

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK BIJI PETAI (*Parkia speciosa*) TERHADAP
BAKTERI *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO**

SKRIPSI
PROGRAM STUDI BUDIDAYA PERAIRAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN

Oleh:

ANNISA FARHANA DEWI

NIM. 125080500111035



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

**UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK BIJI PETAI (*Parkia speciosa*) 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:

ANNISA FARHANA DEWI

NIM. 125080500111035



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2016

SKRIPSI

UJI EFEKTIVITAS EKSTRAK BIJI PETAI (*Parkia speciosa*) TERHADAP
BAKTERI *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO

Oleh:

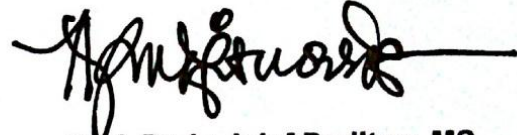
ANNISA FARHANA DEWI
NIM. 125080500111035

telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 09 Mei 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

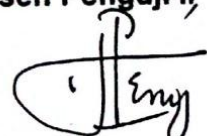
Menyetujui,
Dosen Penguji I


Dr. Ir. Abd Rahem Fagih, M.Si
NIP. 19611106 198602 2 001
TANGGAL : 19 MAY 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I


Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.
NIP. 19550213 198403 1 001
TANGGAL : 19 MAY 2016

Menyetujui,
Dosen Penguji II,


Ir. Heny Suprastyani, MP
NIP. 196209044 198701 2 001
TANGGAL : 19 MAY 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing II


Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc
NIP. 19621014 198701 1 001
TANGGAL : 19 MAY 2016

Mengetahui,
Ketua Jurusan
Manajemen Sumberdaya Perairan


Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS
NIP : 19620805 198603 2 001
TANGGAL : 19 MAY 2016



PERNYATAAN ORISINALITAS

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar – benar merupakan hasil karya saya sendiri, dengan 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 dikemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil penjiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut sesuai hukum yang berlaku di Indonesia.



Malang, Mei 2016

Mahasiswa

Annisa Farhana Dewi

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji syukur kehadiran Allah SWT, karena atas rahmat dan karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan hasil skripsi dengan baik dan tepat pada waktunya. Penulis juga ingin mengucapkan terimakasih kepada:

1. Bapak dosen pembimbing Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS yang selalu memberi motivasi dalam penyusunan laporan skripsi ini terutama motivasi agar cepat lulus. Bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc yang memberi motivasi dan memudahkan dalam penyusunan laporan skripsi ini.
2. Bapak Dr. Ir. Abd Rahem Faqih, M.Si dan Ibu Ir. Heny Suprastyani, MP selaku dosen penguji yang juga memberi motivasi pada penyusunan laporan.
3. Ayah, Ibu, Shafira dan keluarga yang selalu memberi motivasi doa dan dukungan sehingga laporan skripsi ini dapat terselesaikan.
4. Mba Titin selaku laboran Laboratorium Parasit dan Kesehatan Ikan yang membimbing dari 0 sampai paham, serta teman – teman seperjuangan group skripsi Elida Hasan, Muniroh Ulfah, Arfin, Rusmawanto, Oki, Release Aurora, Siti Nur, Herprita dan 16 teman – teman yang lainnya yang selalu membantu serta mendengarkan curhatan dalam penyelesaian tugas akhir ini.
5. Maulana Abdurrahman yang bersedia menemani dan mendengarkan keluh kesah, Wahyu Kurniallah yang memberikan banyak informasi, Immaria Fransira, Tya Nur, Deeda Amalia, Nurviana, Sherly, Hartaningtyas dan Deka Pramudita yang memberikan dukungan serta semangat.
6. Teman – teman kuliah lain yang selalu memberi motivasi dan bantuan dalam penyusunan laporan skripsi ini.

RINGKASAN

ANNISA FARHANA DEWI. Uji Efektivitas Ekstrak Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In Vitro*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.** dan **Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc**

Peningkatan produksi udang saat ini lebih diarahkan kepada budidaya, hal ini dikarenakan produksi penangkapan udang tidak efisien dan dapat mengancam keberlanjutan untuk peningkatan produksi udang. Salah satu kendala yang harus dihadapi dalam budidaya adalah penyakit. Bakteri *Vibrio harveyi* merupakan salah satu bakteri yang dapat menimbulkan berbagai macam penyakit, salah satunya adalah vibriosis. Udang yang terkena penyakit vibriosis akan menjadi lesu, nafsu makan berkurang, radang berwarna merah pada anus serta menyebabkan kematian masal dan merugikan dalam usaha budidaya. Penggunaan antibiotik serta obat-obat kimia dalam waktu lama untuk mengatasi hal tersebut dapat menyebabkan resistensi bakterial dan residu yang mencemari lingkungan perairan. Oleh karena itu diperlukan suatu bahan alami atau bahan herbal sebagai pengganti antibiotik yang lebih ramah lingkungan yaitu dengan menggunakan ekstrak biji petai (*Pakia speciosa*) yang mengandung senyawa alkaloid, flavonoid, terpenoid dan fenol yang merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, dimana salah satu contohnya flavonoid dapat mengganggu proses metabolisme energi dengan cara menghambat sistem respirasi bakteri.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada Januari sampai dengan Maret 2016. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui daya hambat ekstrak biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *Vibrio harveyi*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental yaitu dengan menguji hubungan suatu sebab (*cause*) dengan akibat (*effect*) yang dilakukan dalam suatu sistem tertutup yang kondisinya terkontrol dan teknik pengambilan datanya dengan cara observasi langsung yaitu pengamat merekam apa yang tengah terjadi pada saat itu juga. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 5 perlakuan dosis ekstrak biji petai (*P. speciosa*) yaitu : dosis (A) 50 ppm; (B) 100 ppm; (C) 150 ppm; (D) 200 ppm dan (E) 250 ppm. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak biji petai (*P. speciosa*) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan rata-rata diameter daya hambat terbesar yaitu dosis 250 ppm adalah sebesar 5,38 mm. Hubungan antara perbedaan dosis ekstrak biji petai (*P. speciosa*) terhadap diameter daya hambat bakteri *V. harveyi* menghasilkan hubungan atau grafik secara linear, dimana persamaannya didapatkan $y = 3,5777 + 0,0073x$ dengan nilai koefisien determinasi $R^2 = 0,905$.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini bahwa hasil uji efektivitas antibakterial dengan menggunakan uji cakram menunjukkan ekstrak biji petai (*P. speciosa*) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dengan dosis maksimalnya yaitu sebesar 250 ppm.

KATA PENGANTAR

Puji syukur kehadiran Tuhan Yang Maha Esa yang telah melimpahkan rahmat dan karunia-Nya sehingga skripsi yang berjudul “Uji Efektifitas Ekstrak Biji Petai (*Parkia speciosa*) Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In Vitro” ini dapat terselesaikan untuk melengkapi tugas – tugas dan memenuhi syarat – syarat guna memperoleh gelar Sarjana Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang. Penulisan skripsi ini didasarkan pada penelitian yang telah dilaksanakan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya pada Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan dan yang telah berjalan selama 2 bulan yaitu dari bulan Januari hingga bulan Maret.

Pada kesempatan ini penulis ingin mengucapkan terima kasih kepada dosen pembimbing I Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS dan dosen Pembimbing II Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc yang senantiasa mengarahkan dan memberi motivasi kepada penulis.

Penulis menyadari bahwa penulisan karya tulis skripsi ini masih terdapat kekurangan, baik dilihat dari segi isi maupun pembahasan. Penulis mengharapkan kritik dan saran yang bermanfaat dari pembaca untuk kesempurnaan penulisan di masa yang akan datang. Mudah – mudahan semua bantuan, masukan dan dorongan yang diberikan dengan penuh keikhlasan akan mendapatkan balasan yang setimpal dari Tuhan Yang Maha Esa. Akhir kata penulis berharap dengan karunia Tuhan Yang Maha Esa skripsi ini dapat bermanfaat bagi penulis maupun pembaca.

Malang, Mei 2016

Penulis

DAFTAR ISI

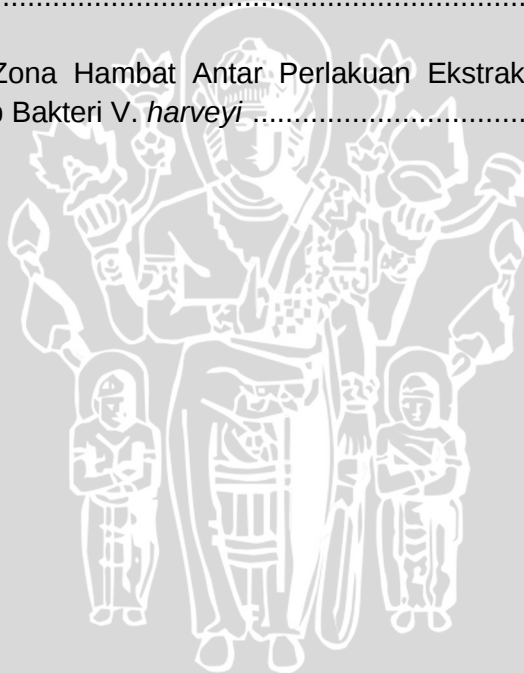
	Halaman
RINGKASAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	viii
DAFTAR TABEL	ix
DAFTAR LAMPIRAN	x
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	3
1.4 Hipotesis	3
1.5 Tempat dan Waktu	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biji Petai (<i>P. speciosa</i>)	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	5
2.1.2 Manfaat dan Kandungan Gizi	6
2.1.3 Bahan Aktif Biji Petai (<i>P. Speciosa</i>)	7
2.1.4 Aktivitas Antibakteri	8
2.2 Bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	10
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	10
2.2.2 Habitat dan Penyebaran <i>V. harveyi</i>	11
2.2.3 Reproduksi Bakteri	12
2.2.4 Infeksi dan Gejala <i>V. harveyi</i>	13
2.3 Ekstraksi	13
2.4 Pelarut Etanol	14
2.5 Uji Antibakteri secara <i>In Vitro</i>	15
3. METODE PENELITIAN	17
3.1 Materi Penelitian	17
3.1.1 Alat penelitian	17
3.1.2 Bahan Penelitian	18
3.2 Metode Penelitian	19
3.3 Rancangan Penelitian	19
3.4 Pengambilan Data	21
3.5 Prosedur Penelitian	21
3.5.1 Proses Sterilisasi	22
3.5.2 Pembuatan Media	23
3.5.3 Pembiakan Bakteri <i>V. harveyi</i>	24
3.5.4 Uji Difusi Kertas Cakram	25
3.6 Pelaksanaan Penelitian	26

3.6.1 Proses pembuatan Ekstrak Biji Petai (<i>P. Speciosa</i>)	26
3.6.2 Pewarnaan Bakteri Uji	27
3.6.3 Penelitian Pendahuluan Dosis Daya hambat Ekstrak Biji Petai (<i>P. speciosa</i>)	28
3.7 Parameter Uji	28
3.7.1 Parameter Utama	28
3.7.2 Parameter Penunjang	28
3.7 Analisa Data	29
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	30
4.1 Ekstraksi Maserasi Biji Petai (<i>P. speciosa</i>)	30
4.2 Identifikasi Bakteri <i>V. harveyi</i>	30
4.3 Penelitian Pendahuluan.....	31
4.4 Daya Hambat Ekstrak Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Bakteri <i>V.</i> <i>harveyi</i> dengan Metode Kertas Cakram	32
4.5 Parameter Penunjang	31
5. KESIMPULAN DAN SARAN	39
5.1 Kesimpulan	39
5.2 Saran	39
DAFTAR PUSTAKA	40
LAMPIRAN	43



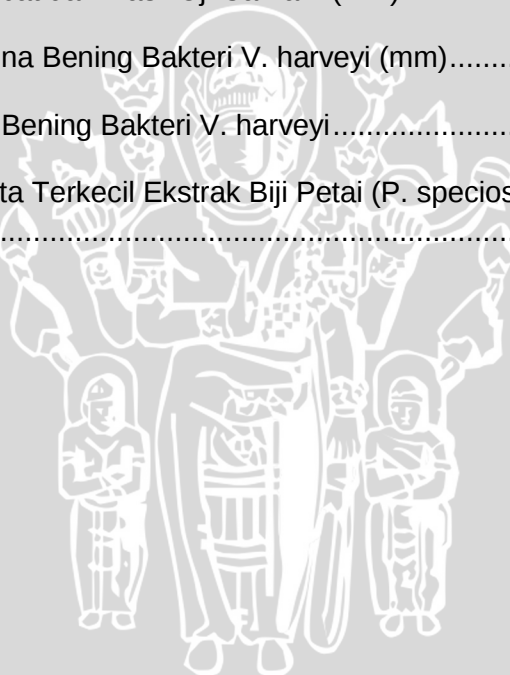
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. (a) Buah Petai ;(b) Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) (Sunanto, 1992)	5
2. Bakteri <i>V. harveyi</i>	10
3. Proses Reproduksi Biner Melintang	12
4. Denah Penelitian	20
5. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri <i>V. harveyi</i> dengan perbesaran 1000x	31
6. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) terhadap Bakteri <i>V. harveyi</i> (a) 50 ppm; (b)100 ppm; (c) 150 ppm; (d) 200 ppm dan (e) 250 ppm	32
7. Grafik Hubungan Zona Hambat Antar Perlakuan Ekstrak Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Bakteri <i>V. harveyi</i>	36



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Kandungan Gizi Biji Petai (<i>P. speciosa</i>)	7
2. Bahan Aktif Tumbuhan Petai (<i>P. speciosa</i>)	8
3. Sifat Fisika dan Kimia Etanol	15
4. Alat - Alat Penelitian yang Digunakan	17
5. Bahan - Bahan Penelitian yang Digunakan	18
6. Reaksi Pewarnaan Bakteri	31
7. Kretaria Zona Hambat dan Hasil Uji Cakram (mm)	33
8. Hasil Rata-Rata Zona Bening Bakteri <i>V. harveyi</i> (mm)	34
9. Sidik Ragam Zona Bening Bakteri <i>V. harveyi</i>	35
10. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil Ekstrak Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Bakteri <i>V. harveyi</i>	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Foto Peralatan Penelitian.....	43
2. Foto Bahan – bahan Penelitian.....	46
3. Pembuatan Ekstrak Dosis Uji.....	48
4. Uji Biokimia.....	49
5. Hasil Uji Cakram Ekstrak Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Bakteri <i>V. harveyi</i>	50
6. Analisis Data Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Zona Hambatan (mm) Bakteri <i>V. harveyi</i> Secara in vitro	52
7. Foto Kegiatan Penelitian.....	55



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Berdasarkan data dari Badan Pusat Statistik, Indonesia merupakan Negara kepulauan yang memiliki potensi pada kelautannya yang sangat besar. Potensi tersebut tersebar pada $\pm 5,8$ juta km^2 zona maritim yang terdiri dari perairan teritori dengan luas 0,8 juta km^2 , perairan kepulauan dengan luas 2,3 juta km^2 dan Zona Ekonomi Eksklusif (ZEE) dengan luas 2,7 juta km^2 . Indonesia memiliki produksi perikanan tangkap laut yang menghasilkan sebanyak lebih dari 2 juta ton pada tahun 1991 dan lebih dari 5 juta ton pada tahun 2012. Sedangkan pada hasil budidaya pada tahun 1991 menghasilkan lebih dari 500 ton dan pada tahun 2012 meningkat menjadi lebih dari 6 juta ton (Anonim, 2012).

