

**UJI DAYA HAMBAT BAKTERI PATOGENIK AIR TAWAR
Aeromonas hydrophila, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas* sp
SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR FENOL *Gracilaria verrucosa***

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh:
NORMAN SYAH JUNAIDI
NIM. 0810850051



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

**UJI DAYA HAMBAT BAKTERI PATOGENIK AIR TAWAR
Aeromonas hydrophila, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas* sp
SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR FENOL *Gracilaria verrucosa***

**SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

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

**Oleh:
NORMAN SYAH JUNAIDI
NIM. 0810850051**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2013**

SKRIPSI

UJI DAYA HAMBAT BAKTERI PATOGENIK AIR TAWAR
Aeromonas hydrophila, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas* sp
SETELAH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR FENOL *Gracilaria verrucosa*

Oleh :
NORMAN SYAH JUNAIDI
NIM. 0810850051

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 1 Agustus 2013
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui

Dosen Penguji I

(Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, MS.i)
NIP. 19600425 198503 1 002
TANGGAL :

Dosen Penguji II

(Dr. Ir. Agoes Soeprijanto, MS)
NIP. 19590807 198601 1 001
TANGGAL :

Dosen Pembimbing I

(Prof. Ir. Marsoedi, Ph.D)
NIP. 19460320 197303 1 001
TANGGAL :

Dosen Pembimbing II

(Dr. Ir. Maftuch, MS.i)
NIP. 19660825 199203 1 001
TANGGAL :

Mengetahui,
Ketua Jurusan

(Dr. Ir. Happy Nursyam, MS)
NIP. 19600322 198601 1 001
TANGGAL:

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, 18 Juli 2013

Mahasiswa

Norman Syah Junaidi



UCAPAN TERIMAKASIH

Penulis menyampaikan ucapan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Prof. Ir. Marsoedi, Ph.D selaku pembimbing 1
2. Bapak Dr. Ir. Maftuch, MS.i selaku pembimbing 2
3. Bapak Dr. Ir. Abd. Rahem Faqih, MS.i selaku penguji 1
4. Bapak Dr. Ir. Agoes Soeprijanto, MS selaku penguji 2
5. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi atas Pendanaan Dalam Penelitian Hibah Bersaing Institusi Batch I Tahun Anggaran 2012, melalui DIPA UB No.0636/023-04.2.16/15/2012, tanggal 9 Desember 2011 dan SK REKTOR UB No.366/SK/2012, tanggal 13 Agustus 2012.
6. Laboran Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan yang banyak membantu dalam menyelesaikan penelitian ini
7. Sujud dan terima kasih yang dalam penulis persembahkan kepada Ibunda dan Ayahanda tercinta, atas dorongan yang kuat, kebijaksanaan dan do'a.
8. Teman-teman seperjuangan program studi S1 Budidaya Perairan angkatan 2008 (Bajak Tambak Community) yang telah memberikan semangat serta dorongan dalam menyelesaikan penelitian ini

Malang, 18 Juli 2013

Penulis

RINGKASAN

Norman Syah Junaidi, Skripsi tentang Uji Daya Hambat Bakteri Patogenik Air Tawar *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas sp* Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Fenol *Gracilaria verrucosa* (di bawah bimbingan **Prof. Ir. Marsoedi, Ph.D dan Dr. Ir. Maftuch, MS.i**).

Gracilaria verrucosa merupakan salah satu spesies alga merah yang banyak tumbuh di perairan Indonesia. Alga merah merupakan kelompok yang jenis-jenisnya memiliki berbagai bentuk dan variasi warna. Salah satu ciri alga merah adalah warnanya akan berubah menjadi ungu atau merah jika mengalami kekeringan akibat terkena sinar matahari langsung.

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui daya hambat ekstrak fenol *Gracilaria verrucosa* terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Pseudomonas sp*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Rancangan penelitian yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL). Penelitian ini terdiri dari empat perlakuan dan tiga ulangan. Sebagai perlakuan yaitu dosis ekstrak *Gracilaria verrucosa* (K = 0 ppt, A = 1 ppt, B = 1.5 ppt dan C = 2 ppt). parameter penunjangnya yaitu (Suhu dan pH).

Hasil dari penelitian ini menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata pada masing-masing perlakuan. Dari hasil penelitian diperoleh rata-rata diameter daya hambat pada bakteri *A. hydrophila* pada perlakuan Kontrol (0 ppt) adalah 5 mm, perlakuan A (1 ppt) adalah 12,33 mm, perlakuan B (1.5 ppt) adalah 14.67 mm dan perlakuan C (2 ppt) adalah 16.00 mm. Bakteri *A. salmonicida* pada perlakuan Kontrol (0 ppt) adalah 5 mm, perlakuan A (1 ppt) adalah 12,33 mm, perlakuan B (1.5 ppt) adalah 13.33 mm dan perlakuan C (2 ppt) adalah 15.00 mm. Bakteri *Pseudomonas* pada pengamatan 24 jam, perlakuan Kontrol (0 ppt) adalah 5 mm, perlakuan A (1 ppt) adalah 13,33 mm, perlakuan B (1.5 ppt) adalah 14.83 mm dan perlakuan C (2 ppt) adalah 15.67 mm. sedangkan pada pengamatan 48 jam perlakuan Kontrol (0 ppt) adalah 5 mm, perlakuan A (1 ppt) adalah 14,33 mm, perlakuan B (1.5 ppt) adalah 15.83 mm dan perlakuan C (2 ppt) adalah 17.50 mm.

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu pemberian ekstrak fenol *Gracilaria verrucosa* terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Pseudomonas sp* memberikan hasil rata-rata diameter daya hambat yang berbeda. Dari penelitian ini disarankan penelitian lanjutan untuk mendapatkan dosis yang optimal.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Rasulullah SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian skripsi ini.

Laporan ini disusun berdasarkan hasil penelitian skripsi tentang Uji Daya Hambat Bakteri Patogenik Air Tawar *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida*, *Pseudomonas* sp Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Fenol *Gracilaria verrucosa*.

Penulis menyadari bahwa penulisan laporan ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, penulis megharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan laporan ini. Namun demikian, penulis berharap semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi pihak-pihak yang berminat dan memerlukannya.

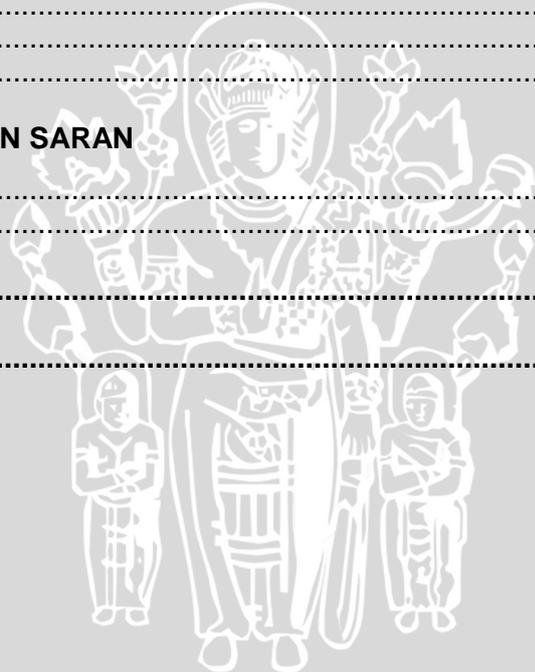
Malang, 18 Juli 2013

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	v
DAFTAR TABEL	vi
DAFTAR LAMPIRAN	vii
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan Penelitian	5
1.4 Hipotesis	5
1.5 Kegunaan	5
1.6 Tempat dan Waktu	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Gracilaria verrucosa</i>	6
2.1.1 Morfologi dan Klasifikasi	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	7
2.1.3 Manfaat dan Kegunaan	7
2.1.4 Bahan Aktif	8
2.2 Bakteri <i>Aeromonas hydrophila</i>	10
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	10
2.2.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan	11
2.3 Bakteri <i>Aeromonas salmonicida</i>	12
2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi	12
2.3.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan	12
2.4 Bakteri <i>Pseudomonas</i> sp	13
2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi	13
2.4.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan	14
2.5 Ekstrak Fenol	14
2.5.1 Ekstraksi	14
2.5.2 Senyawa Fenol	16
2.6 Uji Aktivitas Antibakteri	17
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	19
3.1.1 Peralatan Penelitian	19
3.1.2 Bahan Penelitian	19
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian	19

3.2.1 Metode Penelitian	19
3.2.2 Uji Pendahuluan.....	20
3.2.3 Rancangan Penelitian	20
3.3 Prosedur Penelitian.....	22
3.3.1 Persiapan Penelitian.....	22
3.3.2 Pelaksanaan Penelitian	23
3.4 Analisis Data.....	28
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Karakteristik Ekstrak Kasar Fenol <i>Gracilaria verrucosa</i>	29
4.2 Hasil Daya Hambat Bakteri dengan Uji Cakram	31
4.2.1 Hasil rata-rata jumlah daya hambat bakteri <i>A. hydrophila</i>	32
4.2.2 Hasil rata-rata jumlah daya hambat bakteri <i>A. Salmonicida</i>	34
4.2.3 Hasil rata-rata jumlah daya hambat bakteri <i>Pseudomonas</i>	36
4.3 Perbandingan diameter zona penghambatan bakteri <i>A. Hydrophila</i> , <i>A. Salmonicida</i> dan <i>Pseudomonas</i> terhadap pemberian ekstrak Kasar Fenol <i>Gracilaria verrucosa</i>	40
4.4 Lingkungan hidup Bakteri <i>A. Hydrophila</i> , <i>A. Salmonicida</i> dan <i>Pseudomonas</i>	41
4.4.1 pH	41
4.4.2 Suhu.....	42
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1 Kesimpulan	43
5.2 Saran	43
DAFTAR PUSTAKA.....	44
LAMPIRAN.....	48



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Gracilaria verrucosa</i>	7
2. Struktur Molekul Fenol.....	16
3. Denah Penelitian.....	21
4. Alat Sterilisasi <i>Autoclave</i>	24
5. Sterilisasi Tempat dan Tangan Laboran.....	25
6. Teknik Penuangan Media.....	26
7. Metode Penanaman Bakteri Dengan Spread dan Metode Pengujian Antibiotik Kirby-Bauer.....	27
8. Spektra UV-Vis Total Fenol.....	30
9. Spektra FT-Infra Red Total Fenol.....	30
10. Grafik Daerah Hambat Pertumbuhan <i>A. hydrophila</i>	33
11. Grafik Daerah Hambat Pertumbuhan <i>A. salmonicida</i>	35
12. Grafik Daerah Hambat Pertumbuhan <i>Pseudomonas</i> 24 jam.....	37
13. Grafik Daerah Hambat Pertumbuhan <i>Pseudomonas</i> 48 jam.....	39
14. Gambar Grafik Perbandingan diameter zona hambat pada bakteri <i>A. hydrophila</i> , <i>A. salmonicida</i> dan <i>Pseudomonas</i>	41

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan Perlakuan Penelitian	21
2. Karakteristik ekstrak kasar Fenol <i>Gracilaria verrucosa</i>	29
3. Data Jumlah Daya Hambat Pada Uji Cakram Bakteri <i>A. hydrophila</i>	32
4. Analisis Keragaman <i>A. Hydrophila</i>	32
5. Uji Beda Nyata Terkecil Daya Hambat Bakteri <i>A. Hydrophila</i>	33
6. Sidik Ragam Regresi	33
7. Data Jumlah Daya Hambat Pada Uji Cakram Bakteri <i>A. salmonicida</i> ..	34
8. Analisis Keragaman <i>A. Salmonicida</i>	34
9. Uji Beda Nyata Terkecil Daya Hambat Bakteri <i>A. Salmonicida</i>	35
10. Sidik Ragam Regresi	35
11. Data Jumlah Daya Hambat Pada Uji Cakram <i>Pseudomonas</i> 24 jam ..	36
12. Analisis Keragaman <i>Pseudomonas</i>	36
13. Uji Beda Nyata Terkecil Daya Hambat Bakteri <i>Pseudomonas</i>	37
14. Sidik Ragam Regresi	37
15. Data Jumlah Daya Hambat Pada Uji Cakram <i>Pseudomonas</i> 48 jam ..	38
16. Analisis Keragaman <i>Pseudomonas</i>	38
17. Uji Beda Nyata Terkecil Daya Hambat Bakteri <i>Pseudomonas</i>	39
18. Sidik Ragam Regresi	39
19. Klasifikasi Respon Hambatan	36

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Analisis Keragaman Bakteri <i>A. Hydrophila</i> , <i>A. Salmonicida</i> dan <i>Pseudomonas</i>	48
2. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)	53
3. Bagan Uji Pendahuluan	55
4. Isolasi Senyawa Fenolik <i>Gracilaria verrucosa</i>	58
5. Gambar Alat Penelitian	59
6. Gambar Bahan Penelitian	60
7. Gambar Daya Hambat Bakteri	61



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki laut seluas 5,8 juta km² yang terdiri dari 2,8 juta km² perairan laut nusantara, 0,3 km² laut territorial dan 2,7 juta km² adalah zona ekonomi eksklusif. Selain itu, Indonesia memiliki perairan terbuka lainnya seperti sungai, danau, rawa, persawahan dan estuaria tempat hidup dan berkembangnya berbagai jenis ikan, hal tersebut merupakan habitat hidupnya berbagai jenis biota termasuk ikan yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan untuk mencukupi kebutuhan protein masyarakat Indonesia. Total potensi produksi lestari sumber daya perikanan laut Indonesia adalah 6,4 juta ton pertahun. Untuk mewujudkan Indonesia sebagai Negara penghasil produk kelautan dan perikanan terbesar di dunia tahun 2015, Kementerian Kelautan dan Perikanan sesuai dengan RPJMN 2010-2014 telah menargetkan peningkatan produksi perikanan budidaya hingga 353 %, yaitu dari 5,37 juta ton pada tahun 2010 menjadi 16,9 juta ton pada tahun 2014 (Anonymous^b, 2011).

Penyakit merupakan salah satu kendala utama dalam pembangunan perikanan di Indonesia. Sebagai contoh, kerugian ekonomi akibat serangan penyakit *white spot* bercak putih pada udang windu diperkirakan mencapai USD 300 juta per tahun. Komoditas udang windu telah dikenal sebagai andalan utama sub-sektor perikanan dalam perolehan devisa. Hal ini terlihat dari program peningkatan ekspor hasil perikanan dari target perolehan devisa USD 10 milyar, perolehan dari udang adalah komponen terbesar yaitu sebesar 6,7 milyar USD (Prajitno, 2008).

Air dapat menjadi perantara bagi penularan bibit penyakit. Apabila air yang digunakan dalam budidaya telah tercemar atau mempunyai kualitas yang tidak memenuhi persyaratan untuk budidaya, maka ikan budidaya tersebut akan

terserang bibit penyakit atau parasit yang hidup pada air tersebut (Alamanda, Handajani dan Budiharjo, 2006).

Penyakit ikan merupakan terganggunya kesehatan ikan yang diakibatkan oleh berbagai sebab yang dapat mematikan ikan. Penyakit yang menyerang ikan dapat dikelompokkan menjadi dua, yaitu penyakit infeksi dan non infeksi, penyakit infeksi antara lain adalah virus, bakteri, jamur dan parasit, sedangkan penyakit non infeksi antara lain disebabkan oleh keracunan makanan, kekurangan makanan atau kelebihan makanan dan mutu air yang buruk (Gusrina, 2008). Upaya penanggulangan terhadap penyakit telah banyak dilakukan namun hasilnya masih belum optimal. Ada beberapa cara yang dapat dilakukan dan memberi harapan dalam penanggulangannya (Prajitno, 2008).

Penanggulangan penyakit pada ikan dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu dengan melakukan pemberian obat-obatan secara kimia dan secara alami, pemberian imunostimulan dan pemberian vaksinasi, pada penelitian ini untuk menanggulangi penyakit pada ikan dapat dilakukan dengan cara menggunakan obat-obatan secara alami, yaitu dengan menggunakan ekstrak rumput laut. Rumput laut selama ini dimanfaatkan sebagai makanan untuk manusia. Akan tetapi, dengan semakin banyaknya kemajuan ilmu pengetahuan, pemanfaatan rumput laut sudah digunakan juga sebagai bahan baku pada industri obat-obatan, tekstil, minuman, kosmetik, pasta gigi dan sebagainya (Indriani *et al.*, 2003).

