

BAB III METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian dilaksanakan pada bulan Februari – Juli tahun 2024 di *Integrated Laboratory of Bioproducts (iLaB)* Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong, di Laboratorium Sumberdaya Kelautan dan Perikanan (Lab SKP), dan di Laboratorium Budidaya (*hatchery*) Universitas Pendidikan Indonesia Kampus Serang.

3.2 Desain Penelitian

Desain yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Rancangan acak lengkap merupakan metode analisis statistik yang digunakan saat menguji berbagai perlakuan eksperimen pada sebuah penelitian dalam unsur penelitian yang homogen (Sudarwati *et al.*, 2019). Perlakuan yang diterapkan yaitu tiga perlakuan dengan tambahan ekstrak (P1, P2, dan P3) dan satu perlakuan kontrol (P0) dengan 3 kali pengulangan pada masing-masing perlakuan. Dosis perlakuan yang diberikan mengacu pada penelitian yang dilakukan oleh Astri Ananda L. (2022) untuk dosis perlakuan P1, kemudian dijadikan acuan dengan dosis yang sama pada perlakuan P2 dan perlakuan P3. Berikut perlakuan yang diterapkan dalam penelitian ini:

P0 = Pakan tanpa tambahan ekstrak (kontrol)

P1 = Pakan dengan tambahan dosis ekstrak kunyit 20 mg/kg pakan

P2 = Pakan dengan tambahan dosis ekstrak daun labu siam 20 mg/kg pakan

P3 = Pakan dengan tambahan dosis ekstrak daun mengkudu 20 mg/kg pakan

Tabel 3.1
Denah Posisi Pengacakan Perlakuan

RAK A			RAK B		
P3U1	P1U1	P2U1	P2U2	P3U2	P0U2
P0U3	P1U3	P3U3	P1U2	P0U1	P2U3

Keterangan:

P = Perlakuan

U = Ulangan

3.3 Jenis Penelitian

Penelitian mengenai uji antagonistik kunyit, daun mengkudu, dan daun labu siam terhadap bakteri patogen ikan dan pengaruhnya terhadap pertumbuhan ikan mas (*Cyprinus carpio*) menggunakan metode penelitian kuantitatif, dimana penelitian berupa investigasi sistematis terhadap suatu fenomena dengan cara mengumpulkan data yang diukur menggunakan teknik statistik, matematika dan komputasi. Metode pada penelitian ini berupa metode eksperimental laboratorium. Penelitian eksperimen adalah penelitian yang dilakukan dengan memanipulasi subjek penelitian dan adanya kontrol. Metode eksperimen dilakukan untuk menguji efektivitas tiga ekstrak berbeda terhadap zona hambat bakteri patogen pada ikan dan pengaruhnya terhadap pertumbuhan ikan mas. Observasi yang dilakukan secara langsung ini sebagai teknik pengumpulan data, yaitu dengan mengamati secara sistematis serta menulis catatan kecil tentang perihal apa saja yang ditemukan (Supardi, 2006).

3.4 Populasi dan Sampel Penelitian

Populasi merupakan kumpulan atau keseluruhan dari individu, objek, atau makhluk hidup dengan ciri-ciri tertentu yang hidup di suatu tempat atau lingkungan. Populasi pada penelitian ini yaitu ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diambil dari Balai Budidaya Air Tawar (BBAT) Curug Barang Kabupaten Pandeglang. Sampel merupakan sebagian atau wakil dari suatu populasi, sampel yang akan digunakan yaitu 120 ekor ikan mas berukuran 9 – 12 cm.

Ramdani, 2024

PENGARUH EKSTRAK KUNYIT, DAUN LABU SIAM, DAN DAUN MENGGUDU TERHADAP AKTIVITAS ANTAGONISTIK BAKTERI PATOGEN DAN PERTUMBUHAN IKAN MAS (Cyprinus carpio)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.5 Alat dan Bahan Penelitian

3.5.1 Ekstraksi Maserasi

a. Alat

Alat yang digunakan pada kegiatan ekstraksi maserasi yaitu toples ukuran 5 liter, toples ukuran 1 liter, nampan, pisau, timbangan digital, blender, batang pengaduk, sendok laboratorium (spatula), erlenmeyer ukuran 1000 ml, erlenmeyer ukuran 3000 ml, beaker glass 250 ml, gelas ukur 500 ml, corong, tabung falcon 50 ml, kertas label, pulpen, oven (Drying Oven Memmert UN55), hotplate (hotplate stirrer boeco MSH-420), stirrer, aluminium foil, karet gelang, tisu, kertas saring, gunting, vacuum (Aspirator Pump Lab. Companion VE-11 serial no. W025252), Rotary Evaporator (Rotary Evaporator Buchi R-300 EL), dan lemari pendingin (Showcase Modena SC 1180).

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada kegiatan ekstraksi maserasi yaitu kunyit (*Curcuma sp*), daun mengkudu (*Morinda citrifolia*), daun labu siam (*Sechium edule*), dan pelarut methanol 96%.

3.5.2 Uji Aktivitas Antioksidan (Metode DPPH)

a. Alat

Alat yang digunakan pada kegiatan uji aktivitas antioksidan yaitu botol vial ukuran 20 ml, erlenmeyer ukuran 100 ml, timbangan digital, kaca arloji, tisu, sendok laboratorium (spatula), gelas ukur 50 ml, tabung reaksi pyrex 16x150mm, rak tabung reaksi, aluminium foil, tip pipet 1000 μ l, tip pipet 100 μ l, mikropipet 1000 μ l, mikropipet 100 μ l, Vortex (Vortex Mixer Thermo Scientific 88882010), microplate 96 well, dan TECAN (Microplate Reader TECAN Infinite 200 Pro).

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada kegiatan uji aktivitas antioksidan yaitu sampel ekstrak kunyit (*Curcuma sp*), daun mengkudu (*Morinda citrifolia*), daun labu siam (*Sechium edule*), pelarut methanol 96%, vitamin C (Ascorbic Acid), dan DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl).