Peningkatan produksi penangkapan merupakan hal yang mustahil dan tidak efisien serta dapat mengancam keberlanjutan untuk meningkatkan produksi udang nasional. Hal ini disebabkan meningkatnya perikanan tangkap pada lebih di sebagian besar wilayah pengelolaan perikanan udang, oleh karena itu untuk meningkatkan produksi udang nasional dapat dilakukan dengan usaha budidaya walaupun teknologinya masih memiliki banyak kendala (Garno, 2004).

Kecenderungan yang terjadi dalam budidaya tambak, khususnya pada tambak yang menerapkan teknologi intensif dan semi intensif adalah memburuknya keadaan lingkungan tambak yang sejalan dengan berlangsungnya masa pemeliharaan. Dampak yang ditimbulkan adalah stress yang akan memperlemah kondisi udang dan ikan, sehingga mudah terserang penyakit (Maulina, Handaka dan Riyantini, 2012). Menurut Prajitno (2005), penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan secara langsung maupun secara tidak langsung, sehingga timbulnya serangan penyakit ikan di kolam merupakan hasil interaksi antara ikan, kondisi lingkungan dan

organisme penyakit yang tidak serasi. Ketidakserasian ini dapat menyebabkan ikan stress dan mengakibatkan mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit. Serangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan kendala utama dalam kegiatan budidaya.

Menurut Wardanarni, Noermala dan Sukenda (2012), penyakit yang sering menyerang udang pada usaha budidaya udang adalah penyakit yang disebabkan oleh bakteri, khususnya bakteri *Vibrio harveyi*, bakteri ini adalah salah satu agen penyakit vibriosis yang banyak ditemukan pada usaha budidaya udang serta ikan laut. Bakteri ini akan bersifat pathogen apabila kesehatan udang menurun.

Vibriosis adalah penyakit pada udang windu yang sangat mengganggu dan dapat menimbulkan kematian secara masal. Penyakit ini dapat ditanggulangi dengan senyawa kimia sintetis seperti antibiotik, namun penggunaan antibiotik dalam waktu lama akan menyebabkan resistensi bakterial dan residu yang akan mencemari lingkungan, sehingga saat ini pencarian senyawa antibakteri dari bahan — bahan alami menjadi pusat perhatian (Akhyar, 2010). Pemanfaatan bahan alam (herbal) yang berasal dari tumbuhan untuk dijadikan obat tradisional telah lama dilakukan oleh masyarakat Indonesia untuk penanganan pada permasalahan kesehatan yang timbul. Penggunaan obat herbal ini cukup menguntungkan karena mudah diperoleh atau didapat bahkan dapat ditanam sendiri, harganya pun relatif murah (Nuria, Faizatun dan Sumantri, 2009).

Salah satu bahan alami yang dapat digunakan adalah tanaman petai (*Parkia speciosa*) khususnya biji petai karena biji petai kaya akan mineral penting yaitu diantaranya adalah kalsium, fosfor, magnesium, besi, mangan serta kalium (Muhammed, Shamsuddin Rehman, Sulaiman dan Abdullah (1987), selain itu menurut Kamisah, Othman, Qodriyah dan Jaarin (2013), biji petai (*P. speciosa*) mengandung banyak nutrisi seperti protein lemak dan karbohidrat. Biji

Petai (*P. speciosa*) merupakan sumber mineral yang baik dan mengandung vitamin C dan vitamin E (α – *tocopherol*). Kandungan kimia pada biji petai (*P. speciosa*) diantaranya adalah alkaloid, flavonoid, terpenoid dan fenol, sementara itu kandungan tannin banyak ditemukan pada kulit biji petai (*P. speciosa*).

Berdasarkan informasi mengenai manfaat dari biji petai (*P. speciosa*) yang memiliki sifat antibakteri maka perlu dilakukan penelitian mengenai kemampuan ekstrak biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *V. harveyi* secara in vitro yang dapat digunakan sebagai pengganti antibiotik sehingga tidak mengakibatkan penurunan produktivitas budidaya yang berujung dengan kerugian pada usaha budidaya.

1.2 Rumusan Masalah

Berdasarkan rumusan yang telah dipaparkan maka didapat masalah yaitu sebagai berikut :

- Apakah Penggunaan ekstrak biji petai (*P. speciosa*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui efek penggunaan ekstrak biji petai (*P. speciosa*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* secara *In Vitro*.

1.4 Hipotesis

H_0 : Diduga pemberian ekstrak biji petai (*P. speciosa*) tidak memiliki daya hambat terhadap bakteri *V. harveyi*.

H_1 : Diduga pemberian ekstrak biji petai (*P. speciosa*) memiliki daya hambat terhadap bakteri *V. harveyi*.

1.5 Tempat dan Waktu

Penelitian uji efektivitas ekstrak biji petai (*P.speciosa*) terhadap bakteri *V. harveyi* secara in vitro dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Pelaksanaan berlangsung pada bulan Januari sampai dengan Maret 2016.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biji Petai (*P. speciosa*)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi biji petai (*P. speciosa*) yang disajikan pada **Gambar 1.** menurut *United States Departement of Agriculture* (1996), yaitu sebagai berikut :

Kingdom : Plantae
 Subkingdom : Tracheobionta
 Superdivision : Spermatophyta
 Division : Magnoliophyta
 Class : Magnoliopsida
 Subclass : Rosidae
 Order : Fabales
 Family : Fabaceae
 Genus : *Parkia*
 Species : *P. speciosa*



Gambar 1. (a) Buah Petai ;(b) Biji Petai (*P. speciosa*) (Sunanto, 1992)

Biji petai (*P. speciosa*) berasal dari Malaysia, merupakan tanaman pohon yang memiliki tinggi pohon 5 – 25 meter dan memiliki banyak cabang. Daun dari pohon petai (*P. speciosa*) ini menyirip ganda, kulit batang berwarna coklat agak kemerah-merahan. Bentuk buahnya berpolong dan berisi biji-biji. Biji petai (*P.*

speciosa) ini agak lunak saat masih muda dan akan mengeras saat biji tersebut tua. Jenis biji petai (*P. speciosa*) di pulau Jawa sementara yang dikenal adalah tanaman petai (*P. speciosa*) jenis gajah dan tanaman petai (*P. speciosa*) jenis kacang. Tanaman petai (*P. speciosa*) jenis gajah menghasilkan buah petai (*P. speciosa*) yang panjangnya 25-30 cm dan berisi biji petai (*P. speciosa*) sebanyak 15-18 biji, sedangkan tanaman jenis kacang menghasilkan buah petai (*P. speciosa*) yang panjangnya 20 cm dan berisi biji petai (*P. speciosa*) 10-20 biji yang lebih kecil dibandingkan dengan biji petai (*P. speciosa*) jenis gajah (Sunanto, 1992).

Menurut Rugayah, Hidayat dan Hafir (2014), biji dari petai (*P. speciosa*) tidak bertepung, menggelembung pada setiap ruas bijinya dan berbentuk seperti bulat telur, lebar serta lunak bijinya. Biji petai (*P. speciosa*) diselimuti oleh kulit tipis yang berwarna putih, apabila biji tersebut masak warnanya akan menjadi jingga. Apabila dimakan rasa dari biji petai (*P. speciosa*) tidak pahit. Tanaman ini juga memiliki daun yang tebal dan majmuk serta berpinat, panjang daun antara 2 – 6 cm dan panjang tangkai daun antara 18 – 30 cm. Bunga dari tanaman petai (*P. speciosa*) berbentuk buah pir berwarna kuning coklat. Didalam buahnya terdapat biji petai (*P. speciosa*).

2.1.2 Manfaat dan Kandungan Gizi

Manfaat dari biji petai (*P. speciosa*) menurut Chooi (2007), yaitu dapat dimakan mentah dan dijadikan sayur yang berguna untuk menjadi protein dalam makanan, selain itu bijinya dapat direbus dan diminum untuk membunuh cacing yang ada didalam perut dan usus. Apabila dipanggang, dihancurkan dan ditambah sedikit air lalu dibubuhkan pada kulit dapat membuat kulit licin dan lembut. Pada daunnya dapat dimakan dan menyembuhkan sengatan hewan berbisa. Petai (*P. speciosa*) juga mengandung vitamin A, B dan vitamin C, protein, lemak, air, karbohidrat dan mineral.

Menurut Sunanto (1992), biji dari buah petai (*P. speciosa*) memiliki kandungan mineral yang kaya akan kalori, gizi serta vitamin – vitamin, seperti yang disajikan pada **Tabel 1**.

Tabel 1. Kandungan Gizi Biji Petai (*P. speciosa*).

No.	Nama	Dalam 100 gr biji petai segar
1.	Energi	142 kalori
2.	Air	60,5 gram
3.	Protein	10,4 gram
4.	Lemak	2,0 gram
5.	Karbohidrat	22,0 gram
6.	Kalsium	95 mg
7.	Fosfor	115 mg
8.	Besi	1,2 mg
9.	Vitamin A	200 mg
10.	Vitamin B1	0,17 mg
11.	Vitamin C	36 mg

2.1.3 Bahan Aktif Biji Petai (*P. speciosa*)

Menurut Kamisah, Othman, Qodriyah dan Jaarin (2013), bagian biji dari petai (*P. speciosa*) terkandung terpenoid yang terdeteksi menggunakan gas kromatografi yaitu β – sitosterol, stigmasterol, leupol, campesterol dan squalene. Menariknya, lupol memiliki sifat antikarsinogenik, *antinociceptive* dan *anti-inflammatory*. Kandungan flavonoid juga terdapat pada ekstrak etanol biji petai (*P. speciosa*), namun tidak ditemukan flavonoid pada ekstrak methanol biji petai (*P. speciosa*) yang menggunakan *reversed-phase high performance liquid chromatography*. Selain itu pada biji petai (*P. speciosa*) terkandung *cyclic polysulfides*, namely, *hexathionine*, *tetrathiane*, *trithiolane*, *pentathiopane*, *pentathiocane*, dan *tetrathiepane*. Kandungan tersebut membuat biji petai (*P. speciosa*) memiliki rasa dan bau yang kuat. Selain itu terdapat senyawa alkaloid dan saponin pada tumbuhannya. Kandungan fitokimia dari berbagai bagian tanaman petai (*P. speciosa*) disajikan pada **Tabel 2**.

Tabel 2. Bahan Aktif Tumbuhan Petai (*P. speciosa*)

Bagian	Alkaloid	Saponin	Terpenoid	Fenol	Flavonoid	Tannin
Biji	+	-	+	+	+	-
Kulit biji	+	-	-	+	-	Belum ditemukan
Daun	-	-	+	+	+	Belum ditemukan
Kulit daun	+	+	-	-	+	+
Polong	Belum ditemukan	Belum ditemukan	Belum ditemukan	+	Belum ditemukan	+

Biji petai (*P. speciosa*) memiliki kandungan yang terdiri dari air sebanyak 71%, 11% karbohidrat, 8% protein, 8% lemak, mineral seperti besi, fosfor, kalsium serta vitamin A, B1, B2, niasin dan vitamin C. Biji petai (*P. speciosa*) memiliki kandungan bahan aktif seperti alkaloid, tannin dan sistin (Chooi, 2007).

2.1.4 Aktivitas Antibakteri

Antimikroba adalah suatu zat yang mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme mikroba. Apabila zat tersebut mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri disebut antibakteri. Mekanisme kerja antimikroba antara lain dengan jalan merusak dinding sel, merusak membran sitoplasma, mendenaturasi protein sel dan menghambat kerja enzim dalam sel (Prajitno, 2007).

Mekanisme kerja antibakteri menurut Pelczar dan Chan (1986) adalah sebagai berikut:

a. Kerusakan pada dinding sel

Struktur pada dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukan atau mengubahnya setelah selesai dibentuk.

b. Perubahan permeabilitas membrane sel

Membran sitoplasma berfungsi mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel serta mengatur aliran keluar masuk bahan-bahan lain. Membran memelihara integritas komponen-komponen seluler. Dengan memperlemah

fungsi dari membran akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel.

c. Perubahan molekul protein dan asam nukleat

Hidupnya suatu sel tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein pada asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Suatu kondisi atau substansi yang mengubah keadaan ini, yaitu mendenaturasikan protein dan asam-asam nukleat dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu tinggi dan konsentrasi pekat beberapa zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi (denaturasi), *irreversible* (tidak dapat kembali) komponen-komponen seluler.

d. Penghambatan kerja enzim

Setiap enzim dari beratus-ratus enzim yang berbeda-beda dan terdapat di dalam sel merupakan sasaran potensial bagi bekerjanya suatu penghambat, banyak zat kimia telah diketahui dapat mengganggu reaksi biokimiawi, penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme.

e. Penghambatan sintesis protein

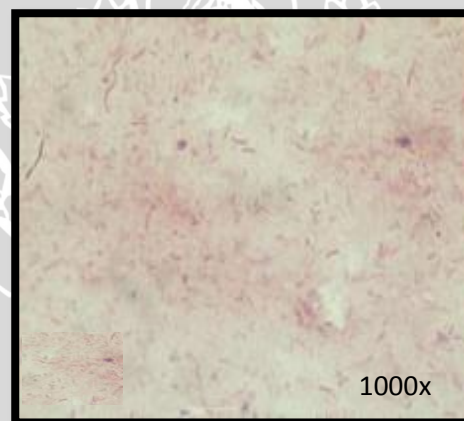
DNA, RNA dan protein memegang peranan penting di dalam proses kehidupan normal sel. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel.

2.2 Bakteri *V. harveyi*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *V. harveyi* yang disajikan pada **Gambar 2.** menurut Akhyar (2010), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Prokaryota
Divisi	: Bacteria
Ordo	: Eubacteriales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: <i>Vibrio</i>
Spesies	: <i>V. harveyi</i>



Gambar 2. Bakteri *V. harveyi* (Ajitma, Suryanti dan Yunasfi, 2014).

Menurut Prajitno (2007), bakteri *V. harveyi* ini termasuk kedalam bakteri gram negatif yang memiliki bentuk batang pendek dan menyerupai koma. Bakteri ini berkoloni dan bergerak, selain itu, bakteri ini dapat berkembang dengan baik pada salinitas kisaran 25 – 35 ppt dan dapat mudah menular melalui air ataupun aktifitas dari manusia. Infeksi yang disebabkan bakteri *V. harveyi* pada udang yaitu melalui mulut, saluran pencernaan, kulit, insang serta gurat sisi. Bakteri ini menghasilkan cahaya seperti kunang – kunang (*fluorescens*) yang diatur oleh enzim *luciferase*. Hardiyani (2014), menyatakan bahwa *V. harveyi* merupakan bakteri gram negatif yang hidup di laut dan beriklim tropis. Tubuhnya berbentuk

menyerupai koma atau batang pendek, bengkok ataupun lurus, bersel tunggal, mempunyai alat gerak berupa *flagella* kutub tunggal (*monotric flagel*) dengan ukuran sel 1 – 4 nm, tidak membentuk spora, oksidase positif, katalase positif serta proses fermentasi karbohidratnya tidak membentuk gas.

