

**UJI SENSITIVITAS EKSTRAK KASAR BUNGA ROSELLA
(*Hibiscus sabdariffa* L.) TERHADAP BAKTERI *VIBRIO HARVEYI*
SECARA IN VITRO**

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

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

Oleh:

DITA KRISTIAN SEPTRIANTI

NIM. 115080500111009



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

**UJI SENSITIVITAS EKSTRAK KASAR BUNGA ROSELLA
(*Hibiscus sabdariffa* L.) TERHADAP BAKTERI *VIBRIO HARVEYI*
SECARA IN VITRO**

**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:
DITA KRISTIAN SEPTRIANTI
NIM. 115080500111009**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2015**

SKRIPSI

UJI SENSITIVITAS EKSTRAK KASAR BUNGA ROSELLA
(*Hibiscus sabdariffa* L.) TERHADAP BAKTERI *VIBRIO HARVEYI*
SECARA IN VITRO

Oleh :
DITA KRISTIAN SEPTRIANTI
NIM. 115080500111009

Telah dipertahankan didepan penguji
Pada tanggal 10 Juni 2015
Dan dinyatakan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. : _____
Tanggal : _____

Dosen Penguji I

Ir. Ellana Sanoesi, MP
NIP. 19630924 199803 2 002
Tanggal :

Dosen Penguji II

Ir. Heny Suprastyani, MS
NIP. 19620904 198701 2 001
Tanggal :

Dosen Pembimbing I

Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS
NIP. 19550213 198403 1 001
Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc
NIP. 19621014 198701 1 001
Tanggal :

Mengetahui
Ketua Jurusan

Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal :

PERNYATAAN ORISINALITAS

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

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

Malang, Juni 2015

Mahasiswa

Dita Kristian Septrianti



RINGKASAN

DITA KRISTIAN SEPTRIANTI. Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In Vitro*. Dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS dan Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc**

Pengembangan budidaya laut merupakan usaha meningkatkan produksi dan sekaligus merupakan langkah pelestarian kemampuan lingkungan yang serasi dan seimbang. Salah satu kendala dalam kegiatan marikultur atau budidaya ini adalah penyakit pada biota budidaya. Timbulnya penyakit dapat disebabkan karena kondisi perairan yang kurang baik. Salah satu spesies bakteri yang paling banyak menyebabkan penyakit dan kematian pada budidaya biota laut adalah *Vibrio harveyi*. Penyakit vibriosis biasanya ditanggulangi menggunakan senyawa kimia sintetik seperti antibiotik. Penggunaan antibiotik dalam waktu lama akan menimbulkan sejumlah masalah utamanya resistensi bakterial dan residu yang dapat mencemari lingkungan. Oleh karena itu, pencarian senyawa – senyawa antibakteri dari bahan alam yang tidak mengandung efek samping. Salah satu bahan alami yang memiliki sifat antibakteri adalah bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Dimulai pada bulan Januari hingga bulan Maret 2015. Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui sensitivitas pemberian ekstrak kasar bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap daya hambat dari bakteri *V. harveyi* secara *In vitro*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Metode eksperimen adalah melakukan percobaan untuk melihat suatu hasil dan rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 4 perlakuan konsentrasi ekstrak kasar bunga Rosella yaitu : A (15%), B (30%), C (45%) dan D (60%). Masing – masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali ulangan. Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pemberian ekstrak kasar bunga Rosella memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap daya hambat pertumbuhan *V. harveyi*. Dosis maksimal adalah pada D (60%) dengan rata – rata diameter zona hambat 26,18 mm, sedangkan dosis optimal yang didapatkan sebesar 15%. Hubungan antara dosis ekstrak kasar bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan diameter hambatan yang terbentuk adalah linear, dimana persamaannya didapatkan $y = 12,047 + 1,27$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9804.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini adalah ekstrak kasar bunga Rosella berpengaruh menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dimana konsentrasi optimum yang dapat menghambat sebesar 60%.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadiran Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga Skripsi dengan judul Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In Vitro* ini terselesaikan. Skripsi ini disusun berdasarkan hasil Penelitian yang telah dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Januari sampai dengan Maret 2015. Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan pada Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya.

Pada kesempatan kali ini penulis menyampaikan ucapan terima kasih kepada Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku dosen pembimbing I dan Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc selaku dosen pembimbing II yang telah karena senantiasa dengan sabar dalam membimbing, mengarahkan serta memberikan motivasi semangat dan jangan mudah menyerah kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa karya tulis ilmiah Skripsi ini masih belum sempurna, sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi perbaikan dan kesempurnaan karya tulis ilmiah ini di masa mendatang. Penulis berharap karya tulis ilmiah Skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan informasi yang berguna bagi pembaca.

Malang, Juni 2015

Penulis

UCAPAN TERIMA KASIH

Puji syukur penulis ucapkan atas terselesainya laporan skripsi ini, penulis mengucapkan terima kasih sebesar besarnya kepada :

1. Allah SWT yang senantiasa mengiringi dan memberi petunjuk-Nya dalam setiap langkah serta, Nabi besar Muhammad SAW yang menjadi suri tauladan bagi umatnya.
2. Ayah Hadi Krisnanto yang selalu menjadi penuntun dan memberi ilmu yang bermanfaat bagi penulis. Serta ibu Yustiantini S.Pd yang selalu memberikan doa yang terbaik dan kakakku Eka Yuli Kristanti, Novi Kristanti dan adikku Kristian Catur Aprilyano.
3. Ir. Prapti Sunarmi selaku Dosen Pembimbing Akademik, yang telah memberikan dukungan moril maupun materiil hingga laporan skripsi ini dapat terselesaikan
4. Mbak Titin dan mbak heni yang telah banyak membimbing penulis dalam menempuh kehidupan dalam menjalani kuliah dan telah banyak memberikan motivasi, ceramah serta ilmu yang bermanfaat kepada penulis.
5. Untuk sahabatku Gabri Digdayaning, Nikita Happy, Dwi Yuli, Kadi Mei, Yayuk Mughiroh, Ani Nadhiroh, Randy Adi, Nur wasilah, Yeti mayantari dan Farida Ayu yang selalu memberikan semangat dan keceriaan yang tiada henti - hentinya kepada penulis.
6. Seluruh rekan - rekan tim parasiters yang telah banyak membantu penulis dan selalu memberikan dukungan dan motivasi untuk terselesainya laporan skripsi ini.
7. Teman - teman Kost Watu Gong 16, Carin, Inot, ella, alpi, ennyekk yang selalu memberikan semangat dan selalu menemani penulis dalam penyelesaian skripsi ini.

8. Teman - teman Aquatic Spartans BP 2011, yang telah ikut serta mendukung penyelesaian skripsi ini dan telah banyak mengukir cerita selama penulis menuntut ilmu.
9. Seluruh pihak yang sudah membantu penulis selama penelitian.

Malang, Juni 2015

Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN PENGESAHAN.....	iii
HALAMAN PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iv
RINGKASAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
UCAPAN TERIMA KASIH.....	vii
DAFTAR ISI.....	ix
DAFTAR GAMBAR.....	xi
DAFTAR TABEL.....	xii
DAFTAR LAMPIRAN.....	xiii
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Hipotesis.....	4
1.5 Tempat Dan Waktu Pelaksanaan Penelitian.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran.....	6
2.1.3 Infeksi Bakteri <i>V. harveyi</i> dan Gejalanya.....	7
2.2 Bunga Rosella <i>H. sabdariffa</i> L.....	7
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	7
2.2.2 Bahan Aktif Bunga Rosella (<i>H. sabdariffa</i> L.).....	9
2.2.3 Aktivitas Antimikroba.....	10
2.3 Uji Sensitivitas Antibakteri Secara <i>In Vitro</i> dengan uji cakram....	11
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	12
3.1 Materi Penelitian.....	12
3.1.1 Alat Penelitian.....	12
3.1.2 Bahan Penelitian.....	12
3.2 Metode Penelitian.....	13
3.3 Pengambilan Data.....	14
3.4 Rancangan Penelitian.....	14
3.5 Prosedur Penelitian.....	16
3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	16
3.5.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan.....	16
3.5.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Bunga Rosella.....	17

3.5.4	Pembuatan Media.....	17
3.5.5	Pembiakan Bakteri <i>V. harveyi</i>	18
3.6	Pelaksanaan Penelitian.....	19
3.6.1	Prosedur Pelaksanaan Uji Cakram.....	19
3.6.2	Uji Difusi Kertas Cakram.....	20
3.7	Parameter Uji.....	20
3.8	Analisa Data.....	20
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	22
4.1	Pembiakan Bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	22
4.2	Daya Anti Bakterial Ekstrak Kasar Bunga Rosella (<i>H. sabdariffa</i> L) Dengan Uji Cakram.....	25
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	33
5.1	Kesimpulan.....	33
5.2	Saran.....	33
	DAFTAR PUSTAKA.....	34
	LAMPIRAN.....	37



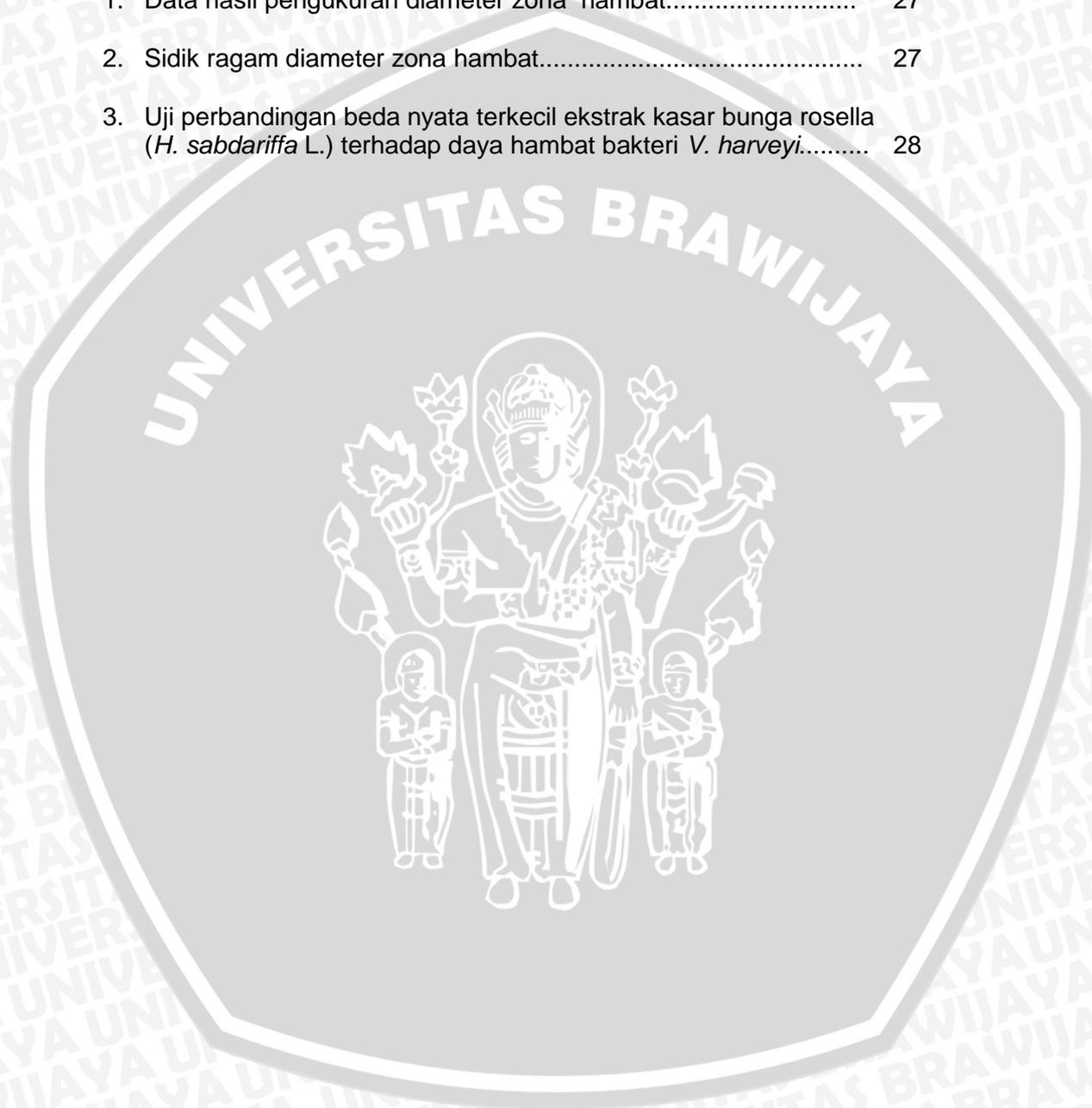
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>V. harveyi</i> dengan pembesaran 1.000x.....	5
2. Bunga Rosella.....	8
3. Denah Penelitian Uji Cakram.....	16
4. Bakteri <i>V. harveyi</i> dokumntasi penelitian.....	21
5. Biakan Murni Bakteri <i>V. harveyi</i>	24
6. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Bunga Rosella (<i>H. sabdariffa</i> L.) terhadap <i>Vibrio harveyi</i>	26
7. Grafik Hubungan antara konsentrasi ekstrak bunga rosella (<i>H. sabdariffa</i> L.) terhadap diameter zona hambat bakteri <i>V. harveyi</i>	29
8. Mekanisme Perusakan Membran Sitoplasma oleh Flavonoid..	31