3.5.3 Uji Aktivitas Antibakteri Metode Sumuran dan Metode Difusi Kertas Cakram

a. Alat

Alat yang digunakan pada kegiatan uji aktivitas antibakteri yaitu erlenmeyer ukuran 100 ml, timbangan digital, kaca arloji, sendok laboratorium (spatula), aluminium foil, plastik tahan panas, kertas tahan panas, plastik wrap, karet, kertas label, spidol, penggaris, sarung tangan latex, masker, kain hitam, lampu belajar, cawan petri, bunsen, ose, beaker glass ukuran 250 ml, tisu, microtube pcr, tip pipet 1000 μ l, tip pipet 100 μ l, mikropipet 1000 μ l, mikropipet 100 μ l, kertas cakram, pinset, hotplate (hotplate stirrer boeco MSH-420), shaker (Shaker DLAB SK-0330-PRO), Autoclave (Autoclave TOMY SX-700), dan Laminar Air Flow (vertical) LAF 130.

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada proses uji aktivitas antibakteri yaitu: aquades, air RO (*reverse osmosis*), sampel ekstrak kunyit (*Curcuma sp*), sampel ekstrak daun mengkudu (*Morinda citrifolia*), sampel ekstrak daun labu siam (*Sechium edule*), isolat bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, BCI3, dan AES3, pelarut *Dimethyl sulfoxide* (DMSO), media Nutrient Broth (NB), dan media Nutrient Agar (NA).

3.5.4 Aplikasi Sampel Ekstrak pada Pakan Pellet

a. Alat

Alat yang digunakan yaitu sendok laboratorium (spatula), gelas ukur, pipet tetes, corong, timbangan digital, kaca arloji/cawan petri, pulpen, kertas label, tisu, nampan, kertas label, botol spray transparan 100ml, toples plastik transparan 1800 ml.

b. Bahan

Bahan yang digunakan yaitu sampel ekstrak kunyit, daun mengkudu, dan daun labu siam, pakan pellet jenis eko feed – 2, dan tween 20 emulsifer, dan aquades.

3.5.5 Pemeliharaan Ikan Uji

a. Alat

Alat yang digunakan pada pemeliharaan ikan mas yaitu *container box* 25 liter, ember 60 liter, aerator (RESUN LOW NOISE AIR PUMP model: LP-60), selang aerator, selang air, sifon aquarium, saringan ikan, pH meter, kertas pH, thermometer, DO meter, timbangan digital, sendok plastik, pulpen, buku, penggaris, kertas label, milimeter blok, toples plastik 200 ml.

b. Bahan

Bahan yang digunakan pada pemeliharaan ikan mas yaitu pakan pellet jenis eko feed – 2 dengan perlakuan P0, P1, P2 dan P3, 120 ekor ikan mas ukuran 9 - 12 cm, dan air.

3.6 Prosedur Penelitian

Prosedur penelitian ini meliputi proses ekstraksi kunyit (*Curcuma sp*), daun mengkudu (*Morinda citrifolia*), daun labu siam (*Sechium edule*) menggunakan metode maserasi, pengujian aktivitas antioksidan masing-masing sampel ekstrak menggunakan metode *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) dengan pengambilan data menggunakan metode spektrofotometri dari TECAN (Microplate Reader TECAN Infinite 200 Pro), skrining fitokimia kunyit, daun labu siam, dan daun mengkudu menggunakan metode spektrofotometri di *Integrated Laboratory of Trunojoyo University* dan di Laboratorium Balai Pengujian Standar Instrumen Tanaman Rempah Obat dan Aromatik (BPSI TROA), pengujian aktivitas antibakteri (zona hambat bakteri) masing-masing sampel ekstrak pada 4 bakteri patogen menggunakan metode cakram dan metode sumuran, pengaplikasian masing-masing sampel ekstrak pada ikan mas melalui pakan pelet, pengelolaan kualitas air, dan proses pengambilan data.

3.6.1 Ekstraksi Maserasi

Ekstraksi maserasi merupakan teknik peredaman suatu benda (sampel) di dalam pelarut tertentu dan dalam waktu tertentu. Ekstraksi menggunakan metode maserasi dilakukan karena ekstraksinya terbilang sederhana dan mudah dilakukan. Ekstraksi metode maserasi mampu menembus dinding sel dan masuk pada rongga sel yang terdapat zat aktif didalam sampel (Ningsih, 2016).

a. Ekstraksi kunyit (*Curcuma sp*)

Rimpang kunyit didapat dari Pasar Cibinong Jl. Raya Jakarta-bogor Km 46, Sentul, Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat 16911 Cibinong. Total rimpang kunyit yang didapat 1024,8 gram yang kemudian dicuci pada air mengalir. Setelah melewati proses pencucian rimpang kunyit dikupas, dicacah kecil, ditiriskan dan dikeringkan di oven (Drying Oven Memmert UN55) pada suhu 75°C selama 1 x 24 jam. Setelah kunyit kering merata, kunyit dihaluskan menggunakan blender hingga semuanya halus. Dari 1024,8 gram rimpang kunyit, diperoleh total 213,6 gram kunyit bubuk (halus). Proses ekstraksinya 100 gram kunyit halus dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer ukuran 3000 ml dengan ditambahkan pelarut metanol sebanyak 2000 ml (perbandingan 1:20), tutup labu erlenmeyer menggunakan alumunium foil dan kunci menggunakan karet gelang agar pelarut ekstrak tidak menguap, diamkan 1 x 24 jam pada hotplate (hotplate stirrer boeco MSH-420) dengan stirrer sebagai pengaduk pada settingan kecepatan perputaran stirrer 1.500 rpm, sehingga larutan terus mengalami pengadukan selama 24 jam. Setelah homogen, larutan ekstrak dilakukan penyaringan menggunakan vacuum (Aspirator Pump Lab. Companion VE-11 serial no. W025252) guna memisahkan cairan ekstrak dengan ampas dari serbuk kunyit. Cairan ekstrak selanjutnya melalui tahap penguapan (evaporasi) menggunakan rotary evaporator (Rotary Evaporator Buchi R-300 EL) pada settingan (recirculating chiller 3.0°C, suhu air di 30°C - 45°C, vacuum 125 mbar, rotation 85 rpm) guna memisahkan pelarut metanol pada cairan ekstrak sehingga diperoleh ekstrak minim pelarut dengan tekstur kental seperti pasta. Hasil akhir dari 100 gram kunyit bubuk diperoleh 18,6 gram/ml ekstrak kunyit.

b. Ekstraksi daun mengkudu (*Morinda citrifolia*)