Menurut Evan (2009), bakteri yang teridentifikasi dari larva yang mati dengan menggunakan pewarnaan gram merupakan bakteri *V. harveyi* yang diperoleh hasil bakteri bersel tunggal, bersifat gram negatif dan berbentuk batang pendek yang bengkok atau lurus. Bakteri ini juga tumbuh pada media TCBSA (*Thiosulphate Citrate Bile-salt Sucrose Agar*) selama 2-3 hari dan apabila diamati pada kondisi yang gelap bakteri ini akan berpendar, berpendarnya bakteri ini disebabkan oleh enzim luciferase yang dapat berfungsi sebagai katalisator dalam proses oksidasi reduksi. Selain itu bakteri ini memiliki bentuk koloni bulat dengan elevasi cembung, berwarna krem pada media agar SWC (*Sea Water Complete*) dengan diameter 2 -3 mm dan mempunyai flagella pada salah satu kutub selnya.

2.2.2 Habitat dan Penyebaran *V. harveyi*

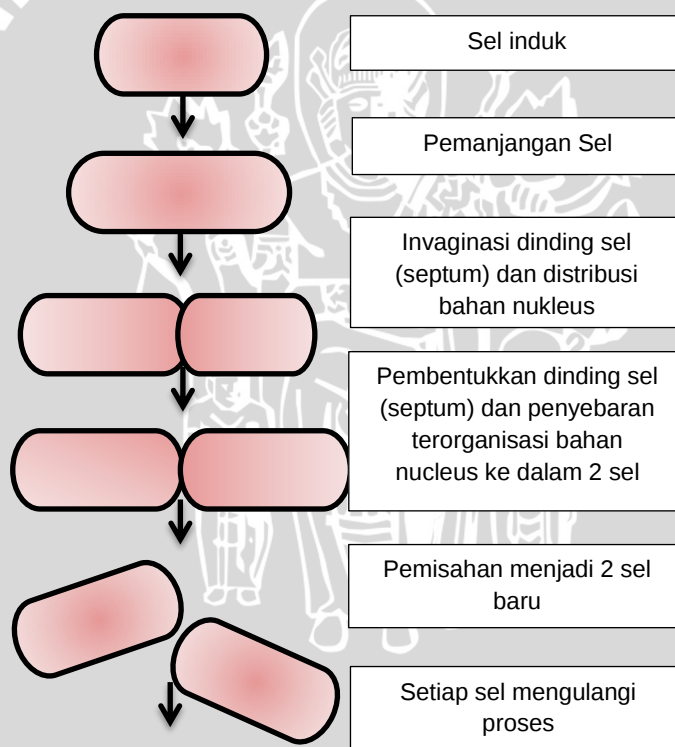
Menurut Prajitno (2007), bakteri *Vibrio* spp termasuk ke dalam kelompok bakteri halofit yaitu bakteri yang dapat hidup di perairan berkadar garam tinggi. Bakteri ini dapat tumbuh pada salinitas optimum 20-30 ppt dan dapat tumbuh dengan baik pada kondisi alkali yaitu pada pH optimum 7,5-8,5. Salinitas rata-rata di sepanjang pantai utara Jawa, mulai dari Pantai Tuban Tuban (Bulu, Bancar, Jenu, Palang), Gresik (Sedayu, Manyar), Sidoarjo, Bangil (Raci), Probolinggo, Karang Tekok (Situbondo), Banyuwangi (Suri Tani Pemuka) adalah 25 ppt yang mana pada keadaan ini rentan terhadap kemunculan *V. harveyi*.

Menurut Chatterjee dan Haldar (2012), bakteri *V. harveyi* termasuk kedalam jenis bakteri gram negatif yang dapat dijumpai di ekosistem laut, estuari maupun kolam budidaya baik ikan maupun udang. Permasalahan vibrio sering

dialami oleh para pembudidaya udang sistem intensif di wilayah Indonesia, Thailand, Filipina dan beberapa Negara Asia Tenggara lainnya.

2.2.3 Reproduksi Bakteri

Menurut Pleczer dan Chan (2010), proses reproduksi yang paling umum adalah reproduksi biner melintang. Proses reproduksi dengan pembelahan ini adalah suatu proses reproduksi aseksual, setelah pembentukan dinding sel melintang maka satu sel tunggal akan membelah menjadi dua sel dan sel hasil pembelahan tersebut dinamakan sel anak. Proses ini mengakibatkan terbentuknya dua organisme baru yang organisme baru tersebut kemudian dapat mengulangi proses tersebut seperti yang disajikan pada **Gambar 3**.



Gambar 3. Proses Reproduksi Biner Meintang

Secara umum, bakteri bereproduksi dengan pembelahan. Selanjutnya diikuti pemanjangan sel, pembentukan membran sel melintang dan dinding sel secara berurutan. Pada bakteri, membran melintang yang baru dan dinding sel tumbuh ke dalam dari lapisan luar, yang melibatkan mesosom septal. Membran

melintang dibentuk sebagai jalan untuk memisahkan dua sister kromosom (kromosom kembar) yang dibentuk saat replikasi kromosom. Ini diakhiri dengan pelekatan kromosom pada membran sel (Brooks, Butel dan Morse, 2001).

2.2.4 Infeksi dan Gejala *V. harveyi*

Menurut Akhyar (2010), bakteri *Vibrio* merupakan penyebab utama penyakit vibriosis pada udang atau penyakit udang menyala dan dapat berperan sebagai patogen primer maupun sebagai 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 inang 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.

Bakteri *V. harveyi* ini dapat menyebabkan kematian yang sangat besar pada ikan dan udang. Penyakit yang ditimbulkan akibat serangan bakteri ini disebut dengan penyakit vibriosis, dimana gejalanya adalah nafsu makan berkurang, tubuh menjadi lesu, terlihat pembusukan pada sirip (*fin rot*), mata biasanya akan menonjol (*popeye*), selain itu terjadi pengumpulan cairan pada perut yang mengakibatkan perut menjadi kembung dan radang berwarna merah pada bagian anus (Akbar dan Sudaryanto, 2002).

2.3 Ekstraksi

Menurut Istiqomah (2013), metode ekstraksi maserasi merupakan sebuah proses membuat ekstrak simplisia dengan menggunakan pelarut dan dilakukan pengocokan atau pengadukan yang ditempatkan pada suhu ruang. Maserasi ini bertujuan untuk menarik zat yang berkhasiat yang dapat tahan pemanasan maupun yang tidak dapat tahan pemanasan. Dasar dari ekstraksi maserasi ini

adalah pelarut dan bahan kandungan simplisia dari sel-sel yang rusak yang terbentuk pada saat penghalusan ekstraksi (difusi) bahan kandungan sel yang masih utuh.

Menurut Niswah (2014), ekstraksi merupakan kegiatan menarik kandungan kimia yang dapat larut dengan pelarut cair. Cara ekstraksi menggunakan pelarut ada 2 macam yaitu: ekstraksi dingin dan ekstraksi panas. Ekstraksi dingin memiliki 2 macam metode yaitu metode maserasi dan metode perlokasi, dimana metode maserasi ini adalah proses pengestrakkan simplisia dengan menggunakan beberapa pelarut dengan dilakukan pengadukkan. Maserasi *kinetic* merupakan maserasi yang dilakukan pengadukkan secara berulang kali (*kontinyu*). Remaserasi berarti melakukan pengulangan penambahan pelarut setelah dilakukan penyaringan maserat pertama dan seterusnya, dengan cara ini sendiri dapat menarik zat yang berkhasiat yang tahan pada pemanasan maupun yang tidak tahan dengan panas.

2.4 Pelarut Etanol

Untuk mendapatkan senyawa kimia yang terkandung dalam bij petai (*P. speciosa*) dilakukan ekstraksi maserasi dengan menggunakan pelarut etanol, dimana etanol mampu melarutkan senyawa kimia yang bersifat polar sampai sampai dengan non polar seperti bahan aktif alkaloid, tannin, saponin, fenolik dan flavonoid. Alkaloid sendiri bersifat semipolar karena adanya gugus amina, amida, metoksi dan fenol yang dapat dimungkinkan tertarik oleh pelarut etanol. Tanin juga memiliki gugus fenolik sehingga larut pada pelarut polar. Flavonoid memiliki ikatan dengan gugus gula yang membuat senyawa ini bersifat polar. Selain itu etanol juga dapat menarik senyawa fenolik yang cenderung larut dengan air (Siedel, 2008). Selain itu Kar (2007) mengatakan bahwa bahan aktif alkaloid dapat mudah larut dengan pelarut alkohol seperti etanol dan metanol.

Menurut (Munawaroh dan Handayan, 2010), etanol merupakan nama lain dari etil alkohol atau alkohol yang lebih dikenal oleh masyarakat merupakan salah satu senyawa kimia yang memiliki rumus kimia C_2H_5OH . Dalam kondisi kamar atau suhu ruang, etanol ini berwujud cairan yang mudah sekali menguap, tidak memiliki warna dan mudah terbakar. Sifat fisika kimia dari etanol disajikan pada **Tabel 3**.

Tabel 3. Sifat Fisika dan Kimia Etanol

Karakteristik	Syarat
Rumus Molekul	C_2H_5OH
Massa molekul relative	46,07 g/mol
Titik leleh	$-114,3^{\circ}C$
Titik didih	$78,32^{\circ}C$
Densitas pada $20^{\circ}C$	0,7893 g/cm ³
Viskositas pada $20^{\circ}C$	1,17 Cp
Kalor spesifik pada $20^{\circ}C$	0,59 kal/g ^o c
Kelarutan dalam air $20^{\circ}C$	Sangat larut

2.5 Uji Antibakteri secara In Vitro

Uji antibakteri yang digunakan adalah uji difusi cakram, dimana uji difusi cakram adalah pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba. Adapun mekanisme kerja dari uji cakram adalah mikroorganisme disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan menggunakan kapas lidi. 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 kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan diletakkan pada permukaan lempeng agar (Roihanah, Sukoso dan Andayani, 2012).

Metode difusi dilakukan dengan metode Kirby – Bauer yang dikenal dengan sebutan metode cakram kertas. Tiap-tiap cakram kertas kosong sebelumnya dipanaskan dalam oven pada suhu 70°C selama 15 menit, kemudian kertas cakram dicelupkan ke dalam larutan uji. Cakram yang telah berisi supernatan, kemudian didiamkan selama 15 menit sebelum diletakkan pada media uji. Kemudian secara aseptik, setelah kertas cakram menyerap supernatant tersebut, masing-masing diletakkan pada permukaan medium yang telah berisi mikroba ujidan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, dilakukan pengukuran diameter zona bening, yaitu zona bening yang terbentuk di sekitar cakram, dengan menggunakan penggaris millimeter (Noverita, Fitria dan Sinaga, 2009).



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain dijelaskan pada

Tabel 4, sementara gambar peralatan disajikan pada **Lampiran 1**.

Tabel 4. Alat - Alat Penelitian yang Digunakan

No.	Alat	Fungsi
1.	Autoklaf	Alat untuk mensterilkan peralatan dan bahan yang akan digunakan
2.	Cawan Petri	Tempat untuk menghitung zona hambat bakteri
3.	Erlenmeyer	Tempat untuk membuat media yang akan digunakan
4.	Tabung Reaksi	Tempat untuk peremajaan bakteri
5.	Kulkas	Untuk menyimpan bahan dengan suhu rendah
6.	<i>Hot Plate</i>	Untuk memanaskan media
7.	<i>Vortex mixer</i>	Untuk menghomogenkan larutan
8.	Mikropipet 10 - 100 μ	Untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan
9.	Gelas Ukur	Untuk mengukur larutan
10.	Botol Sprayer	Untuk menyimpan alkohol yang digunakan dalam sterilisasi
11.	Inkubator	Alat untuk menginkubasi bakteri
12.	Bunsen	Untuk menyalakan api, sebagai bentuk pencegahan terjadinya kontaminasi
13.	Nampan	Sebagai tempat untuk menaruh alat dan bahan
14.	Timbangan Digital	Untuk menimbang dengan ketelitian 10 ⁻²
15.	Timbangan analitik	Untuk menimbang dengan ketelitian 10 ⁻³
16.	Toples kaca	Untuk tempat maserasi
17.	Oven	Untuk mengeringkan cawan petri
18.	Corong	Untuk membantu memindahkan larutan
19.	Spatula	Untuk menghomogenkan larutan
20.	Jarum Ose	Untuk mengambil bakteri saat akan dikultur
21.	Botol Film	Untuk tempat perendaman kertas cakram dengan ekstrak
22.	<i>Laminar Air Flow (LAF)</i>	Tempat untuk menanam bakteri dalam kondisi steril

23.	Rak Tabung	Untuk meletakkan tabung reaksi
24.	Triangle	Untuk meratakan bakteri saat metode sebar
25.	Rotary Vacum Evaporator	Untuk menguapkan pete dan mendapatkan ekstrak
26.	Gunting	Untuk memotong

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain disajikan pada **Tabel 5** dan untuk gambar bahan penelitian disajikan pada **Lampiran 2**..

Tabel 5. Bahan - Bahan Penelitian yang Digunakan

No.	Bahan	Fungsi
1.	Biji Petai (<i>P. speciosa</i>)	Sebagai bahan yang akan dijadikan ekstrak
2.	Akuades	Sebagai bahan pelarut
3.	Etanol 70%	Sebagai bahan pelarut
4.	Kapas	Untuk menutupi alat pada saat sterilisasi
5.	Kertas label	Untuk penanda
6.	Bakteri <i>V. harveyi</i>	Bahan untuk diamati
7.	TCBSA	Media untuk menumbuhkan bakteri <i>V. harveyi</i>
8.	TSB	Media untuk mengkultur bakteri <i>V. harveyi</i>
9.	TSA	Media untuk menumbuhkan bakteri <i>V. harveyi</i>
10.	MgSO ₄	Bahan untuk kultur bakteri <i>V. harveyi</i>
11.	NaCl	Bahan untuk kultur bakteri <i>V. harveyi</i>
12.	KCl	Bahan untuk kultur bakteri <i>V. harveyi</i>
13.	Alumunium foil	Untuk menutup alat dan mencegah kontaminasi
14.	Kertas Cakram	Bahan untuk mengetahui besar zona bening dari ekstrak yang akan digunakan
15.	DMSO 10%	Sebagai bahan pelarut
16.	Benang Kasur	Untuk mengikat alat yang akan disterilisasi
17.	Tissue	Untuk membersihkan
18.	Kain lap	Untuk membersihkan
19.	Plastic Warp	Untuk membungkus cawan petri
20.	Kertas Koran	Untuk membungkus alat yang akan disterilisasi
21.	Kertas saring	Untuk menyaring simplisia yang telah dimaserasi

22.	Spirtus	Sebagai bahan bakar untuk Bunsen
23.	<i>Crystal violet</i>	Pewarna primer untuk memberi warna bakteri
24.	Yodium	Pewarna untuk memfiksasi pewarna primer
25.	Safranin	Untuk mewarnai kembali sel – sel yang telah kehilangan pewarna utama

3.2 Metode Penelitian

Metode dalam penelitian ini adalah metode eksperimental. Metode eksperimen menurut Sukmadinata (2012), metode eksperimen merupakan suatu metode penelitian yang dapat dilakukan baik pada skala laboratorium maupun skala luar laboratorium. Metode eksperimen terdiri dari satu atau dua lebih variabel terhadap variabel lain. Kemudian karena penelitian ini bersifat percobaan maka semua variabel yang dicoba harus diukur dengan menggunakan instrument yang sudah distandardisasikan. Dalam penelitian ini terdapat kontrol dan perlakuan dimana kontrol digunakan untuk perbandingan hasil.