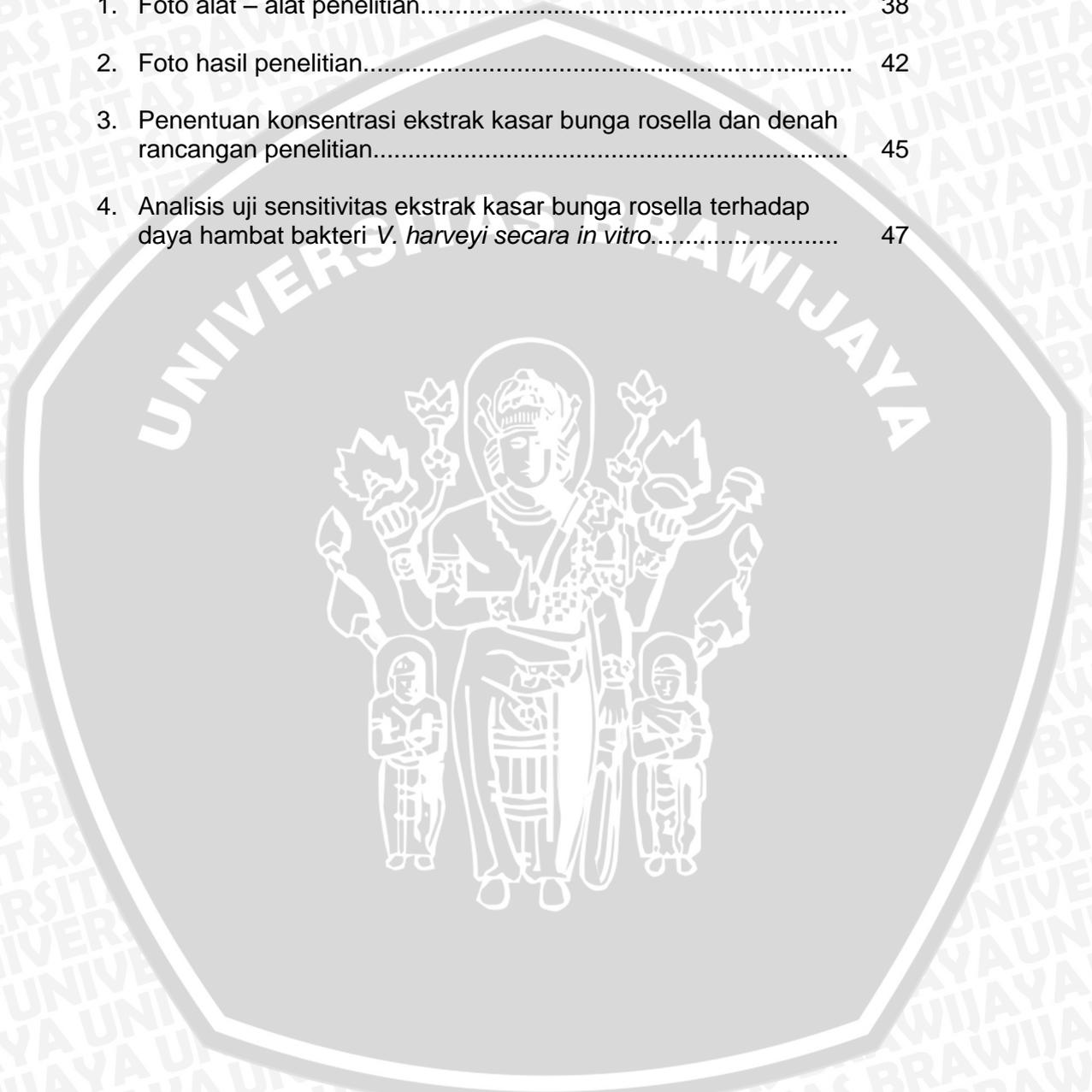
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Data hasil pengukuran diameter zona hambat.....	27
2. Sidik ragam diameter zona hambat.....	27
3. Uji perbandingan beda nyata terkecil ekstrak kasar bunga rosella (<i>H. sabdariffa</i> L.) terhadap daya hambat bakteri <i>V. harveyi</i>	28



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Foto alat – alat penelitian.....	38
2. Foto hasil penelitian.....	42
3. Penentuan konsentrasi ekstrak kasar bunga rosella dan denah rancangan penelitian.....	45
4. Analisis uji sensitivitas ekstrak kasar bunga rosella terhadap daya hambat bakteri <i>V. harveyi</i> secara <i>in vitro</i>	47



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Pengembangan budidaya laut merupakan usaha meningkatkan produksi dan sekaligus merupakan langkah pelestarian kemampuan lingkungan yang serasi dan seimbang dalam rangka mengimbangi pemanfaatan dengan cara penangkapan. Usaha budidaya merupakan salah satu bentuk pengelolaan dan pemanfaatan sumberdaya perairan yang berwawasan lingkungan (Affan, 2012).

Salah satu kendala dalam kegiatan marikultur atau budidaya ini adalah penyakit pada biota budidaya. Timbulnya penyakit dapat disebabkan karena kondisi perairan yang kurang baik, kualitas pakan yang kurang, maupun kualitas induk yang kurang baik. Selain itu, penggunaan teknik budidaya yang kurang tepat dan kontaminasi dari alat-alat budidaya maupun pekerjaanya juga dapat menyebabkan timbulnya penyakit (Hatmanti, 2003).

Menurut Prajitno (2005), penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Dengan demikian timbulnya serangan penyakit ikan di kolam merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, kondisi lingkungan dan organisme penyakit. Interaksi yang tidak sesuai ini dapat menyebabkan ikan stress, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit. Serangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan kendala utama dalam kegiatan budidaya.

Salah satu spesies dalam kelompok bakteri yang paling banyak menyebabkan penyakit dan kematian pada budidaya biota laut adalah *Vibrio harveyi*. Bakteri ini merupakan penyebab penyakit kunang-kunang atau penyakit berpendar, karena krustasea yang terinfeksi akan terlihat terang dalam keadaan gelap (malam hari). Pada dasarnya bakteri ini bersifat oportunistik dan akan

menjadi patogen jika pada media pemeliharaannya terjadi guncangan secara drastik, seperti perubahan suhu, pH, salinitas dan faktor lainnya, Menurut Roza dan Zafran (1998) batas aman keberadaan populasi bakteri di dalam bak pemeliharaan adalah $8,35 \times 10^4$ koloni/ml. Bakteri ini merupakan penyebab utama terhadap tingginya tingkat kematian pada larva krustasea (Hatmanti, 2003).

Menurut Akhyar (2010), penyakit vibriosis biasanya ditanggulangi menggunakan senyawa kimia sintetik seperti antibiotik. Penggunaan antibiotik dalam waktu lama akan menimbulkan sejumlah masalah utamanya resistensi bakterial dan residu yang dapat mencemari lingkungan. Oleh karena itu, pencarian senyawa – senyawa antibakteri dari bahan alam yang tidak mengandung efek samping. Salah satu bahan alami yang memiliki sifat antibakteri adalah bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.).

Bunga Rosella memiliki beberapa kandungan antibakteri terhadap bakteri penyebab plak. Kandungan kimia kelopak bunga Rosella terdiri dari asam organik, senyawa fenol, flavonoid dan antosianin. Zat - zat tersebut mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif dan gram negatif. Hasil penelitian Limyati dan Soegianto (2008) dalam Riwandy (2014), menyebutkan bahwa sediaan ekstrak air kelopak bunga rosella pada konsentrasi 10% dengan metode difusi, telah mampu menghambat bakteri gram positif *Staphylococcus aureus* dan *Streptococcus pyogenes* .

Rosela (*Hibiscus sabdariffa* L.) merupakan tumbuhan famili *malvaceae* telah dikultivasi di Asia sejak lebih dari 300 tahun lalu, tetapi sekarang telah dikultivasi di banyak negara (Tindal, 1983 dikutip dari Ojokoh, 2006). Bunga rosela yang keluar dari ketiak daun yang merupakan bunga tunggal, yang padasetiap tangkai hanya terdapat satu bunga. Pada tahun 1962 Abdul Aziz

Sharafdari Sudan Research Unit, Institute of African and Asian Studies, membuktikan bahwa bunga rosela yang berwarna merah juga mempunyai beberapa khasiat, salah satunya sebagai anti dengan bakteri. Tiga tahun berikutnya Sharaf berhasil membuktikan bahwa bunga rosela dan zat yang berwarna merah di tanaman ini dapat membunuh *Mycobacterium tuberculosis*, bakteri penyebab TBC (Watt and Breyer, 1962 dalam Rostinawati 2008). Selain itu, tidak hanya dengan menggunakan bakteri tersebut saja banyak penelitian yang menggunakan ekstrak bunga Rosella yang berwarna merah ini.

Dengan demikian perlu diadakannya penelitian yang menggunakan bunga Rosella yang telah terbukti memiliki kandungan antibakteri. Bakteri yang dapat diujikan salah satunya adalah dari spesies Vibrio, yaitu *V. harveyi*.

1.2 Perumusan Masalah

Genus Vibrio merupakan bakteri penyebab beberapa penyakit, seperti vibriosis dan cholera. Salah satu spesies bakteri Vibrio adalah *V. Harveyi*. *V. Harveyi* merupakan bakteri patogen yang menyebabkan penyakit vibriosis pada udang, ikan dan kerang – kerangan (Akhyar, 2010).

Vibriosis biasanya ditanggulangi menggunakan senyawa kimia sintetik seperti antibiotik. Penggunaan antibiotik dalam waktu lama akan menimbulkan sejumlah masalah utamanya bakterial dan residu yang dapat mencemari lingkungan. Karena itu diperlukan senyawa antibakteri dari bahan alami yang aman dan tidak menimbulkan efek samping berbahaya. Salah satunya dengan menggunakan bunga Rosella yang mengandung senyawa aktif berupa *flavonoid*.

Flavonoid merupakan senyawa kimia yang terdapat pada tumbuhan tingkat tinggi maupun tingkat rendah yang berfungsi sebagai antioksidan. Selain flavonid kelopak bunga rosella juga mengandung senyawa lain seperti *gossypeptin* (*hydroxyl flavone*), antosianin (zat merah), *glukoside hibisin*, air, protein, lemak,

serat, abu, kalsium, fosfor, zat besi, karoten, tiamin, niasin, asam askorbat dan saponin (Hamdani, 2008).

Berdasarkan rumusan yang telah di paparkan, maka didapat permasalahan sebagai berikut :

- Bagaimanakah sensitivitas pemberian ekstrak kasar bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap daya hambat dari bakteri *V. harveyi* secara *in vitro* ?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui sensitivitas pemberian ekstrak kasar bunga rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) terhadap daya hambat dari bakteri *V. harveyi* secara *In Vitro*.

