas dapat diperoleh rumusan masalah sebagai berikut :

1. Apakah daun Kipahit (*T. diversifolia*) memiliki aktivitas antibakteri terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* ?
2. Berapakah konsentrasi ekstrak daun Kipahit yang baik untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*.

1.3. Batasan Masalah

Batasan masalah dalam penelitian ini adalah aktivitas antibakteri dari ekstrak daun Kipahit dengan konsentrasi yang berbeda terhadap bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*.

1.4. Tujuan Penelitian

Adapun tujuan dari penelitian ini adalah sebagai berikut :

1. Mengetahui aktivitas antibakteri daun Kipahit untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*.
2. Mengetahui konsentrasi ekstrak daun Kipahit yang terbaik untuk menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*.

1.5. Manfaat Penelitian

Manfaat dari penelitian ini adalah memberikan informasi ilmiah terhadap ekstrak daun Kipahit yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*.

II. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. Kipahit (*Tithonia diversifolia*)

2.1.1. Klasifikasi dan Morfologi Tumbuhan Kipahit (*T. diversifolia*)

Kipahit merupakan tumbuhan asli dari Meksiko dan Amerika tengah. Kipahit tumbuh pada ketinggian 20 – 1500 mdpl dan merupakan tumbuhan yang toleransi pada pemangkasan berlebihan. Kipahit merupakan tumbuhan semak menahun dengan stolon di dalam tanah, tingginya dapat mencapai 9 meter. Daun berbentuk seperti telapak tangan dengan tepi daun bercangap menyirip. Daun Kipahit berwarna hijau cemerlang dan susunan daun berhadapan selang-seling. Bunga berbentuk tabung, mahkota bunga berwarna kuning, kepala sari berwarna hitam dan bagian atasnya berwarna kuning (Hakim, 2001).

Tanaman Kipahit mempunyai jenis daun tunggal. Letak daun ini di batang berselang-seling. Panjang daun Kipahit (*T. diversifolia*) ini sekitar 10 – 40 cm dengan lebar \pm 15 – 25 cm. Bagian ujung dan pangkal daun meruncing dan pertulangan daun menyirip. Daun Kipahit bewarna hijau dan memiliki 3 – 7 lekukan (Tona *et al.*, 2010).



Gambar 1. Daun Kipahit (*T. diversifolia*) (Dokumentasi pribadi)

Menurut Tania *et al.* (2016) bahwa klasifikasi tumbuhan Kipahit adalah sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
Divisi : Spermatophyta
Kelas : Dicotyledoneae
Sub Kelas : Metaclamideas
Ordo : Campanulate
Family : Asteraceae
Genus : *Tithonia*
Species : *Tithonia diversifolia*

2.1.2. Habitat dan Penyebaran Tumbuhan Kipahit (*T. diversifolia*)

Tanaman Kipahit (*T. diversifolia*) berasal dari negara Meksiko, sekarang tanaman ini banyak ditanam orang untuk diambil daunnya (Hutapea, 2000). Tanaman yang memiliki genus ini tersebar di seluruh Amerika Tengah dan Hindia Barat dan telah dinaturalisasi di sekitar daerah tropis sebagai spesies yang baru (Wanzala *et al.*, 2016)

Menurut Oludare dan Moughalu (2014) tumbuhan Kipahit adalah tanaman gulma yang invasif, tumbuh secara cepat dan banyak di sepanjang jalan setapak, lahan pertanian, dan pagar tanaman. Tanaman ini dapat digunakan untuk meningkatkan kesuburan tanah dan hasil panen. *T. diversifolia* merambat dari biji dan pertumbuhannya vegetatif. Benih berkecambah secara alam dan bibitnya dapat digali untuk kemudian ditransplantasikan di tempat lain.

2.1.3. Kandungan Daun Kipahit (*T. diversifolia*)

Daun Kipahit mengandung senyawa alkaloid, tanin, flavonoid, terpenoid dan saponin sedangkan pada bunga hanya mengandung senyawa saponin, flavonoid dan diterpenes dan pada bagian akar hanya mengandung senyawa alkaloid dan flavonoid (Odeyemi, 2014).

Tanaman Kipahit juga menunjukkan aktivitas sebagai anti bakteri, anti protozoa dan telah dicoba secara tradisional sebagai bahan pestisida alami untuk mengusir hama pertanian, belalang, dan kutu dengan hasil yang cukup efektif (Sulistijowati dan Gunawan, 2001).

Kandungan alkaloid dalam ekstrak etanol daun Kipahit mempunyai kemampuan antibakteri karena memiliki gugus aromatik kuartener yang mampu berinterkalasi dengan DNA. Selain itu alkaloid juga mampu mengganggu integritas komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri. Peptidoglikan merupakan komponen penyusun dinding sel bakteri sehingga adanya gangguan tersebut akan menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel (Rahman *et al.*, 2017).

Menurut Gutierrez *et al.* (2003) tanin adalah fenolat polimer yang larut dalam air yang mengendapkan protein. Tanin dapat menjadi racun bagi bakteri berfilamen. Tanin dapat mengikat dinding sel bakteri dan mencegah pertumbuhan dan aktivitas protease.

Senyawa saponin bersifat polar yaitu larut dalam air (hidrofilik). Sifat utama senyawa saponin adalah “sapo” dalam bahasa latin yang artinya sabun. Struktur senyawa saponin menyebabkan saponin bersifat seperti sabun sehingga saponin disebut surfaktan alami (Calabria, 2008). Saponin berfungsi sebagai zat

antibakteri, antijamur, antioksidan, dan antiinflamasi (Michael *et al.*, 2011). Senyawa saponin yang terkandung pada daun bidara dapat diperoleh melalui ekstraksi.

Senyawa flavonoid bersifat lipofilik yang akan merusak membran bakteri. Mekanisme kerja flavonoid sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria *et al.*, 2009). Kandungan flavonoid menyebabkan tanaman ini juga berpotensi sebagai antioksidan. Bagian tanaman *T. diversifolia* yang dimanfaatkan sebagai sumber zat kimia adalah daun, akar, batang, buah, dan biji (Verawati *et al.*, 2011).

Menurut Hasibuan dan Rosidanelli (2016) mekanisme senyawa terpenoid sebagai antibakteri adalah dengan membentuk ikatan polimer yang kuat dengan porin sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin mengakibatkan sel bakteri mengalami kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhan bakteri tersebut terhambat. Dinding sel yang rusak menyebabkan senyawa metabolit sekunder dapat masuk ke dalam membran sel dan mengakibatkan kerusakan sel.

2.2. Proses Ekstraksi

Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu zat berdasarkan perbedaan sifat tertentu, terutama kelarutannya terhadap dua cairan tidak saling larut yang berbeda. Pada umumnya ekstraksi dilakukan dengan menggunakan pelarut yang didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran, biasanya air dan yang lainnya pelarut organik. Bahan yang akan diekstrak

biasanya berupa bahan kering yang telah dihancurkan, biasanya berbentuk bubuk atau simplisia (Sembiring, 2007).

Proses ekstraksi pada dasarnya merupakan proses perpindahan massa dari komponen zat padat yang terdapat pada simplisia ke dalam pelarut organik yang digunakan. Pelarut organik akan menembus dinding sel dan selanjutnya akan masuk ke dalam rongga sel tumbuhan yang mengandung zat aktif. Zat aktif akan terlarut dalam pelarut organik pada bagian luar sel untuk selanjutnya berdifusi masuk ke dalam pelarut. Proses ini terus berulang sampai terjadi keseimbangan konsentrasi zat aktif antara di dalam sel dengan konsentrasi zat aktif di luar sel (Marjoni, 2016).

Marjoni (2016) juga menambahkan bahwa ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai metode dan cara yang sesuai dengan sifat dan tujuan ekstraksi itu sendiri. Sampel yang akan diekstraksi dapat berbentuk sampel segar ataupun sampel yang telah dikeringkan. Sampel yang umum digunakan adalah sampel segar karena penetrasi pelarut akan berlangsung lebih cepat. Selain itu penggunaan sampel segar dapat mengurangi kemungkinan terbentuknya polimer resin atau artefak lain yang dapat terbentuk selama proses pengeringan. Penggunaan sampel kering juga memiliki kelebihan yaitu dapat mengurangi kadar air yang terdapat di dalam sampel, sehingga dapat mencegah kemungkinan rusaknya senyawa akibat aktivitas antimikroba. Tujuan dari ekstraksi adalah untuk menarik semua zat aktif dan komponen kimia yang terdapat dalam simplisia.

Menurut Mukhriani (2014) pembuatan ekstrak khususnya bahan yang berasal dari tumbuhan memiliki tahapan sebagai berikut : (1) Pengelompokan bagian tumbuhan (daun, batang, bunga dan lainnya) kemudian dilakukan

pengeringan dan penggilingan bagian tumbuhan yang telah dipisahkan, (2) Pemilihan pelarut, ini digunakan untuk memisahkan zat aktif. Pelarut yang dipilih secara selektif tergantung pada zat aktif yang diharapkan, (3) Pemisahan dan pemurnian, proses ini merupakan pemisahan zat aktif yang diharapkan sehingga didapatkan ekstrak murni, (4) Pengeringan ekstrak, proses ini bertujuan untuk menghilangkan pelarut dari bahan sehingga menghasilkan massa kering keruh, (5) Rendemen merupakan perbandingan antara ekstrak yang diperoleh dengan simplisia awal.

Maserasi

Maserasi merupakan metode sederhana yang paling banyak digunakan. Cara ini sesuai, baik untuk skala kecil maupun skala industri (Agoes, 2007). Menurut Marjoni (2016) maserasi merupakan salah satu metoda ekstraksi yang dilakukan dengan cara merendam simplisia nabati menggunakan pelarut tertentu selama waktu tertentu dengan sesekali dilakukan pengadukan atau penggojokan.

Ekstraksi dengan metode maserasi memiliki kelebihan yaitu terjaminnya zat aktif yang diekstrak tidak akan rusak (Pratiwi, 2010). Kemudian Agoes (2007) menambahkan bahwa metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk tanaman dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah inert yang tertutup rapat pada suhu kamar. Proses ekstraksi dihentikan ketika tercapai kesetimbangan antara konsentrasi senyawa dalam pelarut dengan konsentrasi dalam sel tanaman. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Kerugian utama dari metode maserasi ini adalah memakan banyak waktu, pelarut yang digunakan cukup banyak, dan besar kemungkinan beberapa senyawa hilang. Selain itu, beberapa senyawa mungkin saja sulit diekstraksi pada suhu kamar.

Namun di sisi lain, metode maserasi dapat menghindari rusaknya senyawa-senyawa yang bersifat termolabil.