3.3 Rancangan Penelitian

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

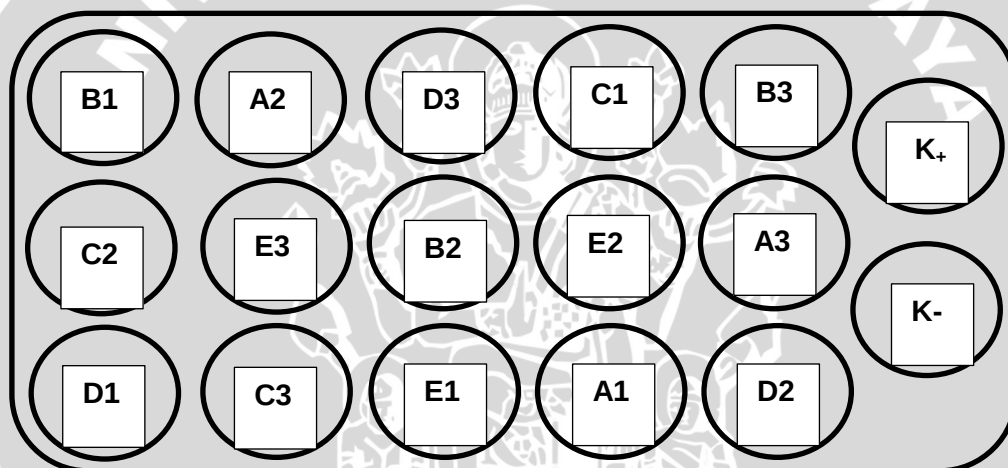
$$Y = \mu + \tau + \varepsilon$$

Keterangan:

- Y : Respon atau nilai pengamatan
- μ : Nilai tengah umum
- T : Pengaruh perlakuan
- ε : Pengaruh galat percobaan

Penelitian dnegan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak biji petai (*P. speciosa*) dengan perlakuan yang diberikan adalah perbedaan konsenterasi ekstrak biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *V. harveyi*. Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan guna mengetahui dosis daya hambat yang tepat dalam penggunaan ekstrak biji petai (*P. speciosa*). Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dengan menggunakan 5 perlakuan dan 2 kontrol yaitu terdiri dari kontrol negatif dan kontrol positif. Adapun rancangan penelitian yang dilakukan disajikan pada

Gambar 4.



Gambar 4. Denah Penelitian

Keterangan:

- A : Perlakuan dengan dosis 50 ppm
- B : Perlakuan dengan dosis 100 ppm
- C : Perlakuan dengan dosis 150 ppm
- D : Perlakuan dengan dosis 200 ppm
- E : Perlakuan dengan dosis 250 ppm
- K+ : Perlakuan dengan konsenterasi ekstrak 100%
- K - : Perlakuan dengan dimetilsukfida (DMSO) 10%
- 1,2,3 : Ulangan

3.4 Pengambilan Data

Proses pengambilan data yang dilakukan dalam penelitian ini adalah observasi langsung. 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.

Observasi merupakan suatu prosedur yang berencana, antara lain meliputi melihat, mendengar serta mencatat sejumlah dan taraf aktifitas tertentu atau situasi tertentu yang ada hubungannya dengan permasalahan yang sedang diteliti. Sehingga dalam melakukan observasi bukan hanya mengunjungi, melihat atau menonton saja, namun disertai keaktifan jiwa atau perhatian khusus dan melakukan pencatatan-pencatatan (Notoatmodjo, 2010).

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Proses Sterilisasi

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi merupakan usaha untuk memusnahkan bakteri yang tidak diinginkan. Sterilisasi dilakukan menggunakan *autoclave* dengan cara sebagai berikut:

- (1) Peralatan yang disterilisasi dicuci terlebih dahulu menggunakan sabun cuci, kemudian dikeringkan dan dibungkus dengan kertas bekas atau kertas Koran, setelah itu diikat dengan menggunakan benang (pada Erlenmeyer dan tabung reaksi bagian lubang atas diberi kapas).
- (2) Dituang akuades secukupnya ke dalam *autoclave*, kemudian peralatan yang telah dicuci dan dibungkus kertas Koran dimasukkan kedalam *autoclave* dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris.

(3) Saklar dinyalakan, setelah itu tombol suhu dan waktu pada *autoclave* diputar sampai batas maximal dan ditunggu sampai keluar uap. Setelah keluar uap klep ditutup. Diatur waktu selama 15 menit dan didiamkan sampai suhu mencapai 121°C dan tekanan 1 atm. Setelah itu alarm akan berbunyi dan saklar segera dimatikan.

(4) Ditunggu sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0 kemudian dibuka kran uap dan dibuka penutup autoklaf dengan cara simetris.

(5) Peralatan yang sudah di sterilisasi daisimpan didalam lemari dan di oven sebelum digunakan, sedangkan untuk bahan yang telah disterilisasi disimpan didalam lemari pendingin.

b. Sterilisasi Tempat Perlakuan

Sterilisasi pada tempat perlakuan juga diperlukan untuk menghindari adanya kontaminasi dari bakteri yang tidak diinginkan. Untuk sterilisasi tempat dapat dilakukan dengan cara menggunakan alkohol 70% (cara kimia) maupun dengan pembakaran langsung maupun dengan penyinaran dengan sinar UV pada *Laminair Air Flow* (LAF). Sebelumnya tangan laboran yang bersinggungan juga harus dalam keadaan aseptis dengan mencuci tangan terlebih dahulu menyemprotkan alkohol.

3.5.2 Pembuatan Media

a. TCBSA (*Thiosulphate Citrat Bile-salt Sucrose Agar*)

Penelitian ini menggunakan bakteri *V. harveyi* sehingga media yang digunakan adalah TCBSA (*Thiosulphate Citrat Bile-salt Sucrose Agar*). TCBSA yang digunakan adalah merk OXOID. Langkah pembuatan media TCBSA adalah sebagai berikut:

(1) Ditimbang NaCl sebanyak 4,69 gram, $1,77\text{ gram MgSO}_4$ dan 0,19 gram KCl dicampur dengan akuades sebanyak 255 ml, setelah itu ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*.

- (2) Setelah itu disterilkan di sterilkan dalam autoklaf dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- (3) Kemudian dicampur dengan TCBSA sebanyak 22,44 gram. Erlenmeyer kemudian diletakkan diatas *hotplate* dan diaduk dengan menggunakan *hotplate* sampai tercampur rata.
- (4) Media yang ingin digunakan dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$, karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang bersuhu tinggi. Media kemudian dituang pada cawan petri yang sudah disterilisasi dan ditunggu hingga dingin, kemudian disimpan didalam lemari pendingin.

b. TSA (*Tryptic Soya Agar*)

TSA (*Tryptic Soya Agar*) digunakan sebagai media untuk peremajaan bakteri yaitu dengan media agar miring. Adapun proses pembuatan media miring agar adalah sebagai berikut:

- (1) Media TSA (*Tryptic Soya Agar*) ditimbang 2 gr dengan menggunakan timbangan digital dicampur dengan 0,03 gram KCl, 0,92 gram NaCl dan 0,34 MgSO_4 .
- (2) Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml.
- (3) Media dilarutkan dengan akuades sebanyak 50 ml dan dihomogenkan.
- (4) Media yang sudah dihomogenkan dimasukkan ke dalam 5 tabung reaksi masing-masing berisi 10 ml.
- (5) Tabung reaksi ditutup dengan menggunakan kapas dan dibungkus dengan aluminium foil kemudian diikat dengan tali.
- (6) Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama ± 15 menit dengan tekanan 1 atm.
- (7) Tabung reaksi yang berisi media steril dimiringkan dengan kemiringan 30° .
- (8) Media ditunggu hingga menjadi padat.

c. TSB (*Tryptic Soy Broth*)

TSB (*Tryptic Soy Broth*) digunakan untuk kultur bakteri *V. harveyi*

Prosedur pembuatan media TSB sebagai berikut:

- (1) TSB ditimbang sebanyak 0,30 gram dilarutkan dalam 10 ml akuades dalam erlenmeyer kemudian dicampur dengan 0,184 gram NaCl, 0,069 gram MgSO₄ dan 0,007 gram KCL.
- (2) Erlenmeyer ditutup dengan kapas hingga tertutup rapat dan dibungkus dengan alumunium foil kemudian diikat dengan menggunakan benang kasur.
- (3) Kemudian TSB disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121⁰ C selama 15 menit.
- (4) Media TSB yang telah steril didiamkan hingga dingin sebelum digunakan

3.5.3 Pembiakan Bakteri *V. harveyi*

Penelitian ini menggunakan bakteri *V. harveyi* yang diperoleh dari isolat murni Balai Besar Budidaya Air Payau Jepara. Isolat murni ini kemudian diremajakan pada media agar miring yaitu dengan menggunakan TSA (*Tryptic Soya Agar*). Langkah pembiakan bakteri *V. harveyi* adalah sebagai berikut:

- (1) Persiapan alat dan bahan yang akan digunakan, media agar yang digunakan adalah TSA (*Tryptic Soya Agar*) miring.
- (2) Jarum osse dipanaskan diatas bunsen sampai berpijar kemudian didiamkan beberapa detik agar tidak terlalu panas dan disentuhkan ke biakkan murni bakteri *V. harveyi*, bakteri diambil sebanyak 1 osse setelah itu digoreskan biakan dari stok bakteri ke media TSA (*Tryptic Soya Agar*) miring yang masih baru.
- (3) Kemudian dibiarkan 12 – 24 jam didalam inkubator dengan suhu 33⁰C.

Untuk mendapatkan bakteri dalam bentuk cair, maka bakteri kembali diremajakan dengan menggunakan metode gores media cair TSB (*Tryptic Soy Broth*), langkah nya adalah sebagai berikut:

- (1) Disiapkan larutan TSB (*Tryptic Soy Broth*) yang sudah steril dan tidak panas.
- (2) Jarum osse dipanaskan diatas bunsen sampai berpijar untuk menghindari adanya kontaminasi.
- (3) Kemudian jarum osse disentuhkan ke media agar (agar jarum osse tidak terlalu panas saat menyentuh bakteri) kemudian diambil biakan murni bakteri *V. harveyi* dan dicelupkan pada media TSB (*Tryptic Soy Broth*).
- (4) Media tersebut diinkubasi selama 24 jam didalam inkubator dengan suhu 31-33°C.
- (5) Setelah 24 jam apabila media berwarna keruh menandakan bahwa bakteri telah tumbuh. Setelah itu dilihat kepadatannya dengan Metode Mc. Farland dengan cara mencocokkan kekeruhannya berdasarkan kepadatan bakteri dengan Mc. Farland. Kepadatan bakteri yang digunakan pada penelitian ini yaitu 10^8 CFU/ml. Kepadatan bakteri 10^8 CFU/ml didapatkan dengan cara mencocokkan kepadatan bakteri pada media cair TSB dengan Mc. Farland berdasarkan kekeruhannya.

3.5.4 Uji Difusi Kertas Cakram

Uji cakram dilakukan untuk mengetahui daya hambat pemberian ekstrak biji petai (*P. speciosa*) dengan melihat zona bening yang berada disekeliling kertas cakram. Seperti pernyataan Miranti, Prasetyorini dan Suwary (2013), metode kertas cakram dilakukan dengan menggunakan pinset steril, kemudian kertas cakram yang steril dan telah ditetesi ekstrak diletakkan dengan menggunakan pinset steril, kertas cakram tersebut kemudian diletakkan diatas lempengan media yang sudah berisi bakteri. Adapun prosedur uji cakram adalah sebagai berikut:

- (1) Cawan petri yang berisi media TCBSA disiapkan sebanyak 20 ml.
- (2) Konsentration dari ekstrak biji petai (*P. speciosa*) disiapkan untuk uji cakram guna mengetahui zona hambatnya.

(3) Bakteri *V. harveyi* yang sudah dikultur di media TSB disiapkan dengan kepadatan 10^8 CFU/ml.

(4) Bakteri *V. harveyi* ditanam pada media TCBSA dengan metode tebar yaitu cawan petri yang sudah berisi media agar dituangkan bakteri sebanyak 0,1 ml menggunakan mikropipet. Kemudian diratakan dengan membentuk angka 8 atau menggunakan *triangle*.

(5) Kertas cakram steril ukuran 6 mm direndam ke dalam ekstrak biji petai (*P. speciosa*) selama 15 menit berdasarkan dosis perlakuan yang telah ditentukan.

(6) Kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak biji petai (*P. speciosa*) ditiriskan dan diletakkan pada permukaan lempeng agar.

(7) 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 dan saat meletakkan kertas cakram tidak boleh bergeser, karena mengurangi validasi pengukuran.

(8) Diinkubasi selama 24 jam pada suhu ruang $31 - 33^{\circ}\text{C}$, kemudian diukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram yaitu area jernih disekeliling kertas cakram menggunakan jangka sorong digital pada 24 jam. Untuk mengetahui sifat bakterisidal (membunuh bakteri) maka dilakukan pengamatan setelah 48 jam.

3.6 Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Proses Pembuatan Ekstrak Biji Petai (*P. speciosa*)

Pembuatan ekstrak dimulai dari persiapan biji petai (*P. speciosa*) sebanyak 3,5 kg, biji petai (*P. speciosa*) yang diperoleh ini kemudian dipotong kecil—kecil menggunakan gunting, setelah itu biji petai yang telah dipotong ini dikeringkan dengan oven selama 72 jam dengan suhu 50°C , kemudian digiling dengan menggunakan blender sampai halus dan menjadi simplisia atau serbuk biji petai (*P. speciosa*) sebanyak 750 gr.

Untuk persiapan *maserasi* (perendaman) langkah pertama adalah serbuk biji petai (*P. speciosa*) ditimbang sebanyak 500 gr dan dimaserasi dalam etanol 70% sebanyak 2,5 liter (1 : 5) selama 1 x 24 jam dalam suhu kamar. Seperti yang dilakukan oleh Hasim, Faridah dan Kurniawati (2015), melakukan metode maserasi pada bunga petai menggunakan 3 pelarut yang berbeda – beda yaitu n – hexan, etanol dan etil asetat dengan konsentersasi 70% perbandingan 1 : 5 selama 24 jam.

Larutan yang diperoleh dari hasil maserasi kemudian di saring dengan menggunakan kertas saring, lalu filtrat yang diperoleh diuapkan dengan menggunakan alat *rotatory vacuum evaporator* selama 5 jam dengan suhu 50⁰ C. Untuk proses pembuatan ekstrak dosis akan disajikan pada **Lampiran 3**.