Dewasa ini banyak dilakukan penelitian tentang pengobatan yang aman dan berwawasan lingkungan yaitu menggunakan bahan-bahan alami, salah satunya rumput laut. Hasil penelitian mengenai rumput laut telah banyak dilaporkan, yaitu : Mtolera (1996) yang mengekstrak 6 algae hijau dengan bahan pelarut diethyl eter terhadap 3 bakteri uji yaitu : *S. aureus*, *B.subtilis*, *E. coli*, ekstrak *Valonia aegrophila* paling aktif terhadap semua organisme uji. Vitor *et al.*,

(2002), ekstrak Heksan, Cloroform dan Ethanol dari 6 makroalgae laut (Rhodophyta dan Chlorophyta) menunjukkan bahwa dari ekstrak makroalga bersifat menghambat terhadap bakteri. Choudhury (2005) melaporkan tiga ekstrak algae laut, *G. corticata*, *U. fasciata*, *E. compressa* dengan menggunakan heksan, cloroform, etil asetat, cloroform, alkohol dan metanol, menunjukkan penghambatan terhadap bakteri pathogen yaitu, *E. tarda*, *V. alginolyticus*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa* dan *A. hydrophila*.

Rumput laut sebagai bahan antimikroba yang dapat digunakan untuk mengatasi masalah penyakit pada budidaya ikan karena rumput laut mengandung senyawa bioaktif sebagai antibakteri. Salah satu rumput laut yang banyak ditemukan di perairan Indonesia adalah rumput laut jenis *Glacilaria* sp (Wiyanto, 2010).

Menurut Taskin *et al.* (2007) ekstrak kasar dari semua algae yang diuji kecuali *C. officinalis* menunjukkan hambatan terhadap *S. aureus* dan *U. rigida* merupakan ekstrak yang paling efektif. Aktivitas hambatan paling tinggi terdapat pada *E. aerogenes* (34.00 ± 1.00 mm) dari *C. officinalis* dan diikuti dengan *E. coli* dan *E. faecalis*. *D. dichotoma* mempunyai aktivitas hambatan yang paling rendah (10.66 ± 1.52 mm). Ekstrak *C. barbata* mempunyai aktivitas spektrum yang paling luas, *D. dichotoma* dan *H. filicina* mempunyai aktivitas yang paling rendah terhadap mikroorganisme. Metabolit primer atau sekunder dari rumput laut ini mungkin mengandung senyawa bioaktif yang berpotensi untuk industri obat. Hasil penelitian juga dilaporkan bahwa aktivitas algae dapat digunakan sebagai antiviral, antibakteri dan antifungal yang berpengaruh terhadap beberapa pathogen (Vitor *et al.*, 2002).

Dalam dekade terakhir ini, berbagai variasi struktur senyawa bioaktif yang sangat unik dari isolat algae merah telah berhasil diisolasi. Namun pemanfaatan sumber bahan bioaktif dari algae belum banyak dilakukan. Berdasarkan proses

biosintesisnya, algae laut kaya akan senyawa turunan dari oksidasi asam lemak yang disebut oxylipin. Melalui senyawa ini berbagai jenis senyawa metabolit sekunder diproduksi (Putra, 2006).

Misonou *et al.* (2003) melaporkan bahwa jenis rumput laut merah *Phorphyra yeszoensis* mengandung potensi senyawa antioksidan yang dapat menghambat penetrasi sinar UV yang kuat ke dalam jaringan atau sel. Menurut Kardono (2004) terdapat sekitar 2500 jenis senyawa bioaktif dari laut yang telah berhasil diisolasi dan diidentifikasi, dan 93 % diantaranya diperoleh dari rumput laut.

Ekstrak methanol dari 56 rumput laut di Afrika Selatan yang berasal kelas Chlorophyta (hijau), Phaeophyta (coklat) dan Rhodophyta (merah), dari ketiga kelas rumput laut tersebut yang mempunyai antibakteri paling tinggi terdapat pada kelas Phaeophyta (Choudhury, *et al.*, 2005).

1.2 Rumusan Masalah

Salah satu permasalahan yang sering dihadapi oleh para pembudidaya ikan ialah penyakit, salah satunya penyakit patogen seperti bakteri *Aeromonas* dan *Pseudomonas*, dalam penelitian ini diharapkan dengan pemberian ekstrak kasar fenol *Gracilaria verrucosa* dapat mengetahui daya hambat dari bakteri patogenik tersebut. Oleh karena itu penelitian tentang Uji Daya Hambat Bakteri Patogenik Air Tawar perlu dilakukan dengan rumusan masalah sebagai berikut:

1. Bagaimana respon daya hambat dari ekstrak kasar fenol *Gracilaria verrucosa* terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Pseudomonas sp*?
2. Spesies bakteri patogenik manakah yang daya hambatnya paling besar setelah diberikan ekstrak kasar fenol *Gracilaria verrucosa*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui daya hambat ekstrak kasar fenol *Gracillaria verucosa* terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Pseudomonas sp.*

1.4 Hipotesis

H_0 : Diduga ekstrak kasar fenol *Gracillaria verucosa* tidak dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Pseudomonas sp.*

H_1 : Diduga ekstrak kasar fenol *Gracillaria verucosa* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Pseudomonas sp.*

1.5 Kegunaan

Hasil penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi awal tentang kemampuan antimikroba dari ekstrak kasar fenol *Gracillaria verucosa* dalam menghambat jenis bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Pseudomonas sp.*, serta dapat digunakan sebagai upaya penanggulangan penyakit yang sering disebabkan oleh bakteri pathogen *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Pseudomonas sp.*

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium Kimia Universitas Islam Negeri Malang pada Bulan April sampai Juni 2013.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1. *Gracilaria verrucosa*

2.1.1 Morfologi dan Klasifikasi

Rumput laut (*seaweed*) merupakan tanaman makro alga yang hidup di laut, tidak memiliki akar, batang, daun sejati dan umumnya hidup di dasar perairan. Fungsi akar, batang dan daun yang tidak dimiliki rumput laut tersebut digantikan oleh thallus. Rumput laut disebut tanaman karena memiliki klorofil (zat hijau daun) sehingga bisa berfotosintesis (Juneidi, 2004).

Rumput laut dapat dikelompokkan dalam 5 jenis yaitu *Cyanophyta* (alga biru), *Chlorophyta* (alga hijau), *Chrysophyta* (alga keemasan), *Phaeophyta* (alga coklat) dan *Rhodophyta* (alga merah). Dari kelima jenis tersebut yang memiliki nilai ekonomis penting karena kandungan senyawa kimia yang dimilikinya adalah alga hijau, alga merah dan alga coklat. Ketiganya merupakan sumber potensial senyawa bioaktif yang sangat bermanfaat bagi pengembangan industri farmasi sebagai anti bakteri, anti kanker, anti tumor atau sebagai reversal agent dan industri agrokimia terutama untuk antifeedant, fungisida dan herbisida (Susanto, 2008).

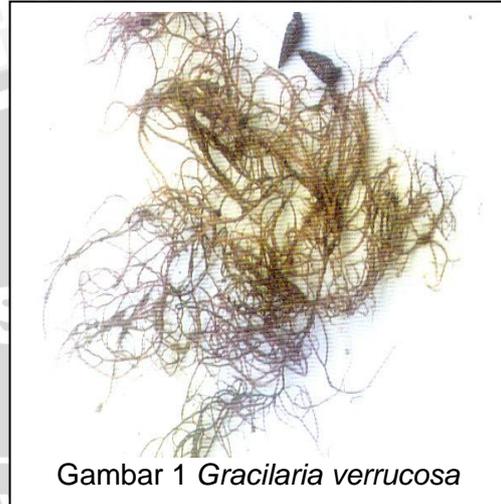
Gracilaria verrucosa merupakan salah satu spesies alga merah yang banyak tumbuh di perairan Indonesia. Alga merah merupakan kelompok yang jenis-jenisnya memiliki berbagai bentuk dan variasi warna. Salah satu ciri alga merah adalah warnanya akan berubah menjadi ungu atau merah jika mengalami kekeringan akibat terkena sinar matahari langsung (Juneidi, 2004).

Ciri-ciri *Gracilaria verrucosa* adalah memiliki thallus silindris, licin, berwarna kuning-coklat atau kuning-hijau. Percabangan berselang seling tidak beraturan, kadang-kadang berulang-ulang memusat ke bagian pangkal. Cabang-

cabang lateral memanjang menyerupai rambut, ukuran panjang sekitar 250 mm dengan diameter thallus 0,5-1,5 mm (Atmadja, 1996).

Adapun klasifikasi *Gracilaria verrucosa* adalah sebagai berikut :

Kerajaan : Plantae
Divisi : Thallophyta
Kelas : Rhodophyta
Ordo : Gigartinales
Famili : Solieriaceae
Genus : Gracilaria
Specise : *Gracilaria verrucosa*



Gambar 1 *Gracilaria verrucosa*

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Rumput laut jenis *G.verrucosa* merupakan salah satu jenis alga merah (Rhodophyta) yang tumbuh di daerah tropik dan subtropik yang tumbuh dominan di perairan laut dangkal (Komarawidjaja dan Kurniawan, 2008).

Sjafrie (1990), menyatakan bahwa *Gracilaria verrucosa* umumnya hidup sebagai fitobentos, melekat dengan bantuan cakram pelekat pada substrat padat. Terdiri dari kurang lebih 100 spesies yang menyebar luas dari perairan tropis sampai subtropis. Hal ini menyebabkan beberapa ilmuwan menyebutnya sebagai spesies yang kosmopolit. *Gracilaria verrucosa* hidup di daerah litoral dan sub litoral, sampai kedalaman tertentu, yang masih dapat dicapai oleh penetrasi cahaya matahari. Beberapa jenis hidup di perairan keruh, dekat muara sungai.

2.1.3 Manfaat dan Kegunaan

Pengembangan upaya menggali potensi laut sangat menarik perhatian, bukan saja terhadap pembudidayaannya tetapi juga terhadap kelestarian

sediaan alaminya. Salah satu diantaranya adalah rumput laut, yang merupakan sumber bahan pangan dan sumber bahan obat – obatan maupun industri.

Rumput laut selama ini dimanfaatkan sebagai makanan untuk manusia. Akan tetapi, dengan semakin banyaknya kemajuan ilmu pengetahuan, pemanfaatan rumput laut sudah digunakan juga sebagai bahan baku pada industri obat-obatan, tekstil, minuman, kosmetik, pasta gigi dan sebagainya (Indriani *et al.*, 2003).

Gracilaria verrucosa merupakan salah satu jenis rumput laut penghasil agar-agar yang tumbuh di Indonesia. Jenis *G. verrucosa* ini banyak dibudidayakan di Indonesia karena proses pemeliharaan yang mudah. *G. verrucosa* sebagai penghasil agar, banyak dimanfaatkan untuk pembuatan media tumbuh bakteri dan produk makanan (Teddy, 2009).

2.1.4 Bahan Aktif

Senyawa-senyawa yang diisolasi dari rumput laut diketahui memiliki fungsi sebagai antibakterial (bakterisidal). Senyawa-senyawa tersebut antara lain asam amino, terpenoids, phlorotanin, asam acrylic, senyawa phenol, steroid, hlogenated keton dan alkanes, cyclic polysulphida dan asam lemak (Mtolera dan Semesi, 1996).

Alga merah juga mengandung senyawa phenol dari golongan florotannin yang memiliki kemampuan antibakteri dan antifungi (Chkhikvishvili dan Ramazanov, 2000). Ballantine *et al* (1987) menyatakan bahwa *Gracilaria verrucosa* memiliki kemampuan antibakteri pada jenis *Bacillus subtilus* dan *Staphylococcus aureus*.

Kakita *et al* (1999) menyatakan bahwa *Gracilaria verrucosa* memiliki bahan aktif hemagglutinin. Terdapat 4 jenis hemagglutinin yang terkandung di dalam *G. verrucosa*. Yang pertama adalah GVA-1 yang merupakan protein atau glycoprotein dengan kandungan karbohidrat yang rendah. Yang kedua adalah

proteo-glycan dengan berat 49 kDa. yang ketiga adalah H-GVH, polisakarida sulfat dengan berat molekul yang besar. Yang keempat adalah L-GVH dengan berat molekul yang rendah. Jenis yang pertama dan kedua, memiliki berat molekul rendah, struktur oligomer dan tidak memiliki ikatan disulfida.

Selain sebagai bahan antibakteri, rumput laut juga dapat digunakan sebagai salah satu bahan imunostimulan. Karagenan, substansi yang banyak terdapat pada alga merah (Rhodophyta) termasuk di dalamnya *Gracilaria verrucosa*, memiliki kandungan bahan aktif β -Glucan yang dapat digunakan sebagai imunostimulan untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh baik pada ikan maupun udang.

Rachmaniar (1996) dalam Prajitno (2006) mengatakan bahwa beberapa jenis rumput laut dari perairan pantai Indonesia mempunyai aktivitas sebagai zat antibakteri, antara lain *E. cottonii*, *E. spinosum*, *G. verrucosa*, *G. confervoides*, *Sargassum sp*, *H. opuntia* yang menunjukkan aktivitas antibakteri patogen pada *Staphylococcus aureus*, *Bacillubtilis*, *V. parahaemolyticus* dan *Vibrio harveyii*.

Menurut Prajitno, (2006) menyatakan bahwa pada *E. cottonii*, *Gracilaria verrucosa* maupun *H. opuntia* pada konsentrasi 3 % mempunyai sifat bakteriostatik dan bakteriosidal terhadap bakteri *Vibrio harveyii*, pada ekstrak *H. opuntia* mengandung 52,25% fenolik (flavonoid). Hal ini dipertegas oleh Pelczar, et al (1988) menyatakan bahwa persenyawaan fenolik sebagai antibakteri menghambat pertumbuhan dan metabolisme bakteri dengan cara merusak membran sitoplasma dan mendenaturasi protein sel. Golongan senyawa kimia utama yang mempunyai sifat antibakteri adalah fenol, alkohol, halogen, logam berat, zat warna, deterjen, senyawa kuarter, asam dan basa. Senyawa fenol dapat berinteraksi dengan komponen dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan dapat juga berdifusi kedalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat atau mati, selain itu

senyawa ini juga dapat menembus membran dan berinteraksi dengan material genetik sehingga bakteri mengalami mutasi (Trisnawati dan Susanto, 2003).

2.2 Bakteri *Aeromonas hydrophila*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Bakteri *Aeromonas hydrophila* menurut Buchanan dan Gibsons (1974), diklasifikasikan sebagai berikut :

Filum	: Protophyta
Klas	: Schizomyecetes
Ordo	: Pseudomonodale
Family	: Vibrionceae
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Spesies	: <i>Aeromonas hydrophila</i>

Secara morfologis bakteri ini berbentuk batang pendek dengan ukuran 1,0-1,5 μm dan lebar 15,7-15,8 μm , termasuk bakteri gram negatif, bersifat motil, bergerak dengan satu polar flagella, oksidatif fermentatif, termasuk bakteri fakultatif anaerobik dan merupakan bakteri penyebab penyakit *Haemorrhagic septicaemia* yaitu bakteri yang merusak jaringan dan organ pembuat sel darah. Suhu optimum untuk pertumbuhannya adalah 37°C (Kabata, 1985).

Penyakit yang disebabkan oleh *Aeromonas hydrophila* bersifat oportunistik yaitu mampu berkembangbiak menjadi ganas pada keadaan optimum. Kemampuan bakteri *Aeromonas hydrophila* menyebabkan penyakit pada ikan disamping karena dapat membiak dengan cepat dalam tubuh ikan juga bergerak aktif dengan flagellanya melalui aliran darah ke seluruh tubuh sehingga dapat merusak organ dalam ikan seperti ginjal, hati dan limpa. Bakteri ini memiliki pili dan merupakan salah satu indikator virulensi *Aeromonas hydrophila* karena dibutuhkan oleh bakteri patogen untuk menempel pada inang sebelum infeksi (Lallier dan Daignealt, 1984).