Daun mengkudu didapat dari jalan arah menuju gedung *Integrated Laboratory of Bioproducts* (iLaB) Badan Riset dan Inovasi Nasional (BRIN) Cibinong, Kabupaten Bogor, Jawa Barat 16911. Total daun mengkudu yang didapat 886,6 gram yang kemudian dicuci pada air mengalir. Setelah melewati proses pencucian daun mengkudu dicacah kecil,

ditiriskan dan dikeringkan di oven (Drying Oven Memmert UN55) pada suhu 75°C selama 1 x 24 jam. Setelah daun mengkudu kering merata, haluskan menggunakan blender hingga semuanya menjadi serbuk halus. Dari 886,6 gram diperoleh total 190,8 gram daun mengkudu bubuk (halus). Proses ekstraksinya 100 gram daun mengkudu halus dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer ukuran 3000 ml dengan ditambahkan pelarut metanol sebanyak 2000 ml (perbandingan 1 : 20), tutup labu erlenmeyer menggunakan alumunium foil dan kunci menggunakan karet gelang agar pelarut ekstrak tidak menguap, diamkan 1 x 24 jam pada hotplate (hotplate stirrer boeco MSH-420) dengan stirrer sebagai pengaduk pada settingan kecepatan perputaran stirrer 1.500 rpm, sehingga larutan terus mengalami pengadukan selama 24 jam. Setelah homogen, larutan ekstrak dilakukan penyaringan menggunakan vacuum (Aspirator Pump Lab. Companion VE-11 serial no. W025252) guna memisahkan cairan ekstrak dengan ampas dari serbuk daun mengkudu. Cairan ekstrak selanjutnya melalui tahap penguapan (evaporasi) menggunakan rotary evaporator (Rotary Evaporator Buchi R-300 EL) pada settingan (recirculating chiller 3.0°C, suhu air di 30°C - 45°C, vacuum 125 mbar, rotation 85 rpm) guna memisahkan pelarut metanol pada cairan ekstrak sehingga diperoleh ekstrak minim pelarut dengan tekstur kental seperti pasta. Hasil akhir dari 100 gram daun mengkudu bubuk diperoleh 49,98 gram/ml ekstrak daun mengkudu.

c. Ekstraksi daun labu siam (*Sechium edule*)

Daun labu siam didapat dari alamat domisili peneliti di kampung Pasir Luhur, Cisarupan, Kabupaten Garut, Jawa Barat 44163. Total daun labu siam yang didapat 555,5 gram yang kemudian dicuci pada air mengalir. Setelah melewati proses pencucian daun labu siam dicacah kecil, ditiriskan dan dikeringkan di oven (Drying Oven Memmert UN55) pada suhu 75°C selama 1 x 24 jam. Setelah daun labu siam kering merata, haluskan menggunakan blender hingga semuanya menjadi serbuk halus. Dari 555,5 gram diperoleh total 113,6 gram daun labu siam (halus). Proses ekstraksinya 100 gram daun labu siam halus dimasukkan ke dalam labu erlenmeyer ukuran 3000 ml dengan ditambahkan pelarut metanol sebanyak 2000 ml

(perbandingan 1 : 20), tutup labu erlenmeyer menggunakan aluminium foil dan kunci menggunakan karet gelang agar pelarut ekstrak tidak menguap, diamkan 1 x 24 jam pada hotplate (hotplate stirrer boeco MSH-420) dengan stirrer sebagai pengaduk pada settingan kecepatan perputaran stirrer 1.500 rpm, sehingga larutan terus mengalami pengadukan selama 24 jam. Setelah homogen, larutan ekstrak dilakukan penyaringan menggunakan vacuum (Aspirator Pump Lab. Companion VE-11 serial no. W025252) guna memisahkan cairan ekstrak dengan ampas dari serbuk daun labu siam. Cairan ekstrak selanjutnya melalui tahap penguapan (evaporasi) menggunakan rotary evaporator (Rotary Evaporator Buchi R-300 EL) pada settingan (recirculating chiller 3.0°C, suhu air di 30°C - 45°C, vacuum 125 mbar, rotation 85 rpm) guna memisahkan pelarut metanol pada cairan ekstrak sehingga diperoleh ekstrak minim pelarut dengan tekstur kental. Hasil akhir dari 100 gram daun labu siam bubuk diperoleh 1,17 gram/ml ekstrak daun labu siam.

3.6.2 Skrining Fitokimia

a. Uji alkaloid

Sebanyak 2 ml larutan ekstrak diuapkan hingga tersisa residu. Residu kemudian dicampurkan dengan asam klorida 2N sebanyak 1 ml dan air suling sebanyak 9 ml. Pindahkan filtrat ke dalam 3 tabung reaksi, kemudian dimasukkan pereaksi mayer dan pereaksi dragendorff sebanyak 2 tetes pada masing-masing tabung. Jika setelah ditambahkan pereaksi mayer dan larutan terbentuk endapan putih atau kuning maka ekstrak positif mengandung alkaloid dan jika terbentuk endapan oranye kuning setelah ditambahkan pereaksi dragendorff maka sampel ekstrak positif mengandung alkaloid (Endarini, 2016).

b. Uji flavonoid

Sebanyak 1 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan serbuk magnesium sebanyak 0,5 gram dan HCl pekat sebanyak 10 tetes. Jika larutan berubah warna menjadi jingga, merah muda, atau merah maka sampel ekstrak positif mengandung senyawa aktif flavonoid (Endarini, 2016).

c. Uji terpenoid

Sebanyak 1 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, kemudian ditambahkan asetat anhidrida sebanyak 3 tetes dan asam sulfat pekat sebanyak 1 tetes. Jika larutan muncul warna merah maka sampel ekstrak positif mengandung terpenoid.

d. Uji tanin

Sebanyak 1 ml ekstrak dimasukkan ke dalam tabung reaksi, masukan larutan FeCl_3 1% sebanyak 2 tetes. Jika terbentuk warna hijau tua atau biru-hijau maka sampel ekstrak positif mengandung tanin (Endarini, 2016).

e. Uji saponin

Sebanyak 0,5 gram serbuk simplisia dimasukkan ke dalam tabung reaksi, masukan aquades panas sebanyak 10 ml lalu kocok selama 10 detik. Jika terbentuk buih yang menetap dengan ketinggian 1 – 10 cm dan tidak hilang ketika ditambahkan 1 tetes HCl 2N maka sampel positif mengandung saponin (DepKes, 1995).