3.6.2 Pewarnaan Bakteri Uji

Pewarnaan bakteri uji yang dilakukan adalah pewarnaan gram. Pewarnaan bakteri ini dilakukan guna identifikasi dan guna memastikan bahwa tidak ada kontaminasi pada penelitian ini. Langkah pertama adalah objek glass yang digunakan disterilkan terlebih dahulu menggunakan alkohol 70% dan setelah itu dikeringkan. Kemudian jarum osse yang akan digunakan disterilkan dengan membakar diatas bunsen sampai berpijar, dan didiamkan sampai dingin terlebih dahulu. Kemudian diambil 1 ose bakteri dengan menggunakan jarum osse dan diratakan diatas objek glass. Kemudian bakteri difiksasi dengan cara melewati kaca objek diatas api bunsen hingga terbentuk noda pada objek glass. Selanjutnya preparat diwarnai dengan *crystal violet* sebanyak 2 – 3 tetes dan ditunggu selama 1 menit, setelah itu dibilas dengan air mengalir dan dikering anginkan. Setelah kering, ditetesi lugol atau yodium dan didiamkan selama 1 menit, dicuci dengan akuades dan dikering anginkan kembali. Kemudian ditetesi alkohol dan didiamkan selama 30 detik dan dicuci dengan air. Preparat kemudian diwarnai dengan safranin dan didiamkan selama 20 detik, kemudian dicuci

dengan air dan kering anginkan. Setelah itu diamati di mikroskop. Bakteri yang berwarna merah dikategorikan bakteri gram positif, sedangkan bakteri yang berwarna ungu dikategorikan bakteri gram negatif.

3.6.3 Penelitian Pendahuluan Dosis Daya Hambat Biji Petai (*P. speciosa*)

Penelitian pendahuluan dilakukan awal penelitian dengan uji difusi kertas cakram pada media TCBSA yang sudah ditanam bakteri *V. harveyi* dan penggunaan ekstrak biji petai (*P. speciosa*) sebagai antibakteri. Adapun dosis uji difusi kertas cakram pada penelitian pendahuluan adalah 0 ppm, 1 ppm, 5 ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm dan 1000 ppm dengan menggunakan kepadatan bakteri 21×10^8 CFU/ml yang telah dicocokkan dengan Mc Farland. Kemudian diinkubasi didalam inkubator dengan suhu $31 - 33^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam dan diukur zona hambat (area bening disekitar cakram) dengan menggunakan jangka sorong dan diamati lagi pada 48 jam untuk mengetahui sifat antibakteri. Setelah didapat hasil penelitian pendahuluan kemudian dilaksanakan penelitian inti.

3.7 Parameter Uji

3.7.1 Parameter Utama

Parameter utama pada penelitian ini adalah parameter uji yang berupa ukuran diameter zona bening yang dihasilkan setelah dilakukan uji difusi kertas cakram (berdiameter ± 6 mm) dengan menggunakan ekstrak biji petai (*P. speciosa*) dalam satuan milimeter (mm).

3.7.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang adalah parameter uji yaitu berupa suhu inkubasi yang digunakan untuk mengetahui pertumbuhan bakteri *V. harveyi* selama penelitian.

3.8 Analisa Data

Berdasarkan hasil uji daya hambat (zona bening) ekstrak biji petai (*P. speciosa*) 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 yang terbaik.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Ekstraksi Maserasi Biji Petai (*P. speciosa*)

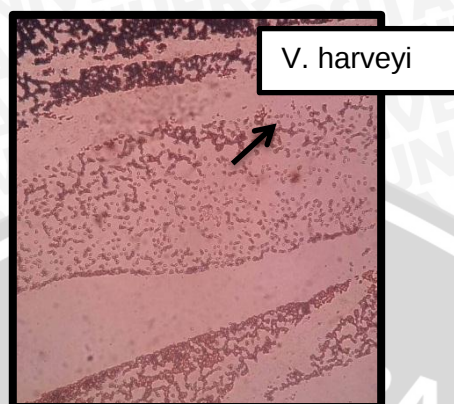
Pada penelitian ini sampel yang digunakan adalah biji petai (*P. speciosa*). Proses ekstraksi dilakukan dengan metode maserasi menggunakan pelarut etanol biji petai (*P. speciosa*). Setelah dilakukan evaporasi selama 5 jam diperoleh ekstrak kental yang berwarna coklat kehitaman pekat dan lengket sebanyak 11,5 gram dan memiliki bau yang sangat tajam seperti bau khas biji petai (*P. speciosa*). Rendemen yang dihasilkan adalah sebesar 2,3 %.

4.2 Identifikasi Bakteri *V. harveyi*

Pada penelitian ini bakteri yang digunakan adalah bakteri isolat murni yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau Jepara. Kemudian dilakukan peremajaan bakteri pada media agar miring menggunakan TSA (*Tryptic Soya Agar*) dalam peremajaan menggunakan metode gores dan pada media cair menggunakan TSB (*Tryptic Soy Broth*).

Identifikasi bakteri yang digunakan dalam penelitian ini uji biokimia yang hasilnya disajikan pada **Lampiran 4** dan juga uji pewarnaan bakteri untuk mengetahui apakah bakteri tersebut termasuk kedalam bakteri gram positif ataupun bakteri gram negatif. Hasil uji pewarnaan bakteri, diperoleh Bakteri *V. harveyi* adalah bakteri gram negatif, berikut ini merupakan gambar hasil pewarnaan uji bakteri *V. harveyi* yang disajikan pada **Gambar 5**. Menurut Pratiwi (2008), apabila bakteri tersebut berwarna merah maka dikategorikan sebagai bakteri gram negatif dan apabila berwarna ungu dikategorikan sebagai bakteri gram positif. Perbedaan warna ini disebabkan oleh adanya perbedaan struktur pada dinding selnya. Dinding sel bakteri gram positif banyak mengandung

peptidoklikan, sedangkan dinding bakteri gram negatif banyak mengandung lipopolisakarida.



Gambar 5. Hasil Pewarnaan Gram Bakteri *V. harveyi* dengan perbesaran 1000x (Dokumentasi Pribadi, 2016)

Perbedaan bakteri gram positif dan bakteri gram negatif ini seperti yang dinyatakan oleh Pleczar dan Chan (2010) yang disajikan pada **Tabel 6**.

Tabel 6. Reaksi Pewarnaan Bakteri

Larutan yang Digunakan	Reaksi dan Tampang Bakteri	
	Gram positif	Gram Negatif
<i>Crystal Violet</i> (CV) Larutan Yodium (Y)	Selnya berwarna ungu Kompleks larutan CV – Y terbentuk di dalam sel, sel tetap berwarna ungu	Selnya berwarna ungu Kompleks larutan CV – Y terbentuk di dalam sel, sel tetap berwarna ungu
Alkohol	Dinding sel akan mengalami dehidrasi, pori – pori menciut, daya rembes dinding sel dan membran menurun, CV – Y tidak dapat keluar dari sel dan sel tetap berwarna ungu	Lipid terekstraksi dari dinding sel bakteri, pori – porinya akan mengembang, kompleks CV – Y keluar dari dinding sel dan sel nya kemudian akan menjadi tidak berwarna
Safranin	Sel bakteri tidak akan terpengaruh dan tetap akan berwarna ungu	Sel bakteri menyerap zat warna safranin dan akan menjadi berwarna merah

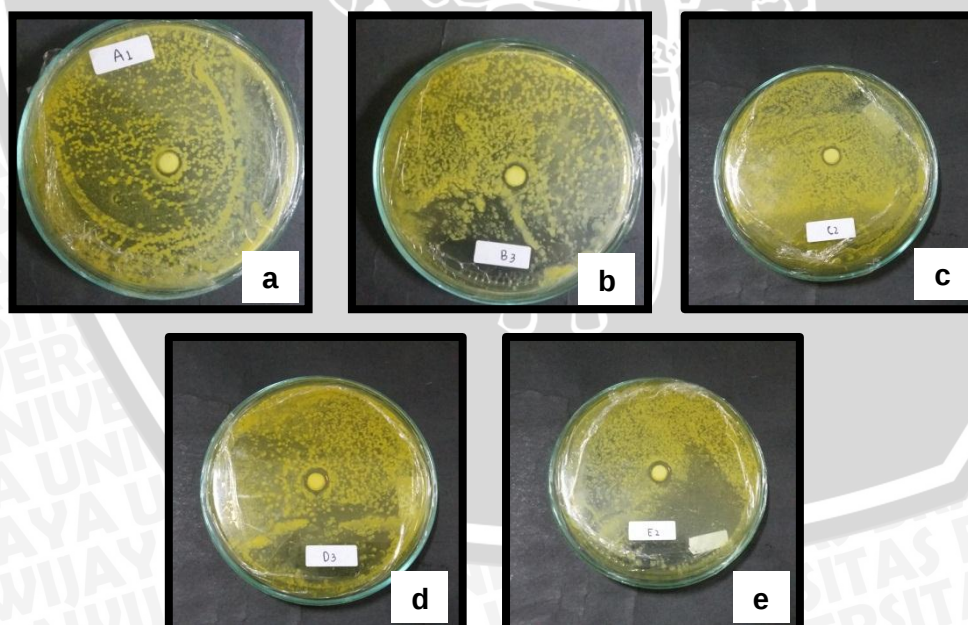
4.3 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan yang dilakukan pada awal penelitian dengan uji difusi kertas cakram pada media TCBSA menggunakan dosis 0 ppm, 1 ppm, 5

ppm, 10 ppm, 25 ppm, 50 ppm, 75 ppm, 100 ppm, 250 ppm, 500 ppm, 750 ppm dan 1000 ppm dengan menggunakan kepadatan bakteri 21×10^8 CFU/ml yang telah dicocokkan dengan Mc Farland. Dimana didapatkan hasil pada dosis 1 – 25 ppm memiliki zona hambat sebesar 0,3 mm – 0,47 mm, sedangkan pada dosis 50 ppm dapat menghambat pertumbuhan bakteri dengan zona hambat 2,88 mm. sehingga dilakukan penelitian pada dosis 50 ppm dan rentang dosis yang digunakan adalah 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm.

4.4 Daya Hambat Ekstrak Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *V. harveyi* dengan Metode Kertas Cakram

Dari hasil pengamatan selama penelitian mengenai uji efektivitas ekstrak biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *V. harveyi* dengan 5 perlakuan dosis yaitu 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm. Pemilihan dosis ini didasarkan atas pendahuluan. Pada penelitian didapat hasil gambar hasil penelitian dengan zona bening yang disajikan pada **Gambar 6** dan **Lampiran 5**.



Gambar 6. Hasil Uji daya Hambat Ekstrak Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *V. harveyi* (a) 50 ppm; (b) 100 ppm; (c) 150 ppm; (d) 200 ppm dan (e) 250 ppm

Pada hasil penelitian dengan kelima dosis ekstrak yang diujikan menunjukkan adanya diameter zona hambat atau zona bening disekitar kertas cakram yang direndam oleh ekstrak biji petai (*P. speciosa*). Menurut Dewi, Ratnasari dan Trimulyono (2014), terbentuknya zona hambat merupakan bentuk penghambatan pertumbuhan bakteri akibat adanya senyawa metabolit sekunder yang memiliki aktivitas antibakteri yang ada pada ekstrak tanaman.

Zona hambat yang yang diberikan setiap perlakuan berbeda-beda. Semakin tinggi dosis, maka zona bening atau zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram semakin besar dan begitu pula sebaliknya, semakin rendah dosis yang diberikan maka zona bening atau zona hambat yang terbentuk disekitar kertas cakram semakin kecil pula. Ajizah (2004), menyatakan bahwa semakin tinggi dosis ekstrak yang diberikan maka akan sedikit jumlah bakteri yang bertahan hidup, hal ini berarti bahwa dengan meningkatnya dosis yang diberikan maka senyawa metabolit sekunder yang terkandung didalamnya semakin besar sehingga semakin besar pula zona hambat yang terbentuk.

Hasil penelitian pada **Gambar 6** dengan dosis perlakuan tertinggi sampai terendah yaitu pada perlakuan E dengan dosis sebesar 250 ppm, perlakuan D dengan dosis sebesar 200 ppm, perlakuan C dengan dosis sebesar 150 ppm, perlakuan B dengan dosis sebesar 100 ppm dan perlakuan A dengan dosis sebesar 50 ppm. Hasil ini telah diamati dan diukur zona bening atau zona hambatnya pada jam ke 24 dan jam ke 48, kemudian hasil pengamatan pada 24 jam dan 48 jam dibandingkan dengan klasifikasi respon hambat menurut Davis dan Stout (1971) yang disajikan pada **Tabel 7**.

Tabel 7. Kretaria Zona Hambat dan Hasil Uji Cakram (mm)

Davis dan Stout (1971)		Hasil Pengamatan 24 jam			Hasil Pengamatan 48 jam		
Zona hambat (mm)	Kriteria	Perlakuan	Zona hambat (mm)	Kriteria	Perlakuan	Zona hambat (mm)	Kriteria
<5	lemah	50 ppm	2	Lemah	50 ppm	3.88	lemah
5 – 10	sedang	100 ppm	2.57	Lemah	100 ppm	4.38	lemah
10 – 20	kuat	150 ppm	3.03	Lemah	150 ppm	4.69	lemah
>20	sangat kuat	200 ppm	3.39	Lemah	200 ppm	5.01	sedang
		250 ppm	3.99	Lemah	250 ppm	5.38	sedang
		K +	30	sangat kuat	K +	33	sangat kuat
		K -	0	tidak ada	K -	0	tidak ada

Keterangan : Hasil diameter zona hambat sudah dikurangi kertas cakram (6 mm)

Berdasarkan tabel klasifikasi respon hambat diatas, maka dapat dilihat bahwa pada 24 jam dengan dosis 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan 250 ppm dengan rata-rata zona hambat 2 mm, 2,57 mm, 3,03 mm, 3,39 mm dan 3,99 mm termasuk kedalam kretaria zona hambat lemah, sedangkan pada pengamatan 48 jam terjadi peningkatan zona hambat pada kelima perlakuan dan pada dosis 200 serta 250 ppm dengan rata-rata zona hambat 5,01 mm dan 5,38 mm termasuk kedalam kretaria zona hambat sedang. Meningkatnya zona hambat dari pengamatan 24 jam sampai 48 jam pada dosis 200 ppm dan 250 ppm menunjukkan bahwa aktivitas antibakteri tersebut bersifat bakterisidal, serta dapat dikatakan bahwa dosis 250 ppm sudah dapat membunuh sehingga dosis 250 ppm lebih efektif. Anita, Khotimah dan Yanti (2014), menyatakan sifat antibakteri mempunyai efek bakterisidal yang ditandai dengan adanya peningkatan diameter zona hambat.

Untuk kontrol negatif yang digunakan dalam penelitian ini adalah pelarut DMSO 10 %. Kertas cakram ditetaskan pada pelarut DMSO 10 % dan hasil dari zona hambat kontrol negatif adalah 0 mm, hal ini menunjukkan bahwa penggunaan pelarut DMSO tidak mempengaruhi hasil uji antibakteri dari ekstrak,

sedangkan untuk kontrol positif menggunakan konsentration ekstrak biji petai (*P. speciosa*) 100% diperoleh hasil rata – rata zona hambat sebesar 30 mm.

Hasil perhitungan rata-rata zona hambat dengan ekstrak biji petai (*P. speciosa*) menggunakan 5 perlakuan dosis yang berbeda dan 3 kali ulangan disajikan pada **Tabel 8**.