Gejala ikan apabila terserang bakteri *Aeromonas hydrophila* menurut Afrianto dan Liviawaty (1992) akan memperlihatkan tanda-tanda: Warna tubuhnya berubah menjadi agak gelap, kulit menjadi kasar dan timbul pendarahan, selanjutnya akan menjadi borok (*haemorrhagic*), kemampuan berenang akan menurun dan sering mengambang dipermukaan air karena insangnya rusak dan sulit bernafas, sering terjadi pendarahan pada organ dalam seperti hati, ginjal, maupun limpa. Kadang juga terlihat perutnya agak kembung (*dropsy*), seluruh siripnya rusak dan insangnya menjadi berwarna keputih-putihan, mata rusak dan agak menonjol.

2.2.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Bakteri *Aeromonas hydrophila* bersifat fakultatif anaerob yaitu bakteri yang dapat hidup dengan atau tanpa adanya oksigen (Kabata, 1985) dan akan tumbuh tersebar di seluruh medium jika diinokulasikan pada medium cair. Bakteri ini dapat tumbuh pada kisaran suhu 15-30°C, pH 5,5–9. Pembrokanya secara aseksual dengan memanjangkan sel diikuti pembelahan satu sel menjadi dua sel selama lebih kurang 10 menit (Volk dan Wheeler, 1993).

Bakteri *Aeromonas hydrophila* tidak dapat hidup lama tanpa inangnya, suhu optimal bagi pertumbuhannya 22 – 28° C, pada suhu 35°C pertumbuhannya terhambat. Genus *Aeromonas* mempunyai habitat di lingkungan perairan tawar, keberadaan *Aeromonas* erat hubungannya dengan jumlah kandungan bahan organik di perairan atau sedimen dasar. Bakteri ini diakui sebagai patogen bagi hewan berdarah dingin (Holmes *et al.*, 1996).

Aeromonas hydrophila sering muncul pada musim kemarau, karena pada musim ini kandungan bahan organik perairan tinggi. Kandungan O₂ yang rendah, suhu tinggi, dan akumulasi bahan organik atau sisa metabolisme ikan serta pola padat penebaran dengan kepadatan tinggi akan berkorelasi positif terhadap perkembangbiakannya (Christian *et al.*, 2001).

2.3 Bakteri *Aeromonas salmonicida*

2.3.1 Klasifikasi dan Morfologi

Bakteri *A. salmonicida* menurut Buchanan dan Gibsons (1974), diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Proteobacteria
Phylum	: Gammaproteobacteria
Class	: Aeromonadales
Genus	: <i>Aeromonas</i>
Species	: <i>Aeromonas salmonicida</i>

Aeromonas salmonicida merupakan bakteri gram negatif, Bakteri gram-negatif adalah bakteri yang tidak mempertahankan zat warna metal ungu pada metode pewarnaan gram. *A. Salmonicida* berbentuk batang pendek (1,3-2,0 x 0,8-1,3 μm), non motil atau tidak bergerak, tidak membentuk spora, fakultatif anaerob, resisten terhadap 0/129, pertumbuhan optimum pada suhu 22°C, G+C ratio 57-63%, memproduksi brown pigmen yang diffusible (untuk strain *typical*). Koloni bakteri ini berwarna putih, kecil, bulat, dan cembung. Strain *typical* dapat menghasilkan pigmen coklat yang akan lebih kelihatan apabila medium ditambah dengan tyrosine atau phenylalanine. Pada media dengan kandungan asam amino tinggi pigmen coklat akan jelas kelihatan pada umur kultur 48 jam. Secara biokimia bakteri ini mempunyai sifat-sifat : oksidase positif dan memfermentasi glukosa (Wirsan, 2011).

2.3.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Aeromonas salmonicida adalah bakteri berbentuk batang pendek dengan ukuran 1,3-2,0 x 0,8-1,3 μm , bersifat gram negatif, non motil, tidak membentuk spora maupun kapsul dan bersifat aerob. Bakteri ini tidak dapat hidup tanpa inangnya dan suhu optimal bagi pertumbuhannya antara 22-28°C, sedangkan pada suhu 35°C pertumbuhannya terhambat. Bakteri ini dapat ditemukan pada

air laut maupun air tawar dan dikenal sebagai penyebab penyakit *furunculosis*. Gejala klinis yang timbul akibat penyakit ini adalah: pembengkakan dibawah kulit yang biasanya menjadi luka terbuka berisi nanah dan darah, sirip putus atau patah, pendarahan pada insang, ptechiae pada otot serta usus dibagian belakang lengket dan bersatu. Bakteri ini menyerang ikan Mas. Infeksi bakteri ini menunjukkan gejala klinis luka pada bagian badannya, insang luka, perdarahan diperut, perdarahan diusus (BKIPM, 2010).

2.4 Bakteri *Pseudomonas* sp

2.4.1 Klasifikasi dan Morfologi

Bakteri *Pseudomonas* menurut Buchanan dan Migula (1894), diklasifikasikan sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Order	: Pseudomonales
Family	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Pseudomonas</i>

Morfologi dari genus *Pseudomonas* ini adalah sel tunggal, batang lurus atau melengkung, namun tidak berbentuk heliks, pada umumnya berukuran 0.5 – 1.0 μm X 1.5 – 4.0 μm . Biasanya motil dengan flagelum polar : Monotriks atau multitriks, bereaksi negatif terhadap pewarnaan Gram, kemoorganotrop. Beberapa spesies merupakan kemolitotrof fakultatif, dapat menggunakan H_2 atau CO sebagai sumber energy, O_2 merupakan penerima electron universal, beberapa spesies dapat melakukan denitrifikasi dengan menggunakan nitrat sebagai penerima pilihan, aerobik sejati, kecuali spesies - spesies yang dapat menggunakan denitrifikasi sebagai cara respirasi anaerobik, katalase positif (Pelczar dan Chan, 1986).

Bakteri *Pseudomonas* sangat penting dalam keseimbangan lingkungan. Bakteri ini biasanya aktif dalam dekomposisi aerobik dan biodegradasi, oleh karena itu memainkan peranan penting dalam siklus karbon. Selain itu, bakteri ini meliputi spesies yang bersifat pathogen pada manusia, hewan maupun tumbuhan (Todar, 2004). Menurut Hasanudin (2003), bakteri *Pseudomonas sp.* telah diteliti sebagai agen pengendali hayati penyakit tumbuhan. Di seluruh dunia perhatian kepada golongan bakteri *Pseudomonas sp.* ini dimulai dari penelitian yang dilakukan di University of California, Berkeley pada tahun 70-an.

2.4.2 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Bakteri *Pseudomonas* termasuk pada grup bakteri gram negatif. Anggota-anggota genus ini dapat ditemukan secara luas baik di tanah, air tawar maupun air laut. Bakteri ini sering ditemukan berasosiasi dengan tanaman maupun hewan sebagai agen penyakit (Todar, 2004). *Pseudomonas* terbagi atas beberapa grup, diantaranya adalah sub-grup berpendar (*fluorescent*) yang dapat mengeluarkan pigmen *phenazine* (Brock & Madigan, 1988).

Banyak spesies dari genus bakteri ini yang mampu menghasilkan pigmen pada bahan pangan, diantaranya *Pseudomonas fluorescen* yang menghasilkan pigmen berwarna hijau, *Pseudomonas nigrifican* yang menghasilkan pigmen berwarna hitam pada makanan yang mengandung priotein. Bakteri kelompok ini mampu tumbuh pada suhu rendah kecuali *Pseudomonas aeruginosa* dan *Pseudomonas flurescen* yang dapat tumbuh pada suhu 37⁰C (Anonymous^a, 2011).

2.5 Ekstrak Fenol

2.5.1 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu proses pemisahan senyawa dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ragam ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang

diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi (Khopkar, 1990). Ekstraksi dibedakan menjadi 2 macam yaitu ekstraksi secara dingin dan ekstraksi secara panas (Dinda, 2009 dalam Samad, 2010).

a. Ekstraksi Secara Dingin

- **Metode Maserasi** : Cara pengekstrakan sederhana dengan cara merendam sampel dalam suatu solven selama beberapa hari pada suhu kamar adan terlindung dari cahaya. Metode ini digunakan jika sampel mempunyai sifat mudah larut dalam pelarut.
- **Metode soxhletasi** : Metode ekstraksi sampel secara berkesinambungan, cairan ekstrak dipanaskan hingga menguap, uap cairan ekstrak akan terkondensasi menjadi molekul-molekul air oleh pendingin balik dan turun mengekstrak sampel dalam kondensor dan selanjutnya masuk lagi ke dalam labu alas bulat setelah melewati pipa sifon.
- **Metode perklorasi** : Cara ekstraksi dengan mengalirkan sampel dalam bentuk serbuk yang telah dibasahi.

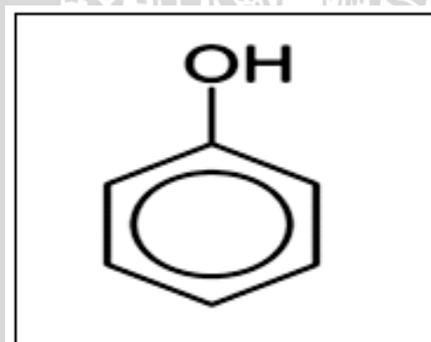
b. Ekstarsi Secara Panas

- **Metode refluks** : Metode ini banyak digunakan jika sampel yang akan diekstrak mempunyai tekstur kasar dan tahan terhadap pemanasan langsung.
- **Metode destilasi uap** : Metode yang digunakan untuk mengekstrak sampel yang mengandung minyak yang mudah menguap atau mengandung senyawa kimia yang mempunyai titik didih tinggi pada tekanan udara normal.

2.5.2 Senyawa Fenol

Menurut Maqsood (2010) dalam Samad (2010), senyawa fenolik adalah zat bioaktif secara luas pada tanaman dan merupakan elemen penting yang biasa digunakan oleh manusia untuk menurunkan berat badan. Senyawa fenolik terdiri dari berbagai macam senyawa seperti flavonoid (anthocyanin, flavonol, flavol, dll) dan beberapa kelas non flavonoid (asam fenola, lignins, stilbenes). Senyawa fenolik bervariasi dalam struktur dan jumlah gugus hidroksil, menyebabkan variasi dalam aktivitas antioksidan. Secara umum, senyawa fenolik bertindak sebagai antioksidan melalui mekanisme dari tindakan yang berbeda, seperti pembilasan radikal bebas, menghilangkan spesies oksigen reaktif, penghambatan enzim oksidatif, chelation dari logam transisi melalui interaksi dengan biomembran. Oleh karena itu, senyawa ini telah dianggap sebagai calon potensial yang menjanjikan sebagai pelindung terhadap oksidasi lipid dan biologis penuaan jaringan.

Fenol memiliki rumus kimia C_6H_5OH dengan struktur molekul sebagai berikut :



Gambar 2. Struktur Molekul Fenol

Fenol banyak terdapat di alam biasanya berasal dari bahan – bahan organik yang telah membusuk atau bahan – bahan yang terdapat di alam. Misalnya saja bahan – bahan yang mengandung lignin karena di dalam ligninlah terdapat gugus fenol yang nantinya bisa diuraikan melalui beberapa proses

misalnya dengan hidrolisis, pirolisis, ekstraksi dan lain- lain. Fenol merupakan turunan dari benzen (C_6H_6) yang salah satu gugus atomnya kehilangan atom H yang di sebut fenil, dengan rumus C_6H_5 (Anonymous, 2013).

2.6 Uji Aktivitas Antibakteri

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi (Pharmacopeial, 1993). Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode silinder yaitu meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi tahan karat di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa hingga berdiri di atas media agar, diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling silinder. Metode lubang yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang. Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram (Kusmiyati, 2006).

Menurut Pelczar dan Chan (1988), berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu:

1. Merusak dinding sel yaitu dengan menghambat pembentukan dan mengubahnya setelah selesai terbentuk.

2. Mengganggu permeabilitas sel yaitu dengan merusak membran sel. Fungsi membran sel adalah mempertahankan bahan-bahan dalam sel serta mengatur aliran keluar masuknya bahan lain. Adanya kerusakan pada membran ini mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya.
3. Merubah molekul protein dan asam nukleat yaitu dengan mendenaturasikan protein dan asam nukleat sehingga kerusakan sel tidak dapat diperbaiki lagi karena hidup suatu sel tergantung pada molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiah.
4. Menghambat kerja enzim dengan mengganggu reaksi biokimiawi. Penghambatan ini dengan mengakibatkan terganggunya metabolisme sel.
5. Menghambat sintesis asam nukleat dan protein. Gangguan pada pembentukan atau fungsi-fungsi DNA, RNA dan protein dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel, karena zat-zat tersebut memegang peranan penting dalam proses kehidupan normal sel.

3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : gelas ukur, labu erlenmeyer, cawan petri, autoclave, bunsen, tabung reaksi, rak tabung reaksi, jarum ose, spatula, hot plate, lemari pendingin, sprayer dan mistar.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Ekstrak Fenol Rumput Laut *Gracilaria verrucosa*, biakan murni bakteri *Aeromonas hydrophila* kepadatan 10^7 sel/ml, *Aeromonas salmonicida* kepadatan 10^7 sel/ml, *Pseudomonas* sp kepadatan 10^7 sel/ml, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya dengan kepadatan awal 10^8 sel /ml. TSA (*Trypton Soya Agar*), NB (*Nutrient Broth*) kapas, tissue, kertas saring, kertas label, aluminium foil, cotton swab, kertas cakram steril, aquabides dan alkohol 70%.

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki (Nazir, 1988). Tujuan eksperimen adalah untuk menemukan hubungan sebab dan akibat antara variabel. Hasil yang diperoleh menegaskan bagaimana hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki dan seberapa besar hubungan sebab dan akibat tersebut, dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan. Teknik pengumpulan data dilakukan dengan observasi langsung atau dengan pengamatan secara langsung (Nazir, 1988).

3.2.2 Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk memperoleh konsentrasi senyawa fenolik dari ekstrak *Gracilaria verrucosa* sebagai antibakteri. Konsentrasi yang digunakan yaitu 1 ppt, 1.5 ppt dan 2 ppt. Kemudian diuji cakram dengan menggunakan bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas sp* dengan konsentrasi 10^7 sel/ml. Parameter yang diamati yaitu besarnya daerah hambatan pada kertas cakram yang sudah direndam oleh ekstrak fenol *Gracilaria verrucosa*.

3.2.3 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam atau homogen, sehingga RAL banyak digunakan untuk percobaan di laboratorium, rumah kaca, dan peternakan. Karena lingkungan homogen maka lingkungan atau tempat percobaan tidak memberikan pengaruh pada respon yang diamati dan model untuk RAL adalah sebagai berikut (Sastrosupadi, 2000) :

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

Keterangan:

Y_{ij} : Respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

μ : Nilai tengah umum

T_i : Pengaruh perlakuan ke-i

ε_{ij} : Pengaruh kesalahan (gallat) percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j

i : 1, 2, 3 (perlakuan)

j : 1, 2, 3 (ulangan)

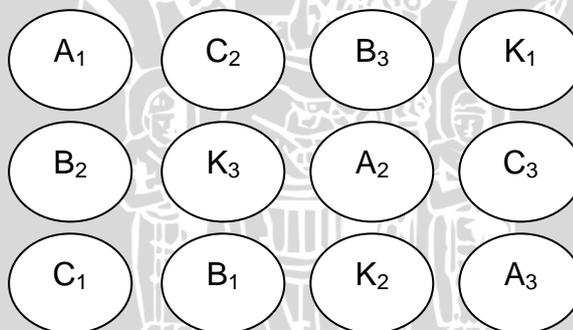
Dalam penelitian yang dilakukan, perlakuan yang diamati adalah pengaruh perbedaan dosis ekstrak fenol alga merah *G. verrucoa* terhadap perkembangbiakan bakteri *A. hydrophila*, *A. Salmonicida* dan *Pseudomonas sp*

pada petridisk yang diamati selama 24 jam. Pengamatan didasarkan pada besarnya daerah hambatan yang diukur dengan satuan milimeter (mm). Tingkatan dosis yang digunakan adalah 3 perlakuan, yaitu dengan menggunakan perbandingan antara ekstrak dengan pelarut, dosis yang digunakan adalah 1ppt, 1,5ppt, 2ppt. Untuk mempermudah dalam menganalisis diperlukan kontrol (K) sebagai pembanding yaitu tanpa pemberian ekstrak fenol *Gracilaria verrucosa* dengan menggunakan pelarut aquades. Sehingga Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali, jumlah sampel yang diamati adalah sebanyak 12 termasuk kontrol. Rancangan perlakuan penelitian dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan perlakuan penelitian.