3.6.3 Uji Aktivitas Antioksidan Metode *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH)

Pada uji aktivitas antioksidan, langkah pertama dilakukan pengenceran dari masing-masing sampel ekstrak terlebih dahulu, pengenceran dibuat menjadi enam rentang (*range*) yaitu di 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm. Perhitungan komposisi untuk menentukan komposisi pengenceran ekstrak setiap rentang yaitu jika 1 mg dalam 1 ml pelarut (1 mg/ml) adalah 1000 ppm, maka nilai rentang konsentrasi 50 ppm didapat dari 1 mg sampel ekstrak yang dilarutkan dengan 20 ml pelarut (0,05 mg/ml). Berikut rincian komposisi pengenceran hasil perhitungan setiap rentang konsentrasi:

50 ppm	= 1 mg ekstrak	+ 20 ml pelarut metanol
75 ppm	= 1,5 mg ekstrak	+ 20 ml pelarut metanol
100 ppm	= 2 mg ekstrak	+ 20 ml pelarut metanol
125 ppm	= 2,5 mg ekstrak	+ 20 ml pelarut metanol
150 ppm	= 3 mg ekstrak	+ 20 ml pelarut metanol
200 ppm	= 4 mg ekstrak	+ 20 ml pelarut metanol

Pengenceran dengan komposisi pelarut metanol sebanyak 20 ml karena menyesuaikan dengan volume dari botol vial yang digunakan sebagai wadah

pengenceran ketiga sampel ekstrak. Selanjutnya, membuat larutan *2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl* (DPPH) konsentrasi 100 ppm dengan menimbang 3 mg serbuk dpph dan dilarutkan dengan 30 ml metanol (perbandingan 1 : 10). Larutan dpph dimasukan pada erlenmeyer ukuran 100 ml menggunakan mikropipet dan blue tip 1000 µl dan seluruh bagian erlenmeyer ditutup dengan aluminium foil agar tidak terkena cahaya. Setelah pembuatan larutan dpph selesai, langkah selanjutnya membuat larutan vitamin C konsentrasi 100 ppm menggunakan serbuk *Ascorbic acid* yang akan digunakan sebagai kontrol positif (+). Digunakan sebagai kontrol + karena vitamin C mempunyai persentase aktivitas antioksidan yang tinggi. Proses pembuatannya, serbuk *Ascorbic acid* ditimbang sebanyak 0,5 mg dan dilarutkan dengan 5 ml metanol (perbandingan 1 : 10). Larutan *ascorbic acid* kemudian dimasukan dalam tabung reaksi menggunakan mikropipet dan blue tip 1000 µl dan disimpan pada rak tabung reaksi sebagai larutan sampel kontrol positif yang akan direaksikan dengan larutan dpph. Setelah larutan dpph dan larutan kontrol + dibuat, selanjutnya membuat larutan blanko sebagai kontrol negatif untuk pembuatannya hanya memasukan larutan metanol (pelarut dari semua sampel) sebanyak 1 ml menggunakan mikropipet dan blue tip 1000 µl kedalam tabung reaksi. Setelah larutan dpph, larutan kontrol positif dan kontrol negatif selesai dibuat, langkah selanjutnya masing-masing dari pengenceran ekstrak rentang 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 125 ppm, 150 ppm, dan 200 ppm diambil 1 ml menggunakan mikropipet dan blue tip 1000 µl dan dimasukan kedalam tabung reaksi.

Semua tabung reaksi kemudian diberikan label kode sampel sesuai jenis sampel ekstrak dan rentang pengenceran, contoh: K50 ppm, K75 ppm, K100 ppm, K125 ppm, K150 ppm, dan K200 ppm untuk tabung reaksi dengan sampel ekstrak kunyit, DLS50 ppm, DLS75 ppm, DLS100 ppm, DLS125 ppm, DLS150 ppm, dan DLS200 ppm untuk tabung reaksi dengan sampel ekstrak daun labu siam, DM50 ppm, DM75 ppm, DM100 ppm, DM125 ppm, DM150 ppm, dan DM200 ppm untuk tabung reaksi dengan sampel ekstrak daun mengkudu, C + untuk tabung reaksi dengan sampel kontrol positif, dan C – untuk tabung reaksi dengan sampel kontrol negatif. Setelah semua larutan sampel selesai dibuat, tabung reaksi dengan kode sampel ekstrak dan kode sampel kontrol positif ditambahkan larutan dpph menggunakan mikropipet dan blue tip 1000 µl masing-masing 1 ml sehingga

perbandingan larutan sampel dan larutan dpph dalam tabung reaksi menjadi 1:1. Setelah semua larutan sampel selesai ditambahkan larutan dpph, segera tutup semua bagian tabung reaksi dengan aluminium foil dan homogenkan masing-masing tabung reaksi menggunakan vortex (Vortex Mixer Thermo Scientific 88882010) dengan settingan 50 – 2800 rpm selama 10 detik. Ketika semua tabung reaksi selesai di vortex, simpan kembali pada rak tabung reaksi dan diamkan selama 30 menit, pada tahap ini terjadi proses reaksi antar larutan sampel uji dengan larutan dpph yang dimana biasanya terjadi perubahan warna larutan setelah ditambahkan larutan dpph.

Semakin tinggi kadar antioksidan yang terkandung dalam suatu sampel ekstrak maka warna larutan akan tampak semakin cerah ketika direaksikan dengan larutan dpph. Jika sudah didiamkan selama 30 menit, setiap dari masing-masing sampel termasuk sampel semua pengenceran ekstrak, sampel larutan kontrol, dan sampel larutan dpph semua diambil 200 µl menggunakan mikropipet dan blue tip 200 µl dan dimasukkan kedalam microplate 96 well dengan 3 kali pengulangan pada setiap sampel. Microplate kemudian dilakukan pengecekan menggunakan TECAN (Microplate Reader TECAN Infinite 200 Pro) guna mengetahui nilai absorbansi dari masing-masing sampel. Rumus yang digunakan untuk menghitung persentase aktivitas antioksidan adalah sebagai berikut:

$$(\%) \text{ Aktivitas Antioksidan} = \frac{\text{Abs kontrol} - \text{Abs sampel}}{\text{Abs kontrol}} \times 100\%$$

3.6.4 Uji Aktivitas Antibakteri Metode Sumuran dan Metode Difusi Kertas

Cakram

Uji aktivitas antibakteri dilakukan guna mengetahui apakah ekstrak kunyit, daun mengkudu dan daun labu siam memiliki sifat pertentangan terhadap bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, BCI3, dan AES3.