Pelarut

Pemilihan pelarut merupakan salah satu faktor yang penting dalam proses ekstraksi. Jenis pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi mempengaruhi jenis komponen aktif bahan yang terekstrak karena masing-masing pelarut mempunyai selektifitas yang berbeda untuk melarutkan komponen aktif dalam bahan. Menurut Perry (1984), berbagai syarat pelarut yang digunakan dalam proses ekstraksi, yaitu sebagai berikut: 1) Memiliki daya larut dan selektivitas terhadap solute yang tinggi, 2) Bersifat inert terhadap bahan baku, sehingga tidak bereaksi dengan komponen yang akan diekstrak, 3) Reaktivitas. Pelarut tidak menyebabkan perubahan secara kimia pada komponen bahan ekstraksi, 4) Tidak menyebabkan terbentuknya emulsi, 5) Tidak korosif, 6) Tidak beracun, 7) Tidak mudah terbakar, 7) Stabil secara kimia dan termal, 8) Tidak berbahaya bagi lingkungan, 9) Memiliki viskositas yang rendah, sehingga mudah untuk dialirkan, 10) Murah dan mudah didapat, serta tersedia dalam jumlah yang besar, 11) Memiliki titik didih yang cukup rendah agar mudah diuapkan. Memiliki tegangan permukaan yang cukup rendah.

Pelarut yang dapat digunakan pada maserasi adalah air, etanol, etanol-air atau eter. Pilihan utama untuk pelarut pada maserasi adalah etanol karena etanol memiliki beberapa keunggulan sebagai pelarut diantaranya menurut yaitu: a) Etanol bersifat lebih selektif, b) Dapat menghambat pertumbuhan kapang dan

kuman, c) Bersifat non toksik (tidak beracun), d) Etanol bersifat netral, e) Memiliki daya absorpsi yang baik, f) Dapat bercampur dengan air pada berbagai perbandingan, g) Panas yang diperlukan untuk pemekatan lebih sedikit, h) Etanol dapat melarutkan berbagai zat aktif dan meminimalisir terlarutnya zat pengganggu seperti lemak (Marjoni, 2016).

2.3. Pengujian Aktivitas Antibakteri

Antibakteri merupakan senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme ini bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi dan mencegah pembusukan dan perusakan bahan oleh mikroorganisme (Sulistyo, 1971).

Penentuan kerentanan suatu patogen bakteri terhadap obat antimikroba dapat dilakukan dengan salah satu di antara dua metode utama yaitu difusi dan difusi. Penting untuk menggunakan metode standar yang mengontrol semua faktor yang memengaruhi aktivitas antimikroba (Jawetz *et al.*, 2010).

Metode Difusi

Penentuan aktivitas antibakteri dengan metode difusi didasarkan pada kemampuan difusi dari zat antimikroba dalam lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan mikroba uji. Hasil pengamatan yang akan diperoleh berupa ada atau tidaknya zona hambatan yang akan terbentuk disekeliling zat antimikroba pada waktu tertentu masa inkubasi (Brooks *et al.*, 2007). Metode ini dapat dilakukan dengan 3 cara sebagai berikut :

- 1) Cara Cakram (*Disc diffusion*)

Menurut Pelczar dan Chan (1988) cara ini merupakan cara paling sering digunakan untuk menentukan kepekaan kuman terhadap berbagai macam obat-obatan. Pada cara ini kertas cakram berfungsi sebagai tempat menampung zat antimikroba. Kertas cakram diletakkan pada lempeng agar yang telah diinokulasi mikroba uji, kemudian diinkubasi pada waktu tertentu dengan suhu tertentu, sesuai dengan kondisi optimum dari mikroba uji. Pada umumnya, hasil yang diperoleh setelah diinkubasi selama 18 – 24 jam dengan suhu 33 – 37 °C ialah berupa zona bening yang terbentuk disekeliling kertas cakram yang menunjukkan zona hambat pada pertumbuhan bakteri.

2) Cara Parit (*Ditch*)

Suatu lempeng agar yang telah diinokulasikan dengan bakteri uji dibuat sebidang parit. Parit tersebut berisi zat antimikroba, kemudian diinkubasi pada waktu dan suhu optimum yang sesuai dengan mikroba uji. Hasil dari pengamatan ini adalah diperoleh berupa adanya ada tidaknya zona hambat yang terbentuk disekitaran parit (Bonang, 1992).

3) Cara Sumur (*Hole/cup*)

Pada lempeng agar yang telah diinokulasi dengan bakteri uji dibuat suatu lubang yang selanjutnya diisi dengan zat antimikroba uji. Kemudian setiap lubang itu diisi dengan zat uji. Setelah diinkubasi pada suhu dan waktu tertentu dengan mikroba uji dilakukan pengamatan dengan melihat ada atau tidaknya zona hambat di sekeliling lubang (Bonang, 1992).

Metode Dilusi

Cara ini digunakan untuk menentukan KHM (Kadar Hambat Minimal) dan KBM (Kadar Bunuh Minimal) dari obat antimikroba. Prinsip dari Metode Dilusi menggunakan satu seri tabung reaksi yang diisi media cair dan sejumlah tertentu sel mikroba yang diuji. Kemudian masing-masing tabung diisi dengan obat yang telah diencerkan secara serial. Selanjutnya, seri tabung diinkubasi pada suhu 37 °C selama 18 – 24 jam dan diamati terjadinya kekeruhan pada tabung. Konsentrasi terendah obat pada tabung yang ditunjukkan dengan hasil biakan yang mulai tampak jernih (tidak ada pertumbuhan mikroba) adalah KHM dari obat. Selanjutnya biakan dari semua tabung yang jernih di inokulasikan pada media agar padat, di inkubasikan dan keesokan harinya diamati ada tidaknya koloni mikroba yang tumbuh. Konsentrasi terendah obat pada biakan padat yang ditunjukkan dengan tidak adanya pertumbuhan koloni mikroba adalah KBM dari obat terhadap bakteri uji (Dzen, 2003).

2.4. Bakteri Patogen

Bakteri adalah mikroba prokariotik yang uniseluler dan berkembangbiak dengan cara aseksual dengan pembelahan sel. Bakteri tidak berklorofil namun ada yang bersifat fotosintetik, kemudian bakteri hidup secara bebas, parasit, saprofit, sebagai patogen pada manusia, hewan dan tumbuhan. Habitatnya terdapat dimana-mana misalnya di alam, tanah, laut, atmosfer dan di dalam lumpur. Ukuran sel-sel bakteri sangat bervariasi tergantung masing-masing spesiesnya, namun pada umumnya 0,5 – 1,0 x 2,0 – 5 µm. Hal tersebut sama halnya dengan 10.000 bakteri yang panjang selnya 1 µm dari satu ujung ke ujung lainnya (Alimuddin, 2005).

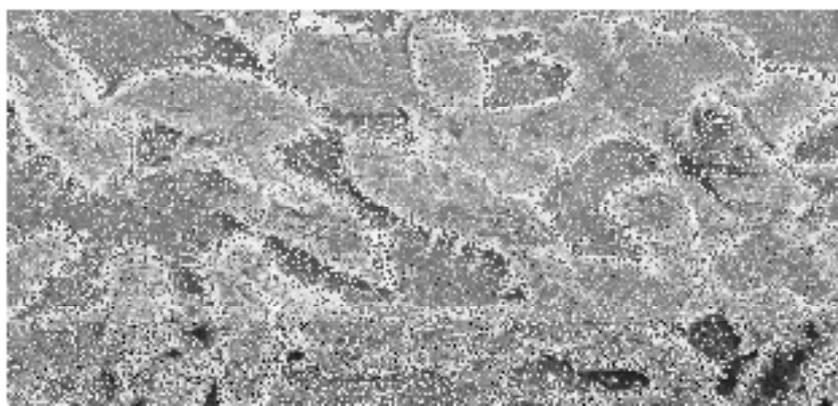
Pelczar dan Chan (1988) bakteri patogen adalah bakteri yang mampu menyebabkan penyakit. Bakteri patogen dapat menyebar melalui populasi manusia dalam berbagai cara. Pengobatan infeksi yang disebabkan bakteri patogen melibatkan penggunaan antibiotik, obat yang telah diformulasikan khusus untuk membunuh bakteri.

2.4.1. *Aeromonas hydrophila*

Menurut Krieg dan Holt (1984) klasifikasi dari *A. hydrophila* adalah sebagai berikut :

- Filum : Protophyta
- Kelas : Schizomycetes
- Ordo : Pseudomonadales
- Famili : Vibrionaceae
- Genus : *Aeromonas*
- Species : *Aeromonas hydrophila*

A. hydrophila merupakan bakteri *heterotrofik uniseluler*, tergolong protista prokariot yang dicirikan dengan tidak adanya membran yang memisahkan inti dengan sitoplasma. Bakteri ini biasanya berukuran $0,7 - 1,8 \times 1,0 - 1,5 \mu\text{m}$ dan bergerak menggunakan sebuah polar flagel (Kabata, 1985 dalam Haryani *et al.*, 2012).



Gambar 2. *A. hydrophila* (Anonim, 2013)

Bakteri *A. hydrophila* termasuk Gram negatif, berbentuk batang pendek, bersifat aerob dan fakultatif anaerob, tidak berspora, motil mempunyai satu flagel, hidup pada kisaran suhu 25-30 °C. Serangan bakteri ini dapat mengakibatkan gejala penyakit hemorhagi septicaemia yang mempunyai ciri luka di permukaan tubuh, insang, ulser, abses, eksoptalmia dan perut gembung serta gastroenteritis, diare dan extra intestinal pada manusia (Lukistyowati dan Kurniasih, 2012).

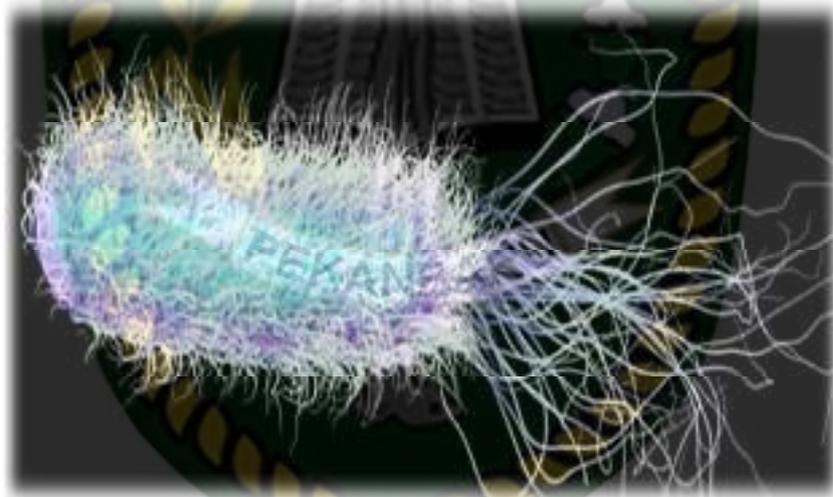
Menurut Lubis *et al.*, (2014) *A. hydrophila* adalah bakteri yang umum menyerang yang ikan, baik ikan air tawar maupun air laut. *A. hydrophila* telah ditemukan pada berbagai jenis ikan air tawar di seluruh dunia, dan ada kalanya pada ikan laut. Terdapat pandangan yang berbeda tentang pengaruh yang tepat dari bakteri *A. hydrophila* sebagai patogen ikan. Beberapa peneliti menetapkan bahwa organisme ini hanya sebagai penyerang sekunder pada inang yang lemah, sedang yang lain menyatakan *A. hydrophila* adalah suatu patogen utama ikan air tawar.