Tabel 8. Hasil Rata-Rata Zona Bening Bakteri *V. harveyi* (mm)

Perlakuan	Ulangan			Total (mm)	Rerata (mm)
	1	2	3		
A (50 ppm)	3,93	3,95	3,76	11,64	3,88
B (100 ppm)	4,26	4,5	4,37	13,13	4,38
C (150 ppm)	4,55	4,78	4,74	14,07	4,69
D (200 ppm)	4,82	4,83	5,37	15,02	5,01
E (250 ppm)	5,22	5,24	5,68	16,14	5,38
Total				70,00	

Berdasarkan tabel diatas menunjukkan hasil pengukuran zona hambat atau zona bening ekstrak biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *V. Harveyi* yang terbesar adalah pada dosis 250 ppm dengan rata – rata zona hambat 5,38 mm, hal ini dimungkinkan karena lebih banyaknya bahan aktif pada dosis 250 ppm. Sementara untuk hasil rata – rata zona hambat terendah adalah pada dosis 50 ppm yaitu sebesar 3,88 mm. Setelah pengukuran zona hambat dilanjutkan dengan perhitungan menggunakan sidik ragam yang bertujuan untuk mengetahui pengaruh ekstrak biji petai terhadap pertumbuhan *V. harveyi*. Hasil sidik ragam mengenai pengaruh pemberian ekstrak biji petai terhadap *V. harveyi* disajikan pada **Tabel 9**, sementara untuk perhitungan sidik ragamnya disajikan pada **Lampiran 6**.

Tabel 9. Sidik Ragam Zona Bening Bakteri *V. harveyi*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	3.9838	0.99595	24.05**	3.48	5.99
Acak	10	0.4141	0.04141			
Total	14					

Keterangan : **) Berbeda Sangat Nyata

Pada hasil tabel sidik ragam diatas menunjukkan bahwa pengaruh ekstrak biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *V. harveyi* adalah berbeda sangat nyata. Hal ini ditunjukkan oleh hasil perhitungan nilai F Hitung yang lebih besar dari nilai F Tabel 1% dan F Tabel 5 % atau nilai 24,05 yang lebih besari dari nilai 5,99 dan 3,48. Maka H_0 ditolak, yang berarti bahwa ekstrak biji petai (*P. speciosa*) memiliki pengaruh terhadap bakteri *V. harveyi*. Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan pengaruh antar lima perlakuan, maka dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang disajikan pada **Tabel 10**.

Tabel 10. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil Ekstrak Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *V. harveyi*

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		3.88	4.38	4.69	5.01	5.38	
A	3.88	-					a
B	4.38	0.50*	-				b
C	4.69	0.81**	0.31 ^{ns}	-			bc
D	5.01	1.13**	0.63**	0.32 ^{ns}	-		cd
E	5.38	1.50**	1.00**	0.69**	0.37 ^{ns}	-	d

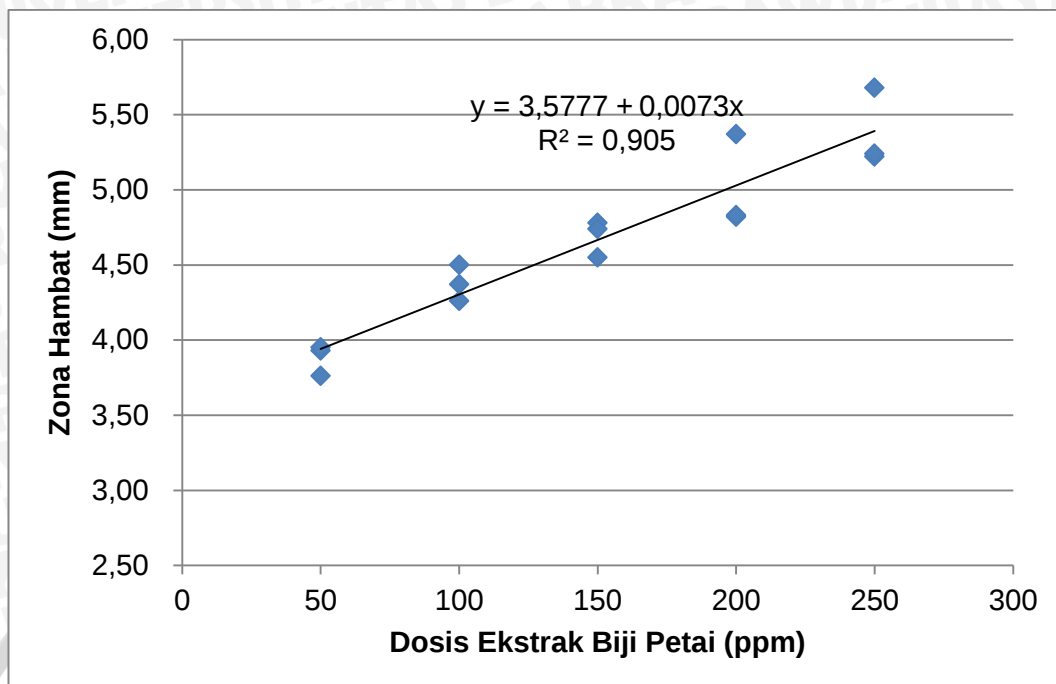
Keterangan : *) Berbeda Nyata

Keterangan : **) Berbeda Sangat Nyata

Berdasarkan Tabel diatas dapat dilihat bahwa nilai hasil perlakuan E (250 pm) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A (50 ppm). Kesimpulan dari uji BNT ini didapat dari hasil selisih antara perlakuan (rata – rata) yang dibandingkan dengan nilai BNT 5% dan nilai BNT 1 % yang disajikan pada **Lampiran 6**. Perbedaan notasi dari tiap perlakuan ini dikarenakan perlakuan E dengan dosis 250 ppm mampu menghambat paling baik daripada dosis lainnya yang ditunjukkan pula dengan lebar dari zona hambat bakteri uji.

Untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) setiap perlakuan dengan parameter yang diuji atau zona hambat bakteri *V. harveyi*, maka dilakukan uji polynomial orthogonal. Hasil dari uji polynomial orthogonal disajikan pada

Gambar 7.



Gambar 7. Grafik Hubungan Zona Hambat antar Perlakuan Ekstrak Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *V. harveyi*

Berdasarkan hasil Uji polinomial orthogonal yang ditunjukkan pada gambar diatas menunjukkan bahwa hubungan antara perbedaan konsententrasi ekstrak biji petai (*P. speciosa*) terhadap diameter zona hambat bakter *V. harveyi* menghasilkan hubungan atau grafik secara linear. Dari gambar tersebut nampak bahwa perlakuan ini menghasilkan garis perpotongan membentuk grafik linear dengan persamaan $y = 3.5777 + 0.0073x$ dengan nilai koefisiensi determinasi (R^2) sebesar 0.905 yang berarti bahwa ekstrak tersebut mampu menghambat pertumbuhan bakteri sebesar 90,5% dan sisanya dipengaruhi oleh faktor lain dan koefisien korelasi (r) sebesar 0,951 yang memiliki arti bahwa hubungan antara sumbu X dan sumbu Y adalah sangat rekat (hampir mendekati 1). Grafik diatas menunjukkan bahwa dari 5 perlakuan dosis yaitu 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm dan dosis 250 ppm yang merupakan dosis maksimal ekstrak biji petai (*P. speciosa*). Kemampuan ekstrak biji petai (*P. speciosa*) pada dosis 250 ppm ini dapat memberikan diameter zona hambat yang paling besar dibandingkan

dengan 4 perlakuan yang lain. Perbedaan zona hambat tersebut dipengaruhi oleh tingginya jumlah dosis bahan aktif yang meresap kedalam kertas cakram, sesuai dengan pernyataan Lingga dan Rustama (2005), semakin tinggi konsentration bahan antibakteri yang diberikan maka aktivitas antibakterinya akan semakin kuat.

Meningkatnya zona hambat ini disebabkan oleh kandungan senyawa metabolit sekunder yang terdapat dalam biji petai (*P. speciosa*) yaitu alkaloid, flavonoid, fenol dan terpenoid. Seperti yang dinyatakan oleh Kar (2007) bahwa alkaloid cukup larut dalam pelarut alkohol seperti etanol dan methanol. Alkaloid didalam tumbuhan berfungsi sebagai zat beracun sehingga dapat melindungi serangan hewan herbivora atau serangga. Santoso, Praharani dan Purwanto (2012) menambahkan, senyawa alkaloid sebagai antibakteri memiliki mekanisme yang diduga adalah dengan mengganggu komponen penyusun peptidoglikan pada sel bakteri, sehingga akibatnya lapisan dari sel bakteri tidak terbentuk secara utuh dan menyebabkan kematian pada sel bakteri.

Anyasor, Aina, Olushola dan Aniyika (2011), menyatakan bahwa aktivitas antibakteri dari ekstrak tanaman kemungkinan disebabkan senyawa kimia flavonoid yang berikatan dengan dinding sel bakteri dan menghambat biosintesisnya. Mekanisme kerja antibakteri senyawa flavonoid adalah dengan membentuk senyawa yang kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan kemudian diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler, selain itu flavonoid juga dapat mengganggu proses metabolisme energi dengan cara menghambat sistem respirasi sel bakteri. Sistem respirasi diperlukan untuk menghasilkan energi yang cukup dan energi dibutuhkan untuk penyerapan berbagai metabolit dan biosintesis makromolekul. Jika terjadi gangguan regulasi tersebut dapat menyebabkan bakteri lisis (Ngajow, Abidjulu dan Kamu, 2013).

Senyawa fenol memiliki mekanisme dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara berinteraksi terhadap sel bakteri melalui absorpsi sehingga mengakibatkan terjadinya ikatan hidrogen. Pada kadar rendah protein masuk ke dalam sel dan menyebabkan protein mengalami penguraian selanjutnya protein akan terdenaturasi. Pada kadar tinggi fenol menyebabkan koagulasi protein sehingga membran mengalami kebocoran, sel bakteri akan kekurangan nutrisi dan sel mengalami lisis yang akhirnya mati (Dewi, Ratnasari dan Trimulyono, 2014).

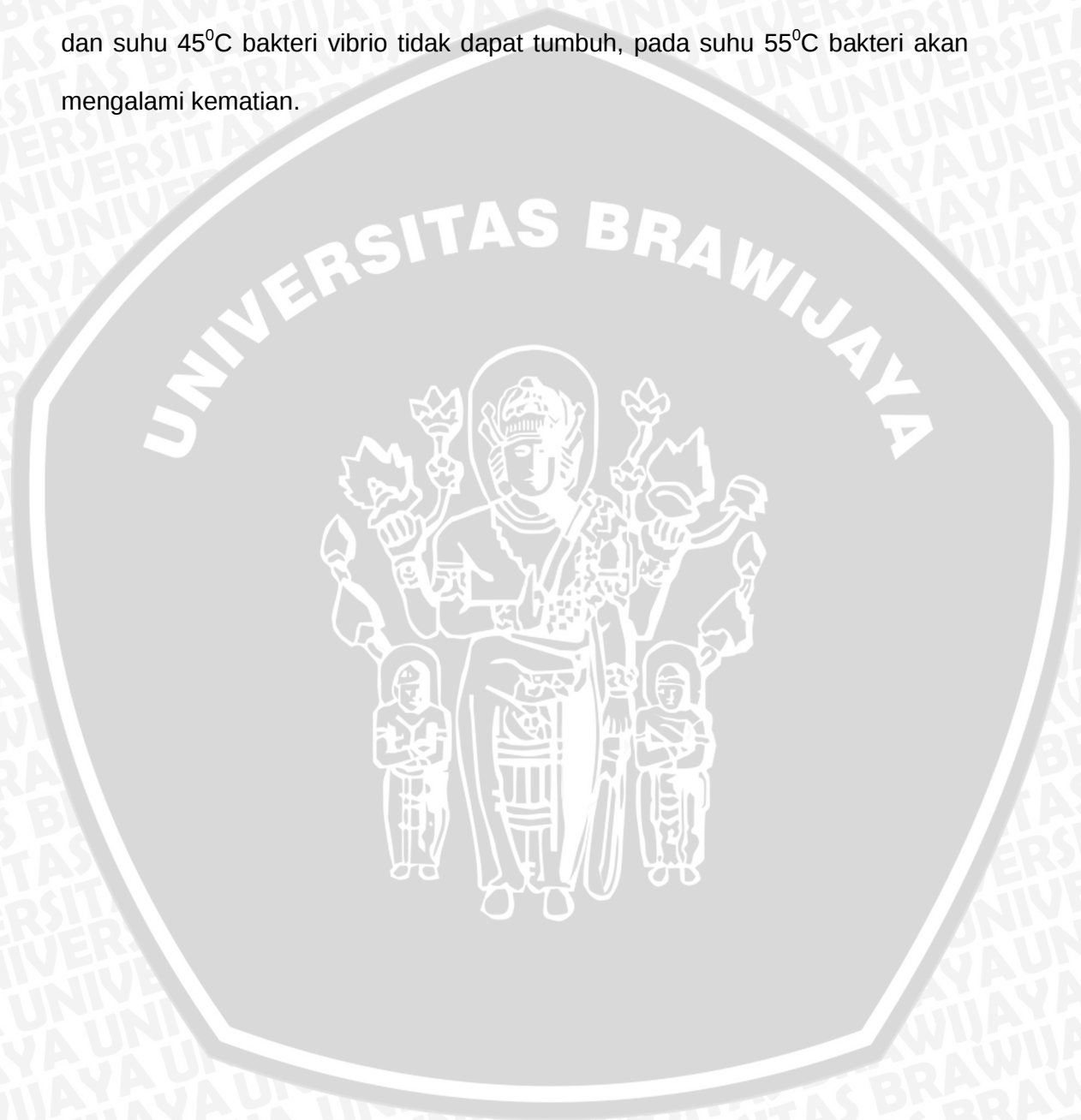
Senyawa terpenoid memiliki sifat antibakteri dengan merusak membran sel, seperti yang dijelaskan oleh Rachmawati, Nuria dan Sumantri (2011) bahwa mekanisme aksi dari senyawa terpenoid yaitu terpenoid beraksi dengan porin (protein transmembran) pada membran luar dinding sel bakteri kemudian membentuk ikatan polimer yang kuat antara terpenoid dan porin sehingga mengakibatkan rusaknya porin. Porin merupakan pintu keluar masuknya senyawa, sehingga apabila porin rusak mengalami kematian.

Berdasarkan pembahasan diatas, dapat diketahui bahwa ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) memiliki kemampuan untuk menghambat pertumbuhan bakteri patogen *V. harveyi* karena di dalam ekstrak tersebut terdapat senyawa metabolit sekunder yang memiliki senyawa antibakteri yaitu seperti alkaloid, flavonoid, fenol, dan terpenoid.