a. Inokulasi bakteri

Inokulasi merupakan kegiatan atau pekerjaan memindahkan organisme mikroskopik (mikroba) dari media lama ke media baru dengan tingkat ketelitian yang sangat tinggi (Sari, 2017). Inokulasi dilakukan di ruangan khusus yaitu Laminar agar tidak terjadi kontaminasi oleh mikroba lain. Tahap awal yaitu menimbang Nutrient Broth (NB) yang akan

digunakan sebagai media pertumbuhan 4 bakteri patogen ikan. Ketentuan penggunaan media Nutrient Broth yaitu *8 gram in 1 liter*, sehingga untuk 50 ml diperlukan sebanyak 0,4 gram NB untuk 1 jenis bakteri patogen dalam satu wadah erlenmeyer. Erlenmeyer yang digunakan yaitu berukuran 100 ml, setelah menimbang masing-masing sebanyak 0,4 gram media NB dimasukkan kedalam erlenmeyer dan dilarutkan menggunakan air aquades masing-masing sebanyak 50 ml. Setelah NB larut, masing-masing isolat bakteri *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, BCI3, dan AES3 dimasukkan menggunakan kawat ose sebanyak 1 ose (1 kali ose) ke dalam masing-masing erlenmeyer proses pemindahan isolat bakteri ini dilakukan di ruangan khusus dan steril yaitu di laminar (Laminar Air Flow (vertical) LAF 130) agar tidak terkontaminasi oleh mikroba lain. Erlenmeyer kemudian dikasih label sesuai dengan nama masing-masing jenis bakteri yang sudah dimasukkan dan kemudian ditutup rapat menggunakan aluminium foil dengan dilapisi plastik tahan panas dan dirapatkan menggunakan karet gelang. Setelahnya, masing-masing media bakteri diinkubasi bergoyang menggunakan alat shaker (Shaker DLAB SK-0330-PRO) dengan kecepatan putaran 121 rpm selama 1 x 24 jam. Apabila sudah 1 x 24 jam amati apakah bakteri tumbuh pada media baru, bakteri yang tumbuh ditandai dengan ciri-ciri keruh putih atau kuning dan apabila media masih terlihat bening shaker dilanjutkan kembali 1 sampai 2 hari kedepan sampai media terlihat keruh dan bakteri benar-benar tumbuh. Jika bakteri tetap tidak tumbuh ulangi proses inokulasi dari awal.

- b. Uji antagonistik ekstrak kunyit, daun mengkudu dan daun labu siam terhadap bakteri patogen *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, BCI3, dan AES3.

Tahap awal pada langkah ini yaitu masing-masing sampel ekstrak ditimbang sebanyak 1 mg kemudian dilarutkan menggunakan pelarut *Dimethyl sulfoxide* (DMSO) sebanyak 1 ml (perbandingan 1:1). Tahap selanjutnya, menimbang media Nutrient Agar (NA) yang akan digunakan sebagai media uji zona hambat bakteri. Ketentuan penggunaan media Nutrient Agar yaitu *20 gram in 1 liter* sehingga untuk 75 ml dibutuhkan

sebanyak 1,5 gram NA untuk 1 jenis bakteri dalam satu wadah erlenmeyer yang akan dibagi kedalam 3 cawan petri (3 ulangan). Masing-masing 1,5 gram NA dimasukkan ke dalam masing-masing erlenmeyer berukuran 100 ml, kemudian dilarutkan menggunakan aquades sebanyak 75 ml. Erlenmeyer kemudian ditutup menggunakan aluminium foil dengan dilapisi plastik tahan panas dan rapatkan menggunakan karet gelang lalu dipanaskan menggunakan hotplate (hotplate stirrer boeco MSH-420) dengan stirrer sebagai pengaduk pada suhu 75 - 150°C dan kecepatan perputaran stirrer 500 - 1.500 rpm sampai NA benar-benar larut dalam aquades. Setelah larut, media NA didinginkan sebentar dan dilanjutkan dengan disterilisasi menggunakan autoclave (Autoclave TOMY SX-700) pada suhu 121°C selama 1 jam bersamaan dengan cawan petri agar semuanya steril dari mikroba lain sebelum dilakukan pengujian pada mikroba yang baru.

Setelah proses sterilisasi selesai, erlenmeyer yang berisi media NA, cawan petri, sampel ekstrak yang sudah dilarutkan DMSO, erlenmeyer yang berisi media NB yang sudah tumbuh bakteri, beserta dengan alat dan bahan lain yang diperlukan pada uji antibakteri dibawa ke ruang khusus uji bakteri yaitu ruang di laminar (Laminar Air Flow (vertical) LAF 130) agar tidak terkontaminasi oleh mikroba lain. Masing-masing erlenmeyer berisikan media NA dibuka penutupnya, lalu setiap dari masing-masing erlenmeyer tersebut ditambahkan sebanyak 1 ml media NB yang sudah tumbuh bakteri menggunakan mikropipet dan tip pipet berukuran 1000µl dan diberi label sesuai nama bakteri yang dimasukkan. Tahap selanjutnya yaitu masing-masing media NA yang sudah ditambahkan bakteri dituangkan ke cawan petri segera agar tidak mengeras dalam tabung erlenmeyer. Untuk 75 ml media NA bisa terpakai tiga cawan petri (3 ulangan) untuk satu sampel bakteri sehingga untuk 4 jenis bakteri bisa terpakai 12 cawan petri untuk 1 metode uji. Setelah semua media NA dituangkan dalam cawan petri, masing-masing cawan petri diberi tanda label sesuai jenis bakteri yang ada didalamnya dan kemudian diamankan selama 5 menit hingga NA mengeras dalam cawan petri. Semua cawan petri bagian alas kemudian dibentuk garis

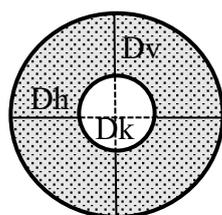
membentang vertikal dan horizontal guna membagi menjadi 4 zonasi (1 bagian kontrol dan 3 bagian untuk 3 jenis ekstrak).

Tahap metode sumuran, NA pada keempat zonasi dalam setiap cawan petri dilubangi menggunakan tip pipet ukuran 1000 μ l dengan diameter lubang tip pipet 8 mm, kemudian masing-masing sampel ekstrak beserta kontrol dimasukkan kedalam lubang tersebut menggunakan mikropipet dan tip pipet berukuran 100 μ l sebanyak 50 μ l (0,05 ml) setelahnya tutup cawan petri dan lapisi bagian samping cawan menggunakan plastik wrap agar tidak terkontaminasi mikroba lain.