1.4 Hipotesis

H_0 : Diduga pemberian ekstrak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan dosis yang berbeda tidak mempengaruhi daya hambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

H_1 : Diduga pemberian ekstrak Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan dosis yang berbeda dapat mempengaruhi daya hambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

1.5 Tempat Dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan 1 Januari – 8 Maret 2015.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *V. harveyi*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Akhyar (2010) klasifikasi dan morfologi *V. harveyi* adalah sebagai berikut ini :

Divisi : Protophyta

Kelas : Schizomycetes

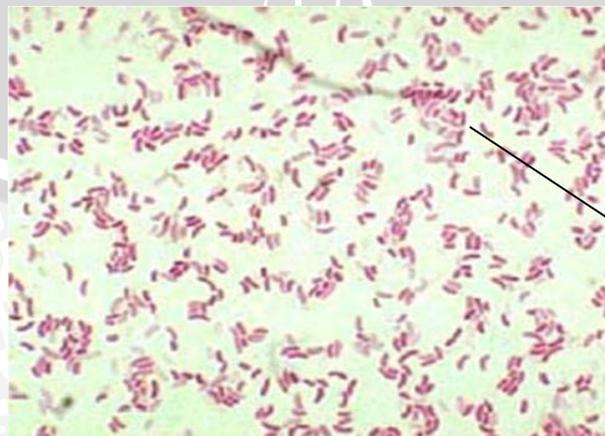
Bangsa : Eubacteriales

Suku : Enterobacteriaceae

Marga : *Vibrio*

Jenis : *V. harveyi*

Vibrio harveyi memiliki ciri – ciri seperti, dinding sel kaku, sel tunggal, bentuk koma atau batang terpilin, motil karena flagela kutub tunggal (monotoric flagel), gram negatif, habitat pada lingkungan akuatik, organ-organ reproduktif, saluran pencernaan, dan rongga mulut hewan (termasuk manusia), patogenetik bagi binatang (termasuk manusia). ukuran sel 1-4 μm , yang tidak membentuk spora, oksidase positif, katalase positif, serta proses fermentasi karbohidratnya yang tidak membentuk gas. Untuk lebih jelas lihat Gambar 1.



V. harveyi

Gambar 1. *V. Harveyi* dengan pembesaran 1.000x (Rizka, 2013)

Menurut Felix *et al.*, (2011), genus *Vibrio* merupakan patogen oportunistik, yaitu organisme yang dalam keadaan normal ada dalam lingkungan pemeliharaan lalu berkembang dari sifat yang saprofit menjadi patogenik karena kondisi lingkungan memungkinkan.

Bakteri ini merupakan penyebab penyakit kunang-kunang atau penyakit berpendar, karena krustasea yang terinfeksi akan terlihat terang dalam keadaan gelap (malam hari). Pada dasarnya bakteri ini bersifat oportunistik dan akan menjadi patogen jika pada media pemeliharaannya terjadi guncangan secara drastik, seperti perubahan suhu, pH, salinitas dan faktor lainnya, Menurut Roza dan Zafran (1998) batas aman keberadaan populasi bakteri di dalam bak pemeliharaan adalah $8,35 \times 10^4$ koloni/ml. Bakteri ini merupakan penyebab utama terhadap tingginya tingkat kematian pada larva krustasea (Hatmanti,2003).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Felix *et al.*, (2011), Identifikasi menggunakan teknik sekuens 16S rDNA mendapatkan bakteri pada udang windu, air tambak, dan air laut didominasi oleh genus *Vibrio*. Genus *Vibrio* merupakan patogen oportunistik, yaitu organisme yang dalam keadaan normal ada dalam lingkungan pemeliharaan lalu berkembang dari sifat yang saprofit menjadi patogenik karena kondisi lingkungan memungkinkan.

Menurut Rahmat *et al.*,(2014) *Vibrio* spp. adalah bakteri halofilik Gram - negatif milik kelas *Gammaproteobacteria* . *Vibrio* adalah salah satu yang paling sering dipelajari dan beragam genera mikroorganisme yang ditemukan di ekosistem perairan terdiri dari bakteri *culturable* utama dalam laut dan lingkungan muara. Hal ini telah dibuktikan dengan beberapa penelitian yang membahas habitat dari bakteri *vibrio*.

2.1.3 Infeksi Bakteri *V. harveyi* dan Gejalanya

Udang yang terserang *Vibrio* umumnya ditandai dengan gejala klinis, di mana udang terlihat lemah, berwarna merah gelap atau pucat, antena dan kaki renang berwarna merah. Bakteri ini merupakan jenis patogen yang menginfeksi dan menyebabkan penyakit pada saat kondisi udang lemah dan faktor lingkungan yang ekstrim (Lopillo, 2000 *dalam felix et al.*, 2011).

Menurut Akhyar (2010), *Vibrio* merupakan penyebab utama penyakit vibriosis pada udang atau penyakit udang menyala dan dapat berperan sebagai patogen primer ataupun patogen sekunder. Sebagai patogen primer, *vibrio* masuk melalui kontak langsung dengan organisme, sedangkan sebagai patogen sekunder, *vibrio* menginfeksi organisme yang telah terlebih dahulu terinfeksi penyakit lain. *Vibrio* menyerang dengan merusak lapisan kutikula yang mengandung khitin dikarenakan *Vibrio* memiliki chitinase, lipase, dan protease. Vibriosis ini pada umumnya menyerang udang pada stadia mysis sampai awal pasca larva.

2.2 Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi dari kelopak bunga rosela (Backer and Bakhuizen, 1963) *dalam Rostinawati* (2008) adalah sebagai berikut :

Regnum	: Plantae
Divisi	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Subkelas	: Dilleniidae
Ordo	: Malvales
Familia	: Malvaceae

Genus : Hibiscus
Spesies : *H. sabdariffa* L

Rosella memiliki lebih dari 300 spesies yang tersebar pada daerah tropis dan non tropis. Kebanyakan tanaman Rosella dipergunakan sebagai tanaman hias dan beberapa diantaranya dipercaya memiliki khasiat medis, salah satu diantaranya adalah rosella merah atau roselle (*H. sabdariffa* L). Bunga rosella memiliki putik sekaligus serbuk sari sehingga tidak memerlukan bunga lain untuk bereproduksi. Rosella (*H. sabdariffa* L.) dapat hidup di daerah yang memiliki iklim lembab dan hangat pada daerah tropis dan sub tropis. Rosella memiliki kelebihan dibandingkan dengan tanaman tropis dan subtropis lainnya yaitu dapat bertahan dalam cuaca yang sangat dingin serta dapat hidup dalam ruangan yang memiliki sedikit pencahayaan akan tetapi pertumbuhan terbaik diperoleh pada ruang terbuka dengan cahaya matahari (Tanjong, 2011).
Dibawah ini Gambar 2. adalah bunga rosella (*H. sabdariffa* L.)



Gambar 2. Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) (Tanjong, 2011)

Menurut Rostinawati (2008), Rosella merupakan herba tahunan yang bisa mencapai ketinggian 0,5 sampai 3 meter. Batangnya bulat, tegak, berkayu, dan berwarna merah. Daunnya tunggal, berbentuk bulat telur, pertulangan menjari, ujung tumpul, tepi bergerigi, pangkal berlekuk. Panjang daun 6 sampai 15 cm dan

lebarnya 5 sampai 8 cm. Tangkai daun bulat berwarna hijau, dengan panjang 4 sampai 7 cm (Maryani dan Kristiana, 2005). Bunga rosela yang keluar dari ketiak daun merupakan bunga tunggal, artinya pada setiap tangkai hanya terdapat satu bunga. Bunga ini mempunyai 8 sampai 11 helai kelopak yang berbulu, panjangnya 1 cm, pangkalnya saling berlekatan, dan berwarna merah. Kelopak bunga rosela ini sering dianggap sebagai bunga oleh masyarakat. Bagian inilah yang sering dimanfaatkan sebagai bahan makanan dan minuman (Maryani dan Kristiana, 2005). Mahkota bunga berbentuk corong, terdiri dari 5 helaian, panjangnya 3 sampai 5 cm. Tangkai sari yang merupakan tempat melekatnya kumpulan benang sari berukuran pendek dan tebal, panjangnya sekitar 5 mm dan lebar sekitar 5 mm. Putiknya berbentuk tabung, berwarna kuning atau merah. Buahnya berbentuk kotak kerucut, berambut, terbagi menjadi 5 ruang, berwarna merah. Bentuk biji menyerupai ginjal, berbulu, dengan panjang 5 mm dan lebar 4 mm. Saat masih muda, biji berwarna putih dan setelah tua berubah menjadi abu-abu (Maryani dan Kristiana, 2005).

2.2.2 Bahan Aktif Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Karakteristik fisikokimia bunga rosela yang berwarna merah cerah telah banyak diteliti dan diketahui memiliki vitamin C yang tinggi dengan kandungan gula yang rendah. Asam suksinat dan asam oksalat merupakan dua asam organik yang dominan pada rosela. Tumbuhan rosela juga diketahui memiliki asam askorbat yang lebih tinggi dari pada jeruk dan mangga (Wong *et al*, 2002 *dalam* Fasoyiro *et al*, 2005). Fitokonstituen yang ditemukan dalam ekstrak bunga rosela yaitu flavonoid, polisakarida dan asam organik, yang berpengaruh terhadap aktivitas farmakologinya (Daffallah dan Mustafa, 1996 *dalam* Hussaini *et al*, 2004). Bunga Rosela diketahui memiliki asam sitrat, tanin dan glukosida seperti delfinidin-3-monoglukosida dan delfinidin yang pada konsentrasi tinggi

bersifat toksik bagi jaringan hewan dan manusia. Selain itu banyak penelitian yang melibatkan ekstrak bunga rosella yang berwarna merah cerah ini (Ojokoh *et al.*, 2002; Morton, 1987 *dalam* Rostinawati 2008).

Antosian yang menyebabkan warna merah pada tanaman ini mengandung delfinidin-3-siloglukosida, delfinidin – 3 - glukosida, sianidin – 3 - siloglukosida, sedangkan flavonoidnya mengandung gosipetin dan mucilago (rhamnogalakturonan, arabinogalaktan, arabinan). Sterol minyak biji rosella terdiri atas 61,3% β -sitosterol, 16,5% kampasterol, 5,1% kolesterol, dan 3,2% ergosterol. Karkadeh (bunga kering tanpa ovari) mengandung 13% campuran asam sitrat dan asam malat, dua antosianin; gosipetin (hidrosilflavon) dan hibiskin, asam askorbat 0,004-0,005%. Mahkota bunga mengandung glikosidaflavon hibiskritin, yang mengandung aglikon hibisketin. Bunga rosella juga mengandung fitosterol. Bunga kering mengandung 15,3% asam hibiskat. Akar rosella mengandung saponin dan asam tartrat (Tanjong,2011).

2.2.3 Aktivitas Antimikroba

Antimikroba adalah suatu zat yang mampu mengganggu pertumbuhan dan aktivitas metabolisme mikroba. Khusus untuk bakteri dinamakan antibakteri. Mekanisme kerja antimikroba antara lain dengan jalan merusak dinding sel mikroorganisme, merusak membran sitoplasma, mendenaturasi protein sel dan menghambat kerja enzim dalam sel (Pelczar dan Chan, 1986). Semua senyawa flavonoid, menurut strukturnya merupakan turunan senyawa induk flavon dan semuanya mempunyai sejumlah sifat yang sama flavonoid terutama berupa senyawa yang larut dalam air dan berupa senyawa fenol (Harbone, 1987).

Sifat antimikroba suatu senyawa dikatakan memiliki aktivitas yang tinggi terhadap apabila nilai konsentrasi penghambatan bakteri yang terendah (MIC) kecil, tetapi mempunyai diameter penghambatannya besar (Irianto, 2007 *dalam* Suciati *et al.*, 2012).

Secara umum antimikroba yang mempengaruhi pembentukan dinding sel atau permeabilitas membran sel bekerja bakteriosidal sedangkan pada sintesis protein bekerja bakteriostatik. Istilah bakteriosidal digunakan untuk zat yang dapat membunuh bakteri dan bakteriostatik adalah suatu keadaan yang mencegah pertumbuhan bakteri sehingga populasi bakteri tetap (Pelczar dan Chan, 1986).

2.3 Uji Efektivitas Antibakteri Secara *In Vitro* dengan Uji Cakram

Menurut Kusmiati dan Agustini (2006), 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.

Menurut Roihanah *et al.*, (2012) Uji cakram, yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba dan dibandingkan dengan antibiotik kanamycin. Lempeng Trypton Soya Agar (TSA) ditandai dengan nama, tanggal dan mikroorganisme yang diuji. *Cotton swab* steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji, dengan OD: 0,1 CFU.ml-1, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut. Mikroorganisme disebar pada permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian lempeng agar diputar 900 dan dibuat olesan kedua, dengan lempeng agar diputar 450 dan dibuat olesan ketiga. Lempeng agar dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan pada permukaan lempeng agar.