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
Kontrol	K ₁	K ₂	K ₃
A	A ₁	A ₂	A ₃
B	B ₁	B ₂	B ₃
C	C ₁	C ₂	C ₃

Untuk denah penelitian yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Denah Penelitian

Keterangan:

K = Kontrol (tanpa pemberian ekstrak fenol *Gracilaria verrucosa* dengan menggunakan Aquades)

A = 1 ppt

B = 1.5 ppt

C = 2 ppt

1, 2, 3 : Ulangan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Penelitian

Persiapan penelitian yang akan dilakukan meliputi ekstraksi senyawa fenolik *G. verrucosa*, pengukuran kadar ekstrak fenol *G. verrucosa*, pembiakan bakteri *A. hydrophila*, persiapan alat dan persiapan hewan uji.

Menurut Lestario *et al.* (2008) ekstraksi senyawa fenolik dan pengukuran kadar ekstrak fenol *G. verrucosa* adalah sebagai berikut :

a. Ekstraksi senyawa fenolik *G. verrucosa*

➤ Pembuatan ekstrak fenol *G. verrucosa*

- Disiapkan bahan *G. verrucosa* dalam keadaan kering
- Dibersihkan dan dipisahkan dari kotoran-kotoran yang menempel
- Dipotong kecil-kecil dan diblender hingga halus
- Ditimbang sebanyak 1000 gram
- Dimasukkan ke dalam plastik dan diberi kertas label
- Disiapkan 5 buah beaker glass
- Dimasukkan bahan ke dalam masing-masing beaker glass sebanyak 200 gram dengan ditambahkan pelarut sebanyak 600 ml (perbandingan 1:3) menggunakan pelarut etanol 96 % (sesuai dengan hasil penelitian pendahuluan, dapat dilihat pada Lampiran 3)
- Didiamkan selama 48 jam (sesuai dengan hasil penelitian pendahuluan, dapat dilihat pada Lampiran 3) untuk mendapatkan ekstrak polifenol *G. verrucosa*.
- Untuk mendapatkan ekstrak fenol murni dapat dilihat di Lampiran 4.

b. Pengukuran kadar ekstrak fenol *G. verrucosa*

- Disiapkan 3 buah tabung reaksi untuk wadah ekstrak fenol
- Diisi tabung reaksi dengan aquades secukupnya
- Bahan ditimbang dan diletakkan ke dalam cawan petri

- Diambil dan dihomogenkan bahan dengan menggunakan spatula dari cawan petri dimasukkan ke dalam tabung reaksi
- Diberi kertas label sebagai penanda
- Dilakukan vortex untuk menghomogenkan larutan
- Larutan disimpan ke dalam tabung reaksi
- Disiapkan spektrofotometer untuk mengukur kandungan fenol
- Baca absorbansinya dengan panjang gelombang 460 nm menggunakan spektrofotometer
- Diperoleh hasil kadar ekstrak fenol *G. verrucosa*

c. Pemiakan bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas*

Bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dengan kepadatan 10^8 sel/ml sebanyak 1000 ml. Bakteri yang digunakan yaitu dengan kepadatan 10^7 sel/ml, sehingga untuk mendapatkan kepadatan bakteri tersebut harus dilakukan perhitungan pengenceran dengan menggunakan rumus menurut Cappucino (1988), sebagai berikut :

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

Dimana :

N_1 : Kepadatan populasi bakteri dalam media NB (sel/ml)

N_2 : Kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)

V_1 : Volume suspensi bakteri dalam NB yang dibutuhkan

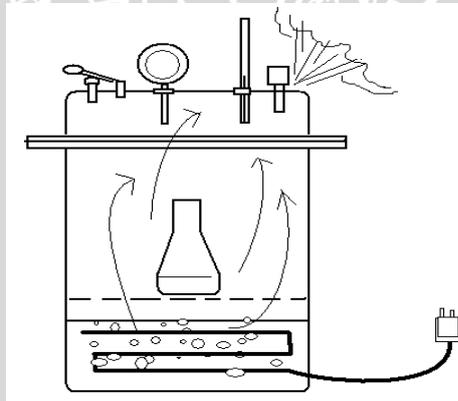
V_2 : Volume media air dalam wadah pemeliharaan ikan

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

a. Sterilasi Alat dan Bahan

- Alat-alat yang akan digunakan dicuci menggunakan detergen, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas koran dan diikat menggunakan benang

- Air secukupnya dituang ke dalam *autoclave* (Gambar 4), kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam *autoclave* dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris.
- Kompor pemanas dinyalakan, setelah mencapai suhu 121°C dan tekanan menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15-20 menit dengan cara membuka dan atau menutup kran uap yang berada di bagian atas tutup *autoclave*
- Kompor dimatikan. Tunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka kran uap lalu buka penutup *autoclave* dengan cara simetris.
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil.
- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

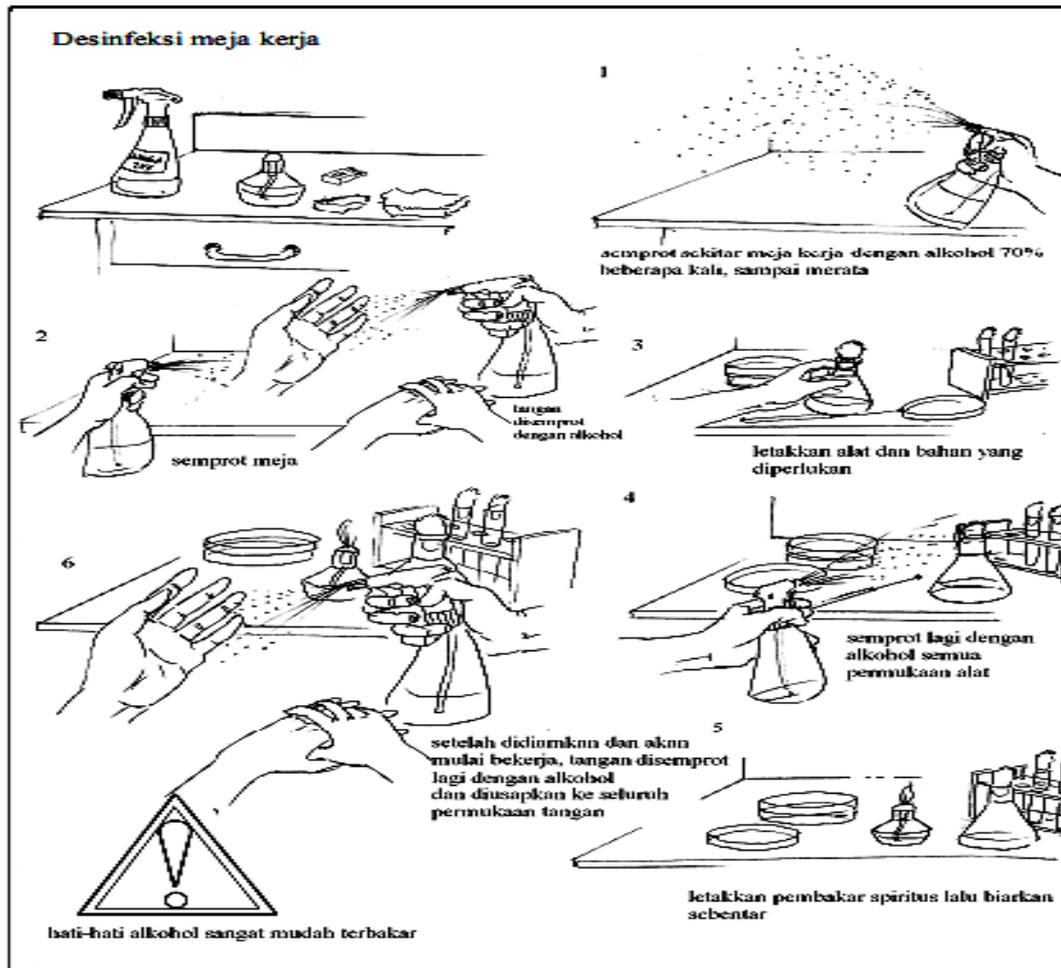


Gambar 4. Alat Sterilisasi *Autoclave* (Anonymous, 2012).

b. Sterilisasi tempat perlakuan

Selain alat dan bahan, tempat dan laboran harus steril guna menghindari kontaminan. Tangan laboran yang bersinggungan, meja dan barang disekitar tempat perlakuan harus selalu dalam kondisi aseptis. Untuk menghindari kontaminasi, tangan laboran dilindungi dengan memakai sarung tangan. Sedangkan untuk penutup mulut, laboran menggunakan masker. Sterilisasi tempat

dapat dilakukan dengan cara kimia menggunakan alkohol maupun cara fisika dengan pembakaran langsung menggunakan bunsen maupun dengan penyinaran dengan sinar UV. Sterilisasi dapat dilihat pada Gambar 5.

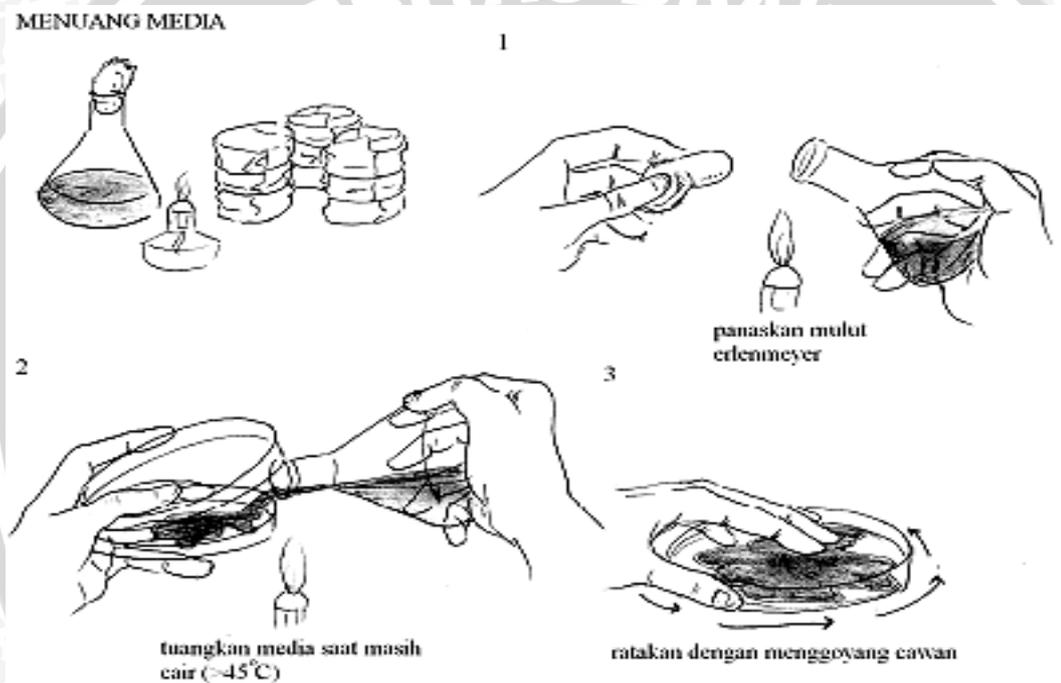


Gambar 5. Sterilisasi Tempat dan Tangan Laboran (Anonymous, 2012).

c. Pembuatan Media TSA (*Triptic Soya Agar*)

- TSA merk OXOID dengan dosis 40 gram/L
- Ditimbang 40 gram TSA
- Dimasukkan dalam erlenmeyer berisi 540 mL aquadest
- Diaduk pada kondisi hangat diatas hotplate sampai tercampur rata
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan aluminium foil kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Ditiriskan erlemeyer setelah disterilisasi

- Dituangkan ke dalam cawan petri yang telah disterilisasi sebelumnya sebanyak 36 cawan
- Disterilisasi dengan menggunakan bunsen saat penuangan (Gambar 6)
- Ditunggu sampai mengeras (menjadi agar)
- Dibalik cawan petri
- Diletakkan cawan petri ke dalam plastik dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin
- Panaskan lagi apabila akan digunakan kembali



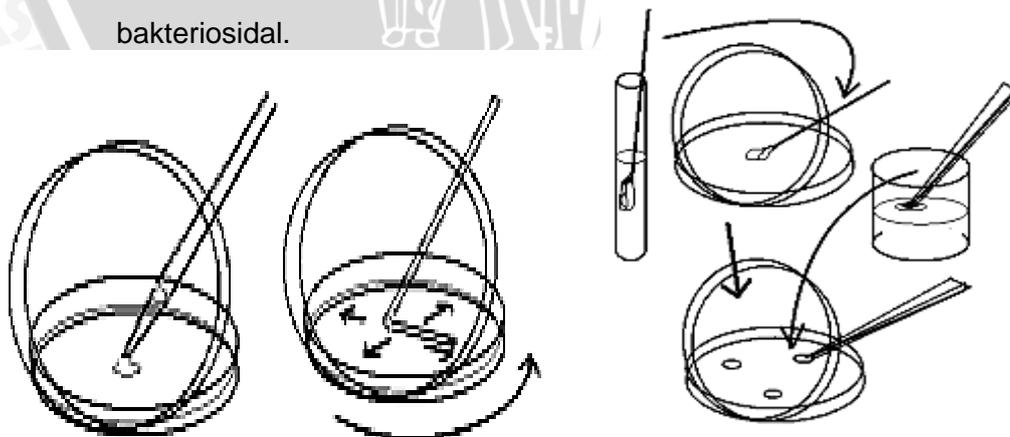
Gambar 6 Teknik Penuangan Media (Anonymous, 2012).

d. Uji Cakram

Prosedur pelaksanaan Uji cakram adalah sebagai berikut dan dapat dilihat pada Gambar 7 :

- 3 inokulum biakan murni bakteri ditanam dalam 4 ml media cair (Nutrient Broth) dan diinkubasi pada suhu 35°C selama 3 jam sehingga terbentuk kekeruhan yang sama dengan larutan Standart *Mc Farland* (10^7 sel/ml).

- Disiapkan petridisk yang telah terdapat media TSA
- Disiapkan tabung reaksi steril untuk perlakuan konsentrasi ekstrak fenol
- Disiapkan kertas cakram steril direndam ke dalam ekstrak fenol alga merah selama 30 menit berdasarkan konsentrasi yang telah ditentukan.
- Diambil 100 μ L bakteri (10^7 sel/ml) dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media agar dengan ketebalan \pm 6 mm.
- Bakteri diratakan dengan triangle
- Kertas cakram yang telah ditiriskan dan diletakkan pada permukaan lempeng agar
- Dibaca hasil setelah diinkubasi pada suhu ruang (37°C) selama 24-48 jam dengan mengukur daerah hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram
- Diameter zona hambat diukur dengan menggunakan mistar
- Untuk mengetahui sifat dari setiap konsentrasi yang dilakukan, maka setelah pengukuran diameter zona hambat dilakukan inkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 35°C . Apabila pada daerah bening terlihat adanya pertumbuhan bakteri, ini berarti dosis tersebut bersifat bakteriostatik; tetapi apabila sebaliknya, berarti dosis tersebut bersifat bakteriosidal.



Gambar 7. Metode Penanaman Bakteri Dengan Spread dan Metode Pengujian Antibiotik Kirby- Bauer (Anonymous, 2012).

Cara peletakan kertas cakram dalam petridisk harus memenuhi kaidah – kaidah sebagai berikut :

- Jarak kertas cakram dengan tepi petridisk tidak boleh kurang dari 15 mm.
- Jika jumlah kertas cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram tidak boleh kurang dari 24 mm.
- Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh sedikitpun bergeser, karena mengurangi validasi pengukuran.
- Pengukuran berdasarkan diameter daerah hambatan dalam milimeter.

Hambatan akan tampak sebagai daerah bening di sekeliling cakram disk yang menunjukkan bahwa pada daerah tersebut tidak ditumbuhi bakteri. Lebar daerah hambatan tergantung daya resap obat ke dalam agar dan tingkat resistensi bakteri terhadap dosis obat.