Tahap metode kertas cakram, NA pada keempat zonasi dalam setiap cawan petri bagian atas (permukaan) ditempelkan kertas cakram yang sudah di teteskan sebanyak 50 μ l sampel ekstrak dan kontrol kemudian tutup cawan petri dan lapisi bagian samping cawan menggunakan plastik wrap. Setiap zonasi dalam setiap cawan petri diberikan tanda dengan kode sampel C+ untuk kode sampel kontrol positif dari kloramfenikol, C- untuk kode sampel kontrol negatif, K untuk kode sampel ekstrak kunyit, DLS untuk kode sampel ekstrak daun labu siam, dan DM untuk kode sampel dengan ekstrak daun mengkudu. Semua cawan petri kemudian diinkubasi di ruangan inkubasi bakteri pada suhu ruang 37°C selama 24 jam yang kemudian dilanjutkan dengan melakukan pengamatan, pengukuran, pencatatan dan dokumentasi zona hambat yang terbentuk pada setiap perlakuan.

Pengukuran zona hambat bakteri dapat dihitung dengan menggunakan rumus Harti (2015), yaitu:

$$\frac{(Dv - Dk) + (Dh - Dk)}{2}$$



Keterangan:



= Zona hambat

Dv

= Diameter vertikal

Dh

= Diameter horizontal

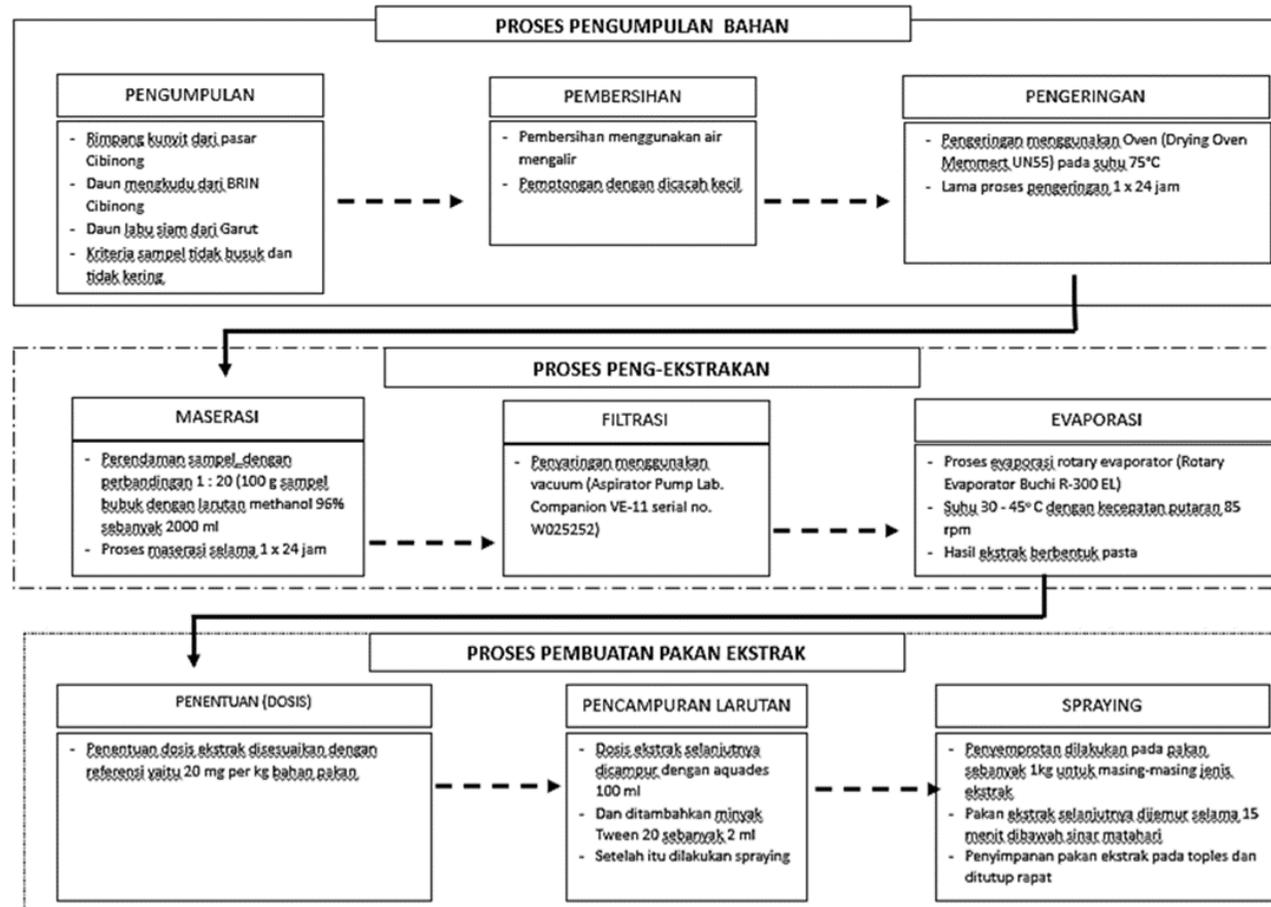
Dk

= Diameter koloni

3.6.5 Aplikasi Ekstrak pada Pakan

Tahap pengaplikasian ekstrak pada pakan dilakukan dengan harapan ekstrak bisa langsung masuk pada tubuh ikan melalui pakan. Untuk prosedurnya, masing-masing ekstrak ditimbang sebanyak 20 mg lalu diencerkan menggunakan pelarut tween 20 sebanyak 2 ml menggunakan pipet tetes dan kemudian diaduk menggunakan spatula (sendok laboratorium). Setelah ekstrak larut dalam tween, ditambahkan sebanyak 100 ml aquades, aduk kembali menggunakan spatula dan kemudian dimasukkan ke dalam botol spray transparan volume 100 ml. Botol spray diberi tanda label sesuai jenis ekstrak dan disemprotkan pada 1 kg pakan pellet jenis eko feed-2 sambil dilakukan pengadukan agar merata. Pakan pellet disimpan pada nampan, dijemur selama 15 menit agar sampel ekstrak menyatu pada pakan pellet dan setelah kering pakan pellet dimasukkan pada wadah toples plastik transparan yang diberi label sesuai jenis ekstrak didalamnya.