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.3.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian tentang “Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) Terhadap Bakteri *V. harveyi* Secara *In vitro*” antara lain, (Lihat *Lampiran 1*):

- Toples Kaca
- Timbangan Digital
- Timbangan Analitik
- *Beaker Glass*
- Gelas Ukur
- Erlenmeyer
- Bunsen
- Cawan Petri
- Nampan
- Pipet Tetes
- *Micropipet*
- *Hotplate*
- *Pinset*
- *Autoclave*
- Lemari Pendingin
- Tabung Reaksi
- Rak Tabung Reaksi
- Gunting
- Jarum osse
- Kompor Gas
- *Spatula*
- *Laminar*
- *Rotary vacum evaporator*
- *Incubator*
- Jangka Sorong
- Korek Gas
- Botol Film
- *Blue tip*
- *Vortex Mixer*

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian tentang “Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* secara *In vitro*” antara lain (Lihat *Lampiran 1*) :

- Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.)
- TSA (*Tryptic Soy Agar*)
- TSB (*Tryptitone Soy Broth*)
- Bakteri *Vibrio harveyi*
- Lap Kering
- Kertas Label
- DMSO 10 %
- Alkohol 70 %
- Etanol 96 %
- Kapas
- Tissue
- Kertas Saring
- Akuades
- Spirtus
- Kertas Cakram ukuran 6 mm
- Tali
- Alumunium foil
- Cotton Swap
- Kertas bekas atau koran
- TCBSA (*Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar*)

3.2 Metode Penelitian

Metode Penelitian dalam penelitian ini menggunakan metode eksperimen. Menurut Jaedun (2011), metode penelitian eksperimen pada umumnya digunakan dalam penelitian yang bersifat laboratoris. Namun, bukan berarti bahwa pendekatan ini tidak dapat digunakan dalam penelitian sosial, termasuk penelitian pendidikan. Jadi, penelitian eksperimen yang mendasarkan pada paradigma positivistik pada awalnya memang banyak diterapkan pada penelitian ilmu-ilmu keras (*hard-science*), seperti biologi dan fisika, yang kemudian diadopsi untuk diterapkan pada bidang - bidang lain, termasuk bidang sosial dan pendidikan.

Metode eksperimen menurut Nazir (1988), penelitian eksperimental adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap obyek penelitian serta adanya kontrol. Tujuan penelitian eksperimental adalah untuk menyelidiki kemungkinan saling hubungan sebab-akibat dengan cara

mengenakan kepada satu atau lebih kelompok eksperimental, satu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan.

3.3 Pengambilan Data

Pada penelitian ini dilakukan pengambilan data dengancara observasi secara langsung. Observasi adalah pengambilan data yang menggunakan pengamatan peneliti dengan kata lain menggunakan indera (Umar, 2004). Sehingga, pengambilan data dengan metode ini memerlukan kemampuan dan kecermatan pengamat.

Sedangkan menurut Arikunto (2002), observasi dapat disebut juga pengamatan, yang meliputi kegiatan pemusatan perhatian terhadap suatu obyek dengan menggunakan alat indera yaitu melalui penglihatan, penciuman, pendengaran, peraba dan pengecap. Dengan observasi kita dapat memperoleh gambaran tentang kehidupan sosial yang sukar untuk diketahui dengan metode lainnya.

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap (RAL). RAL digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam sehingga kondisi lingkungan tempat penelitian dalam keadaan sama (Sastrosupadi, 2002).

$$Y = \mu + \tau + \varepsilon$$

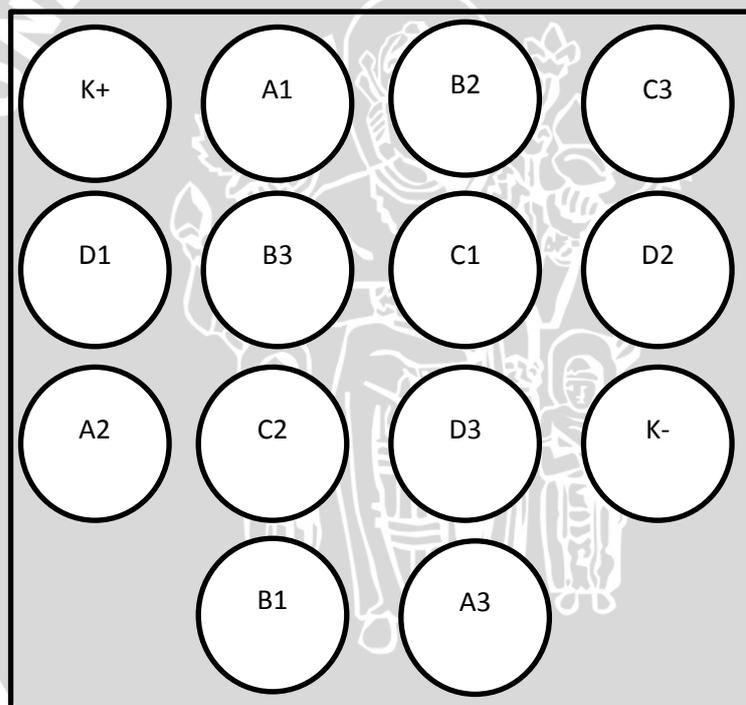
Keterangan :

μ : nilai rerata harapan (*mean*)

τ : pengaruh faktor perlakuan

ε : pengaruh galat

Penelitian dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan perlakuan yang diberikan adalah perbedaan konsentrasi ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap bakteri *V. harveyi*. Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat yang tepat dalam penggunaan ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.). Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, sedangkan perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 4 perlakuan dan 2 kontrol, kontrol positif dan kontrol negatif. Sehingga tiap perlakuan dapat dilihat pada Gambar 3 (Lihat Lampiran 3) sebagai berikut ini :



Gambar 3. Denah Penelitian Uji Cakram

Keterangan :

- A : Perlakuan konsentrasi 15 %
- B : Perlakuan konsentrasi 30 %
- C : Perlakuan konsentrasi 45 %
- D : Perlakuan konsentrasi 60 %
- K+ : Perlakuan konsentrasi 100% (kontrol positif)
- K- : Perlakuan konsentrasi tanpa diberi ekstrak 0% (kontrol negatif)

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sebelum alat dan bahan yang akan digunakan saat penelitian maka perlu dilakukan proses sterilisasi. Proses sterilisasi tersebut adalah sebagai berikut ini :

1. Alat-alat yang akan digunakan dicuci menggunakan sabun cuci, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan plastik tahan panas dan diikat menggunakan benang.
2. Aquades secukupnya dituang ke dalam *autoclave*, kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam *autoclave* dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris.
3. Tombol ON dinyalakan, setelah mencapai suhu 121°C dan tekanan menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit dengan cara membuka dan atau menutup kran uap yang berada di bagian atas tutup *autoclave*.
4. Tombol OFF ditekan, ditunggu beberapa saat sampai suhu menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka kran uap lalu buka penutup *autoclave* dengan cara simetris.
5. Kemudian yang harus dilakukan yaitu alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil.
6. Dan terakhir yaitu alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

3.5.2 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. Sterilisasi tempat dapat dilakukan dengan cara kimia menggunakan alkohol 70 % maupun cara fisika

dengan pembakaran langsung maupun dengan penyinaran dengan sinar UV. Pada penelitian ini sterilisasi tempat dilakukan dengan menggunakan sinar UV yang terdapat pada *Laminar air flow*.

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Kasar Bunga Rosella

Proses pembuatan ekstrak dimulai dengan menyiapkan kelopak bunga rosella kering yang didapatkan dari daerah Batu, Jawa Timur sebanyak 1 kg. Selanjutnya bunga rosella kering tersebut dipotong kecil – kecil dengan menggunakan gunting. Untuk mendapatkan ekstrak kasar yang baik lalu dilakukan penggilingan dengan menggunakan *blender* sampai halus. Kemudian bunga tersebut diambil sebanyak 100 gr dengan cara ditimbang dengan menggunakan timbangan analitik.

Persiapan perendaman (*maserasi*) dimana serbuk bunga rosella sebanyak 100 gr di dimaserasi dalam etanol 96% sebanyak 500 mililiter selama 2 x 24 jam dalam suhu kamar. Larutan yang didapat kemudian disaring dengan kertas saring lalu diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak bunga rosella sebanyak 42.58 gram. Nilai randemen dari ekstrak kasar bunga rosella ini adalah 0,1813 gram.

3.5.4 Pembuatan Media

a. TCBSA (*Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar*)

- TCBSA merk OXOID
- Ditimbang 22,4 gram TCBSA
- Dimasukkan dalam erlenmeyer berisi 280 ml akuades.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen / *aluminium foil*.
- Diaduk pada kondisi hangat diatas *hotplate* sampai tercampur rata.

- Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
- Dituang pada cawan petri *steril* dan di tunggu hingga dingin
- Simpan media yang akan digunakan ke dalam lemari pendingin
- Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin.
- Apabila akan digunakan, maka dapat dipanaskan kembali.

b. Tryptitone Soy Broth (TSB)

- TSB ditimbang 6 gram dilarutkan dalam 200 ml akuades dalam erlenmeyer kemudian diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kuning.
- Erlenmeyer ditutup kapas dan alumunium foil lalu dibungkus dan diikat
- kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Media yang akan digunakan untuk pembiakan bakteri dibiarkan dingin karena bakteri akan mati bila diinokulasi pada media yang masih panas.

3.5.5 Pembiakan Bakteri *V. harveyi*

1. Pertama yang harus dilakukan siapkan yaitu cuci perlatan yang akan digunakan seperti erlenmeyer, sendok bahan dan spatula, lalu siapkan larutan TSB (*Tryptitone Soy Broth*) disiapkan sebanyak 6 gram dalam erlenmeyer sebanyak 200 ml.
2. Jarum osse dipanaskan diatas bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum ose disentuhkan kebiakan murni *Vibrio harveyi* kemudian dicelupkan ke TSB.
3. Larutan TSB dibiarkan 12 - 24 jam dalam inkubator pada suhu 33°C .
4. Disiapkan petridisk yang berisi media TCBSA.

5. Setelah TSB menjadi keruh, lalu *cutton swap* dicelupkan ke TSB yang di dalamnya terdapat bakteri *V. harveyi* yang telah diencerkan dan digoreskan ke permukaan TCBSA.
6. Digoreskan ke dalam media TCBSA V secara zig – zag dengan metode goresan sinambung, T atau Kuadran.
7. Media TCBSA diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 33°C selama 48 jam.

3.6 Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Prosedur Pelaksanaan Uji Cakram :

- Disiapkan cawan petri yang telah terdapat media TCBSA .
- Disiapkan konsentrasi ekstrak kasar bunga rosella untuk uji cakram.
- Penanaman bakteri pada media TCBSA dilakukan dengan cara mengambil biakan bakteri dari media TSB dengan mencelupkan *cutton swap*, kemudian digoreskan pada seluruh permukaan media agar hingga merata.
- Kertas cakram steril ukuran 6 mm direndam ke dalam ekstrak bunga rosella selama 15 menit berdasarkan dosis perlakuan yang telah ditentukan.
- Kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak kasar bunga rosella ditiriskan dan diletakkan pada permukaan lempeng agar.
- Dibaca hasil setelah diinkubasi pada suhu ruang 33°C selama 48 jam dengan mengukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong.
- Jarak kertas cakram dengan tepi cawan petri 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 bergeser, karena mengurangi validasi pengukuran.

3.6.2 Uji difusi kertas cakram

Metode difusi kertas cakram adalah salah satu metode yang paling umum digunakan dalam uji anti bakteri, karena metode ini cukup sederhana dan efektif untuk mengetahui kemampuan anti bakteri pada suatu sampel uji (Pelzar dan Chan, 1986).

Uji cakram digunakan untuk mengetahui pada konsentrasi tertentu yang dapat menghambat bakteri yang bersifat bakteristatik (menghambat bakteri) setelah diinkubasi selama 24 jam, maupun bakteriosidal (membunuh bakteri) setelah diinkubasi selama 48 jam. Kertas cakram yang telah direndam dengan zat antibakteri diletakkan di atas lempengan agar yang telah ditanam dengan mikroorganisme yang diuji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antibakteri terlihat sebagai wilayah yang jernih di sekitar pertumbuhan mikroorganisme.