2.4.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Pemberian nama bakteri *P. aeruginosa* memakai sistem penamaan binomial. Klasifikasi dari *P. aeruginosa* menurut Siegrist (2010) adalah sebagai berikut :

Kingdom : Bacteria

Phylum : Proteobacteria
Class : Gamma Proteobacteria
Order : Pseudomonadales
Family : Pseudomonadaceae
Genus : Pseudomonas
Species : *Pseudomonas aeruginosa*



Gambar 3. *P. aeruginosa* (Anonim, 2021)

Bakteri *P. aeruginosa* mempunyai ciri-ciri sebagai berikut : warna koloni kuning dengan diameter 2,42 mm mempunyai bentuk sel batang, dan bersifat motil. Karakteristik biokimia adalah reaksi gram negatif, oksidase, produksi indol, penggunaan karbon dari citrat negatif dan positif terhadap katalase. Bakteri ini secara luas dapat ditemukan di alam, contohnya di tanah, air, tanaman, dan hewan. Bakteri *P. aeruginosa* adalah patogen oportunistik (Strohl, 2001).

Bakteri patogen yang bersifat oportunistik seperti *P. aeruginosa*, kemunculan penyakit dimulai dengan adanya gangguan atau kelainan dari sistem pertahanan tubuh yang normal (Todar, 2012). Bakteri ini menempel dan membentuk koloni pada membran mukosa atau kulit, menginvasi secara lokal, dan menyebabkan penyakit sistemik (Brooks *et al.*, 2013).

Todar (2012) juga menambahkan bahwa Kebanyakan infeksi oleh *Pseudomonas* bersifat invasif dan toksinogenik. Infeksi *Pseudomonas* yang paling utama, terjadi dalam 3 fase berbeda, yaitu : (1) perlekatan bakteri dan kolonisasi; (2) invasi lokal; (3) penyebaran penyakit sistemik. Faktor penentu patogenitas sangat berperan dalam fase-fase ini dan juga memberikan pengaruh utama pada sindrom asindroma khas yang muncul bersama dengan penyakit yang timbul.

Pengobatan bakteri *P. aeruginosa* tidak boleh dengan terapi obat tunggal karena tingkat keberhasilan rendah dan bakteri dengan cepat menjadi resisten. Pola kepekaan bakteri ini bervariasi secara geografik. Antibiotik yang aktif terhadap bakteri *P. aeruginosa* antara lain aztreonam, imipinem, kuinolon baru, termasuk ciprofloxacin (Jawetz *et al.*, 1986).

2.4.3. *Vibrio alginolyticus*

Bakteri *V. alginolyticus* merupakan gram negatif yang dapat menggunakan sejumlah komponen seperti satu-satunya sumber karbon dan energi tanpa membutuhkan vitamin atau *growth factor*. Banyak juga yang hidup pada kisaran suhu 4 – 42 °C dan dapat menetap selama berminggu-minggu di dalam lingkungan basah dengan sedikit atau tanpa makanan. Karakteristik ini menjelaskan mengapa vibrio adalah sebuah pathogen opportunistic yang efektif

(Brogden *et al.*, 2000). Adapun klasifikasi dari bakteri *V. alginolyticus* adalah sebagai berikut :

Kingdom : Bakteri
Filum : Proteobacteria
Kelas : Gammaproteobacteria
Order : Vibrionales
Famili : Vibrionaceae
Genus : *Vibrio*
Species : *Vibrio alginolyticus*



Gambar 4. *V. alginolyticus* (Anonim, 2021)

Jenis bakteri *V. alginolyticus* merupakan salah satu bakteri penyebab penyakit vibriosis, dimana penyebaran penyakit ini dapat melalui udang, kepiting dan ikan (Wei dan Wendy, 2012). Menurut Austin (1988) bakteri *V. alginolyticus* memiliki ciri-ciri berwarna kuning dan diameter 3-5 μ m. Karakteristik biokimia adalah mempunyai sifat fermentatif, katalase, oksidase, methyl red, H₂S, glukosa, laktosa, dan manitol positif. Sedangkan sellobiosa, fruktosa dan galaktosa negatif.

Menurut Murdjani (2002) ada beberapa jenis bakteri *Vibrio* yang hidupnya berasosiasi dengan kerapu bebek yang antara lain *V. alginolyticus*, *V. anguillarum* dan *V. fuscus* yang mana keganasan *V. alginolyticus* dan *V. anguillarum* dapat menyebabkan kematian larva kerapu bebek. Bahkan *V. alginolyticus* dapat menyebabkan kematian larva hingga 100 %.



III. METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Penelitian

Penelitian ini akan dilaksanakan di Laboratorium Balai Benih Ikan Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau pada bulan Januari – Maret 2021.

3.2. Alat dan Bahan Penelitian

3.2.1. Alat Penelitian

Adapun alat yang dibutuhkan dalam melakukan penelitian ini antara lain :

Tabel 3.1. Alat Penelitian

| No. | Nama Alat | Jumlah | Fungsi |
|-----|-------------------------|---------|--|
| 1 | Tabung Reaksi | 6 Buah | Tempat media agar miring |
| 2 | Cawan Petri | 15 Buah | Tempat media agar |
| 3 | Timbangan analitik | 1 Unit | Menimbang bahan yang dibutuhkan |
| 4 | Kaca arloji | 1 Unit | wadah media untuk penimbangan |
| 5 | Sendok | 1 Buah | Mengambil bahan yang dibutuhkan |
| 6 | Gelas ukur 250 ml | 1 Buah | Menakar aquades |
| 7 | Gelas ukur 25 ml | 1 Buah | Menakar agar yang masih cair |
| 8 | Erlemeyer 250 ml | 1 Buah | Wadah memanaskan media |
| 9 | Erlemeyer 50 ml | 19 Buah | Wadah memanaskan media di autoclave dan kultur bakteri patogen |
| 10 | <i>Hot plate</i> | 1 Unit | Memanaskan media yang dibutuhkan |
| 11 | <i>Magnetic stirrer</i> | 1 Buah | Mengaduk media saat pemanasan di hot plate |
| 12 | Aluminium Foil | 1 roll | Menutup Wadah media yang digunakan |
| 13 | Rak tabung reaksi | 2 Buah | Tempat meletakkan tabung reaksi |
| 14 | <i>Laminar air flow</i> | 1 Unit | Tempat menanam dan infeksi bakteri patogen |
| 15 | Beaker glass 20 ml | 7 Buah | Wadah kertas cakram dan cakram antibiotik yang digunakan |
| 16 | <i>Autoclave</i> | 1 Unit | Sterilisasi alat dan bahan yang digunakan |
| 17 | Vortex | 1 Unit | menghomogenkan suspensi ekstrak |

| | | | |
|----|--------------------------|----------|---|
| 18 | Jarum ose | 2 Buah | Infeksi bakteri patogen ke media agar |
| 19 | Bunsen | 2 Buah | Sterilisasi jarum ose |
| 20 | Pinset | 1 Buah | Mengambil kertas cakram |
| 21 | Micro pipet 10-100 | 1 Buah | Mengambil sampel ekstrak bakteri ke media agar |
| 22 | Micro pipet 100-1000 | 1 Buah | Mengambil sampel ekstrak daun kipahit |
| 23 | Botol selai kaca | 4 buah | Penyimpanan ekstrak daun Kipahit |
| 24 | Botol vial | 5 Buah | Wadah stok konsentrasi ekstrak daun Kipahit |
| 25 | Plat tetes | 1 Buah | Wadah kertas cakram yang akan ditetesi oleh ekstrak daun Kipahit |
| 26 | <i>Rotary evaporator</i> | 1 Buah | Mengekstraksi daun Kipahit |
| 27 | <i>Incubator</i> | 1 Unit | Tempat inkubasi dan pembiakan bakteri |
| 28 | Jangka sorong | 1 Unit | Mengukur diameter daya hambat terhadap bakteri patogen |
| 29 | Sarung tangan anti panas | 1 pasang | Melindungi tangan saat memegang alat dan bahan yang masih panas setelah proses sterilisasi di autoclave |

3.2.2. Bahan Penelitian

Bahan yang diperlukan dalam melakukan penelitian ini antara lain :

Tabel 3.2. Bahan Penelitian

| No. | Nama Bahan | Fungsi |
|-----|--|---|
| 1 | Ekstrak daun Kipahit | Bahan sampel uji |
| 2 | Etanol 95 % | Mengekstraksi ekstrak daun Kipahit |
| 3 | Metanol | Melarutkan ekstrak |
| 4 | Kertas cakram | Uji antagonis |
| 5 | Kertas cakram antibiotik oksitetrasiklin | kontrol positif uji antagonis |
| 6 | Aquades | Pelarut media agar dan broth |
| 7 | spiritus | Bahan bakar bunsen |
| 8 | Alkohol | Sterilisasi |
| 9 | Nutrien Agar (NA) | Media isolasi, kultur dan pemurnian bakteri patogen |

| | | |
|----|---------------------------------------|--|
| 10 | Nutrien Broth | Media pemurnian bakteri |
| 11 | Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i> | Bakteri patogen uji antagonis |
| 12 | Bakteri <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | Bakteri patogen uji antagonis |
| 13 | Bakteri <i>Vibrio alginolyticus</i> | Bakteri patogen uji antagonis |
| 14 | Tissu | Untuk mengeringkan alat penelitian |
| 15 | Kloroform 0,05 N | Uji alkaloid |
| 16 | H ₂ SO ₄ 2N | Uji alkaloid dan uji terpenoid/steroid |
| 17 | Mayer | Uji alkaloid |
| 18 | Dragendorff | Uji alkaloid |
| 19 | Serbuk magnesium | Uji flavonoid |
| 20 | Acetic acid | Uji terpenoid/steroid |
| 21 | FeCl ₃ 1 % | Uji fenolik |
| 22 | HCl 37% | Uji flavonoid |
| 23 | Aquades | Sebagai pelarut NA, NB dan uji fitokimia |
| 24 | Sarung tangan latex | Melindungi tangan dari kotoran dan mengurangi risiko kontaminasi |

3.3. Hasil Uji Pendahuluan Aktivitas Antibakteri

Uji pendahuluan bertujuan untuk mengetahui apakah ekstrak daun Kipahit terhadap bakteri patogen (*A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*) memiliki aktivitas antibakteri atau tidak. Konsentrasi ekstrak daun Kipahit yang digunakan pada uji pendahuluan ini adalah 50%. Uji pendahuluan ini menghasilkan bahwa ekstrak daun Kipahit dengan konsentrasi 50% memiliki aktivitas antibakteri yang menunjukkan terbentuknya zona hambat (zona bening) pada bakteri *A. hydrophila* sebesar 28 mm, *P. aeruginosa* sebesar 29 mm dan *V. alginolyticus* sebesar 29 mm pada area sekitar kertas cakram yang diletakkan pada media. Efektivitas daya hambat ini tergolong sangat kuat. Hasil penelitian pendahuluan tersebut digunakan untuk menentukan konsentrasi perlakuan pada penelitian ini.