4.5 Parameter penunjang

Parameter penunjang yang digunakan dalam penelitian ini adalah suhu inkubasi bakteri *V. harveyi* selama penelitian berlangsung, suhu sendiri merupakan faktor utama yang sangat penting dalam penunjang laju pertumbuhan bakteri. Suhu inkubasi bakteri *V. harveyi* yang digunakan selama penelitian adalah 31 – 33°C yang masih dapat dikatakan suhu optimum dalam kondisi

biakan. Menurut Pelczar dan Chan (2010), suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri mesofil $20 - 37^{\circ}\text{C}$ sedangkan untuk kondisi biakan (inkubasi) adalah $25 - 40^{\circ}\text{C}$. Menurut Prajitno (2005), suhu optimum yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio* berkisar antara $30 - 35^{\circ}\text{C}$, sedangkan pada suhu 4°C dan suhu 45°C bakteri *vibrio* tidak dapat tumbuh, pada suhu 55°C bakteri akan mengalami kematian.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang pengaruh pemberian ekstrak biji petai (*P. speciosa*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* secara *in vitro* diperoleh kesimpulan bahwa hasil uji efektifitas antibakterial dengan menggunakan uji cakram menunjukkan ekstrak biji petai (*P. speciosa*) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dengan dosis daya hambat maksimal pada penelitian ini yaitu sebesar 250 ppm dengan zona hambat 5,38 mm dan bersifat bakterisidal (dapat membunuh bakteri) yang dapat dilihat pada meningkatnya zona hambat pada pengamatan pada 24 jam ke 48 jam.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian ini maka disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang Uji efektifitas ekstrak biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *V. harveyi* untuk mencari dosis optimal serta dengan pemberian pelarut yang berbeda dan dilanjutkan uji *in vivo* menggunakan biota laut yang terinfeksi bakteri *V. harveyi*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonim. 2012. Perkembangan Beberapa Indikator Utama Sosial Ekonomi Indonesia. Jakarta. Badan Pusat Statistik. 230 hlm.
- Ajitama, P., D. Suryanto dan Y. Djayus. 2014. Jenis-jenis Bakteri Gram Negatif Potensial Patogen Pada Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus tauvina*) Di Keramba Jaring Apung Perairan Belawan. *Jurnal Aquacoatmarine*. **5** (4): 132-146.
- Ajizah, A., 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun *Psidium gujava* L. *Biosciectiae*. **1** (1): 31 – 38
- Akbar, S. dan Sudaryanto. 2002. Pembenihan dan Pembesaran Kerapu Bebek. Penebar Swadaya. Jakarta. 104 hlm.
- 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.
- Anita, A., S. Khotimah, A. H. Yanti. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Benalu Jambu Air (*Dendrophoe pentandra* (L.) Miq) Terhadap Pertumbuhan *Salmonella typhi*. *Jurnal Protobiont*. **3** (2): 268-272.
- Anyasor, G. N., Aina D.A, Olushola M., Aniyika A.F. 2011. *Phytochemical constituent, proximate analysis, antioxidant, antibacterial and wound healing properties of leaf extracts of Chromolaena*. Ann. Biol. Res. **2**(2): 441 – 451.
- Arikunto, S. 2002. Prosedur Penelitian Suatu Pendekatan Praktek. Rineka Cipta. Jakarta. 342 hlm.
- Brooks, G. F., J. S. Butel dan S. A. Morse. 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Penerbit Salemba Medika. Jakarta. 528 hlm.
- Chatterjee, S. dan S. Haldar. 2012. *Vibrio* Related Disease In Aquaculture And Development Of Rapid And Accurate Identification Methods. *J. Marine Sci Res Dev*. **1** (2): 1-7.
- Chooi, Ong Hean. 2007. Sayuran Khasiat Makanan dan Ubatan. PRIN-AD SDN. BHD. Kuala Lumpur. 148 hlm.
- Davis, W. W, dan Stout, T. R. 1971. *Disc Plate Methods of Microbiological Antibiotic Assay*, *Microbiology*. **22** (4) 659-670.
- Dewi, M. K., Ratnasari, E dan Trimulyono, G. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Daun Majapahit (*Crescentia cujete*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Ralstonia solanacearum* Penyebab Penyakit Layu. *Lentera Bio*. **3** (1): 51-57.
- Evan, Y. 2009. Uji Ketahanan Beberapa Strain Larva Udang Galah (*Macrobrachium rosenbergii* de Man) Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor: Bogor. 60 hlm.

- Garno, Y. S., 2004. Pengembangan Budidaya Udang dan Potensi Pencemarannya Pada Perairan Pesisir. *Jurnal Teknik Lingkungan*. **5** (3): 187 - 192
- Hardiyani, S. 2014. Uji Patogenitas dan Studi *in vivo* Bakteri Biokontrol *Bacillus* sp. D2.2 Terhadap *Vibrio alginolyticus* Pada Pemeliharaan Udang Vaname (*Litopennaeus vannamei*). Skripsi. Universitas Lampung. Bandar Lampung. 62 hlm.
- Hasim, D. N. Faridah dan D. A. Kurniawati. 2015. *Antibacterial Activity of Parkia speciosa Hassk. Peel to Escherichia coli and Staphylococcus aureus bacteria*. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **7** (4): 239 – 243.
- Istiqomah. 2013. Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis retrofracti frucus*). Skripsi. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta. 82 hlm
- Kamisah, Y; Othman, F; Qodriyah, M. S.; dan Jaarin, K. 2013. *Parkia speciosa Hassk.: A Potential Phytomedicine, Evidence-Based Complementary and alternative Medicine*. 9 hlm.
- Kar, A. 2007. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*, 2nd edition, diterjemahkan oleh Shinta Rachmawati dan Ryeska Fajar Respaty. Penerbit Buku Kedokteran Jakarta. 888 hlm.
- Lingga, M. A. dan M.M. Rustama. 2005. Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Air dan Etanol Bawang Putih (*Alium sativum* L.) terhadap Bakteri Gram Negatif dan Gram Positif yang Diisolasi dari Udang Dogol (*Metapenaeus monoceros*). Udang Lobster (*Parulirus* sp.) dan Udang Rebon (*Mysis Acetes*). Jurusan Biologi FMIPA Universitas Padjajaran. Bandung. 72 hlm.
- Maulina, Ine; Asep agus Handaka dan Indah Riyantini. 2012. Analisis prospek budidaya tambak udang di Kabupaten Garut. *Jurnal Akuatika*. **3** (1): 49-62.
- Miranti, M., Prasetyorini dan C. Suwary. 2013. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 30 % dan 96% Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa*L) Terhadap Bakteri *Streptococcus aureus*. *Jurnal Ekologia*. **13** (1): 9- 18.
- Muhammed, S; Shamsuddin; Rehman; Sulaiman S dan Abdullah F. 1987. *Some nutritional and anti nutritional components in jering (pithecellobium jeringa) kerdas (pithecellobium microcarpum) and association with pregnancy outcome in Korean pregnan women, petai (Parkia speciosa)*. *Pertanika*. **10** (1): 61- 68.
- Munawaroh, S. dan P.A. Handayani. 2010. Ekstraksi Minyak Daun Jeruk Purut (*Citrus hystrix* D. C) dengan Pelarut Etanol dan N-Heksana. *Jurnal Kompetensi Teknik*. **2** (1): 73-78.

- Niswah, Lukluatun. 2014. Uji Aktivitas Antibakteri dari Ekstrak Buah Parijoto (*Medinilla speciosa* Blume) Menggunakan Metode Difusi Cakram. Skripsi. UIN Syarif Hidayatullah Jakarta. 51 hlm.
- Ngajow, M., Abidjulu, J., dan Kamu, V. S. 2013. Pengaruh Antibakteri Ekstrak Kulit Batang Matoa (*Pometia pinnata*) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* Secara in vitro. Jurnal MIPA UNSRAT. **2** (2): 128 – 132.
- Notoatmodjo, S. 2010. Metodologi Penelitian Kesehatan. Rineka Cipta. Jakarta. 243 hlm.
- Noverita., D. Fitria., dan E. Sinaga. 2009. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri Jamur endofit dari daun dan rimpang *Zingiber ottensii* val. Jurnal Farmasi Indonesia. **4**(4): 173-174.
- Nuria, Maulita Cut; Arfin Faizatul dan Sumantri. 2009. Uji Aktifitas Antibakteri Eksrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATC 25923, *Escherchia coli* ATCC 25922 dan Daun *Salmonella typhi* ATCC 1408. Mediagro. **5**(2): 26 – 37.
- Pelczar, M.J dan E. C. S. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi I. Universitas Indonesia. Jakarta. 443 hlm.
- ., dan E. C. S. Chan 2010. Dasar-dasar Mikrobiologi I. Universitas Indonesia. Jakarta. 443 hlm.
- Prajitno, A. 2005. Diktat Parasit dan Penyakit Ikan. Fakultas Perikanan. Universitas Brawijaya : Malang. 105 hlm.
- . 2007. Penyakit Ikan – Udang: Bakteri. UM Press. Malang. 115 hlm.
- Pratiwi, Sylvia T. 2008. Mikrobiologi Farmasi. Erlangga: Jakarta. 256 hlm.
- Rachmawati, F., M. C. Nuria dan Sumantri. 2011. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Kloroform Ekstrak Etanol Pegagan (*Centella asiatica*) Serta Identifikasi Senyawa Aktifnya. 7 hlm.
- Roihanah, S., Sukoso dan Andayani S. 2012. Akitivitas antibakteri ekstrak teripang *Holothuria* sp. terhadap bakteri *Vibrio harveyi* secara in vitro. **2**(1): 1-5.
- Rugayah, Arief Hidayat dan Ujang Hafir. 2014. Kedawung (*Parkia timoriana*) dan Kerabatnya di Jawa; Petir (*P. Intermedia*) dan Petai (*P. speciosa*). Berita Biologi. **13**(2): 143- 152.
- Santoso, R. M., D. Praharani dan Purwanto. 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Pare (*Momordica charantia*) Dalam Menghambat Pertumbuhan *Streptococcus viridans*. Artikel Penelitian Mahasiswa. Universitas Jember. Jember. 7 hlm.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Yogyakarta. 242 hlm.

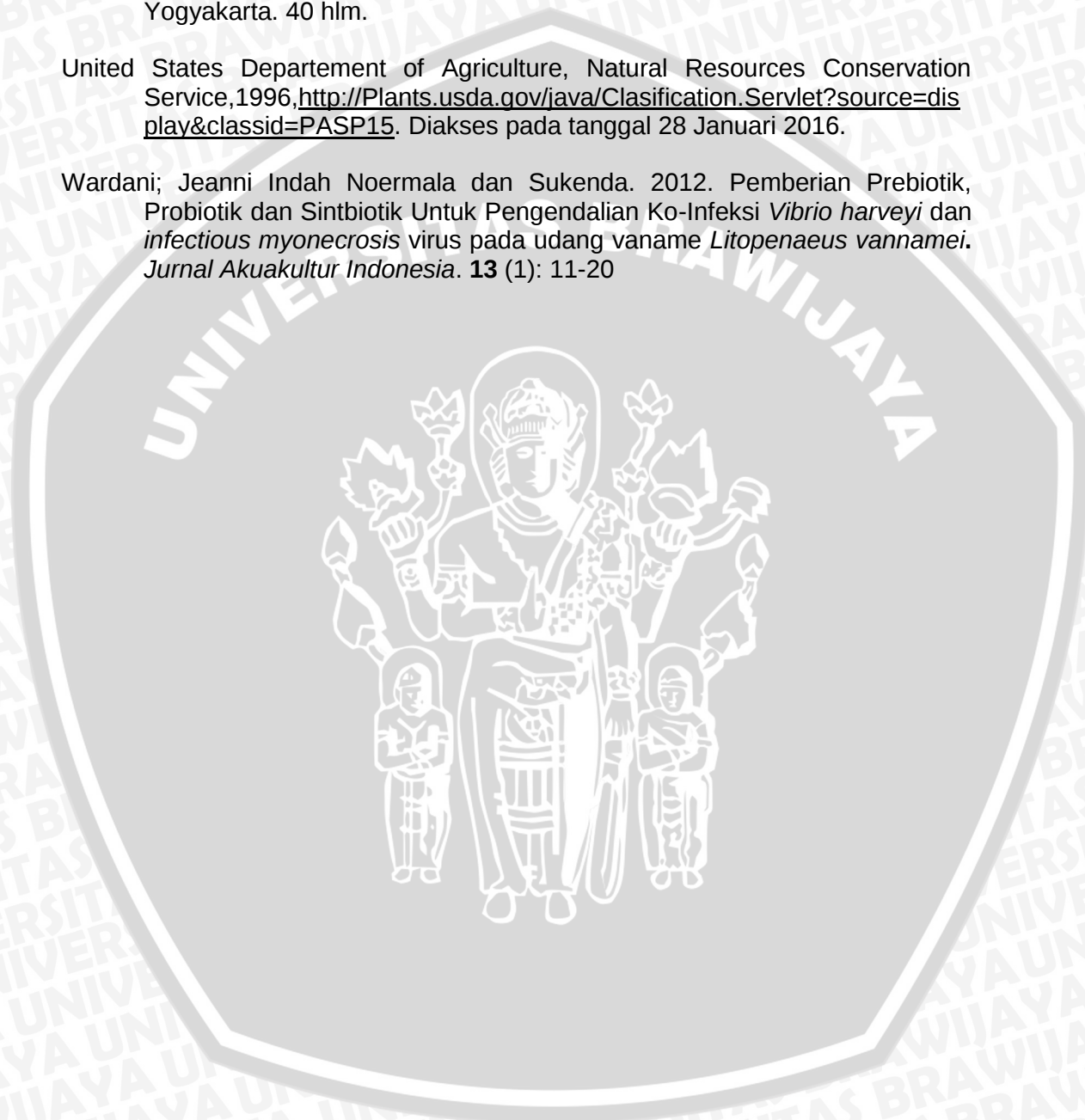
Siedel, V 2008. *Initial and Bulk Extraction Natural products Isolation*. 2nd Ed, Humana Press, New Jersey. 33 – 34.

Sukmadinata, N. S. 2012. *Metode Penelitian Pendidikan*. Remaja Rosdakarya: Bandung. 326 hlm.

Sunanto, Hatta. 1992. *Budidaya Petai dan Aspek Ekonominya*. Kanisius. Yogyakarta. 40 hlm.

United States Departement of Agriculture, Natural Resources Conservation Service, 1996, <http://Plants.usda.gov/java/Classification.Servlet?source=display&classid=PASP15>. Diakses pada tanggal 28 Januari 2016.