3.7 Parameter uji

Parameter uji terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama yaitu diameter daerah hambatan yang diukur dengan menggunakan kertas cakram yang dinyatakan dengan mm. Parameter penunjangnya adalah suhu inkubasi yakni sebesar 33°C.

3.8 Analisis Data

Berdasarkan hasil uji daya hambat (zona bening) ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdarrifa* L.) terhadap bakteri *V. harveyi* maka dilakukan analisa data secara statistik dengan menggunakan analisa keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Uji ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon zona hambat (zona bening) yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilakunjutkan

dengan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yaitu untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan. Kemudian untuk mengetahui hubungan antar perlakuan dengan diameter zona hambat (zona bening) digunakan uji polynomial orthogonal yang memberikan keterangan mengenai pengaruh keterangan terbaik.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Pembiakan Bakteri *Vibrio harveyi*

Vibrio spp. adalah bakteri halofilik Gram - negatif dari kelas *Gammaproteobacteria*. *Vibrio* adalah salah satu yang paling sering dipelajari dan beragam genera mikroorganisme yang ditemukan di ekosistem perairan dan terdiri dari bakteri laut dan lingkungan muara. Hal ini telah dibuktikan dengan beberapa penelitian yang membahas habitat dari bakteri *vibrio* (Rahmat *et al.*, 2014). Gambar 4. Merupakan *Vibrio harveyi* yang digunakan saat penelitian.

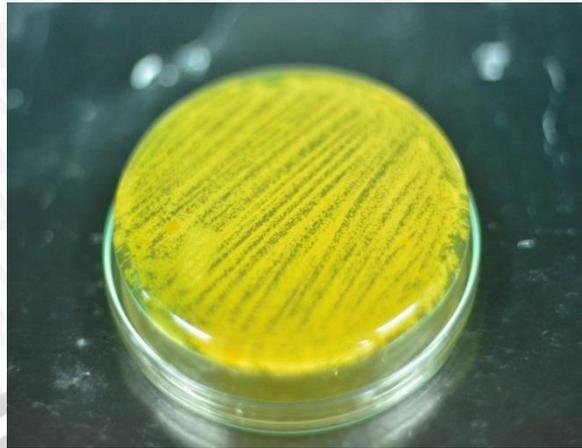


Gambar 4. *V. harveyi* dokumentasi penelitian dengan pembesaran 1000x

Pada penelitian ini digunakan isolat murni bakteri *V. harveyi* yang didapatkan dari Balai Besar Pengembangan Budidaya Air Payau Jepara, Jawa Tengah. Tahapan berikutnya yang dilakukan dalam penelitian ini adalah peremajaan bakteri *V. harveyi* pada media agar yakni TSA (*Trypticase Soy Agar*) dalam peremajaan metode gores dan pada media cair yakni TSB (*Tryptic Soy Broth*). Menurut Saptiani *et al.*, (2012), *V. harveyi* diisolasi dan dikultur pada media *Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar* (TCBSA) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 33°C dan diamati koloninya. Jika koloni bakteri berpendar, maka *V. harveyi* tersebut bersifat ganas kembali dan siap dipakai untuk uji daya hambat. Sebelum digunakan bakteri tersebut disuburkan kembali

pada media *Triptic Soy Agar* (TSA). Hal ini juga sama dengan pernyataan Akhyar (2010), *V. harveyi* yang berasal dari biakan murni diambil satu ose lalu diinokulasikan dengan cara digoreskan dengan medium TSA miring, kemudian diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Sedangkan menurut Polapa (2015), peremajaan bakteri dilakukan dengan cara mengambil isolat bakteri dengan ose bulat kemudian dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang berisi Medium TSB, lalu diinkubasi dengan suhu 30°C selama 1 x 24 jam. Bakteri yang telah tumbuh ditandai dengan terjadinya perubahan medium dari jernih menjadi keruh.

Dari hasil peremajaan bakteri *V. harveyi* di dalam media cair TSB didapatkan hasil kepadatan bakteri sebesar 10^8 CFU/ml. Hasil ini didapatkan dengan mencocokkan kekeruhan warna bakteri yang ada di dalam media cair TSB dengan metode standar Mc. Farland. Setelah itu dilakukan pengenceran dengan menggunakan Na-fis sebanyak 6 ml yang dituang ke dalam tabung reaksi, lalu diambil 1ml bakteri *V. harveyi* di dalam TSB menggunakan micropipet, setelah tercampur di homogenkan dengan vortex mixer. Dari hasil pengenceran ini didapatkan kepadatan bakteri *V. harveyi* sebesar 10^7 CFU/ml. Hal ini sesuai dengan pernyataan Haris *et al.*, (2013), Perhitungan kepadatan bakteri dengan optical density (OD) berdasarkan metode Standar Mc Farland. Metode standar Mc Farland adalah peyetaraan konsentrasi mikroba dengan menggunakan larutan $BaCl_2$ 1% dan H_2SO_4 1%. Standar kekeruhan Mc Farland ini dimaksudkan untuk menggantikan perhitungan bakteri satu per satu dan untuk memperkirakan kepadatan sel yang akan digunakan pada prosedur pengujian antimikroba. Suspensi bakteri *S. aureus* dilakukan seri pengenceran pada tingkatan 10^{-1} sampai 10^{-6} . Sebanyak 1 ml suspensi bakteri pada pengenceran 10^{-1} dimasukkan kedalam 9 ml akuades steril, disebut sebagai pengenceran 10^{-2} . Demikian seterusnya sampai mencapai pengenceran 10^{-6} (Retnowati *et al.*, 2011).



Gambar 5. Biakan murni bakteri *V. harveyi*

Bakteri yang sudah diencerkan dapat digoreskan pada media agar yang sesuai untuk bakteri *V. harveyi* yaitu media agar TCBSA. Bakteri *V. harveyi* digoreskan pada media agar TCBSA dengan metode gores, hal ini dilakukan untuk menghindari koloni bakteri yang menumpuk pada satu tempat atau titik saja. Dengan metode ini diharapkan bakteri dapat tumbuh menyebar di seluruh permukaan media agar TCBSA pada cawan petri. Hal ini sesuai dengan pernyataan Munir *et al.*, (2004), hasil pengenceran yang dibiakkan pada media agar dengan metode sebaran adalah pengenceran dari 10^{-5} , 10^{-6} dan 10^{-7} . Pemiakan dilakukan dalam inkubator pada suhu kamar selama 2 x 24 jam. Bakteri yang telah dibiakkan selama 2 x 24 jam kemudian dipindahkan atau diisolasi dengan metode cawan gores menggunakan ose ke media biakan yang komposisinya sama seperti media yang digunakan untuk menumbuhkan bakteri. Pada media NA dihitung keseluruhan bakteri yang tumbuh. Bakteri *V. harveyi* dikatakan tumbuh bila media agar TCBSA yang semula berwarna hijau setelah diinkubasi selama 24 jam berubah warna menjadi kuning cerah seperti warna buah mangga, maka dapat dikatakan bakteri *V. harveyi* tumbuh baik pada media tersebut. Hal ini sesuai dengan pernyataan Yulineri (2009), media TCBS diamati *Vibrio* sp. yang koloninya berwarna hijau atau kuning sedangkan *S. aureus* pada

medium MSA akan membentuk koloni putih kekuningan dengan zona kuning di sekitar koloni.

4.2 Daya Antibakterial Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan Uji Cakram

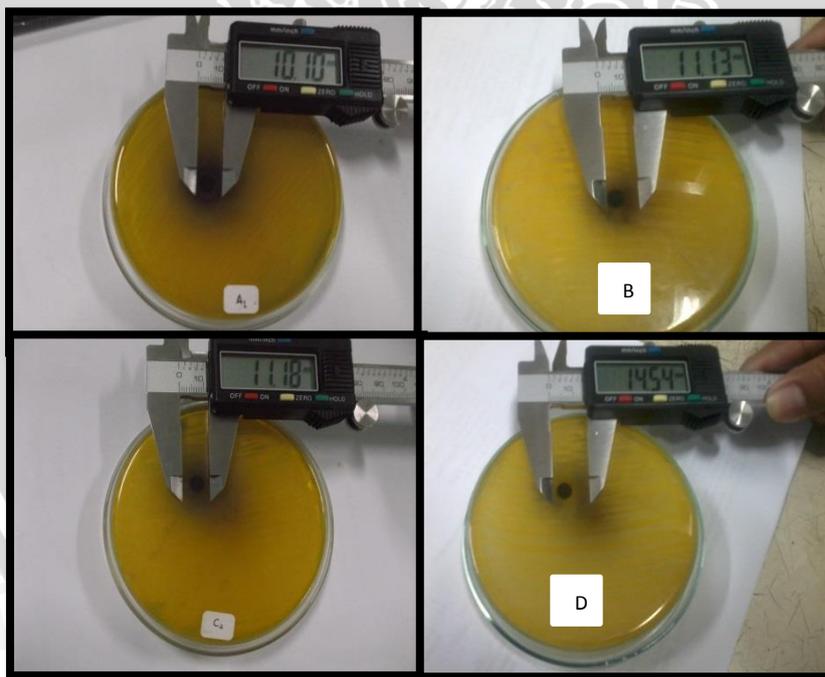
Uji cakram dilakukan untuk mengetahui daya antibakteri yang terkandung dalam ekstrak kasar bunga rosella. Kertas cakram yang telah disiapkan dicelupkan ke dalam ekstrak kasar bunga Rosella dengan dosis dan waktu perendaman kertas cakram yang telah ditentukan.

Untuk mengetahui antibakteri tersebut dapat dilihat dari hasil uji cakram. Bila kertas cakram yang telah direndam ekstrak kasar bunga rosella ditanam dalam cawan petri yang telah di goreskan bakteri *V. harveyi* memiliki daya hambat atau zona bening, maka dapat disimpulkan bahwa ekstrak tersebut memiliki sifat antibakterial. Efektivitas antibakteri ditunjukkan dengan terbentuknya zona bening di sekitar cakram. Larutan ekstrak kasar Teripang digunakan untuk pengujian aktivitas antibakteri dengan menggunakan metode difusi cakram Kirby-Bauer, yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba sesuai dengan konsentrasi perlakuan (Roihanah *et al.*, 2012)

Sebelum melakukan penelitian inti, perlu dilakukan penelitian pendahuluan untuk mendapatk dosis yang tepat serta lama perendaman yang ideal untuk memunculkan daya hambat atau zona bening. Didapatkan dosis yang tepat yaitu dimulai dari 15%, 30%, 45% dan 60% dengan lama perendaman kertas cakram ke dalam ekstrak selama 15 menit. Pada penelitian ini dalam satu cawan petri terdapat satu kertas cakram yang telah diberi perlakuan, hal ini dilakukan untuk mendapatkan hasil yang maksimal. Pada hasil penelitian ini didapatkan diameter zona bening dengan ukuran yang berbeda pada setiap perlakuannya. Dengan

demikian dapat ditarik kesimpulan bahwa ekstrak kasar bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) dapat menghambat bakteri *V. harveyi*.