3.4. Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) yang dilakukan dengan 5 perlakuan dan 2 kali ulangan. Menurut Lake *et al.* (2017) Rancangan Acak Lengkap (RAL) merupakan jenis rancangan percobaan yang paling sederhana. Pada umumnya, rancangan ini biasa digunakan untuk percobaan yang memiliki media atau lingkungan percobaan yang seragam. Perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini adalah perbedaan konsentrasi ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) sebagai berikut :

- P1 = Ekstrak daun Kipahit konsentrasi 10 %
- P2 = Ekstrak daun Kipahit konsentrasi 20%
- P3 = Ekstrak daun Kipahit konsentrasi 30%
- P4 = Ekstrak daun Kipahit konsentrasi 40%
- P5 = Ekstrak daun Kipahit konsentrasi 50%

Rancangan penelitian ini dilakukan 2 tahap, sebagai berikut :

1. Tahap pertama melakukan eksperimental laboratorium dengan cara daun Kipahit (*T. diversifolia*) diekstraksi dengan metode maserasi dengan menggunakan pelarut etanol 95%. Ekstrak daun Kipahit ini menentukan aktivitas sediaan ekstrak daun Kipahit sebagai kandidat antibakteri.
2. Tahap kedua melakukan penelitian dengan kertas cakram, dimana teknik ini media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri patogen (*A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*), kemudian dimasukkan kertas cakram pada media yang telah diisi ekstrak uji.

3.5. Prosedur Penelitian

3.5.1. Pengambilan Sampel Daun kipahit (*T. diversifolia*)

Daun Kipahit (*T. diversifolia*) sebagai sampel penelitian diperoleh di sekitaran Jalan Kamang Mudiak Jorong Rawang Bunian Kecamatan Tilatang Kamang Kabupaten Agam Sumatera Barat.

3.5.2. Ekstraksi Daun Kipahit (*T. diversifolia*)

Daun Kipahit (*T. diversifolia*) diperoleh dari tanaman Kipahit yang tumbuh liar di Jalan Kamang Mudiak Jorong Rawang Bunian Kecamatan Tilatang Kamang Kabupaten Agam Sumatera Barat. Kemudian daun Kipahit ini dikeringkan dengan suhu ruangan dan tidak terkena oleh cahaya matahari secara langsung selama 10 hari sampai daun tersebut mudah hancur seperti kerupuk. Kemudian daun tersebut diblender hingga menjadi serbuk. Serbuk daun Kipahit dimasukkan ke dalam erlemeyer berukuran 1L dicampur dengan pelarut etanol 95% hingga serbuk daun tersebut terendam semua dan tutup dengan aluminium foil dengan rapat agar tidak menguap. Perendaman menggunakan pelarut etanol ini diharapkan dapat menarik zat-zat aktif yang bersifat polar (dibutuhkan) dan perendaman ini dilakukan selama 2 hari. Setelah 2 hari, hasil maserasi atau perendaman disaring menggunakan kapas saring untuk memisahkan larutan dengan endapannya. Proses ini dilakukan pengulangan kembali agar mendapatkan ekstrak daun lebih banyak.

Hasil saringan tersebut diuapkan (evaporasi) dengan suhu 40 °C untuk mendapatkan ekstrak murni dari daun Kipahit. Proses penguapan ini menggunakan alat *rotary evaerator*. Setelah mendapatkan ekstrak murni daun dari proses evaporasi, ekstrak dimasukkan kedalam botol selai kaca dan ditutup

menggunakan tisu agar penguapannya maksimal. Jika ekstrak daun tersebut tidak banyak memiliki kandungan etanol, maka tutup rapat menggunakan tutup botol selai kaca.

3.5.3. Pembuatan Konsentrasi Suspensi Ekstraksi Daun Kipahit (*T. diversifolia*)

Konsentrasi suspensi ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) yang akan digunakan adalah konsentrasi 10%, 20%, 30%, 40%, dan 50% dengan cara :

1. Konsentrasi 10 % (0,2 g ekstrak daun Kipahit + 2 ml metanol)
2. Konsentrasi 20 % (0,4 g ekstrak daun Kipahit + 2 ml metanol)
3. Konsentrasi 30 % (0,6 g ekstrak daun Kipahit + 2 ml metanol)
4. Konsentrasi 40 % (0,8 g ekstrak daun Kipahit + 2 ml metanol)
5. Konsentrasi 50 % (1 gr ekstrak daun Kipahit + 2 ml metanol)

3.5.4. Sterilisasi Alat dan Bahan

Kegiatan penelitian ini sangat perlu dilakukan sterilisasi alat yang akan digunakan agar tidak terjadi kontaminasi terhadap bakteri patogen yang akan dikultur. Sterilisasi alat penelitian dilakukan sebelum melakukan kultur bakteri dan uji aktivitas bakteri. Adapun proses sterilisasi alat dan bahan penelitian sebagai berikut :

- Alat penelitian yang terbuat dari kaca dicuci dengan sabun dan dibilas dengan air hingga bersih, kemudian dikeringkan dengan menggunakan tisu kering. Setelah itu alat yang akan disterilkan dibungkus dengan plastik bening dengan memberi beberapa lubang agar uap air keluar. Alat dimasukkan ke dalam autoclave selama 30 menit pada suhu 121 °C.

- Kemudian di samping itu aquades yang akan disterilkan dengan memasukkan aquades ke dalam erlenmeyer sebanyak kebutuhan, kemudian tutup erlenmeyer menggunakan aluminium foil dan dimasukkan ke dalam autoclave selama 15 menit pada suhu 121 °C.

Waktu yang diperlukan untuk sterilisasi tergantung pada sifat bahan yang disterilkan, tipe wadah dan volume bahan. Kondisi yang baik digunakan untuk sterilisasi adalah pada 15 Psi dan temperatur 121 °C selama 15 menit. Agar penggunaan autoklaf efektif, uap air harus dapat menembus setiap alat yang disterilkan. Oleh karena itu, autoklaf tidak boleh terlalu penuh, agar uap air benar-benar menembus semua area (Adji *et al.*, 2007).

3.5.5. Peremajaan Bakteri Patogen

Proses peremajaan bakteri patogen merupakan proses penanaman ulang bakteri patogen yang sebelumnya sudah ada ke media yang baru untuk mempertahankan ketersediaan bakteri tersebut. Proses peremajaan bakteri ini dilakukan pada media agar miring. Bakteri patogen yang akan digunakan untuk peremajaan bakteri patogen adalah *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*. Adapun proses pembuatan media agar miring sebagai berikut :

- Siapkan alat dan bahan yang akan digunakan seperti 6 buah tabung reaksi yang telah disterilisasi, sendok, timbangan analitik, erlenmeyer 100 ml, *magnetic stirrer*, aluminium foil, *hot plate*, Nutrien Agar (NA), aquades dan *autoclave*.
- Nutrien Agar (NA) ditimbang sebanyak 1,08 gram kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer yang berukuran 100 ml. Lalu tambahkan aquades sebanyak

54 ml dan masukkan *magnetic stirrer*. Kemudian tutup erlenmeyer menggunakan aluminium foil.

- Kemudian larutkan sampai homogen dan dipanaskan hingga mendidih dengan menggunakan *hot plate* dengan suhu 200 °C.
- Setelah mendidih, angkat dan dinginkan sebentar, kemudian masukkan ke dalam *autoclave* untuk disterilisasi selama 20 menit pada suhu 121 °C.
- Setelah media Nutrien Agar (NA) disterilisasi menggunakan autoclave, pindahkan ke *Laminar air flow*. Tuangkan media ke dalam tabung reaksi sebanyak 9 ml, kemudian miringkan tabung reaksi tersebut hingga NA padat/mengeras.
- Kemudian tanam bakteri patogen masing-masing dua kali ulangan dengan metode gores zig-zag menggunakan jarum ose.
- Beri nama bakteri pada setiap tabung reaksi sesuai dengan bakteri patogen yang ditanamkan.
- Kemudian inkubasi selama 24 jam dengan suhu 30 °C di dalam inkubator.

3.5.6. Kultur Bakteri Patogen pada Nutrient Broth (NB)

Nutrient Broth (NB) merupakan salah satu media yang digunakan untuk kultur bakteri dan patogen yang berbentuk cair. Adapun cara pembuatan media NB untuk 3 tabung erlenmeyer adalah sebagai berikut :

- Nutrient Broth (NB) ditimbang sebanyak 0,24 gr dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berukuran 50 ml.
- Kemudian tambahkan aquades sebanyak 30 ml dan masukkan *magnetic storer*, tutup erlenmeyer tersebut dengan menggunakan aluminium foil lalu homogenkan.

- Setelah itu panaskan di atas *hot plate* dengan suhu 200 °C hingga mendidih.
- Setelah mendidih angkat dan diamkan sebentar, kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer yang berukuran 30 ml sebanyak 3 buah yang masing-masing diisi dengan 10 ml NB.
- Lalu tutup dengan aluminium foil dan sterilkan pada *autoclave* selama 20 menit hingga suhu mencapai 121 °C.
- Setelah media NB sterilkan menggunakan *autoclave*, dinginkan di dalam *Laminar air flow*.
- Kemudian tanam bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* yang telah diremajakan dengan menggunakan jarum ose steril untuk masing-masing erlenmeyer yang telah berisi NB tersebut.
- Lalu tutup erlenmeyer menggunakan aluminium foil dan masukkan ke dalam inkubator untuk proses inkubasi dalam suhu 30 °C selama 24 jam.

3.5.7. Uji Aktivitas Antibakteri

Metode yang digunakan dalam uji aktivitas bakteri ini adalah metode difusi cakram. Bakteri patogen *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* yang digunakan diperoleh dari Laboratorium Balai Benih Ikan Fakultas Pertanian Universitas Islam Riau. Adapun cara uji aktivitas bakteri dengan menggunakan metode cakram adalah sebagai berikut ;

- Pembuatan Nutrien Agar (NA) yang digunakan untuk kultur bakteri patogen yang berbentuk. Pembuatan media NA untuk 15 buah cawan petri dengan cara menimbang NA sebanyak 4,5 gram kemudian masukkan ke dalam erlenmeyer yang berukuran 250 ml.