PEMBUATAN PAKAN EKSTAK KUNYIT, DAUN MENGKUDU, DAN DAUN LABU SIAM



Gambar 3.1 Proses Pembuatan Pakan dengan Tambah Ekstrak

Ramdani, 2024

PENGARUH EKSTRAK KUNYIT, DAUN LABU SIAM, DAN DAUN MENGKUDU TERHADAP AKTIVITAS ANTAGONISTIK BAKTERI PATOGEN DAN PERTUMBUHAN IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

3.6.6 Persiapan Air Pemeliharaan Ikan Uji

Air yang digunakan untuk pemeliharaan ikan merupakan air dari Laboratorium Budidaya (*hatchery*). Sebelum digunakan, beberapa parameter fisika, kimia, dan biologi air di cek terlebih dahulu. Standard parameter mengacu pada Peraturan Pemerintah (PP) No. 82 Tahun 2001 (Kelas II) diantaranya pH 6 – 9, *Dissolved oxygen* (DO), > 4 mg/l, nitrat max. 10 mg/L, Fosfat max. 0,2 mg/L, Amoniak $\leq 0,02$ mg/l, *Biochemical Oxygen Demand* (BOD) < 3 mg/L.

Parameter kualitas air yang peneliti cek yaitu warna, bau, rasa, pH, kadar oksigen terlarut (DO), dan suhu air. Proses pengecekannya dilakukan secara langsung di laboratorium budidaya dan laboratorium SKP. Untuk pengecekan warna, bau, dan rasa di cek secara langsung menggunakan indra pelihat, indra pengecap dan indra pembau saat sebelum air digunakan. Hasilnya air jernih, tidak beraroma dan hambar (netral). Pengecekan suhu air, pH dan DO menggunakan termometer, kertas pH atau pH meter dan DO meter dengan cara dicelupkan dan ditunggu hingga angka berhenti, untuk nilai suhu air di laboratorium budidaya didapat pada 26°C, pH air di angka 7 dan DO air di angka 6-7 mg/l. Setelah air laboratorium memenuhi kriteria, air kemudian ditampung dan diendapkan beberapa hari pada ember besar (bak tandon) dan tahap selanjutnya dipindahkan ke wadah pemeliharaan.

3.6.7 Persiapan Wadah Pemeliharaan Ikan Uji

Wadah yang digunakan pada pemeliharaan ikan uji menggunakan *container box* berukuran 25 liter sebanyak 12 buah. *Container box* dicuci terlebih dahulu kemudian diisi air dari kolam tandon sebanyak 7/8 liter dari total volume *container box*, kemudian masing-masing wadah diberi label perlakuan.

3.6.8 Persiapan Ikan Uji

Ikan yang digunakan adalah ikan yang diambil dari Balai Budidaya Air Tawar (BBAT) Curug Barang Kabupaten Pandeglang dengan ukuran 9 – 12 cm sebanyak 120 ekor. Setelah ikan sampai di laboratorium budidaya (*hatchery*) ikan dilakukan proses aklimatisasi terlebih dahulu dengan tujuan ikan dapat beradaptasi dengan lingkungan baru. Proses aklimatisasi dilakukan dalam waktu 15 menit, selanjutnya ikan dimasukkan ke dalam wadah pemeliharaan masing-masing wadah sebanyak 10 ekor. Sebelum diberikan perlakuan, ikan dipuasakan selama 24 jam

dan kemudian dilakukan pemeliharaan selama 7 hari untuk adaptasi lingkungan. budidaya (*hatchery*) ikan dilakukan proses aklimatisasi terlebih dahulu dengan tujuan ikan dapat beradaptasi dengan lingkungan baru. Proses aklimatisasi dilakukan dalam waktu 15 menit, selanjutnya ikan dimasukkan ke dalam wadah pemeliharaan masing-masing wadah sebanyak 10 ekor. Sebelum diberikan perlakuan, ikan dipuasakan selama 24 jam dan kemudian dilakukan pemeliharaan selama 7 hari untuk adaptasi lingkungan.

3.6.9 Pemberian Pakan Ikan Uji

Pemberian pakan pada penelitian ini dilakukan sebanyak dua kali dalam sehari yaitu pada pagi hari pukul 08.00 WIB dan sore hari pukul 16.00 WIB dengan konsentrasi pemberian pakan sebanyak 3% dari bobot ikan. Setiap minggu dilakukan penimbangan bobot ikan guna mengetahui perkembangan bobot ikan dan dapat dilakukan pengubahan konsentrasi pemberian pakan. Perhitungan konsentrasi pemberian pakan dapat dihitung menggunakan rumus (Listiyani, 2017):

$$\Sigma W \times 3\% = F$$

Keterangan:

ΣW = Jumlah bobot ikan dalam satu pengulangan

3% = Konsentrasi pemberian pakan

F = Takaran pakan yang diberikan

3.6.10 Pemeliharaan Ikan Uji

Pemeliharaan ikan uji dilakukan selama 28 hari, setiap 1 kali sehari kolam ikan disifon pada waktu pagi hari pukul 06.00 WIB sampai dengan pukul 07.00 WIB guna membersihkan residu dari sisa-sisa makanan dan kotoran ikan. Selanjutnya kolam diisi air kembali dari bak tandon sesuai volume awal.

3.7 Parameter Pengamatan

Parameter pengamatan pada penelitian ini yaitu data pertumbuhan, kelangsungan hidup, rasio konversi pakan, dan kondisi lingkungan ikan mas (*Cyprinus carpio*) diamati setiap minggu selama 28 hari.