Setelah ditunggu hasil penelitian ini selama 48 jam zona bening yang melingkari kertas cakram tersebut ukurannya masih tetap sama, maka dapat dikatakan pertumbuhan bakteri tersebut bersifat bakteriosida yang disebabkan oleh adanya senyawa flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak kasar bunga rosella. Bunga rosella memiliki beberapa kandungan antibakteri terhadap bakteri penyebab plak. Kandungan kimia kelopak bunga rosella terdiri dari asam organik, senyawa fenol, flavonoid dan antosianin. Zat - zat tersebut mempunyai aktivitas antibakteri terhadap bakteri gram positif dan gram negatif (Riwandy,2014). Gambar hasil penelitian dapat dilihat pada gambar 6. dan untuk lebih jelas lihat *Lampiran. 2*



Gambar 6. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap Bakteri *V. harveyi*

Pada penelitian ini didapatkan hasil uji cakram dari masing – masing perlakuan yaitu pada perlakuan A (15%) didapatkan diameter zona bening sebesar 3,17 mm, perlakuan B (30%) didapatkan diameter zona bening sebesar

4,91 mm, pada perlakuan C (45%) didapatkan diameter zona bening sebesar 6,33 mm dan perlakuan D (60%) didapatkan diameter zona bening sebesar 8,72 mm. Hasil data pengukuran zona hambat ditunjukkan pada Tabel 1. dibawah ini :

Tabel 1. Data hasil pengukuran diameter zona hambat (mm)

PERLAKUAN	ULANGAN			TOTAL	RATA-RATA
	1	2	3		
A (15%)	4,11	3,61	1,81	9,53	3,17
B (30%)	4,96	4,65	5,13	14,74	4,91
C (45%)	5,61	8,21	5,18	19,00	6,33
D (60%)	8,32	8,54	9,32	26,18	8,72
TOTAL				65,19	

Pada pemaparan Tabel 1. diatas didapatkan hasil rata – rata diameter zona hambat ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi* yang terbesar yaitu terdapat pada dosis D (60%) yaitu sebesar 8,72 mm dan rata – rata diameter zona hambat yang terkecil terdapat pada dosis A (15%) yaitu sebesar 3,17 mm (Lihat *Lampiran 4.*). Setelah dilakukan pengukuran diameter zona hambat, lalu dilanjutkan dengan perhitungan dengan menggunakan sidik ragam hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan yang telah diberikan. Hasil dari perhitungan sidik ragam penelitian tentang uji sensitivitas ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

Tabel 2. Sidik Ragam Diameter Zona Hambat ekstrak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi*

Sumber Keragaman	dB	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	49,551	16,517	14,72**	4,07	7,59
Acak	8	8,97	1,121			
Total	11					

Keterangan : ** = Berbeda Sangat Nyata

Pada perhitungan sidik ragam diatas menunjukkan bahwa pengaruh pemberian ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa L.*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* adalah berbeda sangat nyata. Hal ini ditunjukkan dengan hasil perhitungan F Hitung yang lebih besar dari F Tabel 5% maupun F Tabel 1% atau nilai 14,72 lebih besar dari 4,07 maupun 7,59 (Lihat *Lampiran 4.*). Selanjutnya untuk mengetahui antar perlakuan (rata – rata) yang mana yang berbeda sangat nyata maka dilakukan uji nilai tengah (rata – rata) antar perlakuan atau uji Beda Nyata Terkecil (BNT) yang ditunjukkan pada Tabel 3. berikut ini.

Tabel 3. Uji perbandingan beda nyata terkecil ekstrak bunga rosella (*H. sabdariffa L.*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi*

Rata-Rata Perlakuan	A	B	C	D	Notasi
	3,18	4,91	6,33	8,73	
A (3,18)	-				a
B (4,91)	1,74 ^{ns}	-			a
C (6,33)	3,16 ^{**}	1,42 ^{ns}	-		ba
D (8,73)	5,55 ^{**}	3,81 ^{**}	2,39 [*]	-	c

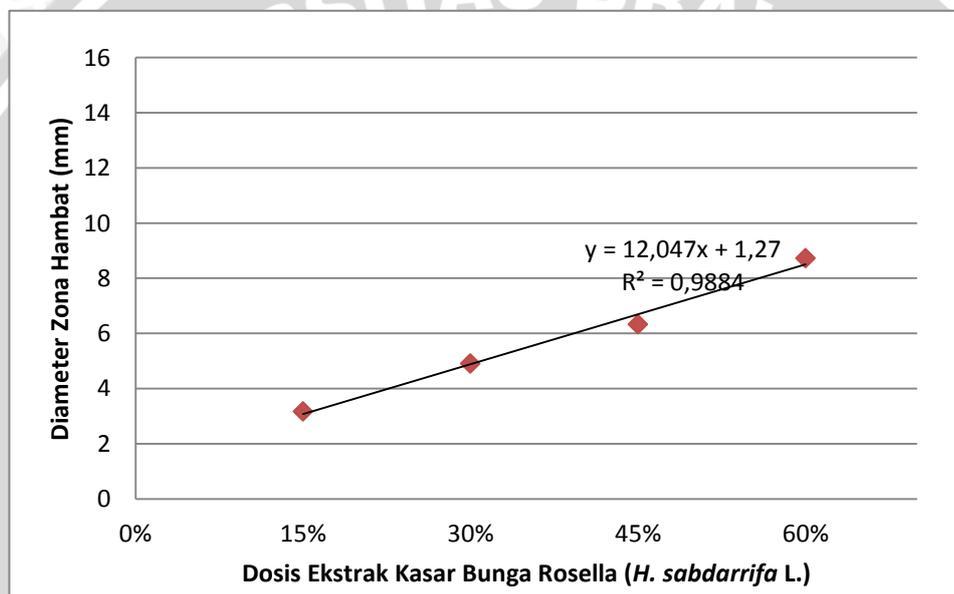
Keterangan :

** : Berbeda sangat nyata

Data yang disajikan pada Tabel 3 ini didapati bahwa nilai hasil dari perlakuan D (60%) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A (15%), B (30%) dan C (45%). Perlakuan tersebut didasari dari perlakuan A tidak memberikan pengaruh terhadap semua perlakuan sehingga diberi notasi a. Perlakuan B tidak memberikan pengaruh terhadap perlakuan A sehingga diberi notasi a. Perlakuan C memberikan pengaruh terhadap perlakuan A tetapi tidak berpengaruh terhadap perlakuan B sehingga diberi notasi BA. Dan perlakuan D memberikan pengaruh terhadap semua perlakuan. Perbedaan notasi dikarenakan perlakuan dengan Dosis 60% (D) mampu menghambat paling baik daripada dosis lainnya yang ditunjukkan pula dengan

lebar dari zona hambat bakteri uji. Penghambatan pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dilakukan oleh senyawa flavonoid dan fenol yang terkandung dalam ekstrak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.), Lihat *Lampiran 4*.

Kemudian untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antara perlakuan dengan parameter yang diuji yaitu daya hambat bakteri *V. harveyi*, maka dilakukan perhitungan uji polinomial orthogonal pada *Lampiran 3*. Kemudian dari hasil penelitian didapat grafik regresi diameter zona bening yang dihasilkan dengan perlakuan yang berbeda seperti pada *Gambar 5*.



Gambar 7. Grafik hubungan antara konsentrasi ekstrak bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap diameter zona hambat bakteri *V. harveyi*

Hubungan antara konsentrasi ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap diameter zona hambat bakteri *V. harveyi* yang disajikan pada *Gambar 5* menunjukkan hubungan antara pengaruh pemberian ekstrak kasar bunga rosella dengan diameter zona hambat bakteri *V. harveyi*, nampak bahwa garis perpotongan membentuk grafik linear dengan persamaan $y = 12,047x + 1,27$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,9804. Dari hasil persamaan tersebut kemudian dilakukan perhitungan turunan persamaan kuadratik yang disajikan pada *Lampiran 4*, sehingga didapatkan dosis optimal untuk pemberian

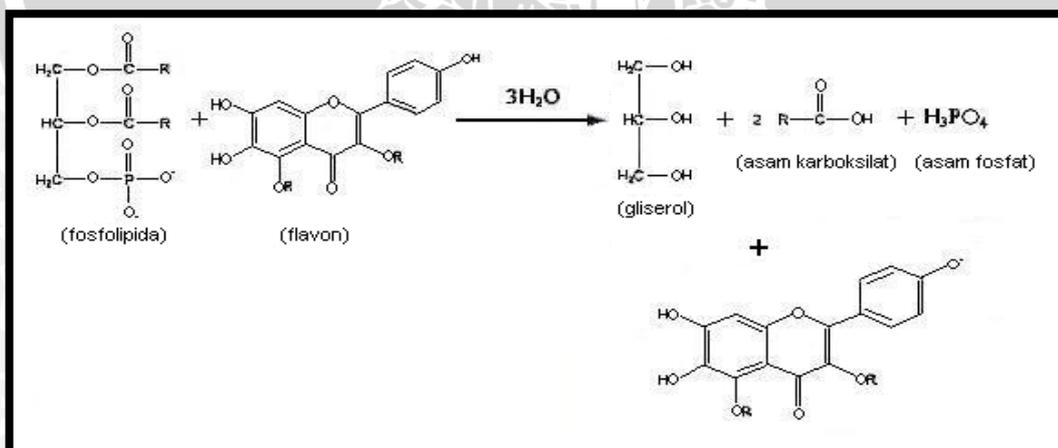
ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) sebesar 60% yang artinya bahwa dosis pemberian ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terbaik yang dapat menghambat pertumbuhan *V. harveyi* atau paling optimal dalam sistem kerja daya hambatnya. Pada dosis 15 % hingga 45 % grafik nampak masih mengalami kenaikan kurva hingga menuju ke titik puncak, hal ini dikarenakan ekstrak kasar bunga rosella masih mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri *V. harveyi*. Menurut Lingga dan Rustama (2005) dalam Ariyanti *et al.*, (2012), semakin tinggi konsentrasi suatu bahan antibakteri maka aktivitas antibakterinya akan semakin kuat. Kemampuan ekstrak bunga rosella untuk dapat memberikan zona hambat terbaik ini diduga disebabkan karena adanya senyawa flavonoid yang lebih besar dari konsentrasi dari perlakuan lain yang sudah diberikan.

Bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) yang mengandung senyawa aktif yaitu flavonoid akan menghambat pertumbuhan dari bakteri *V. harveyi* dengan cara merusak struktur dinding sel, lalu setelah dinding sel rusak maka antibakteri akan mengubah permeabilitas (keluar masuknya bahan) membran, ketika membran mengalami kerusakan maka akibatnya akan terhambat masuknya bahan – bahan untuk kelangsungan hidup bakteri. Setelah itu senyawa flavonoid akan merusak sitoplasma yang akan menyebabkan terjadinya koagulasi atau bisa disebut dengan penggumpalan komponen – komponen seluler yang vital atau sangat penting.

Flavonoid sendiri merupakan senyawa fenol alami yang telah banyak diuji memiliki sifat antimikroba. Flavonoid berefek antimikroba melalui kemampuan untuk membentuk kompleks dengan protein ekstra seluler dan protein yang dapat larut serta dengan dinding sel bakteri (Ardananurdin *et al.*,2004). Pendapat berbeda tentang mekanisme kerja flavonoid dijelaskan oleh Sabir (2005), para peneliti menyatakan pendapat yang berbeda - beda sehubungan dengan mekanisme kerja dari flavonoid dalam menghambat pertumbuhan bakteri, antara

lain bahwa flavonoid menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri, sementara Mirzoeva *et al.* 1997, dalam penelitiannya mendapatkan bahwa flavonoid mampu melepaskan energi transduksi terhadap membran sitoplasma bakteri selain itu juga menghambat motilitas bakteri. Mekanisme yang berbeda dikemukakan oleh Di Carlo *et al.* 1999 dan Estrela *et al.* 1995, yang menyatakan bahwa gugus hidroksil yang terdapat pada struktur senyawa flavonoid menyebabkan perubahan komponen organik dan transpor nutrisi yang akhirnya akan mengakibatkan timbulnya efek toksik terhadap bakteri.

Volk dan Wheeler (1993) menjelaskan bahwa senyawa flavonoid dapat merusak membran sitoplasma yang dapat menyebabkan bocornya metabolit penting dan menginaktifkan sistem enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino merembes keluar dan mencegah masuknya bahan-bahan aktif ke dalam sel, keadaan ini dapat menyebabkan kematian bakteri. Reaksi penguraian pada membran sitoplasma bakteri oleh flavon menurut Noviana (2004), ditunjukkan pada Gambar 8.



Gambar 8. Mekanisme Perusakan Membran Sitoplasma oleh Flavonoid

Pada gambar 8 ini nampak pada perusakan membran sitoplasma, ion H⁺ dari senyawa fenol dan turunannya (flavanoid) akan menyerang gugus polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipida akan terurai menjadi gliserol, asam

karboksilat dan asam fosfat. Hal ini mengakibatkan fosfolipida tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma akibatnya membran sitoplasma akan bocor dan bakteri akan mengalami hambatan pertumbuhan dan bahkan kematian (Noviana, 2004).