Wardani; Jeanni Indah Noermala dan Sukenda. 2012. Pemberian Prebiotik, Probiotik dan Sintbiotik Untuk Pengendalian Ko-Infeksi *Vibrio harveyi* dan *infectious myonecrosis virus* pada udang vaname *Litopenaeus vannamei*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **13** (1): 11-20



LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto Peralatan Penelitian



Inkubator



Laminair Air Flow



Timbangan Digital



Desikator



Oven



Autoklaf



Lemari Pendingin



Hot Plate



Bunsen dan Korek



Botol Film



Rak Tabung



Toples Kaca



Erlenmeyer



Gelas Ukur



Nampan



Gunting dan cutter



Spatula



Triangle



Micropipet dan Blue tip



Cawan Petri



Tabung Reaksi



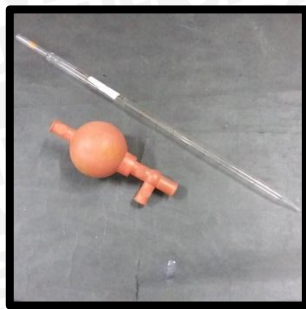
Pinset



Corong



Gelas Ukur



Pipet Volume dan Bola Hisap



Botol Spray



Vortex Mixer



Rotary Vacum Evaporator



Timbangan Sartorius



Jarum osse



Jangka Sorong

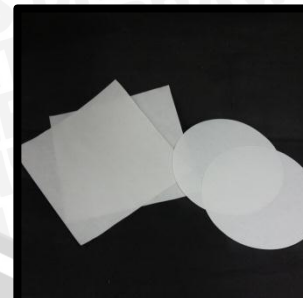
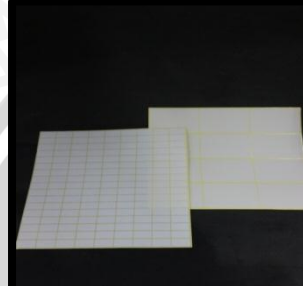


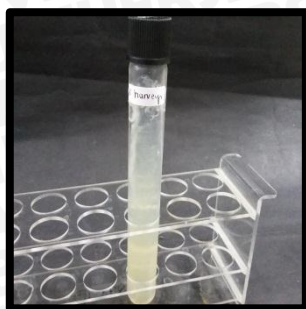
Mikroskop



Pipet Tetes

Lampiran 2. Foto Bahan – bahan Penelitian

		
Plastic Warp dan Alumunium Foil	Benang Kasur	Kertas Saring
		
Kertas Label	Kapas	Ekstrak Biji Petai (<i>P. speciosa</i>)
		
MgSO₄, KCl, NaCl	Akuades	Kertas Cakram
		
Tissue	DMSO 10%	Etanol



Isolat Murni Bakteri *V. harveyi*



TSB (Tryptic Soy Broth)



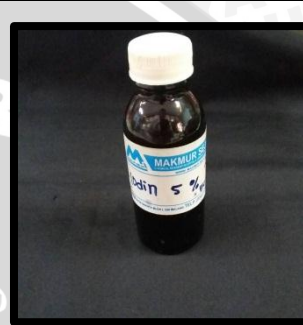
TSA (Tryptic Soya Agar)



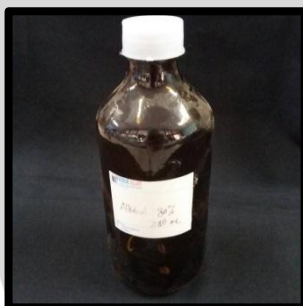
TCBSA (Thiosulfat Citrat Bile-salt Agar)



Crystal Violet



yodium



Alkohol



Biji Petai (*P. speciosa*)



Safranin

Lampiran 3. Pembuatan Ekstrak Dosis Uji

Dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 50 ppm, 100 ppm, 150 ppm, 200 ppm, 250 ppm dimana untuk pembuatannya dicampurkan dengan 3 ml pelarut DMSO 10 % seperti yang dijelaskan dibawah ini :

(1) 1000 ppm (sebagai stok)

Pembuatan dosis 1000 ppm
adalah dengan mencampur
ekstrak sebanyak 10 mg dan
DMSO sebanyak 10 ml

(2) 250 ppm

$V1 \times N1 = V2 \times N2$
 $1000 \times V1 = 250 \times 3 \text{ ml}$
 $V1 = 0,75 \text{ ml}$
DMSO10%= 2,25 ml

(3) 200 ppm

$1000 \times V1 = 200 \times 3 \text{ ml}$
 $V1 = 0,6 \text{ ml}$
DMSO10%= 2,4 ml

(4) 150 ppm

$1000 \times V1 = 150 \times 3 \text{ ml}$
 $V1 = 0,45 \text{ ml}$
DMSO10%= 2,55 ml

(5) 100 ppm

$1000 \times V1 = 100 \times 3 \text{ ml}$
 $V1 = 0,3 \text{ ml}$
DMSO10%= 2,7 ml

(6) 50 ppm

$1000 \times V1 = 50 \times 3 \text{ ml}$
 $V1 = 0,15 \text{ ml}$
DMSO10%= 2,85 ml

(7) Kontrol +

(Konsentrasi 100%)

Dengan menggunakan ekstrak
sebanyak 1 gr dan DMSO
sebanyak 1 ml.

Lampiran 4. Uji Biokimia

52



**KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA
BALAI BESAR PERIKANAN BUDIDAYA AIR PAYAU**

LABORATORIUM UJI BBPAP JEPARA

Alamat surat: PO Box 1 Jepara, Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418
Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724
Email : bbbapjpr@rad.net.id Website : udang-bbbap.com



LAPORAN HASIL UJI

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

Uji Bio Kimia	<i>Vibrio harveyi</i>
TCBS	+
Bentuk	batang
Cat Gram	—
Swarming	—
Growth with 0% NaCl	—
Arginine decarboxilase	—
Lysine decarboxilase	+
Ornithine decarboxilase	+
Nitrat reduced	+
Oxidase	+
Gas from Glucose	—
Indol	+
ONPG	—
VP	—
Resisten to :	
0/129 10 µg	+
0/129 150 µg	—
ampicillin 10 µg	+
Starch Hydrolysis	+
Urea Hydrolysis	+
Acid from :	
L-arabinose	—
Arbutin	—
Salicin	+
Sucrose	+
Xylose	—
Growth on :	
Ethanol	—
Propanol	—

Lab. Mikrobiologi BBPAP Jepara

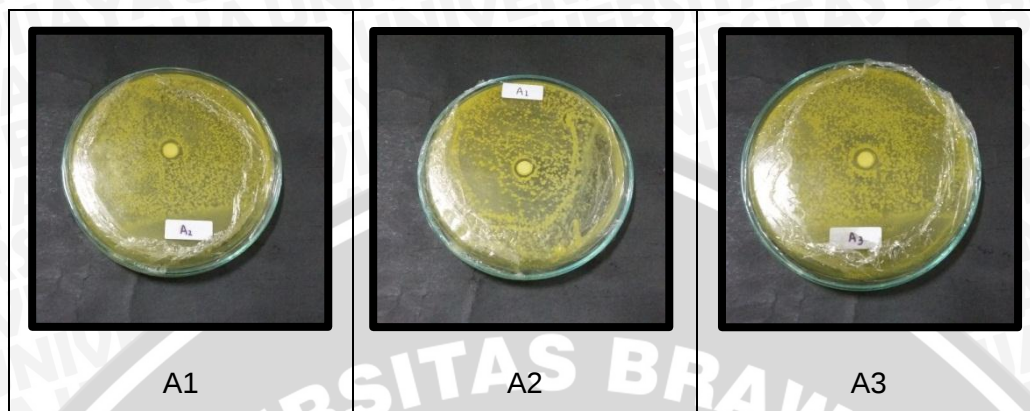
Penyelia

Sri Murti Astuti, SP.



Lampiran 5. Hasil Uji Cakram Ekstrak Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *V. harvey*

(1) Perlakuan A Dosis 50 ppm



(2) Perlakuan B Dosis 100 ppm



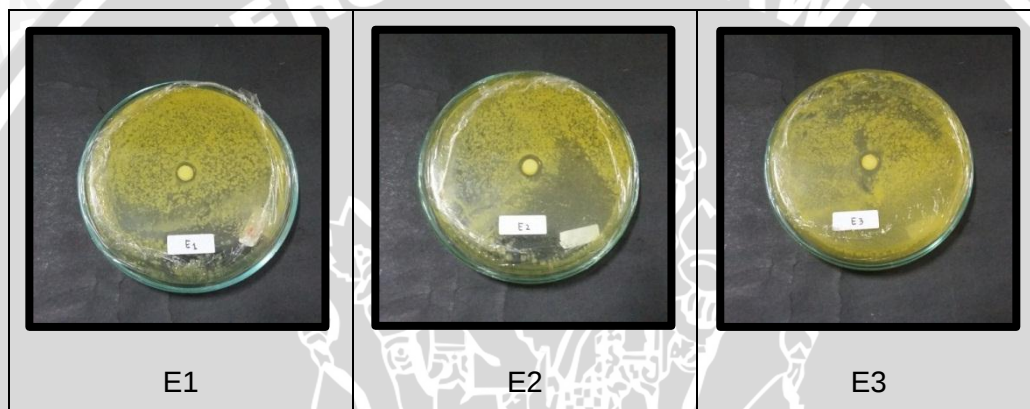
(3) Perlakuan C Dosis 150 ppm



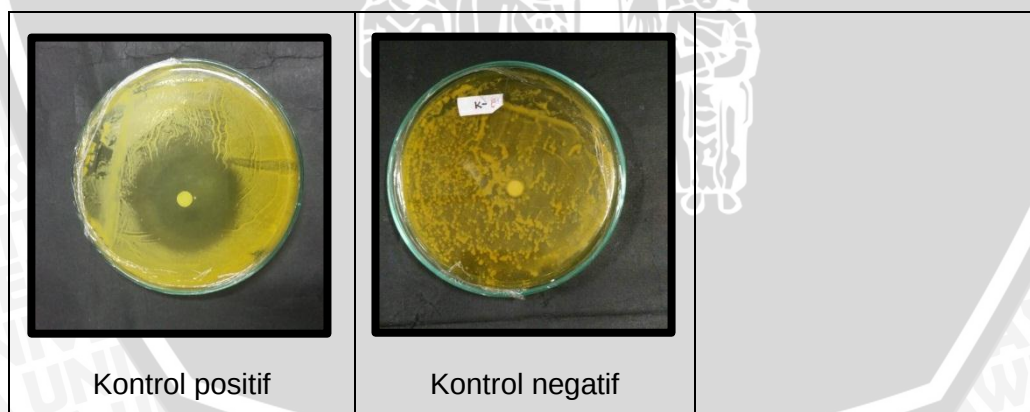
(4) Perlakuan D Dosis 200 ppm



(5) Perlakuan E Dosis 250 ppm



(6) Kontrol positif dan Kontrol negatif



Lampiran 6. Analisis Data Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Zona Hambatan (mm) Bakteri *V. harveyi* Secara in vitro

Perlakuan	Ulangan			Total	Rerata
	1	2	3		
A (50 ppm)	3,93	3,95	3,76	11,64	3,88
B (100 ppm)	4,26	4,50	4,37	13,13	4,38
C (150 ppm)	4,55	4,78	4,74	14,07	4,69
D (200 ppm)	4,82	4,83	5,37	15,02	5,01
E (250 ppm)	5,22	5,24	5,68	16,14	5,38
Total				70,00	

Perhitungan:

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

$$= \frac{70^2}{15}$$

$$= 326,6667$$
- Jumlah Kuadrat (JK total) $= \sum x_{ij}^2 - FK$

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

$$= (3,93^2 + 3,95^2 + 3,76^2 + \dots + 5,68^2) - 326,6667$$

$$= 4,3979$$
- JK Perlakuan $= \frac{\sum (\sum x_i)^2}{r} - FK$

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

$$= \frac{22,13^2 + 14,96^2 + 25,78^2 + 39,8^2}{3} - 326,6667$$

$$= 3,9838$$
- JK Acak $= JK \text{ Total} - JK \text{ Perlakuan}$

$$= 4,3979 - 3,9838$$

$$= 0,4141$$

Lampiran 6. (Lanjutan)

$$\begin{aligned}
 5. \text{ db Total} &= (n \times r) - 1 \\
 &= (5 \times 3) - 1 \\
 &= 14 \\
 6. \text{ db Perlakuan} &= n - 1 \\
 &= 5 - 1 \\
 &= 4 \\
 7. \text{ db Acak} &= \text{db Total} - \text{db Perlakuan} \\
 &= 14 - 4 \\
 &= 10
 \end{aligned}$$

– Tabel Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	3,9838	0,99595	24,05**	3,48	5,99
Acak	10	0,4141	0,04141			
Total	14					

Keterangan : **) Berbeda Sangat Nyata

Karena F hitung lebih besari dari F tabel maka diperoleh hasil berbeda sangat nayat, sehingga dilanjutkan dengan uji BNT

$$\text{SED} = \sqrt{\frac{2 \times \text{KT acak}}{\text{ulangan}(r)}} = \sqrt{\frac{2 \times 0,041413333}{3}} = 0,166$$

$$\text{BNT } 5\% = t_{(0,05;\text{dbA})} \text{SED} = 2,228 \times 0,166 = 0,370$$

$$\text{BNT } 1\% = t_{(0,01;\text{dbA})} \text{SED} = 3,169 \times 0,166 = 0,527$$

– Tabel Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		3.88	4.38	4.69	5.01	5.38	
A	3.88	-					A
B	4.38	0.50*	-				B
C	4.69	0.81**	0.31 ^{ns}	-			Bc
D	5.01	1.13**	0.63**	0.32 ^{ns}	-		Cd
E	5.38	1.50**	1.00**	0.69**	0.37 ^{ns}	-	D

Keterangan : *) Berbeda Nyata **) Berbeda Sangat Nyata ^{ns}) Tidak berbeda

Urutan perlakuan terbaik dari uji BNT adalah E – D – C – B – A. Kemudian selanjutnya dilakukan uji polynomial orthogonal

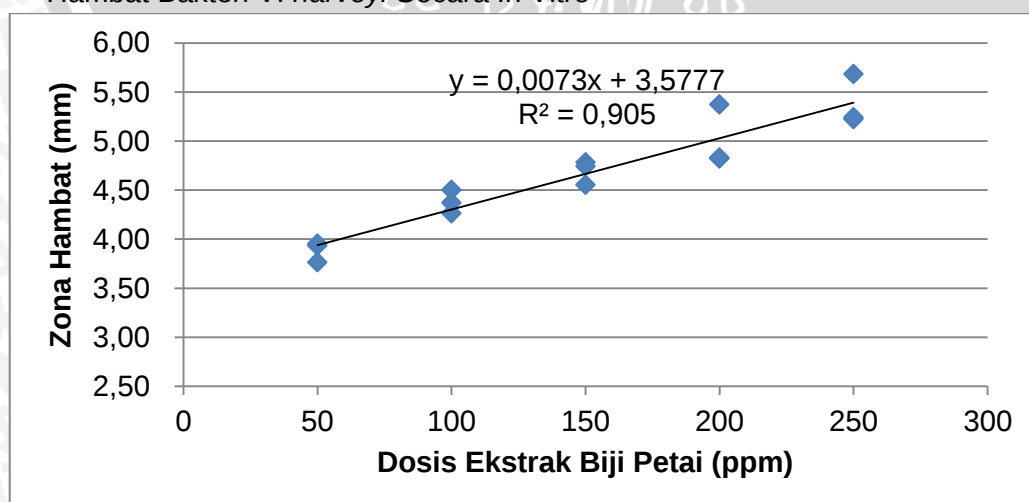
– Tabel Uji Polinomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	11.64	-2	2	-1	1
B	13.13	-1	-1	2	-4
C	14.07	0	-2	0	6
D	15.02	1	-1	-2	-4
E	16.14	2	2	1	1
$Q = \sum Ci \cdot Ti$		10.89	-0.73	0.72	-0.4
Hasil Kuadrat		10	14	10	70
$Kr = (\sum Ci^2) \cdot r$		30	42	30	210
$JK = Q^2 / Kr$		3.95307	0.012688095	0.01728	0.0007619

– Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	3.9838			3.48	5.99
Linier	1	3.95307	3.95307	95.45404	**	
Kuadratik	1	0.0126881	0.012688095	0.306377	ns	
Kubik	1	0.01728	0.01728	0.417257	ns	
Kuartik	1	0.0007619	0.000761905	0.018398	ns	
Acak	10	0.4141	0.041413333			
Total	14					

– Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. harveyi* Secara In Vitro



Lampiran 7. Foto Kegiatan Penelitian

		
Pengeringan Biji Petai	Penimbangan Simplisia	Proses Maserasi
		
Penyaringan Ekstrak	Pengevaporasian Ekstrak	Penimbangan Ekstrak
		
Penghomogenan Ekstrak	Hot Plate Media	Penuangan Media
		
Membuat Media Agar Miring	Penumbuhan Bakteri Pada Media	Pewarnaan Bakteri