3.4 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan. Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan digunakan uji polynomial orthogonal yang memberikan keterangan mengenai pengaruh perlakuan terbaik.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Karakteristik Ekstrak Kasar Fenol *Gracilaria verrucosa*

Sampel kering *Gracilaria verrucosa* sebanyak 1000 gram yang diekstrak dengan perendaman selama 2x24 jam menggunakan pelarut etanol 96% dengan perbandingan 1:3 menghasilkan filtrat yang berupa cairan berwarna coklat. Setelah pemekatkan dengan *rotary evaporator* dan ditreatmen sebanyak tiga kali, diperoleh ekstrak kasar (*crude ekstrak*) pekat berwarna coklat tua sebanyak 15,31 gram berat kering. Untuk lebih jelasnya karakteristik ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* dapat dilihat pada Tabel 2 berikut :

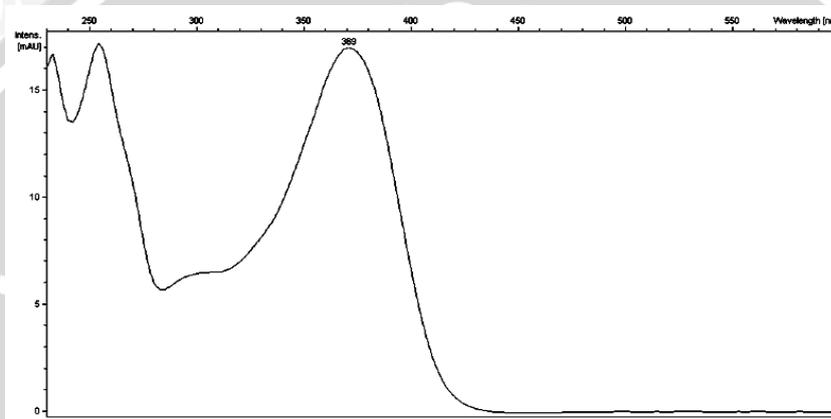
Tabel 2. Karakteristik ekstrak kasar Fenol *Gracilaria verrucosa*

No	Karakteristik	Nilai
1.	Rendemen	1,53 %
2.	λ_{max}	369 nm
3.	FT-IR - Serapan Asam Karboksilat (Fenol) – OH - Serapan aldehida – C-H - Serapan Ikatan Aromatik – C≡C	3.433 nm 2.921 nm 1.635 nm
4.	Total Fenol	12.450 ppm

Hasil spektrofotometri (analisa laboratorium Kimia Analitik) dengan pereaksi folin denis reagen dan sodium carbonate, didapatkan bahwa total kandungan fenol rumput laut *Gracilaria verrucosa* dari berat sampel yang diperoleh 15,31 gram dengan serapan kuat pada gelombang Infra Red 369 nm dan total fenol sebesar 80% (12.450 ppm), sedangkan 20% senyawa lainnya adalah senyawa aldehida dan ikatan aromatik. Amsler dan Fairhead (2006); Arnold dan Nensi (2000) menjelaskan bahwa besarnya varibilitas kandungan

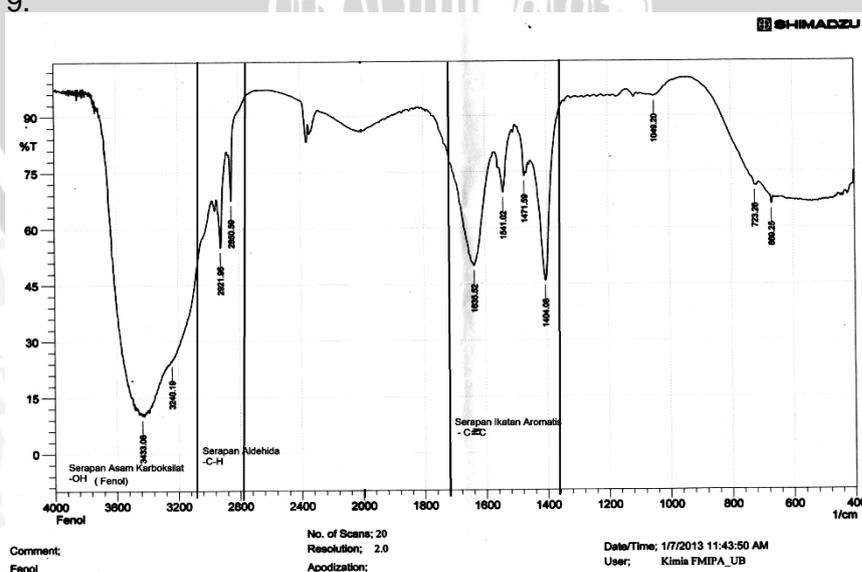
fenol pada rumput laut tergantung dari faktor eksternal (lingkungan) seperti herbivora, cahaya, kedalaman, salinitas, nutrient, musim dan faktor intrinsik seperti umur, panjang dan ukuran tubuh, tipe jaringan.

Karakterisasi senyawa menggunakan spektroskopi ultraviolet memberikan hasil berupa spektra dan data absorbansi serta panjang gelombang maksimum ($\lambda_{max} = 369 \text{ nm}$) dari isolat senyawa. Hasil spektra spektroskop UV-Vis dapat dilihat pada gambar 8.



Gambar 8. Spektra UV-Vis Total Fenol

Berdasarkan hal tersebut dapat dilakukan pendugaan terhadap senyawa yang terkandung dalam sampel. Hasil spektra total fenol dapat dilihat pada Gambar 9.



Gambar 9. Spektra FT-Infra Red Total Fenol

Gambar 9 menunjukkan bahwa panjang gelombang standar untuk senyawa phenol (C_6H_5OH) berada pada 3200 nm, sedangkan pada *Gracilaria verrucosa* panjang gelombangnya bergeser ke nilai yang lebih besar yaitu 3.433 nm. Panjang gelombang 3.433 menunjukkan adanya unsur aromatik atau ikatan rangkap terkonjugasi ($C\equiv C$). Menurut SNI 2004 semua fenol dalam air akan bereaksi dengan 4-aminoantipirin pada pH $7,9\pm 0,1$ dalam suasana larutan kalium ferrisianida akan membentuk warna merah kecoklatan dari antipirin.

4.2 Hasil Daya Hambat Bakteri dengan Uji Cakram

Uji daya hambat dengan metode disc atau cakram dengan menggunakan lempengan agar yang disemai dengan mikroorganisme penguji. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar/petridish yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambat pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme seperti yang diperkenalkan oleh (William Kirby dan Alfred Batier, 1966; Lay, 1994). Lebar zona hambatan yang dibentuk ekstrak *Gracilaria verrucosa* tergantung pada daya serapnya ke dalam agar dan kepekaan kuman terhadap antibakteri tersebut. Cara cakram ini menghasilkan kategori sensitivitas terhadap antimikroba berdasarkan difusi antimikroba dari kertas cakram ke dalam agar yang dikemukakan oleh Bonang dan Koeswardono, (1992) dalam Laminem, (2007).

4.2.1 Hasil rata-rata jumlah daya hambat bakteri *A. hydrophila*

Hasil data rata-rata jumlah daya hambat bakteri *A. hydrophila* pada uji cakram dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Data Jumlah Daya Hambat Pada Uji Cakram Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata	SD
	1	2	3			
Kontrol (tanpa perlakuan)	5.00	5.00	5.00	15.00	5.00	0
Perlakuan A (1 ppt)	12.00	13.00	12.00	37.00	12.33	0.58
Perlakuan B (1.5 ppt)	15.50	15.00	13.50	44.00	14.67	1.04
Perlakuan C (2 ppt)	16.50	15.00	16.50	48.00	16.00	0.87
Total	49.00	48.00	47.00	144.00	48.00	2.48

Berdasarkan hasil penelitian, jumlah rata-rata uji daya hambat bakteri *A. hydrophila* pengamatan 24 jam dapat dilihat dengan konsentrasi dosis 1 ppt diperoleh nilai rata-rata 12.33; konsentrasi 1.5 ppt diperoleh nilai rata-rata 14.67; konsentrasi 2 ppt diperoleh nilai rata-rata 16.00; dan yang terakhir untuk kontrol diperoleh nilai rata-rata diameter hambat 5,00, pada pengamatan 48 jam daerah bening di sekeliling kertas cakram ditumbuhi oleh bakteri *A. hydrophila* sehingga dapat disimpulkan bahwa dosis ekstrak *Gracilaria verrucosa* tersebut bersifat bakteriostatik pada bakteri *A. hydrophila*. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap daya hambat bakteri *A. hydrophila* maka dilakukan analisa sidik ragam, tabel analisa sidik ragam dapat dilihat pada tabel 4.

Tabel 4. Analisis Keragaman *A. hydrophila*

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	216.67	72.22	133.333	4.07	7.59
Acak	8	4.33	0.54	**		
Total	11	221.00				

Keterangan : ** berbeda sangat nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *A. hydrophila*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F

hitung yang lebih besar dari F 5% tetapi lebih kecil dari F 1% yang berarti dosis pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* berpengaruh terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *A. hydrophila*. Sehingga perlu dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui tingkat perbedaan antar perlakuan. Hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila*

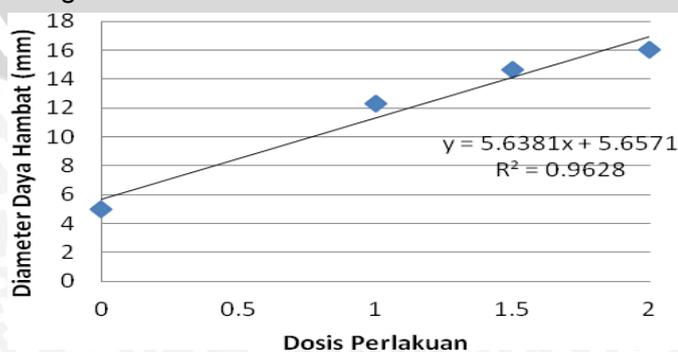
Rata-rata Perlakuan	P0	P1	P2	P3	Notasi
	5.00	12.33	14.67	16.00	
K=5.00	-	-	-	-	a
C=12.33	7.33**	-	-	-	b
B=14.67	9.67	2.33**	-	-	c
A=16.00	11.00	3.67	1.33 ^{ns}	-	c

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* diperlukan analisa regresi. Table sidik ragam regresi dapat dilihat pada table 6.

Tabel 6. Sidik Ragam Regresi

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hitung
Perlakuan	3	216.67	-	
Linear	1	187.2666667	187.2666667	345.7230769
Kuadratik	1	27	27	49.84615385
Kubik	1	2.4	2.4	4.430769231
Acak	8	4.33	0.541666667	
Total	11	221.00		

Hasil perhitungan regresi bentuk regresi yang digunakan adalah linier, didapatkan persamaan $y = 5.6571 + 5.6381x$ dan determinasi (R^2) adalah 0.9628 dapat dilihat pada gambar 10.



Gambar 10. Grafik Daerah Hambat Pertumbuhan *A. hydrophila*

4.2.2 Hasil rata-rata jumlah daya hambat bakteri *A. salmonicida*

Hasil data rata-rata jumlah daya hambat bakteri *A. salmonicida* pada uji cakram dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Data Jumlah Daya Hambat Pada Uji Cakram Bakteri *A. salmonicida*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata	SD
	1	2	3			
Kontrol (tanpa perlakuan)	5.00	5.00	5.00	15.00	5.00	0
Perlakuan A (1 ppt)	12.00	13.00	12.00	37.00	12.33	0.58
Perlakuan B (1.5 ppt)	13.50	12.50	14.00	40.00	13.33	0.76
Perlakuan C (2 ppt)	17.50	13.50	14.00	45.00	15.00	2.18
Total	48.00	44.00	45.00	137.00	45.67	3.52

Berdasarkan hasil penelitian, jumlah rata-rata uji daya hambat bakteri *A. salmonicida* pengamatan 24 jam dapat dilihat dengan konsentrasi dosis 1 ppt diperoleh nilai rata-rata 12.33; konsentrasi 1.5 ppt diperoleh nilai rata-rata 13.33; konsentrasi 2 ppt diperoleh nilai rata-rata 15.00; dan yang terakhir untuk kontrol diperoleh nilai rata-rata diameter hambat 5,00, pada pengamatan 48 jam daerah bening di sekeliling kertas cakram ditumbuhi oleh bakteri *A. salmonicida* sehingga dapat disimpulkan bahwa dosis ekstrak *Gracilaria verrucosa* tersebut bersifat bakteriostatik pada bakteri *A. salmonicida*. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap daya hambat bakteri *A. salmonicida* maka dilakukan analisa sidik ragam, tabel analisa sidik ragam dapat dilihat pada tabel 8.

Tabel 8, Analisis Keragaman *A. salmonicida*

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	175.58	58.53	41.314	4.07	7.59
Acak	8	11.33	1.42	**		
Total	11	186.92				

Keterangan : ** berbeda sangat nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *A. salmonicida*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F

hitung yang lebih besar dari F 5% tetapi lebih kecil dari F 1% yang berarti dosis pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* berpengaruh terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *A. salmonicida*. Sehingga perlu dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui tingkat perbedaan antar perlakuan. Hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 9.

Tabel 9. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Daya Hambat Bakteri *A. salmonicida*

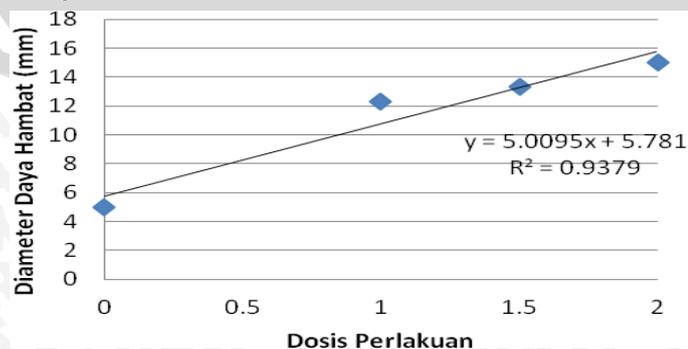
Rata-rata Perlakuan	P0	P1	P2	P3	Notasi
	5.00	12.33	13.33	15.00	
K=5.00	-	-	-	-	a
C=12.33	7.33**	-	-	-	b
B=13.33	8.33	1.00 ^{ns}	-	-	b
A=15.00	10.00	2.67	1.67 ^{ns}	-	b

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida* diperlukan analisa regresi. Table sidik ragam regresi dapat dilihat pada table 10.

Tabel 10. Sidik Ragam Regresi

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hitung
Perlakuan	3	175.58	-	
Linear	1	144.15	144.15	101.7529412
Kuadratik	1	24.08333333	24.08333333	17
Kubik	1	7.35	7.35	5.188235294
Acak	8	11.33	1.416666667	
Total	11	186.92		

Hasil perhitungan regresi bentuk regresi yang digunakan adalah linier, didapatkan persamaan $y = 5.781 + 5.0095x$ dan determinasi (R^2) adalah 0.9379 dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. Grafik Daerah Hambat Pertumbuhan *A. salmonicida*

4.2.3 Hasil rata-rata jumlah daya hambat bakteri *Pseudomonas*

Hasil data rata-rata jumlah daya hambat bakteri *Pseudomonas* pada uji cakram pengamatan 24 jam dapat dilihat pada Tabel 11.

Tabel 11. Data Jumlah Daya Hambat Pada Uji Cakram *Pseudomonas* 24 jam

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata	SD
	1	2	3			
Kontrol (tanpa perlakuan)	5.00	5.00	5.00	15.00	5.00	0
Perlakuan A (1 ppt)	13.00	15.50	11.50	40.00	13.33	2.02
Perlakuan B (1.5 ppt)	16.00	14.00	14.50	44.50	14.83	1.04
Perlakuan C (2 ppt)	15.00	17.00	15.00	47.00	15.67	1.15
Total	49.00	51.50	46.00	146.50	48.83	4.22

Berdasarkan hasil penelitian, jumlah rata-rata uji daya hambat bakteri *Pseudomonas* pengamatan 24 jam dapat dilihat dengan konsentrasi dosis 1 ppt diperoleh nilai rata-rata 13.33; konsentrasi 1.5 ppt diperoleh nilai rata-rata 14.83; konsentrasi 2 ppt diperoleh nilai rata-rata 15.67; dan yang terakhir untuk kontrol diperoleh nilai rata-rata diameter hambat 5,00. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap daya hambat bakteri *Pseudomonas* maka dilakukan analisa sidik ragam, tabel analisa sidik ragam dapat dilihat pada tabel 12.