- Kemudian tambahkan aquades sebanyak 225 ml dan homogenkan, lalu masukkan *magnetic stirer*. Setelah itu erlenmeyer ditutup dengan menggunakan aluminium foil dan sterilkan selama 20 menit di *autoclave* pada suhu 121 °C .
- Setelah disterilisasi, media NA diletakkan pada *Laminar air flow* dan biarkan media NA suhunya turun menjadi 40 °C atau hangat kuku.
- Kemudian tanam bakteri patogen yang telah dikultur pada media NB sebelumnya dengan cara mengambil suspensi bakteri dengan mikropipet dan teteskan sebanyak 30 µL ke dalam erlenmeyer. Lalu homogenkan dan setelah itu tuang ke dalam cawan petri diratakan pada media dan didiamkan selama 30 menit.
- Setelah itu kertas cakram ditetesi dengan ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) sebanyak 30 µL.
- Tunggu kertas cakram agak mengering dan diletakkan di atas media dan sedikit ditekan dengan menggunakan pinset supaya menempel pada media NA.
- Kemudian diberi label pada sisi luar cawan petri dan diinkubasi selama 24 jam dengan suhu 30 °C.

Hasil inkubasi setelah 24 jam berupa zona bening yang berada disekitar kertas cakram yang menunjukkan ada tidaknya pertumbuhan bakteri diinterpretasikan sebagai zona hambat. Penelitian ini menggunakan metode tes Kirby Bauer atau dikenal dengan difusi cakram yang terdiri dari satu kertas cakram antibiotik (+), satu kertas cakram kontrol (-) dan dua kertas cakram yang

ditetesi ekstrak daun kipahit dengan konsentrasi yang telah ditentukan. Hal ini dapat dilihat lebih jelas pada Gambar 5.



Gambar 5. Metode Difusi Cakram

Zona hambat yang terbentuk selama 24 jam tersebut dapat diukur dengan menggunakan jangka sorong dan diinterpretasikan kekuatan zona hambatnya. Adanya aktivitas antibakteri terhadap bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* yang ditandai dengan terbentuknya zona hambat disekitar kertas cakram yang mengandung larutan uji dan kontrol positif.

Tabel 3.3. Klasifikasi Respon hambatan Pertumbuhan Bakteri (Davis, 1971).

| Diameter Zona Bening | Respon Hambatan pertumbuhan |
|----------------------|-----------------------------|
| < 5 mm | Lemah |
| 5 – 10 mm | Sedang |
| 10 – 19 mm | Kuat |
| ≥ 20 mm | Sangat Kuat |

3.5.8. Uji Fitokimia

Uji fitokimia merupakan metode pengujian awal untuk menentukan kadungan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak daun Kipahit. Menurut Robinson (1991) alasan melakukan uji fitokimia adalah untuk menentukan ciri senyawa aktif penyebab efek racun atau efek yang bermanfaat, yang ditunjukkan oleh ekstrak tumbuhan kasar bila diuji dengan sistem biologis. Pemanfaatan

prosedur uji fitokimia telah mempunyai peranan yang mapan dalam semua cabang ilmu tumbuhan. Meskipun cara ini penting dalam semua telaah kimia dan biokimia juga telah dimanfaatkan dalam kajian biologis.

3.5.8.1. Uji Alkaloid

Uji alkaloid dengan cara mengambil ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) sebanyak 0,1 gr kemudian ditambahkan dengan 5 ml kloroform dan 3 tetes amoniak. Fraksi kloroform dipisahkan dan diasamkan dengan 2 tetes H₂SO₄ 2M. Fraksi asam dibagi 3 tabung yang masing-masing ditambah pereaksi Dragendorf, Meyer, dan Wagner. Alkaloida pada sampel ditandai dengan adanya endapan putih pada pereaksi Mayer, endapan merah pada pereaksi Dragendorf dan endapan bewarna coklat pada pereaksi Wagner (Harborne, 1987).

3.5.8.2. Uji Fenolik, Flavonoid, Saponin dan Terpenoid/Steroid

Uji fenolik, flavonoid, saponin dan terpenoid/steroid dapat dilakukan sejalan. Adapun prosesnya adalah dengan menimbang 0,1 gr ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) di dalam botol vial pada timbangan analitik kemudian tambahkan 3 mL kloroform (CHCl₃) lalu divortex agar ekstrak terlarut. Setelah larut, pindahkan larutan ekstrak ke dalam tabung reaksi dan tambahkan aquades sebanyak 8 mL. kocok kuat dan diamkan beberapa saat hingga terbentuk dua lapisan yaitu lapisan kloroform di bawah dan lapisan aquades di atas.

1. Uji Fenolik

Uji Fenolik dilakukan dengan cara mengambil 2 mL larutan ekstrak dilapisan atas kemudian masukkan ke dalam botol vial. Lalu tambahkan 5 tetes FeCl₃ 1

%. Apabila terbentuk larutan berwarna hijau kehitaman atau biru kehitaman maka sampel tersebut positif Fenolik.

2. Uji Flavonoid

Uji Flavonoid dilakukan dengan cara mengambil 2 mL larutan ekstrak dilapisan atas kemudian masukkan ke dalam botol vial. Lalu tambahkan 0,05 gr serbuk magnesium dan 10 tetes asam klorida pekat (HCl 37%) dan tunggu beberapa saat. Apabila terbentuk larutan berwarna merah muda sampai merah maka sampel tersebut positif Flavonoid.

3. Uji Saponin

Uji saponin dilakukan dengan cara mengambil 3 mL larutan ekstrak yang dilapisan atas lalu masukkan ke dalam tabung reaksi. Lalu panaskan dengan Bunsen hingga mendidih dan diamkan sampai dingin, lalu kocok kuat selama 3-5 menit. Jika terbentuk buih atau busa yang stabil selama 5 menit setelah pengocokan maka sampel tersebut positif Saponin.

4. Uji Terpenoid/Saponin

Ambil lapisan kloroform sebanyak 5 tetes dengan menggunakan pipet tetes dan ditetesi pada plat tetes. Diamkan beberapa saat hingga mengering. Kemudian tambahkan pereaksi Liebermann-burchard yaitu 8 tetes asam asetat anhidrida ((CH₃CO)₂O) dan asam sulfat pekat (H₂SO₄ 95%) sebanyak 2 tetes. Jika terbentuk warna ungu atau merah menandakan larutan positif Terpenoid dan jika terbentuk warna biru atau hijau pekat maka menandakan positif Steroid.

3.6. Hipotesis dan Asumsi

Adapun Hipotesa dari penelitian yang akan dilakukan sebagai berikut :

H0 = Ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*.

H1 = Ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) dapat menghambat bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*.

Berdasarkan hipotesis di atas diajukan asumsi sebagai berikut :

1. Tingkat virulensi bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* dianggap sama.
2. Keadaan lingkungan dan keberhasilan alat laboratorium dianggap sama.
3. Tingkat keterampilan dan ketelitian penelitian dianggap sama.

3.7. Analisis Data

Berdasarkan hasil uji daya hambat (zona bening) pemberian ekstrak daun Kipahit (*T. Diversifolia*) terhadap bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* maka data yang diamati selama dilakukannya penelitian berupa aktivitas daya hambat ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) terhadap bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*, dan mengidentifikasi uji fitokimia ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*). Data yang diperoleh dianalisis secara deskriptif kemudian didukung oleh literatur.

IV. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1. Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kipahit (*T. diversifolia*)

Uji fitokimia pada penelitian ini merupakan dugaan awal untuk mengetahui kandungan senyawa pada ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) yang menunjukkan adanya aktivitas antibakteri yang diuji. Metode yang dilakukan untuk uji fitokimia ini ialah dengan cara mereaksikan ekstrak daun Kipahit dengan suatu senyawa tertentu dalam wadah. Hasil uji fitokimia ini dianggap positif jika terjadi perubahan warna terhadap golongan senyawa tersebut yang sesuai dengan warna standar yang telah ditetapkan, begitu juga sebaliknya jika hasil uji fitokimia tidak terjadi perubahan sesuai standar yang ditetapkan, maka dianggap negatif atau tidak mengandung senyawa yang diuji. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil uji fitokimia ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) pada tabel 4.1 berikut :

Tabel 4.1. Hasil Uji Fitokimia Ekstrak Daun Kipahit (*T. diversifolia*)

| No. | Uji Fitokimia | Pereaksi | Hasil | Ket. |
|-----|-------------------|---|-------------------------|------|
| 1. | Alkaloid | Meyer Dragendorff | -Putih keruh -Orange | (+) |
| 2. | Fenolik | FeCl ₃ 1 % | Hijau kehitaman | (+) |
| 3. | Saponin | - | Tidak terbentuk buih | (-) |
| 4. | Terpenoid/steroid | Lieberman-Burchad | Merah keunguan | (+) |
| | | Asam sulfat pekat (H ₂ SO ₄ 95%) | Biru kehijauan | |
| 5. | Flavonoid | Serbuk magnesium 0,05 gr | Merah muda | (+) |
| | | Asam klorida pekat (HCl) 37% | | |

Keterangan : (+) = Teridentifikasi senyawa, (-) = Tidak teridentifikasi senyawa

Hasil uji fitokimia pada tabel di atas menunjukkan bahwa ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) diketahui mengandung senyawa alkaloid, fenolik, terpenoid/steroid dan flavonoid.

Adanya senyawa alkaloid pada ekstrak daun Kipahit diketahui dengan adanya endapan oren saat ditambahkan pereaksi *dragendorff* dan timbulnya warna putih keruh saat ditambahkan pereaksi meyer. Menurut Harbone (1987) hasil senyawa alkaloid pada sampel ditandai dengan adanya perubahan warna oren kemerahan pada pereaksi *dragendorft* dan warna putih keruh pada pereaksi meyer. Cowan (1999) menyatakan bahwa senyawa alkaloid merupakan senyawa sebagai antibakteri dengan cara berinteraksi dengan dinding sel bakteri yang menyebabkan kerusakan dinding sel, dapat berikatan dengan DNA bakteri dan dapat menyebabkan kegagalan sintesis protein.

Hasil uji senyawa fenolik pada ekstrak daun Kipahit diketahui adanya perubahan warna menjadi hijau kehitaman saat ditambahkan pereaksi FeCl_3 , hal ini menandakan bahwa ekstrak daun Kipahit positif mengandung senyawa fenolik. Hal ini sesuai menurut Mawaddah *et al.* (2018) bahwa adanya kandungan dari senyawa fenolik ditandai oleh perubahan warna pereaksi menjadi hijau sampai hitam pekat. Saefudin (2011) menyatakan bahwa senyawa fenolik yang berinteraksi dengan sel bakteri melalui proses absorpsi yang melibatkan ikatan hidrogen yang menyebabkan senyawa fenolik ini memiliki aktivitas antibakteri.

Selanjutnya ekstrak daun Kipahit juga positif mengandung terpenoid/steroid, saat ditambahkan pereaksi Lieberman-Burchad menghasilkan perubahan warna menjadi merah keunguan dan penambahan pereaksi asam sulfat pekat (H_2SO_4 95%) menghasilkan perubahan warna menjadi hijau kehitaman.

Herbone (1987) mengatakan bahwa hasil positif pada uji senyawa terpenoid/steroid ini adalah terbentuknya warna merah untuk senyawa triterpenoid dan warna hijau untuk senyawa steroid. Menurut Kayser (2005) steroid dapat menghambat aktivitas antibakteri melalui interaksi ion Mg^{2+} dan Ca^{2+} yang ada di membran sel, sehingga mengakibatkan peningkatan permeabilitas membran luar pada bakteri gram negatif.