3.7.1 Bobot Mutlak

Bobot mutlak merupakan total nilai bobot ikan diakhir pemeliharaan dikurangi dengan total nilai bobot ikan pada awal pemeliharaan. Menentukan nilai

pertumbuhan bobot mutlak dapat dihitung menggunakan rumus (Zonneveld *et al.*, 1991):

$$W = W_t - W_o$$

Keterangan:

W = Pertumbuhan bobot mutlak (g)

W_t = Bobot akhir pemeliharaan (g)

W_o = Bobot awal pemeliharaan (g)

3.7.2 Laju Pertumbuhan Spesifik (*Specific Growth Rate*)

Laju pertumbuhan spesifik atau *Specific Growth Rate* (SGR) merupakan perubahan pertumbuhan ikan seiring dengan perubahan waktu selama proses pemeliharaan. Laju pertumbuhan ikan spesifik (SGR) dapat dihitung menggunakan rumus (Zonneveld *et al.*, 1991):

$$SGR = \frac{\ln W_t - \ln W_o}{t} \times 100$$

Keterangan:

SGR = Laju pertumbuhan spesifik (%/hari)

W_t = Bobot biomassa ikan akhir pemeliharaan (g)

W_o = Bobot biomassa ikan awal pemeliharaan (g)

t = Waktu pemeliharaan (hari)

3.7.3 Panjang Mutlak

Panjang mutlak merupakan selisih nilai panjang akhir ikan dengan panjang awal ikan selama proses pemeliharaan. Panjang mutlak ikan dapat dihitung menggunakan rumus (Zonneveld *et al.*, 1991):

$$L = L_t - L_o$$

Keterangan:

L = Panjang mutlak (cm)

L_t = Panjang ikan akhir pemeliharaan (cm)

L_o = Panjang ikan awal pemeliharaan (cm)

3.7.4 Tingkat Kelangsungan Hidup (*Survival Rate*)

Tingkat kelangsungan hidup ikan atau *Survival Rate* (SR) merupakan jumlah banyaknya ikan yang hidup pada akhir pemeliharaan dengan jumlah ikan

Ramdani, 2024

PENGARUH EKSTRAK KUNYIT, DAUN LABU SIAM, DAN DAUN MENGGUDU TERHADAP AKTIVITAS ANTAGONISTIK BAKTERI PATOGEN DAN PERTUMBUHAN IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

yang ditebar pada awal pemeliharaan. Tingkat kelangsungan hidup (SR) ikan dapat dihitung menggunakan rumus (Zonneveld *et al.*, 1991):

$$SR = \frac{N_t}{N_o} \times 100$$

Keterangan:

SR = Tingkat kelangsungan hidup ikan (%)

N_t = Jumlah ikan pada akhir pemeliharaan (ekor)

N_o = Jumlah ikan pada awal pemeliharaan (ekor)

3.7.5 Rasio Konversi Pakan (*Feed Conversion Ratio*)

Rasio konversi pakan atau *Feed Conversion Ratio* (FCR) merupakan konversi pakan yang diberikan terhadap bobot ikan yang dihasilkan selama proses pemeliharaan. Rasio konversi pakan (FCR) dapat dihitung menggunakan rumus Effendi, (1997):

$$FCR = \frac{F}{(W_t + D) - W_o}$$

Keterangan:

FCR = Rasio konversi pakan

F = Jumlah pakan yang diberikan selama pemeliharaan (g)

W_t = Berat total ikan akhir pemeliharaan (g)

D = Bobot ikan mati selama pemeliharaan (g)

W_o = Berat total ikan saat awal pemeliharaan (g)

3.7.6 Kondisi Lingkungan (*Parameter Kualitas Air*)

Kondisi lingkungan yang diukur meliputi kondisi suhu, pH dan oksigen terlarut (DO) pada air pemeliharaan. Pengukuran dilakukan setiap 1 kali dalam seminggu dan dilakukan di waktu pagi atau sore hari.

3.8 Analisis Data

Data yang diperoleh dari hasil penelitian diolah dengan menggunakan microsoft excel dan dianalisis dengan menggunakan SPSS 27. Data pertumbuhan bobot mutlak, laju pertumbuhan spesifik (SGR), pertumbuhan panjang mutlak, tingkat kelangsungan hidup ikan (SR), dan rasio konversi pakan (FCR) dianalisis

Ramdani, 2024

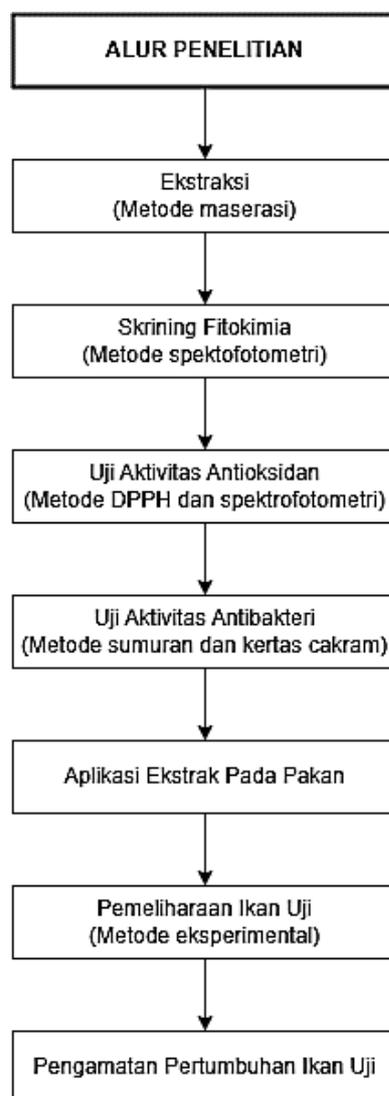
PENGARUH EKSTRAK KUNYIT, DAUN LABU SIAM, DAN DAUN MENGGUDU TERHADAP AKTIVITAS ANTAGONISTIK BAKTERI PATOGEN DAN PERTUMBUHAN IKAN MAS (Cyprinus carpio)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu

menggunakan uji normalitas, uji homogenitas, dan uji *Analysis of variance* (ANOVA) satu arah (*One Way Anova*) untuk melihat dan membandingkan pengaruh dari perlakuan yang digunakan yaitu variabel independen (ekstrak) terhadap variabel dependen (pertumbuhan ikan). Selanjutnya dilakukan uji beda nyata jujur (BNJ) atau tukey untuk melihat variansi dari tiap perlakuan terhadap variabel yang diuji pada taraf 0,05 atau 5%.

3.9 Alur Penelitian

Alur penelitian merupakan kegiatan pelaksanaan penelitian dari tahap awal hingga tahap akhir. Keseluruhan kegiatan pada penelitian ini dapat dilihat pada gambar diagram alur di bawah ini:



Gambar 3.2 Diagram Alur Penelitian

Ramdani, 2024

PENGARUH EKSTRAK KUNYIT, DAUN LABU SIAM, DAN DAUN MENGGUDU TERHADAP AKTIVITAS ANTAGONISTIK BAKTERI PATOGEN DAN PERTUMBUHAN IKAN MAS (*Cyprinus carpio*)

Universitas Pendidikan Indonesia | repository.upi.edu | perpustakaan.upi.edu