Tabel 12. Analisis Keragaman *Pseudomonas* 24 Jam

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	216.23	72.08	44.355	4.07	7.59
Acak	8	13.00	1.63	**		
Total	11	229.23				

Keterangan : ** berbeda sangat nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *Pseudomonas*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 5% tetapi lebih kecil dari F 1% yang berarti dosis pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* berpengaruh terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *Pseudomonas*. Sehingga perlu dilakukan Uji Beda

Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui tingkat perbedaan antar perlakuan. Hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 13.

Tabel 13. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas* 24 jam.

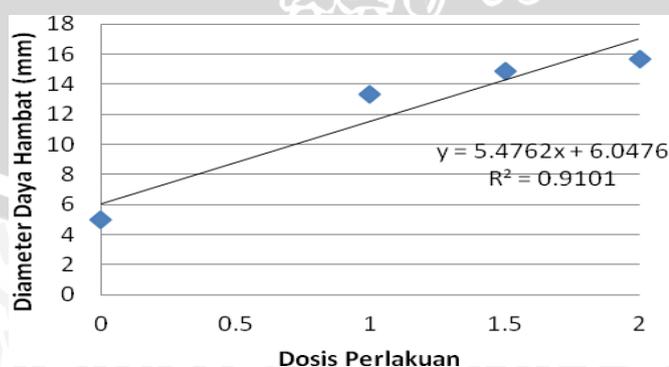
Rata-rata Perlakuan	P0	P1	P2	P3	Notasi
	5.00	13.33	14.83	15.67	
K=5.00	-	-	-	-	a
C=13.33	8.33**	-	-	-	b
B=14.83	9.83	1.50 ^{ns}	-	-	b
A=15.67	10.67	2.33	0.83 ^{ns}	-	b

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *Pseudomonas* diperlukan analisa regresi. Tabel sidik ragam regresi dapat dilihat pada table 14.

Tabel 14. Sidik Ragam Regresi

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung
Perlakuan	3	216.23	-	
Linear	1	168.3375	168.3375	103.5923077
Kuadratik	1	42.1875	42.1875	25.96153846
Kubik	1	5.704166667	5.704166667	3.51025641
Acak	8	13.00	1.625	
Total	11	229.23		

Bentuk regresi yang digunakan adalah linier, didapatkan persamaan $y = 6.0476 + 5.4762x$ dan determinasi (R^2) adalah 0.9101 dapat dilihat pada gambar 12.



Gambar 12. Grafik Daerah Hambat Pertumbuhan *Pseudomonas* 24 jam

Hasil data rata-rata jumlah daya hambat bakteri *Pseudomonas* pada uji cakram pengamatan 48 jam dapat dilihat pada Tabel 15.

Tabel 15. Data Jumlah Daya Hambat Pada Uji Cakram *Pseudomonas* 48 jam

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata	SD
	1	2	3			
Kontrol (tanpa perlakuan)	5.00	5.00	5.00	15.00	5.00	0
Perlakuan A (1 ppt)	14.50	16.00	12.50	43.00	14.33	1.76
Perlakuan B (1.5 ppt)	16.50	15.50	15.50	47.50	15.83	0.58
Perlakuan C (2 ppt)	17.00	18.50	17.00	52.50	17.50	0.87
Total	53.00	55.00	50.00	158.00	52.67	3.20

Berdasarkan pengamatan 48 jam dengan konsentrasi dosis 1 ppt diperoleh nilai rata-rata 14.33; konsentrasi 1.5 ppt diperoleh nilai rata-rata 15.83; konsentrasi 2 ppt diperoleh nilai rata-rata 17.50; dan yang terakhir untuk kontrol diperoleh nilai rata-rata diameter hambat 5,00, sehingga dapat disimpulkan bahwa pada pengamatan 48 jam dosis ekstrak *Gracilaria verrucosa* pada bakteri *Pseudomonas* bersifat bakteriosidal ditunjukkan dengan adanya daerah bening yang semakin melebar disekeliling cakram yang tidak ditumbuhi oleh bakteri. Pernyataan ini didukung oleh Anonymous (2012), bahwa bakteriosidal adalah adanya daerah bening disekeliling cakram disk yang menunjukkan bahwa pada daerah tersebut tidak ditumbuhi bakteri. Untuk mengetahui adanya pengaruh pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap daya hambat bakteri *Pseudomonas* maka dilakukan analisa sidik ragam, tabel analisa sidik ragam dapat dilihat pada tabel 16.

Tabel 16. Analisis Keragaman *Pseudomonas* 48 Jam

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	281.83	93.94	90.187	4.07	7.59
Acak	8	8.33	1.04	**		
Total	11	290.17				

Keterangan : ** berbeda sangat nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah total

daya hambat terhadap bakteri *Pseudomonas*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 5% tetapi lebih kecil dari F 1% yang berarti dosis pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* berpengaruh terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *Pseudomonas*. Sehingga perlu dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui tingkat perbedaan antar perlakuan. Hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 17.

Tabel 17. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas* 48 jam.

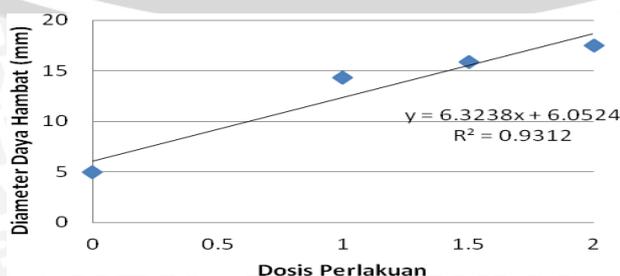
Rata-rata Perlakuan	P0	P1	P2	P3	Notasi
	5.00	14.33	15.83	17.50	
K=5.00	-	-	-	-	A
C=14.33	9.33**	-	-	-	b
B=15.83	10.83	1.50 ^{ns}	-	-	b
A=17.50	12.50	3.17	1.67 ^{ns}	-	b

Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *Pseudomonas* diperlukan analisa regresi. Tabel sidik ragam regresi dapat dilihat pada table 18.

Tabel 18. Sidik Ragam Regresi

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung
Perlakuan	3	281.83	-	
Linear	1	228.15	228.15	219.024
Kuadratik	1	44.08333333	44.08333333	42.32
Kubik	1	9.6	9.6	9.216
Acak	8	8.33	1.041666667	
Total	11	290.17		

Bentuk regresi yang digunakan adalah linier, didapatkan persamaan $y = 6.0524 + 6.3238x$ dan determinasi (R^2) adalah 0.9312 dapat dilihat pada gambar 13.



Gambar 13. Grafik Daerah Hambat Pertumbuhan *Pseudomonas* 48 jam

Dilihat dari data hasil penelitian ini, dari hasil data yang didapatkan, bahwa ekstrak *Gracilaria verrucosa* pada bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas* dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan respon hambatan pertumbuhan lemah dengan ditandai adanya nilai rata-rata diameter zona hambat 11 - 15 mm. Hal ini dapat dilihat pada table 19.

Tabel 19. Klasifikasi Respon Hambatan (Greenwood, (1995) dalam Riniwati (2012)

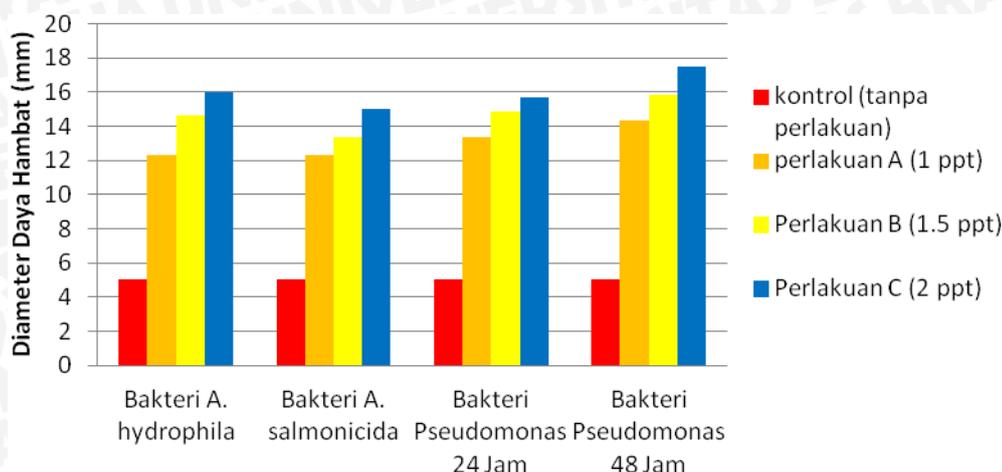
Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤ 10 mm	Tidak ada
11 – 15 mm	Lemah
16 – 20 mm	Sedang
> 20 mm	Kuat

Untuk mengetahui cara perhitungan analisa sidik ragam disajikan pada lampiran 1 dan perhitungan uji Beda Nyata Terkecil (BNT) disajikan pada lampiran 2, dimana hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 5% tetapi lebih kecil dari F 1% yang berarti dosis pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* berpengaruh terhadap jumlah total daya hambat terhadap *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas*. Sehingga perlu dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui tingkat perbedaan antar perlakuan.

4.3 Perbandingan diameter zona penghambatan bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas* terhadap pemberian ekstrak Kasar Fenol *Gracilaria verrucosa*

Hasil dari perbandingan diameter zona hambat setelah pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* sebagai daya anti bakteri terhadap bakteri patogenik air tawar dari masing-masing bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan

Pseudomonas memberikan hasil yang berbeda dari masing-masing perlakuan, dapat dilihat pada gambar 14.



Gambar 14. Gambar Grafik Perbandingan diameter zona hambat pada bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas*.

Hasil perbandingan dari masing-masing bakteri pada pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol memiliki hasil daya hambat yang sama yaitu 5 mm, sedangkan untuk perlakuan 1 ppt, 1.5 ppt dan 2 ppt menunjukkan bahwa daya hambat ekstrak *Gracilaria verrucosa* pada bakteri *Pseudomonas* memiliki daya hambat lebih tinggi di bandingkan dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* maupun *Aeromonas salmonicida*, selain itu dosis ekstrak *Gracilaria verrucosa* bersifat bakteriosidal pada bakteri *Pseudomonas* setelah pengamatan 48 jam.

4.4 Lingkungan Hidup Bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas*.

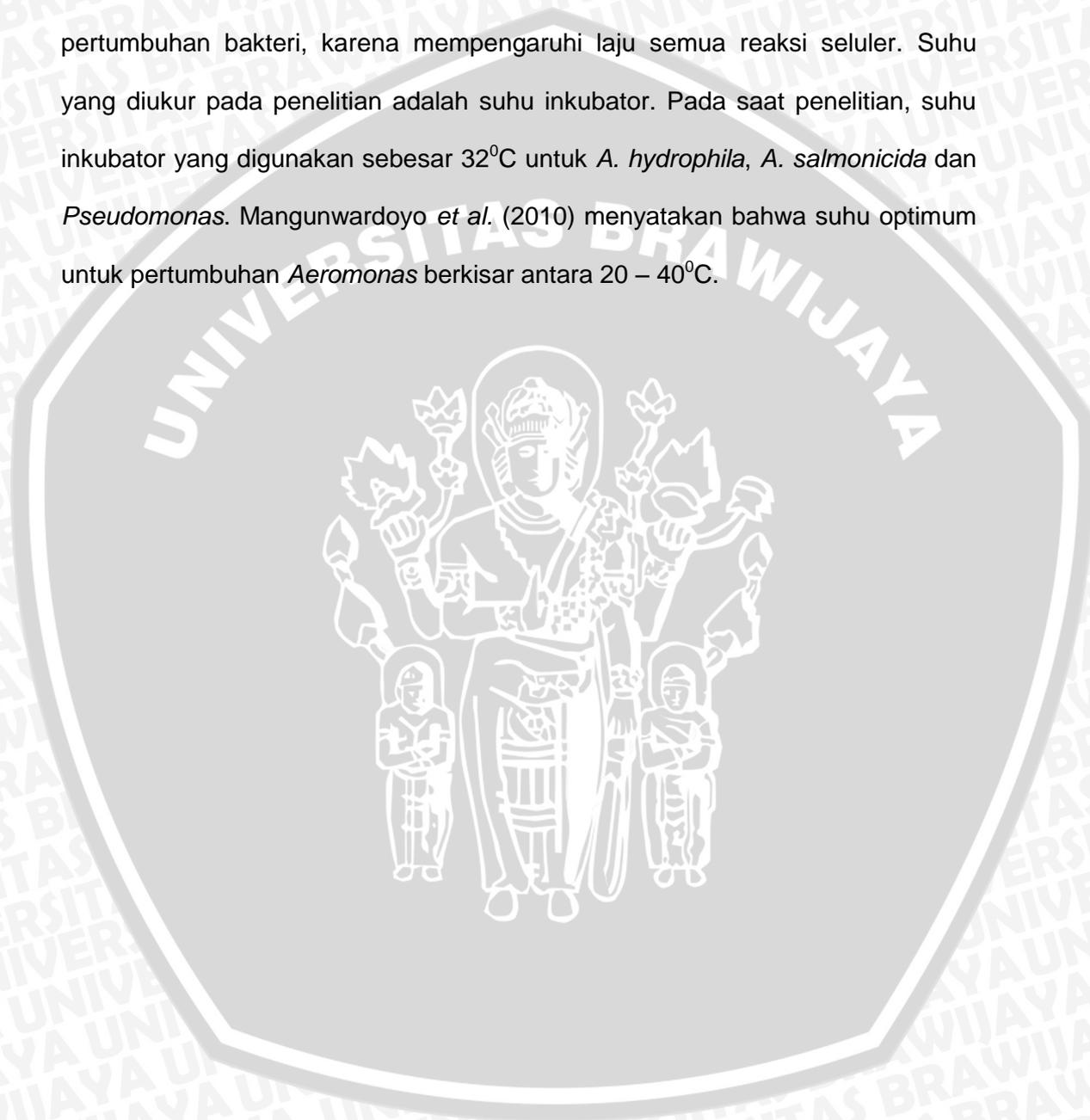
4.4.1 pH

Berdasarkan pengukuran pH, didapatkan nilai pH media sebesar 7. Kondisi ini baik untuk pertumbuhan bakteri. Disamping nutrisi yang memadai, sejumlah kondisi lain harus dipenuhi untuk menumbuhkan bakteri. Media harus mempunyai pH yang tepat yaitu tidak terlalu asam dan tidak terlalu basa, pada dasarnya tidak satupun bakteri dapat tumbuh baik pada pH lebih dari 8.

Sebagian besar bakteri patogen tumbuh baik pada pH netral ($\text{pH} = 7$) atau pada pH yang sedikit basa (Volk dan Wheeler, 1993).