Ekstrak daun Kipahit juga positif mengandung flavonoid dengan ditandai adanya perubahan warna bening menjadi warna merah muda saat larutan ekstrak daun kipahit ditambahkan pereaksi 0,05 gram serbuk magnesium dan asam klorida pekat (HCl 37%). Menurut Cowan (1999) reaksi positif pada uji flavonoid ditunjukkan dengan terbentuknya warna merah atau jingga setelah ditetesi pereaksi. Sabir (2005) menyatakan bahwa, senyawa flavonoid dapat merusak permeabilitas dinding sel mikroba, sehingga mampu menghambat pertumbuhan mikroba karena berikatan dengan protein fungsional sel dan DNA.

Ekstrak daun Kipahit tidak mengandung saponin, karena saat larutan ekstrak daun kipahit dipanaskan hingga mendidih, kemudian diteruskan dengan pengocokkan saat larutan ekstrak tersebut dingin, busa atau buih yang dihasilkan tidak bertahan lama atau tidak stabil, dalam waktu 5 menit busa atau buih perlahan-lahan menghilang. Hasil uji fitokimia ini lebih jelas dapat dilihat pada lampiran 5.

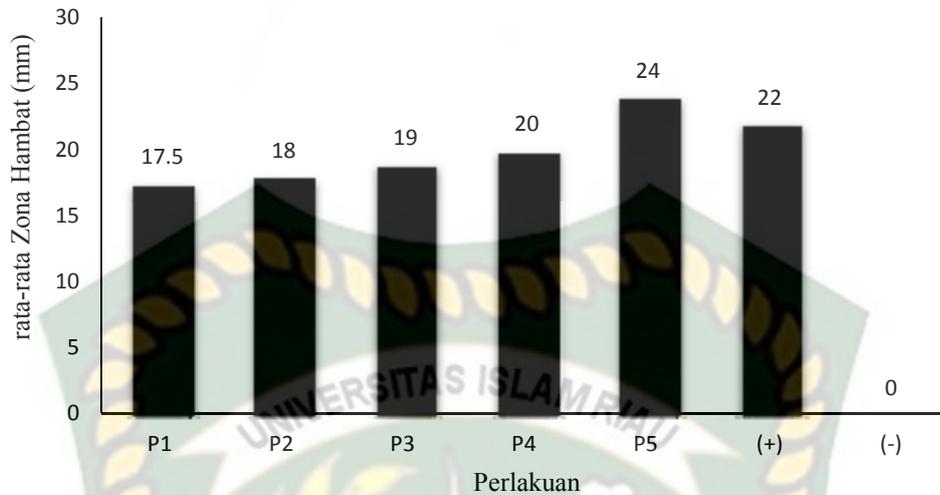
4.2. Uji Aktivitas Antibakteri Daun Kipahit (*T. diversifolia*)

Penelitian uji aktivitas antibakteri daun Kipahit ini menggunakan difusi cakram, dimana kertas cakram ditetesi dengan ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) sesuai konsentrasi perlakuan, kemudian diletakkan di atas media agar yang berisi kultur bakteri patogen dan sedikit ditekan dengan menggunakan pinset supaya menempel pada media.

Hasil dari metode difusi cakram ini diketahui adanya zona hambat berupa zona bening yang terdapat disekeliling kertas cakram setelah diinkubasi selama 24 jam di dalam inkubator. Zona bening ini merupakan petunjuk kepekaan bakteri patogen terhadap bahan antibakteri yaitu ekstrak daun kipahit. Bakteri patogen yang diuji ialah bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*. Cappucino dan Sherman (2001) menyatakan bahwa metode kertas cakram merupakan metode yang biasa digunakan, untuk menguji aktivitas antimikroba suatu antibiotik terhadap mikroorganisme patogen penyebab penyakit. Kepekaan mikroorganisme patogen terhadap antibiotik terlihat dari ukuran zona bening yang terbentuk.

4.2.1. Bakteri *Aeromonas hydrophila*

Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *A. Hydrophila* pada media Agar ini diketahui terbentuknya zona hambat berupa zona bening yang terdapat disekeliling kertas cakram. Untuk lebih jelasnya, hasil uji zona hambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* dapat dilihat pada Gambar 6 berikut :



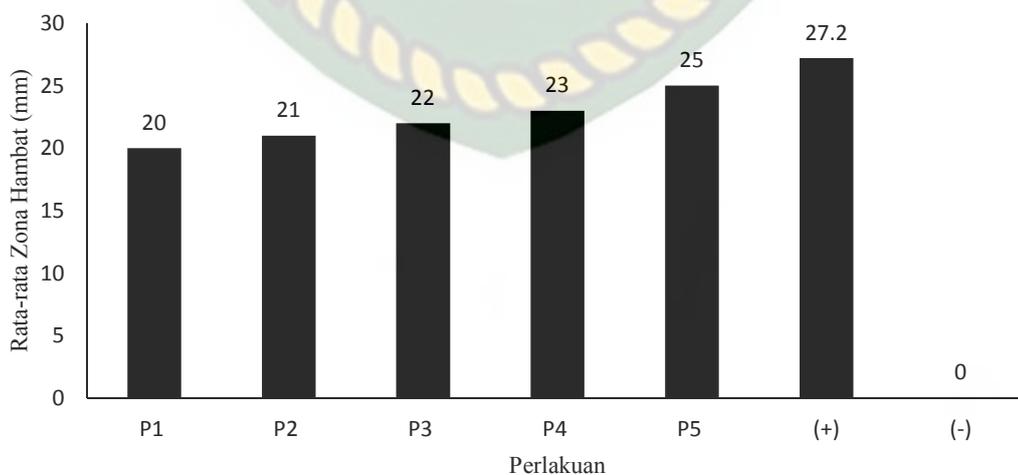
Gambar 6. Rata-rata Diameter Zona Hambat pada Bakteri *A. hydrophila*.

Berdasarkan Gambar 6 pengukuran zona hambat pada bakteri *A. hydrophila* diketahui bahwa rata-rata zona hambat terkecil ditunjukkan pada perlakuan P1 konsentrasi 10 % yaitu 17,5 mm, sedangkan rata-rata zona hambat yang terbesar terdapat pada perlakuan P5 konsentrasi 50 % yaitu sebesar 24 mm. Kemudian rata-rata diameter pada kontrol positif sebesar 22 mm dan tidak ada zona hambat yang terbentuk pada kontrol negatif. Hasil zona hambat pada perlakuan P1 konsentrasi 10% sampai perlakuan P3 konsentrasi 30% digolongkan pada kategori kuat karena besar zona hambat yang dihasilkan memiliki rentang 10-19 mm, sedangkan pada perlakuan P4 konsentrasi 40%, perlakuan P5 konsentrasi 50% dan kontrol positif zona hambat yang dihasilkan merupakan kategori sangat kuat karena memiliki rentang diameter >20 mm. Hal ini sesuai menurut Davis (1971) bahwa klasifikasi respon hambatan pertumbuhan bakteri yaitu diameter 10-19 mm digolongkan kuat dan diameter lebih dari 20 mm digolongkan sangat kuat.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak daun Kipahit yang diberikan, maka zona hambat terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophilla* dari P1 konsentrasi 10% sampai P5 konsentrasi 50% juga semakin besar. Darwis *et al.* (2012) mengatakan bahwa pada dasarnya besar diameter zona hambat bakteri cenderung meningkat sebanding dengan meningkatnya konsentrasi ekstrak. Akan tetapi juga ada konsentrasi yang lebih besar akan mengalami penurunan besar diameter zona bening atau zona hambat pertumbuhan bakteri. Untuk lebih jelasnya zona hambat ekstrak daun Kipahit terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophilla* pada penelitian ini dapat dilihat pada lampiran 6.

4.2.2. Bakteri *Pseudomonas aeruginosa*

Adapun hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* menghasilkan zona hambat pertumbuhan bakteri yang berbeda pada setiap perlakuan yang dapat dilihat pada Gambar 7 berikut :



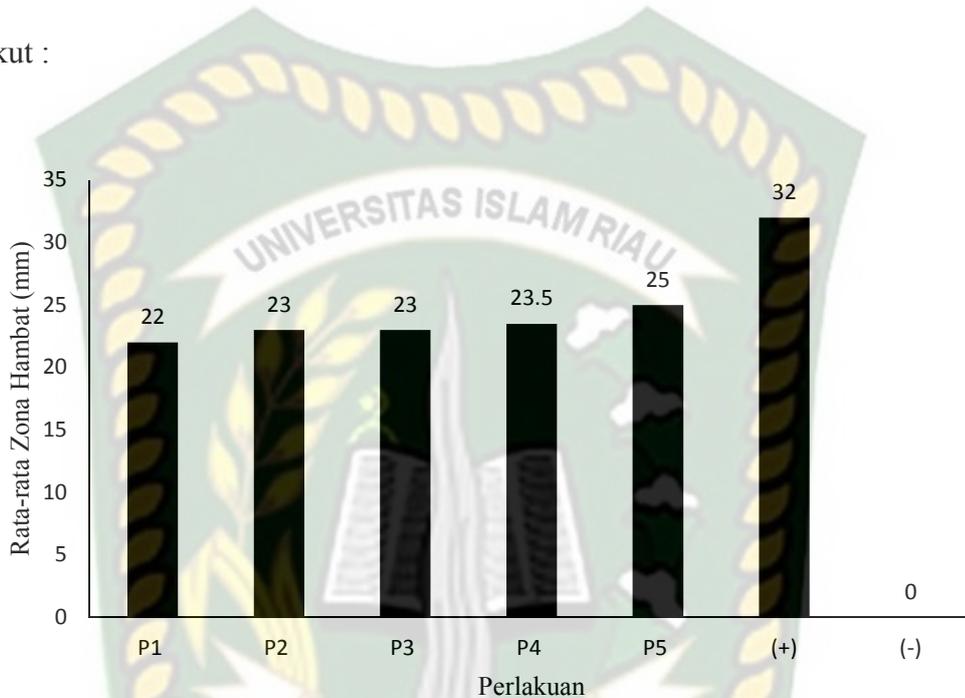
Gambar 7. Rata-rata Diameter Zona Hambat pada Bakteri *P. aeruginosa*.

Berdasarkan Gambar 7 di atas dapat dilihat pemberian ekstrak daun Kipahit dari perlakuan P1 sampai perlakuan P5 daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* menunjukkan peningkatan. Diameter zona hambat yang terkecil terdapat pada perlakuan P1 konsentrasi 10% yaitu sebesar 20 mm. Pada perlakuan P5 konsentrasi 50% merupakan diameter zona hambat yang terbesar yaitu 25 mm. Kemudian, rata-rata diameter zona hambat yang dihasilkan pada kontrol positif adalah 27,2 mm dan pada kontrol negatif tidak menghasilkan zona hambat disekeliling kertas cakram. Daya hambat perlakuan P1 konsentrasi 10% sampai P5 konsentrasi 50%, digolongkan pada kategori sangat kuat karena besar zona hambat pertumbuhan bakteri ≥ 20 mm. Menurut Poeloengan *et al.* (2006) semakin besar konsentrasi maka semakin besar pula zat aktif yang terdapat di dalamnya, sehingga menyebabkan daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri juga semakin besar.