Zona hambat yang muncul disekitar kertas cakram disebabkan oleh beberapa faktor dan mengakibatkan ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Menurut Hooper (2001), mengatakan bahwa dinding sel bakteri merupakan daerah yang sering dimanfaatkan oleh antimikroba untuk dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Antibakteri memiliki dua sifat yaitu bakteristatik dan bakteriosidal. Pada penelitian uji sensitivitas ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) terhadap bakteri *V. harveyi* adalah bakteriosidal. Pada hasil pengamatan 24 jam diamati dan diukur zona hambat, setelah itu ditunggu kembali hingga 48 jam untuk mengetahui sifat dari antibakteri tersebut. Ternyata setelah diukur dan diamati didapatkan hasil bersifat bakteriosidal, bakteriosidal adalah antibakteri yang dapat membunuh sel pada mikrobia tetapi tidak sampai terjadi lisis sel. Sifat bakteriosida ditandai dengan peningkatan diameter zona hambat berwarna bening yang terbentuk oleh bakteri, yang disebabkan kemampuan antibakteri dalam membunuh sel bakteri (Pelczar dan Chan, 1986 dalam Meliana *et al.*, 2013).

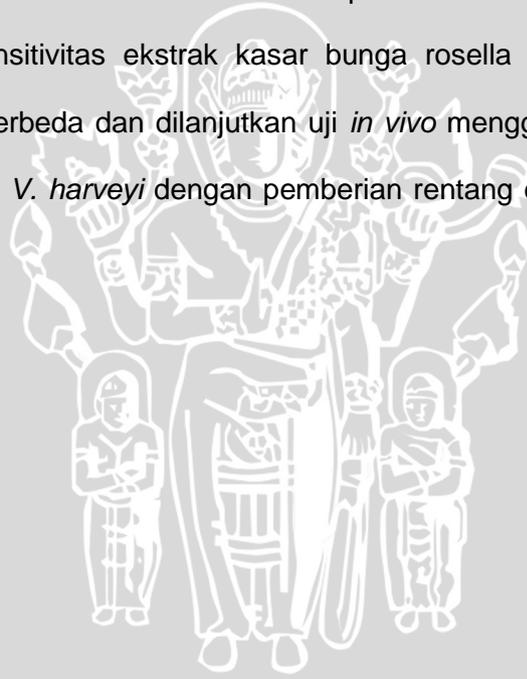
5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan bahwa pemberian ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa L.*) terhadap bakteri *V. harveyi* secara *in vitro* didapatkan kesimpulan bahwa sensitivitas ekstrak kasar bunga Rosella memiliki sifat antibakteri bakteriosidal. Dosis 15 % ekstrak bunga rosella sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian ini maka disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang Uji sensitivitas ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa L.*) dengan Dosis yang berbeda dan dilanjutkan uji *in vivo* menggunakan biota laut yang terinfeksi bakteri *V. harveyi* dengan pemberian rentang dosis antara 15 % hingga 60 %.



DAFTAR PUSTAKA

- Affan J.M.2012. Identifikasi lokasi untuk pengembangan budidaya keramba jaring apung (KJA) berdasarkan faktor lingkungan dan kualitas air di perairan pantai timur Bangka Tengah. *Depik*.1(1) : 78-85.
- Akhyar. 2010.Uji Hambat dan Analisis KLT Bioautografi Ekstrak Akar dan Buah Bakau (*Rhizophora stylosa Griff.*) Terhadap *Vibrio harveyi*.Skripsi. Universitas Hasanuddin. Makassar.52 hlm.
- Anetzberger C.,T. Plrch and K. Jung.2009.Heterogeneity In Quorum Sensing-regulated Bioluminescence Of *Vibrio harveyi*. *Moleculer Microbiology*.73 (2) : 267-277.
- Anggorowati D.A.2008. Kematian Massal Pada Usaha Budidaya Kerang Mutiara.Oseana 33(2) : 9-14.
- Ardananuridin, A., S. Winarsih., dan M. Widayat. 2004. Uji Efektifitas Dekok Bunga Belimbing Wuluh (*Averrhoa Bilimbi*) Sebagai Antimikroba Terhadap Bakteri Salmonella Typhi Secara In Vitro. *Jurnal Kedokteran Brawijaya*. Vol. 20(1) : 30-34.
- Arikunto, S. 2002. *Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktek*. Rineka Cipta. Jakarta. 342 hlm
- Ariyanti N. K., I. B. G. Darmayasa., dan S. K. Sudirga. 2012. Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe Barbadensis Miller*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus* Atcc 25923 Dan *Escherichia Coli* Atcc 25922. *Jurnal Biologi*. 16 (1) :1-4.
- Felix F.,T.T Nugroho., S.Silalahi., dan Y. Octavia.2011. Skrining Bakteri *Vibrio* Sp Asli Indonesia Sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Tehnik 16s Ribosomal Dna.*Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*.3 (2) : 85-99.
- Hamdani. 2013. Daya Hambat Air Rebusan Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa L.*) Terhadap Koloni Kakteri pada Sikat Gigi. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi. UNHAS : Makasar. 54 hlm.
- Haris A., Arniati., dan S. Werorilangi. 2013. Uji Antibakteri Patogen Ekstrak Sponge Menggunakan Metode *High Troughput Screening* (HTS) dengan indikator MTT (3-[4,5-dimethylthiazol- 2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide). UNHAS. Hal : 1-14
- HatmantiA.2003.Penyakit Bakterial Pada Budidaya Krustasea Serta Cara Penanganannya.Oseana.28(3) : 1-10.

Hooper, D.C. 2001. Mechanisms of Action of Antimicrobials. *Clinical Infectious Diseases*. 1(32). 9-15.

Jaedun A.2011.Metodologi Penelitian Eksperimen.UNY.Yogyakarta.Hal. 1-13.

Maliana, Y., S. Khotimah., dan F. Diba. 2013. Aktivitas Antibakteri Kulit *Garcinia mangostana* Linn. Terhadap Pertumbuhan *Flavobacterium* dan *Enterobacter* Dari *Coptotermes curvignathus* Holmgren. *Jurnal Protobiont*. Vol. 2(1) :7-11.

Munir M., N. Afiati ., O. K. Radjasa ., A. Sabdono ., dan T. Bachtiar. 2004. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Pendegradasi Koprostanol dari Lingkungan Sungai, Muara, dan Perairan Pantai Banjir Kanal Timur Semarang pada Monsun Timur. *Jurnal Ilmu Kelautan*. Vol. 9 (2): 67- 73.

Nazir, M.1988.Metode Penelitian.Ghalia Indonesia.Jakarta.62 hlm.

Noviana, L. 2004. Identifikasi Senyawa Flavonoid Dari Propolis Lebah Madu (*Apis mellifera*) dan Uji Aktivitasnya Sebagai Antibakteri *Staphylococcus aureus*. Skripsi. Fakultas Matematika dan IPA Universitas Brawijaya. Malang. 61 hlm.

Polapa F. P. 2015. Potensi Antibakteri Dari Ekstrak Kasar Bakteri Asosiasi Karang Batu Yang Terinfeksi Penyakit *Brown Band* (Brb) Terhadap Bakteri Patogen *Staphylococcus Aureus* Dan *Escherichia Coli*.SKRIPSI.Universitas Hasanuddin.Makassar. 1-51.

Prajitno, A. 2005. Diktat Parasit dan Penyakit Ikan. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya : Malang. 105 hlm.

Rahman M.S., M.E. Martino., B. Cardazzo., P. Facco., P. Bordin., R.Mioni.,E.Novelli.,L.Fasolato.2014.Vibrio Trends In the Ecology Of The Venice Lagoon.*Journals AEM*.80(8): 1-9.

Riwandy A.2014.Aktivitas Antibakteri Ekstrak Air Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus Sabdariffa* L.) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus Mutans*In Vitro.Karya Tulis Ilmiah.Universitas Lambung Mangkurat.Banjarmasin. 72 hlm.

Rizka, A. FM. 2013. Skrining Bakteri Symbion Spons Asal Perairan Pulau Polewali Dan Pulau Sarappolompo Sebagai Penghasil Antibakteri Terhadap Bakteri Patogen Pada Manusia Dan Ikan. SKRIPSI. UNHAS. Makassar. 69 hlm.

Retnowati Y., N. Bialangi., Dan N. W. Posangi. 2011. Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus Aureus* Pada Media Yang Diekspos Dengan Infus Daun Sambiloto (*Andrographis Paniculata*). *Jurnal Saintek*. Vol. 6 (2):1-9.

- Roihanah, S., Sukoso dan Andayani S. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria* sp. Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In vitro*. J. Exp. Life Sci. 2(1): 1-5
- Rostinawati T. 2008. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Dan Ekstrak Air Kelopak Bunga Rosela (*Hibiscus Sabdariffa* L.) terhadap *Mycobacterium tuberculosis* Galur Labkes-026 (*Multi Drug Resisten*) dan L.) dan *Mycobacterium tuberculosis* Galur H37Rv Secara *In Vitro*. Penelitian Mandiri. UNPAD. Jatinangor. 72 hlm.
- Sabir, Ardo. 2005. Aktivitas antibakteri flavonoid propolis *Trigona* sp terhadap bakteri *Streptococcus mutans* (*in vitro*). Maj. Ked. Gigi. (Dent. J.). Vol. 38 (3) : 135-141.
- Saptiani G., S. B. Prayitno., dan S. Anggoro. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Jeruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap Pertumbuhan *Vibrio harveyi* Secara *in vitro*. Jurnal Veterine. Vol. 13(3): 257-262.
- Sastrosupadi, A. 2002. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Penerbit Kanisius. Yogyakarta. 276 hlm.
- Suciati A., Wardiyanto., dan Sumino. 2012. Efektifitas Ekstrak Daun *Rhizophora mucronata* Dalam Menghambat Pertumbuhan *Aeromonas salmonicida* dan *Vibrio Harveyi*. e-Jurnal Rekayasa dan Teknologi Budidaya Perairan. 1(1) : 1-8.
- Sukenda., T.J. Sihombing., F. Novianti dan Widanarni. 2005. Penapisan Bakteri Probiotik dan Peranannya Terhadap infeksi Buatan *Vibrio harveyi* Pada Udang Vaname (*Litopenaeus vannamei*). Jurnal Akuakultur Indonesia. 4 (2) : 181-187.
- Tanjong A. 2011. Pengaruh Konsentrasi Ekstrak Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) Terhadap Koloni *Candida Albicans* Yang Terdapat Pada Plat Gigi tiruan. Skripsi. Universitas Hasanuddin. Makassar. 76 hlm.
- Umar, H. 2004. Metode Riset Ilmu Administrasi. PT Gramedia Pustaka Utama. Jakarta. 242 hlm
- .Wiyanto, D.B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus Alvarezii* dan *Euclima denticulatum* Terhadap Bakteri *Aeromonas Hydrophila* Dan *Vibrio harveyi*. *Jurnal Kelautan*. 3(1): 1-17.
- Yulinery, T., I. Y. Petria., dan N. Nurhidayat. 2009. Penggunaan Antimikroba Dari Isolat *Lactobacillus* Terseleksi Sebagai Bahan Pengawet Alami Untuk Menghambat Pertumbuhan *Vibrio* Sp. Dan *Staphylococcus Aureus* Pada Fillet Ikan Kakap. Berk. Penel. Hayati. Vol. 15 : 85-92.

LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto Alat – alat Penelitian



Cawan Petri



Autoclave



Rak Tabung Reaksi



Inkubator



Oven



Autoclave Denaturasi

Lampiran 1. (Lanjutan)



Lemari Pendingin Penyimpanan
Bakteri



Lemari Pendingin Penyimpanan
Bahan



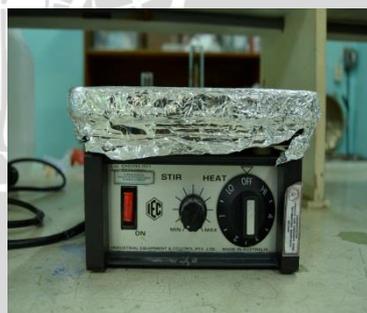
Timbangan Sartorius



Timbangan Digital



Laminar Air Flow



Hot Plate

Lampiran 1. (Lanjutan)



Vortex Mixer



Micropipet



Jangka Sorong Digital



Bunsen dan Korek api



Alumunium Foil



Erlenmeyer

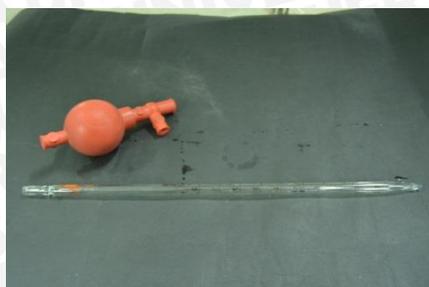


Pinset



Corong Kaca

Lampiran 1. (Lanjutan)



Pipet dan Bola Hisab



Mc. Farland



Jarum Ose



Blue Tip



Kapas dan Benang Kasur



Botol spray Alkohol



DMSO



Beaker Glass

Lampiran 1. (Lanjutan)



Tabung Reaksi



Cotton swap dan spatula



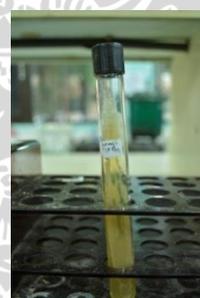
TCBSA



Botol Film



TSB *V. harveyi*



Isolat Murni *V. harveyi*

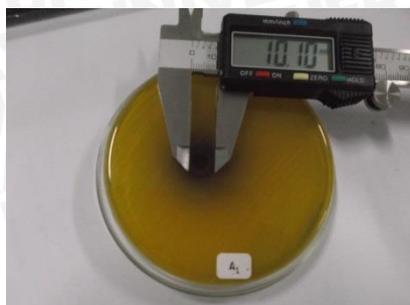


Bunga Rosella Kering



Rotary Vacum Eveporator

Lampiran 2. Foto Hasil Penelitian



A1 (15%)



A2 (15%)



A3 (15%)



B1 (30%)



B2 (30%)

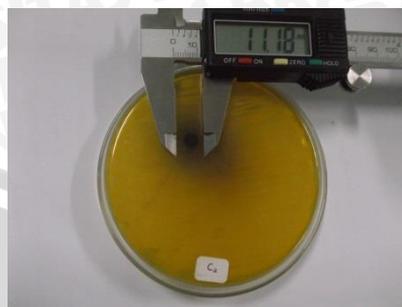


B3 (30%)

Lampiran 2. (Lanjutan)



C1 (45%)



C2 (45%)



C3 (45%)



D1 (60%)

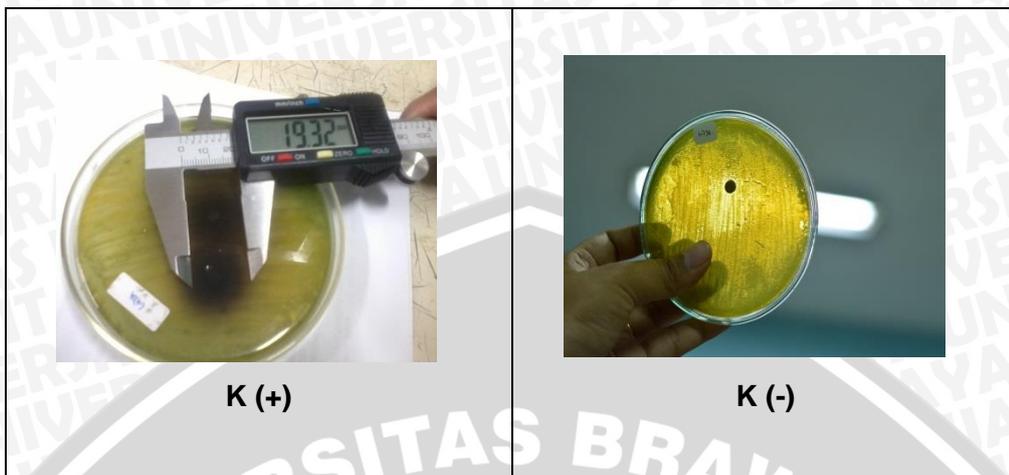


D2 (60%)



D3 (60%)

Lampiran 2. (Lanjutan)



Lampiran 3. Penentuan Konsentrasi Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan Denah Rancangan Penelitian

Pembuatan ekstrak dimulai dengan menimbang bunga rosella kering yang dibeli dari Kota Batu sebanyak 1 kg. Selanjutnya bunga rosella dilakukan pemotongan menjadi lebih kecil untuk mempercepat proses penghalusan menjadi bubuk, menghaluskan bunga rosella ini dengan menggunakan blender. Berat yang didapat setelah bunga rosella dihaluskan yaitu sebanyak 250 gram. Selanjutnya persiapan perendaman (maserasi) dimana bunga rosella yang telah menjadi bubuk lalu direndam dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 100 ml selama 2 x 24 jam. Larutan yang didapat kemudian disaring dengan menggunakan kertas saring dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* untuk menguapkan etanol sehingga didapatkan ekstrak bunga rosella. Selanjutnya dilakukan pengukuran untuk menentukan konsentrasi yang diinginkan dengan menambahkan larutan pengencer DMSO 10%.

- 15 %

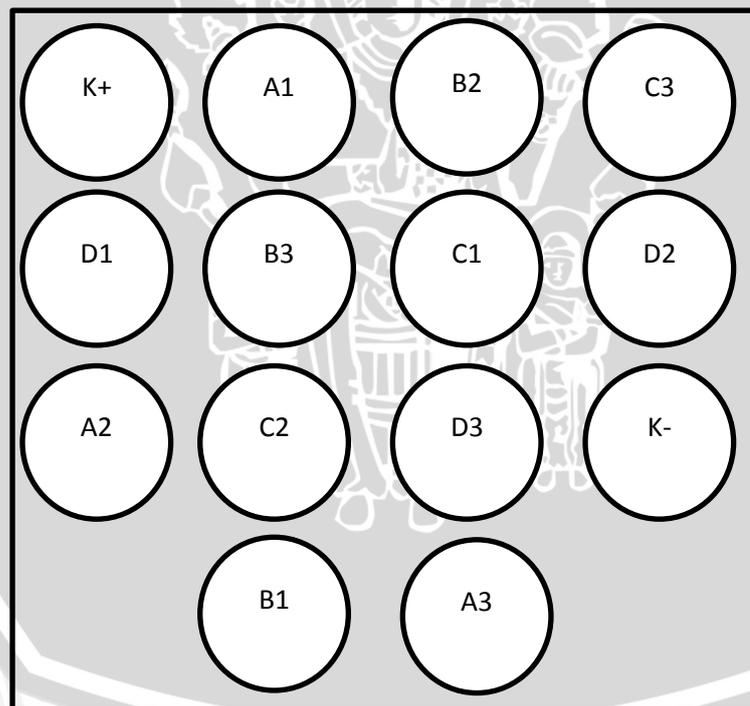
Ditimbang ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L) sebesar 0,15 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan DMSO sebanyak 0,85 ml sehingga dihasilkan 1 ml ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan konsentrasi 15%.

- 30 %

Ditimbang ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) sebesar 0,30 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan DMSO sebanyak 0,70 ml sehingga dihasilkan 1 ml ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan konsentrasi 30%.

- 45 %
Ditimbang ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) sebesar 0,45 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan DMSO sebanyak 0,55 ml sehingga dihasilkan 1 ml ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan konsentrasi 45%.
- 60 %
Ditimbang ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) sebesar 0,60 gram dan ditambahkan pengencer menggunakan DMSO sebanyak 0,60 ml sehingga dihasilkan 1 ml ekstrak kasar bunga rosella (*H. sabdariffa* L.) dengan konsentrasi 60%.

➤ **Denah Rancangan Penelitian**



- A : Perlakuan konsentrasi 5 %
- B : Perlakuan konsentrasi 10 %
- C : Perlakuan konsentrasi 15 %
- D : Perlakuan konsentrasi 20 %
- K+ : Perlakuan konsentrasi tanpa diberi ekstrak 0% (kontrol positif)
- K- : Perlakuan konsentrasi 100% (kontrol negatif)

Lampiran 4. Analisis Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H. sabdariffa L*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. harveyi* Secara *In Vitro*

➤ Data Diameter Hambatan (mm) Bakteri *V. harveyi*

Perlakuan	R1	R2	R3	Σ perlakuan	Rata -rata	R1 ²	R2 ²	R3 ²	Σ R ²
A (45%)	4,11	3,61	1,81	9,53	3,17	16,89	13,03	3,27	33,19
B (30%)	4,96	4,65	5,13	14,74	4,91	24,60	21,62	26,31	72,53
C (45%)	5,61	8,21	5,18	19,00	6,33	31,47	67,40	26,83	125,7
D (60%)	8,32	8,54	9,32	26,18	8,72	69,22	72,93	86,86	229,01
				69,45					460,43

Perhitungan:

1. Faktor Koreksi (FK)

$$= \frac{G^2}{N}$$

$$= \frac{69,45^2}{12}$$

$$= 401,94$$

2. Jumlah Kuadrat (JK total) = $\sum x_{ij}^2 - FK$

$$= (A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + D3^2) - FK$$

$$= (4,11^2 + 3,61^2 + 1,81^2 + \dots + 9,32^2) - 401,94$$

$$= 58,52$$

3. JK Perlakuan

$$= \frac{\sum(\sum xi)^2}{r} - FK$$

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

$$= \frac{9,53^2 + 14,74^2 + 19,00^2 + 26,18^2}{3} - 401,94$$

$$= 49,55$$

4. JK galat

$$= JK \text{ Total} - JK \text{ Perlakuan}$$

$$= 58,52 - 49,55$$

$$= 8,97$$

Lampiran 4. (Lanjutan)

$$\begin{aligned}
 5. \text{ db Total} &= (n \times r) - 1 \\
 &= (4 \times 3) - 1 \\
 &= 11 \\
 6. \text{ db Perlakuan} &= n - 1 \\
 &= 4 - 1 \\
 &= 3 \\
 7. \text{ db Galat} &= \text{db Total} - \text{db Perlakuan} \\
 &= 14 - 3 \\
 &= 11
 \end{aligned}$$

- **Analisa Sidik Ragam dengan Uji F tabel dalam Statistik Rancangan Percobaan Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H. sabdariffa* L) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. harveyi* Secara *In Vitro***

Sumber Keragaman	Db	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	49,55	16,51	14,72	4.07	7.59
Acak	8	8,97	1,12			
Total	11	58,52				

Berdasarkan hasil analisa sidik ragam di atas menunjukkan bahwa nilai F hitung 14,72 lebih besar dari F tabel 5% yaitu 4,07 maupun F tabel 1% sebesar 7,59 maka H_0 ditolak, hal ini berarti bahwa perbedaan perlakuan berpengaruh sangat nyata. Setelah H_0 ditolak, selanjutnya apabila ingin diketahui antar perlakuan (rata - rata) mana yang berbeda nyata, maka untuk mengetahui hal tersebut dilakukan uji nilai tengah (rata - rata) antar perlakuan atau disebut dengan uji Beda Nyata Terkecil (BNT)

Lampiran 4. (Lanjutan)

- Hasil Uji BNT Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H. sabdariffa L*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. harveyi* Secara *In Vitro*

Rerata perlakuan	A (3,18)	B (4,91)	C (6,33)	D (8,73)	Notasi
A (3,18)	-				A
B (4,91)	1,74 ^{ns}	-			A
C (6,33)	3,16 ^{**}	1,42 ^{ns}	-		Ba
D (8,73)	5,55 ^{**}	3,81 ^{**}	2,39*	-	C

*) berbeda nyata

***) berbeda sangat nyata

$$SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ acak}}{\text{ulangan } (r)}} = \sqrt{\frac{2 \times 1,121}{3}} = 0,8647$$

$$BNT \ 5\% = t_{(0,05;dbG)} SED = 2,31 \times 0,8647 = 1,9940$$

$$BNT \ 1\% = t_{(0,01;dbG)} SED = 3,36 \times 0,8647 = 2,9010$$

- Tabel Uji Polinomial Orthogonal

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan Ci		
		Linear	Kuadratik	Kubik
A (15%)	9,53	-3	1	-1
B (30%)	14,74	-1	-1	3
C (45%)	19,00	1	-1	-3
D (60%)	26,18	3	1	1
Q=∑Ci*Ti		54,21	1,97	3,87
Kr=(∑Ci^2)*r		60	12	60
JK=Q^2/Kr		48,978735	0,0000333333	0,249615

- Tabel Sidik Ragam Regresi Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H. sabdariffa L*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. harveyi* Secara *In Vitro*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	49,22838333			4.07	7.59
Linear	1	48,97 8735	67.90	37.63		
Kuadratik	1	0,0000333333	37.42	20.74		
Kubik	1	0,249615	3.65	2.02		
Acak	8	8,972666667	1.80			
Total	11	98,45676667				

Lampiran 4. (Lanjutan)

- Grafik Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Bunga Rosella (*H. sabdariffa L*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. harveyi* Secara *In Vitro*