4.4.2 Suhu

Suhu yang diterapkan selama masa inkubasi dapat mempengaruhi laju pertumbuhan bakteri, karena mempengaruhi laju semua reaksi seluler. Suhu yang diukur pada penelitian adalah suhu inkubator. Pada saat penelitian, suhu inkubator yang digunakan sebesar 32°C untuk *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas*. Mangunwardoyo *et al.* (2010) menyatakan bahwa suhu optimum untuk pertumbuhan *Aeromonas* berkisar antara $20 - 40^{\circ}\text{C}$.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian Uji Daya Hambat Bakteri Patogenik Air Tawar *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Pseudomonas* sp Setelah Pemberian Ekstrak Kasar *Gracilaria verrucosa*, maka dapat disimpulkan sebagai berikut:

- Pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap daya hambat bakteri *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas salmonicida* dan *Pseudomonas*.
- Hasil perbandingan dari masing-masing bakteri pada pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* menunjukkan bahwa pada perlakuan kontrol memiliki hasil daya hambat yang sama yaitu 5 mm, sedangkan untuk perlakuan 1 ppt, 1.5 ppt dan 2 ppt menunjukkan bahwa daya hambat ekstrak *Gracilaria verrucosa* pada bakteri *Pseudomonas* memiliki daya hambat lebih tinggi di dibandingkan dengan bakteri *Aeromonas hydrophila* maupun *Aeromonas salmonicida*, selain itu dosis ekstrak *Gracilaria verrucosa* bersifat bakteriosidal pada bakteri *Pseudomonas* setelah pengamatan 48 jam.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan dosis yang optimal serta mengetahui kemampuan antimikroba dari ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap bakteri patogen lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E. dan Liviawaty, 1992. Pengendalian Hama dan Penyakit Ikan. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 20 hlm.
- Anonymous. 2011^a. Bakteri Pembusuk Pada Makanan Yang Mengandung Protein. <http://www.Zonabawah.Blogspot.com>. Diakses tanggal 20 Desember 2012.
- _____, 2011^b. Strategi Pengembangan Infrastruktur Perikanan Dalam Mendukung Peningkatan Daya Saing. Info Kajian BAPPENAS. Vol. 8 No.2. 10-17 hlm.
- _____, 2012. Bakteriologi Medik. Tim Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya. Bayumedia Publishing. Malang. 373 hlm.
- _____, 2013. Pabrik Fenol Dari Tandan Kosong Kelapa Sawit Dengan Proses Pirolisis. Program Studi D3 Teknik Kimia, FTI-ITS Surabaya.
- Alamanda I.E., N.S. Handajani, dan A. Budiharjo. 2006. Penggunaan Metode Hematologi dan Pengamatan Endoparasit Darah untuk Penetapan Kesehatan Ikan Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*) di Kolam Budidaya Desa Mangkubumen Boyolali. Biodiversitas. 8: 34-38 hlm.
- Atmadja, W.S. 1996. Pengenalan Jenis-Jenis alga Merah (*Rhodophyta*). Puslitbang Oseanologi-LIPI. Jakarta.
- Ballantine, D.L., W.H. Gerwick, S.M. Ve´lez, E. Alexander and P.Guevara. 1987. Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae. *Hydrobiologia* 151/152: 463-469 page.
- BKIPM. 2010. Laporan Pemantauan 2010. Stasiun Karantina Ikan Kelas I Hang Nadim Batam.
- Brock. T.D. and M.T Madigan. 1988. *Biology of Microorganisms*. Prentise Hall International Inc.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibsons. 1974. *Determinative Bacteriology*. Eighty edition. Averly Press. Inc. USA.126 page.
- Capuccino and Sherman, 1988. *Microbiology, A laboratory Manual*. Benjamin/Cumming Science Publishing. Menlo Park. California : 477 page.
- Chkhikvishvili, I. D and Z. M. Ramazanov. 2000. Phenolic Substances of Brown Algae and Their Antioxidant Activity. *Applied Biochemistry and Microbiology* Vol. 36 No. 3 (2000) : 289-291 page.
- Choudhury, S. Sree, A. Mukherjee, S.C. Pattnaik, P. Bapuji. M. 2005. In Vitro Antibacterial Activity of Extracts of selected Marine Algae and mangroves Against Fish Pathogens. *Journal Asian Fisheries Science*. 18:185-294 page.

- Christian, C., C. Volk, R. Creason, J. Jarosh, J. Robinson, and C. Warnes. 2001. Detection of *Aeromonas hydrophila* in a drinking-water distribution system: a field and pilot study. *Canadian Journal of Microbiology* 47(8):782-786 page.
- Gusrina, 2008. *Budidaya Ikan Jilid 3 Untuk SMK*. Direktorat Pembinaan Sekolah Menengah Kejuruan, Direktorat Jenderal Manajemen Pendidikan Dasar dan Menengah, Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta. 94 hlm.
- Hasanudin. 2003. *Peningkatan Peranan Mikroorganisme dalam Sistem Pengendalian Penyakit Tumbuhan Secara Terpadu*. Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan. Fakultas Pertanian. Universitas Sumatera Utara.
- Holmes, P., L. M. Niccolls, and D P. Sartory. 1996. The ecology of mesophilic *Aeromonas* in aquatic environment. In: B. Austin, M. Altwegg, P. Gosling & S.W. Joseph (Eds.) *The Genus Aeromonas*. John Wiley & Sons, New York, NY: 39-76 page.
- Indriani, Heti dan E. Sumiarsih. 2003. *Rumput Laut Budidaya Pengolahan dan Pemasaran*. Penebar Swadaya. Jakarta. 12 hlm.
- Juneidi, A.W. 2004. *Rumput Laut, Jenis dan Morfologinya*. PK.BRL.A.01.M. Direktorat Pendidikan Menengah dan Kejuruan, Ditjen Pendidikan Dasar dan Menengah, Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta.
- Kabata, Z., 1985. *Parasiter and Disease of Fish Cultured in the Tropic*. Taylor. In Francis Inc. 242. Chery St. Phidelphia. 318 hlm.
- Kakita, H, S. Fukuoka, H. Obika and H. Kamishima. 1999. Isolation and Characterisation of a Fourth Hemagglutinin From The Red Alga, *Gracilaria verrucosa*, from Japan. *Journal of Applied Phycology* 11: 49-56 page.
- Kardono, L.B. 2004. *Prospecting on Marine Natural Products for Potensial Functional Foods and Bioactive Substance*. Makalah disampaikan pada forum Bioteknologi Kelautan dan Perikanan, Badan Riset Kelautan dan Perikanan. Departemen Kelautan dan Perikanan, 25 Maret 2004. 15 pp.
- Komarawidjaja, W. dan D.A Kurniawan. 2008. Tingkat Filtrasi Rumput Laut (*Gracilaria* sp.) Terhadap Kandungan Ortofosfat (P_2O_5). *Jurnal Teknik Lingkungan*. 9 (2): 180-183 hlm.
- Kusmiyati., N.W. S Agustini. 2006. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong 16911. Vol.8 No.1. 48-53 hlm.
- Lallier, R and P. Daegneult.1984. Antigenic Diinference Of Pili From Non Virulent and Fish Pathogenic Strains Of *Aeromonas hydrophila*. *Journal Fish Of Diseases*. 509-512 page.

- Laminem. 2007. Kajian Efektifitas Ciprofloxacin Terhadap Infeksi *Aeromonas Salmonicida* pada Koi (*C. Carpio*). Tesis. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. UB : Malang.
- Lay, B. H. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 168 hlm.
- Lestario, L.N, S. Sugiarto dan K.H. Timotius. 2008. Aktivitas Antioksidan dan Kadar Fenolik Total Dari Ganggang Merah (*Gracilaria verrucosa* L.). *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. 19 (2): 132-133 hlm.
- Mangunwardoyo, W., R. Ismayasari dan E. Riani. 2010. Uji Patogenisitas dan Virulensi *Aeromonas hydrophila* Stanier Pada Ikan Nila (*Oreochromis niloticus* Lin.) Melalui Postulat Koch. *Jurnal Riset Akuakultur* Vol.5 (2): 245-255 hlm.
- Maqsood, S., M.H. Samoon, P. Singh, 2009. Immunomodulatory and Growth Promoting Effect of Dietary Levamisole in *Cyprinus carpio* Fingerlings Against the Challenge of *Aeromonas hydrophila*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 9: 111-120 page.
- Migula, W. 1894. Uber ein neues System der Bakterien. *Arb. Bakteriolog. Inst. Karlsruhe*. 1, 235-238 page.
- Misonou, T. J. Saitoh. S. Oshiba. Y. Tokitomo. M. Maegawa. Y. Inoue. H. Hori and T. Sakurai. 2003. UV-Absorbing Substance in Red Alga *Porphyra Yezoensis* (Bangiales, Rhodophyta) Block Thymine Photodimer Production. *Mar. Biotechnol.* 5 : 194-200 page.
- Mtolera and AK. Semeso. 1996. Antimicrobial Activity of Extracts from Six Green Algae from Tanzania. University of Dar es Salaam. Tanzamania.
- Nazir. 1998. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Pelczar MJ, ECS Chan. 1986 *Dasar-dasar mikrobiologi* 2. Diterjemahkan oleh Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia;. 489-522 hlm.
- Prajitno, A. 2006. Pengendalian Penyakit *Vibrio harveyii* dengan Ekstrak Rumput laut (*Halimeda opuntia*) pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab) PL-13. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang.
- Prajitno, A. 2008. Penyakit ikan – Udang Virus. Penerbit Universitas Negeri Malang Press. Malang. ISBN. 978 – 979 – 3506 – 91 – 3.106 hlm.
- Putra, I.N. K. 2007. Study Daya Antimikroba Ekstrak Beberapa Bahan Tumbuhan Pengawet Nira Terhadap Mikroba Perusak Nira Serta Kandungan Senyawa Aktifnya. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang.

- Riniwati, N . 2012. Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete* L.) Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus*. <http://www.ITS-Undergraduate-13710-Paper-370813>. Diakses tanggal 1 November 2012.
- Samad, M.S.F. 2010. Pengaruh senyawa fenolik ubur-ubur (*Aurelia* sp.) terhadap hematologi dan aktivitas fagositosis ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*. Tesis. 109 hlm.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Yogyakarta.
- Sjafrie, N.D.M. 1990. Beberapa Catatan Mengenai Rumpu Laut *Glacilaria*. *Jurnal Oseana* 15 (4): 147-155 hlm.
- Susanto, A.B. 2008. Apa Yang Terdapat Dalam Rumpu Laut?. <http://www.rumputlaut.org/selengkapnya.php>. Diakses tanggal 8 Pebruari 2008.
- Taskin, E. M. Ozturk. O. Kurt. 2007. Antibacterial Activities of Some Marine Algae from the Aegean Sea (Turkey). Departement of Biology, Faculty of Arts&Sciences, Celal Bayar University, Manisa, Turkey. *JAfrican Journal of Biotechnology* Vol.6 (24), pp 2746-2751 page.
- Teddy, M. 2009. Pembuatan Nori Secara Tradisional Dari Rumpu Laut Jenis *Gracilaria* sp. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, ITB. Bogor. Skripsi. 36 hlm.
- Todar Kenneth (2004) *Todar's Online Textbook of Bacteriology/ Pseudomonas aeruginosa*. University of Wisconsin-Madison, Dept. of Bacteriology.
- Trisnawati, Y dan E. Susanto. 2003. Pengolahan Propolis Sebagai Bahan Pangan Fungsional Antimikroba Untuk Kesehatan masyarakat. Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang. 8 hlm.
- Vitor J.M, Carvalho A.F.F.U, Freitas S.M, Melo V.M.M. 2002. Antibacterial Activity Of Extracts Of Six Macroalgae From The Northeastern Brazilian Coast. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciencias Biologicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte;Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, CE, Brasil. *Brazilian Journal Of Microbiology*. 33:311-313 page.
- Volk , W. dan M. Wheeler. 1993. Mikrobiologi Dasar. Penerbit Erlangga. Jakarta. 396 hlm.
- Wiyanto, D.B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumpu Laut *Kappaphycus alvarezii* dan *Euचेuma denticullatum* Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyii*. Universitas Islam Madura. Vol.3 No.1 ISSN:1907-9931 hlm.
- Wirsan. 2011. Bakteri *Aeromonas salmonicida* Penyebab Penyakit Ikan. <https://www.Wirsan.blogspot.com>. Diakses tanggal 20 Desember 2012.

Lampiran 1. Analisis Keragaman Bakteri *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas*

Tabel Data Hasil Pengamatan Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata
	1	2	3		
Kontrol (tanpa perlakuan)	5.00	5.00	5.00	15.00	5.00
Perlakuan A (1 ppt)	12.00	13.00	12.00	37.00	12.33
Perlakuan B (1.5 ppt)	15.50	15.00	13.50	44.00	14.67
Perlakuan C (2 ppt)	16.50	15.00	16.50	48.00	16.00
Total	49.00	48.00	47.00	144.00	48.00

Perhitungan :

$$FK = \frac{(144)^2}{12} = 1728$$

$$JK \text{ total} = [(5)^2 + (5)^2 + (5)^2 + \dots + (16.5)^2] - 1728$$

$$= 1949 - 1728$$

$$= 221$$

$$JK \text{ Perlakuan} = \frac{[(15)^2 + (37)^2 + (44)^2 + (48)^2]}{3} - 1728$$

$$= 1944.67 - 1728$$

$$= 216.67$$

$$JK \text{ Acak} = 221 - 216.67$$

$$= 4.33$$

Tabel Analisis Keragaman *A. hydrophila*

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	216.67	72.22	133.333	4.07	7.59
Acak	8	4.33	0.54	**		
Total	11	221.00				

Keterangan : ns = (tidak berbeda nyata)

* = (berbeda nyata)

** = (berbeda sangat nyata)

Lanjutan Lampiran 1.

Tabel Data Hasil Pengamatan Daya Hambat Bakteri *A. salmonicida*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata
	1	2	3		
Kontrol (tanpa perlakuan)	5.00	5.00	5.00	15.00	5.00
Perlakuan A (1 ppt)	12.00	13.00	12.00	37.00	12.33
Perlakuan B (1.5 ppt)	13.50	12.50	14.00	40.00	13.33
Perlakuan C (2 ppt)	17.50	13.50	14.00	45.00	15.00
Total	48.00	44.00	45.00	137.00	45.67

Perhitungan :

$$FK = \frac{(137)^2}{12} = 1564.08$$

$$JK_{\text{total}} = [(5)^2 + (5)^2 + (5)^2 + \dots + (14)^2] - 1564.08$$

$$= 1751 - 1564.08$$

$$= 186.92$$

$$JK_{\text{Perlakuan}} = \frac{[(15)^2 + (37)^2 + (40)^2 + (45)^2]}{3} - 1564.08$$

$$= 1739.67 - 1564.08$$

$$= 175.58$$

$$JK_{\text{Acak}} = 186.92 - 175.58$$

$$= 11.33$$

Tabel Analisis Keragaman *A. salmonicida*

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	175.58	58.53	41.314	4.07	7.59
Acak	8	11.33	1.42	**		
Total	11	186.92				

Keterangan : ns = (tidak berbeda nyata)

* = (berbeda nyata)

** = (berbeda sangat nyata)

Lanjutan Lampiran 1.

Tabel Data Hasil Pengamatan Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas* 24 jam

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata
	1	2	3		
Kontrol (tanpa perlakuan)	5.00	5.00	5.00	15.00	5.00
Perlakuan A (1 ppt)	13.00	15.50	11.50	40.00	13.33
Perlakuan B (1.5 ppt)	16.00	14.00	14.50	44.50	14.83
Perlakuan C (2 ppt)	15.00	17.00	15.00	47.00	15.67
Total	49.00	51.50	46.00	146.50	48.83

Perhitungan :

$$FK = \frac{(146.5)^2}{12} = 1788.52$$

$$JK_{total} = [(5)^2 + (5)^2 + (5)^2 + \dots + (15)^2] - 1788.52$$

$$= 2017.75 - 1788.52$$

$$= 229.23$$

$$JK_{Perlakuan} = \frac{[(15)^2 + (40)^2 + (44.5)^2 + (47)^2]}{3} - 1788.52$$

$$= 2004.75 - 1788.52$$

$$= 216.23$$

$$JK_{Acak} = 229.23 - 216.23$$

$$= 13$$

Tabel Analisis Keragaman *Pseudomonas* 24 Jam

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	216.23	72.08	44.355	4.07	7.59
Acak	8	13.00	1.63	**		
Total	11	229.23				

Keterangan : ns = (tidak berbeda nyata)

* = (berbeda nyata)

** = (berbeda sangat nyata)

Lanjutan Lampiran 1.

Tabel Data Hasil Pengamatan Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas* 48 jam

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata
	1	2	3		
Kontrol (tanpa perlakuan)	5.00	5.00	5.00	15.00	5.00
Perlakuan A (1 ppt)	14.50	16.00	12.50	43.00	14.33
Perlakuan B (1.5 ppt)	16.50	15.50	15.50	47.50	15.83
Perlakuan C (2 ppt)	17.00	18.50	17.00	52.50	17.50
Total	53.00	55.00	50.00	158.00	52.67

Perhitungan :

$$FK = \frac{(158)^2}{12} = 2080.33$$

$$JK_{\text{total}} = [(5)^2 + (5)^2 + (5)^2 + \dots + (17)^2] - 2080.33$$

$$= 2370.50 - 2080.33$$

$$= 290.17$$

$$JK_{\text{Perlakuan}} = \frac{[(15)^2 + (43)^2 + (47.5)^2 + (52.5)^2]}{3} - 2080.33$$

$$= 2362.17 - 2080.33$$

$$= 281.83$$

$$JK_{\text{Acak}} = 290.17 - 281.83$$

$$= 8.33$$

Tabel Analisis Keragaman *Pseudomonas* 48 Jam

Sidik Ragam	db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	281.83	93.94	90.187	4.07	7.59
Acak	8	8.33	1.04	**		
Total	11	290.17				

Keterangan : ns = (tidak berbeda nyata)

* = (berbeda nyata)

** = (berbeda sangat nyata)

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah total daya hambat terhadap *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas*. Hal ini

Lanjutan Lampiran 1.

ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F 5% tetapi lebih kecil dari F 1% yang berarti dosis pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* berpengaruh terhadap jumlah total daya hambat terhadap *A. hydrophila*, *A. salmonicida* dan *Pseudomonas*. Sehingga perlu dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui tingkat perbedaan antar perlakuan.



Lampiran 2. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Bakteri *A. hydrophila*

$$SED = \sqrt{(2 \times 0.54)/3} = 0.600925213$$

$$BNT\ 5\% = 2.306 \times 0.600925213 = 1.39$$

$$BNT\ 1\% = 3.355 \times 0.600925213 = 2.02$$

Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila*

Rata-rata Perlakuan	P0	P1	P2	P3	Notasi
	5.00	12.33	14.67	16.00	
K=5.00	-	-	-	-	A
C=12.33	7.33**	-	-	-	B
B=14.67	9.67	2.33**	-	-	C
A=16.00	11.00	3.67	1.33 ^{ns}	-	C

Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Bakteri *A. salmonicida*

$$SED = \sqrt{(2 \times 1.42)/3} = 0.971825316$$

$$BNT\ 5\% = 2.306 \times 0.971825316 = 2.24$$

$$BNT\ 1\% = 3.355 \times 0.971825316 = 3.26$$

Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Daya Hambat Bakteri *A. salmonicida*

Rata-rata Perlakuan	P0	P1	P2	P3	Notasi
	5.00	12.33	13.33	15.00	
K=5.00	-	-	-	-	A
C=12.33	7.33**	-	-	-	B
B=13.33	8.33	1.00 ^{ns}	-	-	B
A=15.00	10.00	2.67	1.67 ^{ns}	-	B

Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Bakteri *Pseudomonas* 24 jam

$$SED = \sqrt{(2 \times 1.63)/3} = 1.040833$$

$$BNT\ 5\% = 2.306 \times 1.040833 = 2.40$$

$$BNT\ 1\% = 3.355 \times 1.040833 = 3.49$$

Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas*

Rata-rata Perlakuan	P0	P1	P2	P3	Notasi
	5.00	13.33	14.83	15.67	
K=5.00	-	-	-	-	A
C=13.33	8.33**	-	-	-	B
B=14.83	9.83	1.50 ^{ns}	-	-	B
A=15.67	10.67	2.33	0.83 ^{ns}	-	B

Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Bakteri *Pseudomonas* 48 jam

$$SED = \sqrt{(2 \times 1.04) / 3} = 0.833333$$

$$BNT 5\% = 2.306 \times 0.833333 = 1.92$$

$$BNT 1\% = 3.355 \times 0.833333 = 2.80$$

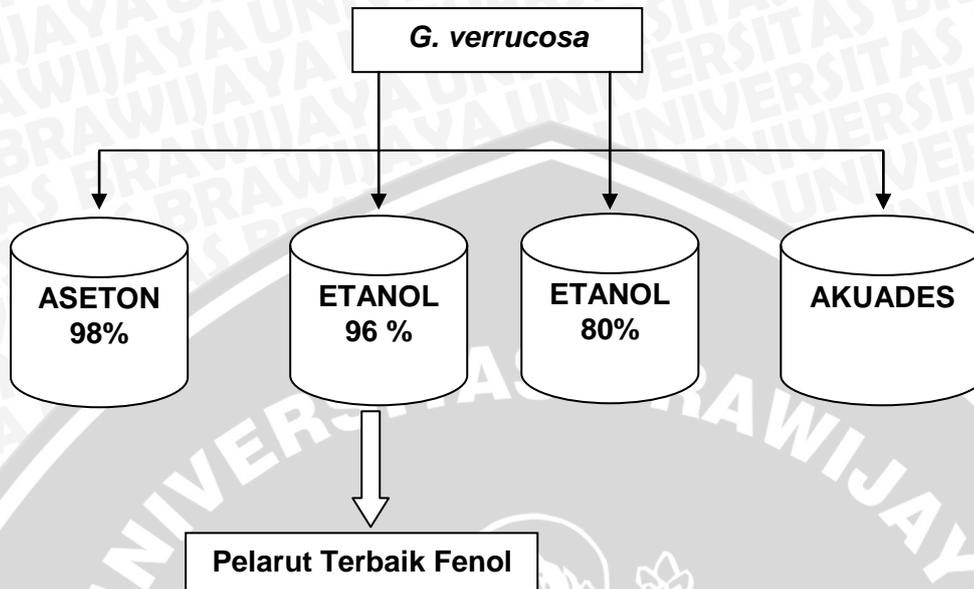
Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas*

Rata-rata Perlakuan	P0	P1	P2	P3	Notasi
	5.00	14.33	15.83	17.50	
K=5.00	-	-	-	-	A
C=14.33	9.33**	-	-	-	B
B=15.83	10.83	1.50 ^{ns}	-	-	B
A=17.50	12.50	3.17	1.67 ^{ns}	-	B



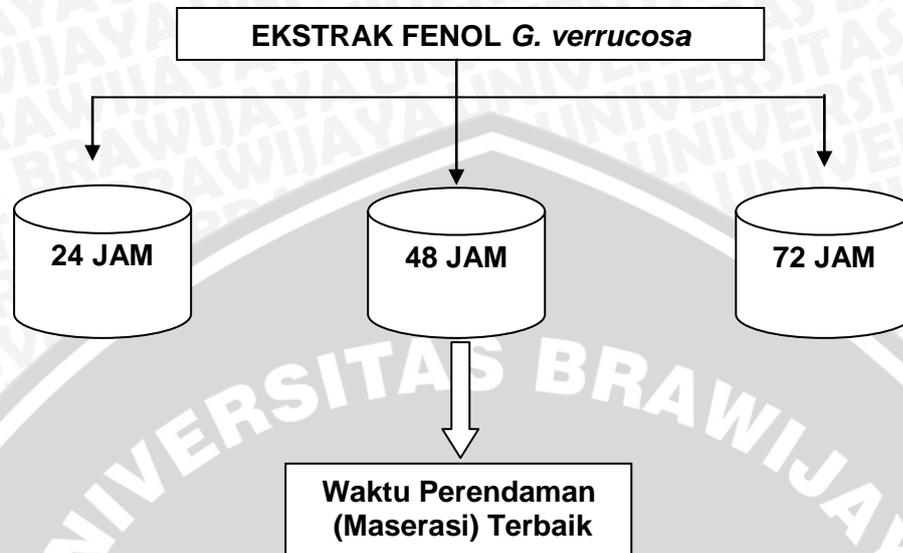
Lampiran 3. Bagan Uji Pendahuluan

1) Penentuan Pelarut yang Terbaik

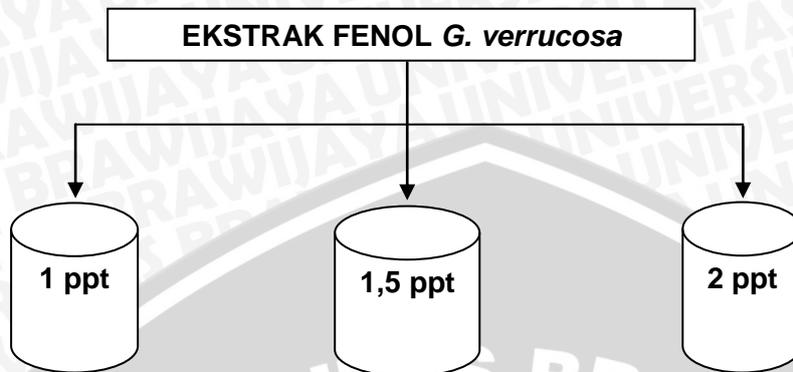


Pada penelitian pendahuluan yang dilakukan untuk mengetahui pelarut terbaik untuk maserasi, diujicobakan macam-macam pelarut berdasarkan tingkat kepolarannya yaitu aseton 98%, etanol 80%, etanol 96% dan akuades. Setelah diujicobakan ternyata pelarut aseton 98% telah menguap pada saat dilakukan proses maserasi, pada maserasi dengan menggunakan etanol 80%, setelah dilakukan pengukuran panjang gelombang ternyata hasilnya lebih rendah daripada etanol 96% begitu juga pada akuades. Setelah pengukuran panjang gelombang dengan menggunakan spektrofotometer panjang gelombangnya juga lebih rendah dibandingkan dengan etanol 96% (etanol 80% : 0,007 mg/l, etanol 96% : 0,015 mg/l, akuades : 0,000 mg/l). Sehingga dari penelitian pendahuluan tersebut, dapat disimpulkan bahwa pelarut terbaik yang digunakan untuk maserasi rumput laut *Gracilaria verrucosa* adalah etanol 96%.

2) Penentuan Lama Perendaman (Maserasi) Terbaik Menggunakan Pelarut Etanol 96%



Setelah mengetahui hasil pelarut terbaik untuk maserasi, penelitian pendahuluan dilanjutkan dengan mencari waktu maserasi terbaik, range waktu yang disarankan adalah selama 24 jam, 48 jam dan 72 jam. Pelarut yang digunakan dalam maserasi adalah etanol 96%, dengan waktu maserasi selama 24 jam didapatkan hasil panjang gelombang yang rendah, sedangkan pada waktu maserasi 72 jam, pelarut menguap pada 24 jam pertama maserasi sebelum penyaringan dilakukan. Sehingga dari hasil tersebut, dapat disimpulkan bahwa waktu maserasi yang optimal adalah 48 jam, setelah pengukuran panjang gelombang didapatkan hasil panjang gelombang lebih tinggi dibandingkan dengan maserasi 24 jam (etanol 96% 48 jam : 0,015 mg/l).

3) Penentuan Dosis Antibakteri Menggunakan Ekstrak Fenol *G. Verrucosa*

Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa range dosis kurang dari 1 ppt tidak optimum apabila digunakan untuk antibakteri, sedangkan apabila lebih 2 ppt fenol akan bersifat *bactericidal* (membunuh bakteri). Sehingga dari hasil penelitian tersebut, disarankan penelitian lanjutan menggunakan range dosis 1 ppt, 1,5 ppt dan 2 ppt. Pada penelitian lanjutan yang menggunakan uji cakram, didapatkan hasil dosis fenol yang menghasilkan daya hambat lebih tinggi adalah dosis 1,5 ppt.

Lampiran 4. Isolasi Senyawa Fenolik *G. verrucosa*

Glacilaria verrucosa (kering)

- Dibersihkan dan dipisahkan dari kotoran-kotoran yang menempel
- Dipotong kecil-kecil hingga halus
- Ditimbang sebanyak 1000 gram bahan
- Dimasukkan ke dalam plastik dan diberi kertas label

Beaker glass

- Disiapkan 5 buah beaker glass
- Dimasukkan bahan ke dalam masing-masing beaker glass sebanyak 200 gram
- Di maserasi menggunakan pelarut etanol 96 % sebanyak 600 ml (perbandingan 1:3)
- Didiamkan selama 24 jam pada suhu ruang (di tempat yang gelap)
- Diulang 2 kali

Ekstrak Polifenol *G.verrucosa*

- Dipekatkan dengan *rotary evaporator vacuum*, dengan suhu 40⁰ C hingga tidak ada pelarut tidak berbau
- Dianalisa jumlah fenol dengan menggunakan spektrofotometer

Senyawa Fenolik *G. verrucosa*

Analisa di Lab. Kimia Organik

Lampiran 5. Gambar Alat Penelitian



Vortex



Inkubator



Autoclav



Pinset



Jangka Sorong



Hot Plate



Timbangan Digital



Mikro Pipet

Lampiran 6. Gambar Bahan Penelitian



Alkohol 70%



Kertas Cakram



Ekstrak *G. verrucosa*



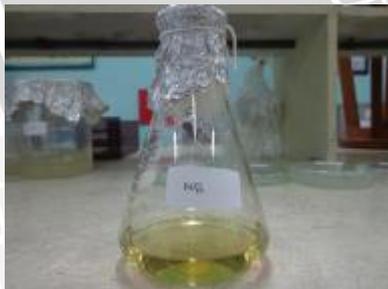
Media Bakteri



Aquades Steril

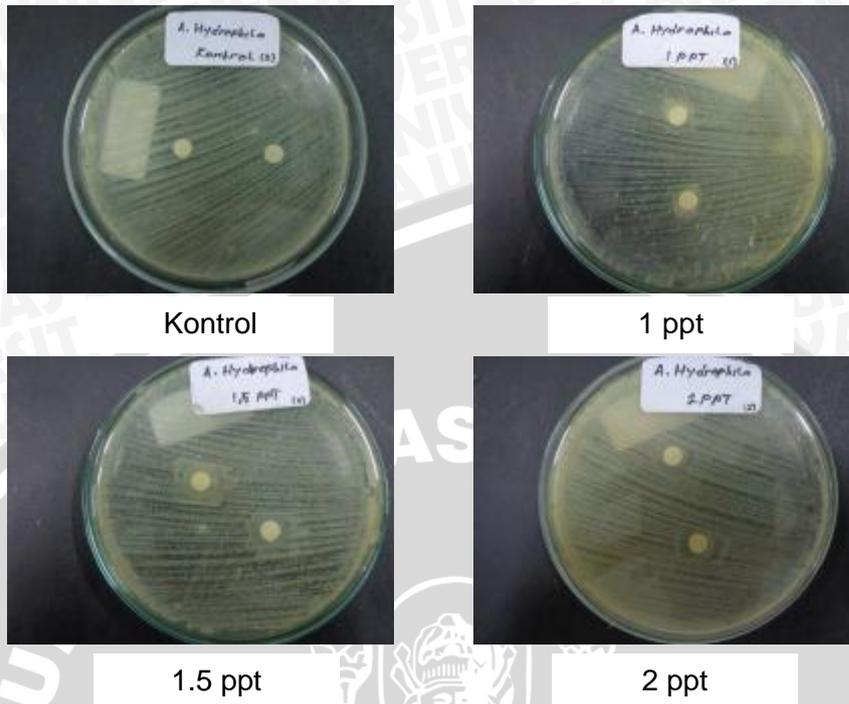


Media TSA

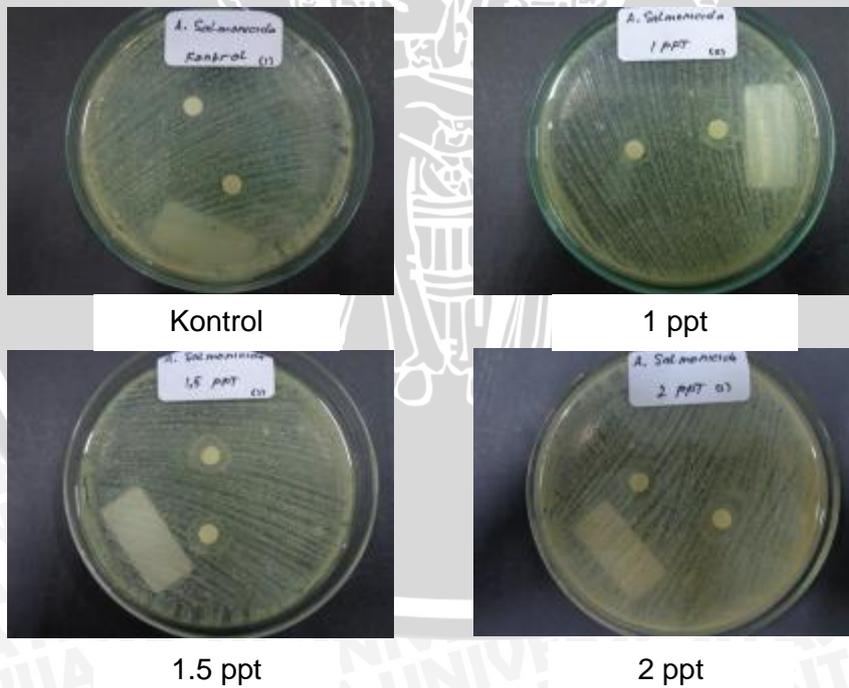


Media NB

Gambar Daya Hambat Bakteri *A. hydrophila*



Gambar Daya Hambat Bakteri *A. salmonicida*



Gambar Daya Hambat Bakteri *Pseudomonas*