Adanya zona hambat disekeliling kertas cakram yang diberikan ekstrak daun Kipahit terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* ini disebabkan oleh adanya kerusakan yang terjadi pada komponen struktural membran sel pada bakteri patogen. Menurut Volk dan Wheeler (1988) membran sel bakteri tersusun atas protein dan lipid rentan terhadap zat kimia yang dapat menurunkan tegangan permukaan. Kerusakan membran sel ini menyebabkan terganggunya transport nutrisi (senyawa dan ion) melalui membran sel sehingga sel bakteri mengalami kekurangan nutrisi yang diperlukan bagi pertumbuhannya. Zona hambat pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* pada penelitian ini lebih jelas juga dapat dilihat pada lampiran 6.

4.2.3. Bakteri *Vibrio alginolyticus*

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, hasil uji daya hambat ekstrak daun Kipahit terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*, perlakuan P1 konsentrasi 10% sampai P5 konsentrasi 50% dapat dilihat pada Gambar 8 sebagai berikut :



Gambar 8. Rata-rata Diameter Zona Hambat pada Bakteri *V. alginolyticus*.

Pada Gambar 8 di atas diketahui rata-rata besar diameter zona hambat yang terkecil terdapat pada P1 konsentrasi 10 % sebesar 22 mm. Rata-rata diameter zona hambat yang terbesar terdapat pada perlakuan P5 konsentrasi 50% dengan diameter sebesar 25 mm. Kemudian rata-rata diameter zona hambat kontrol positif sebesar 32 mm dan pada kontrol negatif tidak terdapat zona hambat disekeliling kertas cakram. Menurut Andries *et al.* (2014) perbedaan besar zona hambat yang berada disekeliling cakram disebabkan oleh beberapa faktor, diantaranya waktu inkubasi, konsentrasi ekstrak yang digunakan, dan inokulum. Zona hambat

pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* pada penelitian ini lebih jelas juga dapat dilihat pada lampiran 6.

Berdasarkan penelitian uji aktivitas antibakteri daun Kipahit terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* juga mengalami peningkatan zona hambat dari perlakuan P1 konsentrasi 10% sampai perlakuan P5 konsentrasi 50%. Lewis (2005) mengatakan bahwa yang menyebabkan terjadinya penghambatan pertumbuhan bakteri karena adanya senyawa yang mengganggu keutuhan membran sel, menghambat kerja enzim, mengganggu sintesis protein dan asam nukleat, serta menghambat sintesa dinding sel bakteri.

Hasil rata-rata besar diameter zona hambat tersebut daya hambat ekstrak daun Kipahit yang dihasilkan terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* ini digolongkan pada kategori sangat kuat, karena zona hambat ekstrak daun Kipahit pada perlakuan P1 konsentrasi 10 % sampai P5 konsentrasi 50% telah melebihi dari 20 mm.

4.3. Mekanisme Senyawa Aktif Metabolit Sekunder Ekstrak Daun Kipahit (*T. diversifolia*)

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, adanya kemampuan ekstrak daun Kipahit dalam menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* karena adanya kandungan senyawa metabolit sekunder diantaranya senyawa alkaloid, fenolik, terpenoid/steroid, dan flavonoid. Menurut Rahman *et al.* (2017) Kandungan senyawa alkaloid yang terdapat pada ekstrak etanol daun Kipahit mempunyai kemampuan antibakteri karena memiliki gugus aromatik kuartener yang mampu berinterkalasi dengan DNA. Kemudian senyawa alkaloid mampu mengganggu integritas komponen penyusun

peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga dapat menyebabkan lapisan dinding sel tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian sel.

Mekanisme antibakteri senyawa fenolik dalam menghambat pertumbuhan mikroorganisme yaitu dengan mendenaturasi protein sel. Denaturasi protein merupakan kerusakan struktur tersier dari protein yang menyebabkan terjadinya kerusakan pada protein dan menyebabkan protein tidak dapat berfungsi. Senyawa fenolik ini merupakan kelompok senyawa terbesar yang berfungsi sebagai antioksidan alami pada tumbuhan. Menurut Rijayanti *et al.* (2014) fenolik yang terbentuk antara fenol dan protein mengakibatkan struktur protein menjadi rusak. Ikatan hidrogen tersebut akan mempengaruhi permeabilitas dinding sel, sehingga menyebabkan ion dalam sel menjadi lisis tidak seimbang.

Mekanisme terpenoid sebagai antibakteri adalah bereaksi dengan protein transmembran pada membran luar dinding sel bakteri, membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Menurut Cowan (1999) bahwa antibakteri yang terdapat pada senyawa terpenoid bekerja membentuk ikatan polimer yang kuat sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Rusaknya porin mengakibatkan sel bakteri mengalami kekurangan nutrisi sehingga pertumbuhan bakteri tersebut terhambat. Dinding sel yang rusaknya menyebabkan senyawa metabolit sekunder dapat masuk ke dalam membran sel dan mengakibatkan kerusakan sel.

Adanya aktivitas antibakteri dari ekstrak daun kipahit karena adanya kandungan golongan senyawa yaitu steroid. Mekanisme kerja senyawa steroid ini menyebabkan perubahan dari morfologi membrane sel yang menyebabkan terjadinya lisis. atau rusaknya integritas membrane sel. Madduluri *et al.* (2013) menyatakan bahwa senyawa steroid sebagai antibakteri berhubungan dengan membran lipid terhadap komponen steroid yang menyebabkan kebocoran pada liposom.

Senyawa flavonoid juga memiliki aktivitas antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan sel bakteri patogen. Mekanisme kerja flavonoid sebagai senyawa antibakteri ialah dengan mengganggu integritas membrane sel bakteri yang disebabkan oleh kemampuan flavonoid dalam membentuk senyawa kompleks terhadap protein. Nuria *et al.* (2009) menyatakan bahwa senyawa yang akan merusak membran bakteri yaitu senyawa flavonoid bersifat lipofilik. Senyawa flavonoid sebagai antibakteri akan membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan protein terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler.

V. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1. Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diketahui bahwa ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*) positif mengandung senyawa alkaloid, fenolik, flavonoid dan terpenoid/steroid. Hasil uji aktivitas antibakteri ekstrak daun Kipahit dapat menghambat pertumbuhan bakteri *A. hydrophila*, *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus*. Daya hambat ekstrak daun Kipahit terhadap pertumbuhan bakteri *A. hydrophila* pada konsentrasi 10% sampai 30% dengan kategori kuat dan konsentrasi 40% sampai 50% dengan kategori sangat kuat. Daya hambat terhadap pertumbuhan bakteri *P. aeruginosa* dan *V. alginolyticus* pada konsentrasi 10% sampai 50% dengan konsentrasi sangat kuat.

5.2. Saran

Berdasarkan penelitian uji aktivitas antibakteri ekstrak daun Kipahit (*T. diversifolia*), dapat menghambat pertumbuhan bakteri patogen. Disarankan untuk dilakukan penelitian uji secara *in vivo* pada ikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Adji, D., Zuliyanti dan H. Larashantyz. 2007. Perbandingan Efektifitas Sterilisasi Alkohol 70% Inframerah, Otoklaf, dan Ozon Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus Subtilis*. J Sain.
- Afrianto, E dan E. Liviawaty. 1992. Hama dan Penyakit Ikan. Kanisius. Yogyakarta.
- Agoes, G. 2007. Teknologi Bahan Alam, ITB Press Bandung. Bandung.
- Alimuddin, A. 2005. Mikrobiologi Dasar. Jilid I. Cet. 1; UNM Press. Makassar.
- Andries, J.R., P.N. Gunawan dan A. Supit. 2014. Uji Efek Antibakteri Ekstrak Bunga Cengkeh terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* secara *in vitro*. Jurnal e-GIGI (eG). 2(2): 1-5.
- Anonim. 2013. Penyakit Ikan. <http://baranyaahmad.blogspot.com/2013/11/aeromonas-hydrophila.html>. Diakses pada 21 Februari 2021.
- Anonim. 2021. Biomedica. <https://www.diomedica.com/stock-\ photo Sem of vibrio alginolyticus mag 4500x at 375 x 5 in these bacteria are found in seawater aquaria and on the surface of diseased stony coral this cytotoxin bacterium is a human pathogen an image9926340.html>. Diakses Pada Tanggal 1 Februari 2021.
- Anonim. 2021. Wickham Laboratories. <https://wickhamlabs.co.uk/technical-resource-centre/fact-sheet-pseudomonas-aeruginosa/>. Diakses Pada tanggal 1 Februari 2021.
- Austin, P.R. 1988. Chitin Solution and Purification of Chitin. dalam W.A. Wood and S.T. Kellog. Biomass. Academic Press Inc. New York.
- Brogden, K.A., J.A. Roth., T.B. Stanton., C.A. Bolin., F.C. Minion and M.J. Wannemuehler. 2000. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. American Society for Microbiology. ASM Press. Washington, DC.
- Bonang, G. 1992. Mikrobiologi untuk Profesi Kesehatan Edisi ke-16. Buku Kedokteran EGC. Jakarta.
- Brooks, G.F., S.B. Janet and A.M. Stephen. 2005. Jawetz, Melnick and Adelbergs, Mikrobiologi Kedokteran (Medical Microbiology) Buku I, Alih Bahasa oleh Mudihardi, E., Kuntaman, Wasito, E.B., Mertaniasih, N.M., Harsono, S., dan Alimsardjono, L. Salemba Medika. Jakarta.

- Brooks, G.F., K.C. Carroll., J.S. Butel dan Morse. 2013. Mikrobiologi Kedokteran Jawetz, Melnick, & Adelberg. Ed. 25. Penerbit Buku Kedokteran EGC: Jakarta.
- Brooks, G.F., J.S. Butel., K. Caarrol., S.A. Morse., Jawetz., Melnick and Adelberg's. 2007. Medical Microbiology. Mc Graw Hill. USA.
- Calabria, L.M. 2008. The Isolation and Characterization of Triterpene Saponins From Silphium and The Shemosystematic and Biological Significance of Saponins In The Asteraceae. Disertasi. Tidak dipublikasikan. University of Texas, Austin.
- Cappucino, J.G. and N. Sherman. 2001. Microbiology: A Laboratory Manual. 2nd Edition. The Benjamin Cummings Publishing Company. Rockland Community College. State University of New York.
- Cowan. 1999. Plant Product as Antimicrobial Agents. Clinical Microbiology Reviews, October, Vol. 12, No. 4, Hal. 564-582
- Davis, S. 1971. Disc Plate Method of Microbiological Antibiotic Essay. Journal of Microbiology. 22(4)
- Darwis, W., M. Hafiedzani, R.R.S. Astuti. 2012. Efektivitas Ekstrak Akar dan Daun Pecut Kuda *Stachytarpetha jamaicensis* (I) Vahl dalam Menghambat Pertumbuhan Jamur *Candida albicans* Penyebab Kandidiasis Vaginalis. Konservasi Hayati. 8(2): 1-6.
- Diana, M. 2019. Uji Sensitivitas Ekstrak Daun Kipahit (*Tithonia diversifolia*) terhadap bakteri *Pseudomonas fluorescens* secara In Vitro. Universitas Brawijaya. Malang.
- Dzen, J. M. 2003. Bakteriologi Medik. 187-197. Bayumedia. Malang.
- Foysal, M.J., M.M. Rahman dan M. Alam. 2011. Antibiotic Sensitivity and In Vitro Antimicrobial Activity of Plant Extracts to *Pseudomonas fluorescens* Isolates Collected from Diseased Fish. International Journal of Natural Sciences.
- Gutierrez, R.M., R. Baculi., N. Pastor., T. Puma-at and T. Balangcod. 2013. Antibacterial Potential of Some Medicinal Plants of the Cordillera Region, Philippines. Indian Journal of Traditional Knowledge.
- Hakim. 2001. Senyawa Atifeedant dari Tanaman *Tithonia Difersifolia* (Kipahit). Milenium Cipta. Semarang.
- Harbone, J.B. 1987. Metode Fitokimia. Institut Teknologi Bandung. Bandung.
- Haryani, A., G. Roffi., D.B. Ibnu dan S. Ayi . 2012. Uji Efektivitas Daun Papaya (*Carica papaya*) untuk Pengobatan Infeksi Bakteri *Aeromonas*

- hydrophila* pada Ikan Mas Koki (*Carassius auratus*). Jurnal Perikanan dan Kelautan.
- Hasibuan, H dan Rosidanelli. 2016. Pemanfaatan Flavonoid Ekstrak Daun Katuk (*Sauropus androgynus* (L) Merr) sebagai Antioksidan pada Minyak Kelapa. Jurnal Teknik Kimia USU, Vol. 5 (1): 45-51.
- Hutapea, J.R. 2000. Inventaris Tanaman Obat Indonesia, Edisi I, 19-20, Bhakti Husada, Jakarta.
- Jawetz, E., J.L. Melnick dan E.A. Adelberg. 1986, Mikrobiologi Kedokteran, diterjemahkan oleh Bagian Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Airlangga, 205-209, Penerbit Salemba Medika, Jakarta.
- Jawetz, M.A. 2010. Mikrobiologi Kedokteran (25 ed.). (G. F. Brooks, K. C. Carroll, J. S. Butel, S. A. Morse, T. A. Mietzner, Penyunt., A. W. Nugroho, D. Ramadhani, H. Santasa, N. Yaselita, & K. W. Nimala, Penerj.) Mc Graw Hill. New York.
- Kayser, F., K. Bienz, J. Eckert, and R. Zinkernagel. 2005. Medical Microbiology. Thieme. New York.
- Krieg, N.R and J.G. Holt. 1984. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 1. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, MD.
- Lake, A.G., Y. Conterius dan D.D.A.A. Daud. 2017. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-alang (*Imperata cylindra*) dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram. Chem Info.
- Lewis, E. R. (2005). Antifungal Pharmacology. <http://www.doctorfungus.org/thedrugs.html>. Diakses pada tanggal 8 Agustus 2020
- Lubis, Y.P.P., Yunasfi dan R. Leidonald. 2014. Jenis-jenis Bakteri pada Luka Ikan Patin. Jurnal Aquacostamarine.
- Lukistyowati, I. dan Kurniasih. 2012. Pelacakan Gen Aerolysin dari *Aeromonas hydrophila* pada Ikan Mas yang Diberi Pakan Ekstrak Bawang Putih. Jurnal Veteriner.
- Madduluri, S., K. Rao., Babu and B. Sitaram. 2013. In Vitro Evaluation of Antibacterial Activity of Five Indegenous Plants Extract Against Five Bacterial Pathogens of Human. International Juornal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. 5(4): 679-684.
- Mawaddah, N., Fakhurazi, Rosmaidar. 2018. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Tempe terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. Fakultas Kedokteran Hewan. Universitas Syah Kuala. Aceh.

- Marjoni, R. 2016. Dasar-Dasar Fitokimia untuk Diploma III Farmasi. Trans Info Media. Jakarta.
- Michel, G.C., I.D. Nasseem and F. Ismail. 2011. Antidiabetik Activity and Stability Study of the Formulated Leaf Extract of *Ziziphus Spina-christi* with the Influence of Seasonal Variation. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Mukhriani. 2014. Ekstraksi, Pemisahan Senyawa dan Identifikasi Senyawa aktif. Fakultas Ilmu Kesehatan. UIN alaudin Makasar. *Jurnal Kesehatan*.
- Murdjani, M. 2002. Identifikasi dan Patologi Bakteri *Vibrio alginolyticus* pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*). Ringkasan Disertasi. Universitas Brawijaya. Malang.
- Novriadi, R., S. Agustatik., Hendrianto., Pramuanggit dan Arik Hariwibowo. 2014. Penyakit Infeksi pada Budidaya Ikan Laut di Indonesia. *Research Gate*.
- Nurchahyo, W. 2014. Parasit pada Ikan. Gajah Mada University Press. Jakarta.
- Nuria, M.C., A. Faizatun dan Sumantri. 2009. Uji Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu – ilmu Pertanian*. 5: 26 – 37.
- Odeyemi, A.T. 2014. Antibacterial Activities of Crude Extracts of *Tithonia diversifolia* Against Common Environmental Pathogenic Bacteria. *Inter J Scient Tech*.
- Poeloengan, M., Chairul, K. Iyep, S. Siti dan M.N. Susan. 2006. Aktivitas Antimikroba dan Fitokimia dari Beberapa Tanaman Obat. Seminar Nasional Teknologi Peternakan dan Veteriner.
- Pelczar, M.J dan E.S. Chan. 1998. Dasar-dasar Mikrobiologi Edisi Ke-2. Penerbit Universitas Indonesia. Jakarta.
- Perry, R.H and Green, D.W., 1984, Perry's Chemical Engineers Hand Book 6 th. Ed. Mc. Graw Hill Co., International Student edition, Kogakusha, Tokyo.
- Pratiwi, E. 2010. Perbandingan Metode Maserasi, Remaserasi, Perkolasi dan Reperkolasi dalam Ekstraksi Senyawa Aktif Andrographolide dari Tanaman Sambilotto (*Andrographis paniculata* Nee). Skripsi. Tidak dipublikasikan. Fakultas Teknologi Pertanian, Institut Pertanian Bogor, Bogor.

- Rahman, F.A., T. Haniastuti dan T.W. Utami. 2017. Skrining Fitokimia dan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) pada *Streptococcus mutans* ATCC 35668. Majalah Kedokteran Gigi Indonesia.
- Rijayanti, Luliana, dan Trianto. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Mangga Bacang (*Mangifera foetida* L.) terhadap *Staphylococcus aureus*. Fakultas Kedokteran Universitas Tanjungpura. Tanjungpura.
- Robinson, T. 1991. Kandungan Organik Tumbuhan Obat Tinggi. Diterjemahkan oleh kokasih Padmawinata, 191-209. ITB. Bandung.
- Sabir, A. (2005). Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis *Trigona* sp. terhadap Bakteri *Streptococcus mutans* (in vitro). Jurnal Kedokteran Gigi. Vol.38, No.3, Hal. 135-141.
- Saefudin, A. 2011. Metode Penelitian. Pustaka Belajar. Yogyakarta.
- Sembiring, B. 2007. Teknologi Penyiapan Simplisia Terstandar Tanaman Obat. Balitro. Bogor. Vol 13(2)
- Siegrist, J. 2010. Pseudomonas a Communicative Bacteria. https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Fluka/Brochure/1/mibi_focu_2_4.pdf diakses 10 Januari 2021.
- Strohl W.A., H. Rouse and B.D. Fisher. 2001. Microbiology. Lippincott Williams & Wilikns. USA.
- Soedarmono, P. 1986. Kebijakan Pemakaian Antibiotika dalam Kaitannya dengan Terjadinya Resistensi Luman. Simposium Perkembangan Antibiotik pada Penanggulangan Infeksi dan Resistensi Kuman. Jakarta.
- Sulistijowati, S.A dan D. Gunawan. 2001. Efek Ekstrak Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia* (Hemsley) A. Gray) Terhadap *Candida Albicans* Serta Profil Kromatografinya. Cermin Dunia Kedokteran.
- Sulistyo. 1971. Farmakologi dan Terapi. EKG. Yogyakarta.
- Tania M.P., D.D. Castelo., C.D. Serrão., A.B. Lobato., R.D. Silva., F.D. Oliveira., P.S. Ferreira., N.P.L. Távora and S.S.M. Da Silva. 2016. Antioxidant Effect of Plant Extracts of the Leaves of *Tithonia diversifolia* (Hemsl.) A. Gray on the Free Radical DPPH. Journal of Chemical and Pharmaceutical Research.
- Todar, K. 2012. Pathogenic E. Coli. <http://textbookofbacteriology.net/e.coli.html>, diakses pada 10 Januari 2021.

- Tona, K., F. Barnelis., B. De Ketelaere., V. Bruggeman and E. Decuypere. Pesticida Alami (Nabati). Erlangga. Jakarta.
- Verawati, M.A., M. Novicaresa dan Scientia. 2011. Aktifitas Anti Inflamasi Ekstrak Etanol Daun Kembang Bulan (*Tithonia diversifolia*. A. Gray) terhadap Mencit Putih Betina-Jurnal Farmasi dan Kesehatan 1 (1), 47-52
- Volk, A.W. and F.M. Wheeler. 1988. Mikrobiologi Dasar. (S. Adisoemarto, Ed.) (Edisi 5). Jakarta: Erlangga.
- Wanzala, W., E.M. Osundwa., O.J. Alwala and M.M. Gakuubi. 2016. Chemical Composition of Essential Oil of *Tithonia diversifolia* (Hemsl). A. Gray from the Southern Slopes of Mount Elgon in Western Kenya. Indian Journal of Ethnophytopharmaceuticals.
- Wardhana, A.H dan N. Diana. 2014. Aktivitas Biolarvasidal Ekstrak Metanol Daun Kipahit (*Tithonia diversifolia*) terhadap Larva Lalat *Chrysomya bezziana*. JITV.
- Wei, L. S and W. Wendi. 2012. Characterization of *Vibrio alginolyticus* Isolated from White Leg Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) with Emphasis n its Antibigram and Heavy Metal Resistance Pattern. Veterinarski Arhiv.
- Yogananth, N., R. Bhagyaraj, A. Chanthuru., T. Anbalagan and N.K. Mullai. 2009. Detection of Virulence Gene in *Aeromonas hydrophila* isolates from Fish Samples using PCR technique. J. Biotec Biochem.