

1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya perikanan di Indonesia semakin ditingkatkan oleh para pembudidaya ikan karena kebutuhan mengkonsumsi ikan semakin meningkat setiap tahunnya. Pada periode 2010-2014, tingkat konsumsi ikan per kapita nasional terus meningkat sebesar 37,89 kg/kapita, atau tercapai 100,24% dari target yang telah ditetapkan. Rata-rata konsumsi ikan per kapita nasional pada tahun 2014 ini meningkat sebesar 7,61% apabila dibandingkan dengan rata-rata konsumsi ikan per kapita nasional pada tahun 2013, yakni sebesar 35,21 kg/kapita. Sedangkan selama kurun periode Renstra (2010-2014), rata-rata konsumsi ikan per kapita nasional meningkat rata-rata sebesar 5,6% per tahun, yakni dari 30,48 kg/kapita pada tahun 2010 menjadi 37,89 kg/kapita pada tahun 2014. Hal tersebut mengindikasikan bahwa peningkatan konsumsi ikan di Indonesia berhasil meningkat (Anonymous, 2014).

Kesadaran masyarakat akan kesehatan dengan tingginya permintaan di bidang perikanan semakin meningkat seiring dengan berjalannya waktu. Hal ini merupakan kabar baik bagi para nelayan dan pembudidaya ikan serta bagi pembangunan perikanan bangsa yang telah menekankan program agribisnis perikanan guna mengembangkan usaha perikanan tahap nasional secara efisien, lestari dan berbasis kerakyatan sehingga dapat meningkatkan devisa negara.

Salah satu kendala atau permasalahan yang terjadi dalam usaha peningkatan pengembangan pembangunan perikanan adalah masalah penyakit yang sering menyerang ikan. Menurut Prajitno (2005), penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Adanya gangguan terhadap ikan dapat ditimbulkan oleh organisme lain, pakan ataupun kondisi lingkungan yang kurang

menunjang kehidupan ikan. Interaksi yang tidak sesuai pada ikan dapat menimbulkan ikan menjadi stres sehingga mekanisme pertahanan diri yang ada pada ikan menjadi lemah lalu akhirnya ikan menjadi mudah terserang penyakit. Salah satu penyakit yang menyerang pada pembudidayaan air payau adalah vibriosis yang disebabkan bakteri *Vibrio alginolyticus*.

Adanya serangan bakteri vibrio pada ikan dapat mengakibatkan kematian ikan yang dibudidayakan lebih dari 80%. Bakteri ini bersifat sangat ganas dan berbahaya baik pada budidaya ikan air laut maupun air payau karena dapat bertindak sebagai patogen primer dan sekunder. Adapun tanda-tanda penyerangan infeksi vibrio adalah ikan terlihat kemerahan, terjadi peradangan, nekrosis, ulser, ikan berenang berputar-putar atau cenderung tidak mau makan dan produksi lendir meningkat (Ilmiah *et al.*, 2012).

Selama ini upaya pencegahan terhadap serangan dari bakteri pada umumnya dilakukan dengan pemberian antibiotik dan bahan kimia lainnya. Tetapi, penggunaan antibiotik ternyata dapat menimbulkan efek samping bagi patogen itu sendiri maupun pada ikan yang dipelihara. Pemberian antibiotik secara terus-menerus menyebabkan organisme patogen menjadi resisten, sehingga penggunaan antimikroba menjadi tidak efektif. Adapun hal lain yang terjadi, residu dari antibiotik dapat mencemari lingkungan perairan yang mengakibatkan kualitas air menjadi turun. Salah satu alternatif yang digunakan untuk mengatasi permasalahan serangan penyakit adalah mengganti penggunaan antibiotik dengan bahan alami seperti tumbuhan herbal yang dapat dijadikan sebagai antibakteri.

Penggunaan tanaman herbal merupakan salah satu pemecah masalah tersebut. Tumbuhan Seledri (*Apium graveolens* L.) merupakan tanaman yang memiliki kandungan kimia dan dapat berpotensi sebagai antibakteri yang menghambat pertumbuhan bakteri. Menurut Gusniwati (2009), beberapa

kandungan kimia yang terdapat dari seledri (*Apium graveolens* L.) antara lain: flavonoid, apigenin, saponin, tanin, minyak atsiri, beberapa vitamin dan mineral yang berpotensi untuk mencegah penyakit infeksi bakteri. Oleh karena itu, diharapkan ekstrak kasar daun seledri (*Apium graveolens* L.) dapat berperan menggantikan bahan kimia sebagai bahan obat herbal yang aman dan ramah lingkungan sehingga dapat mengatasi permasalahan penyakit yang disebabkan bakteri *Vibrio alginolyticus* pada budidaya perikanan.

1.2 Rumusan Masalah

Penyakit merupakan salah satu kendala yang ditakutkan pada kegiatan budidaya. Salah satu penyebab terjadinya penyakit pada ikan yaitu karena adanya patogen penyakit seperti bakteri *Vibrio alginolyticus* yang sering menimbulkan penyakit pada ikan air laut. Penanggulangan penyakit dengan penggunaan antibiotik serta obat-obat kimia menimbulkan resisten terhadap bakteri dan berdampak membahayakan terhadap lingkungan perairan. Oleh karena itu dibutuhkan suatu penanggulangan dengan menggunakan bahan alami sebagai pengganti antibiotik sehingga aman bagi lingkungan perairan yaitu dengan menggunakan ekstrak kasar daun seledri (*Apium graveolens* L.) yang mengandung senyawa bersifat antibakteri.

Berkaitan dengan uraian di atas rumusan masalah dalam penelitian ini adalah :

- Apakah pemberian ekstrak kasar daun seledri (*Apium graveolens* L.) mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar daun seledri (*Apium graveolens* L.) terhadap daya hambat bakteri *Vibrio alginolyticus* secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis

H₀ : Diduga pemberian ekstrak kasar daun seledri (*Apium graveolens* L.) dengan dosis yang berbeda tidak mempengaruhi daya hambat dari bakteri *Vibrio alginolyticus*.

H₁ : Diduga pemberian ekstrak kasar daun seledri (*Apium graveolens* L.) dengan dosis yang berbeda dapat mempengaruhi daya hambat dari bakteri *Vibrio alginolyticus*.

1.5 Kegunaan Penelitian

Penelitian ini dimaksudkan untuk memberikan informasi kepada pembaca dan masyarakat mengenai pemanfaatan dari bahan-bahan alami seperti ekstrak daun seledri (*Apium graveolens* L.) yang dapat digunakan sebagai antibakteri pada proses pencegahan atau pengobatan penyakit ikan tanpa menimbulkan efek samping pada kegiatan budidaya.

1.6 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada tanggal 13 Januari – 20 Februari 2016.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Tumbuhan Seledri (*A. graveolens* L.)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Handoro (2013), klasifikasi tanaman seledri (*A. graveolens* L.)

dapat diuraikan sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisi	: Spermatophyta
Sub Divisi	: Angiospermae
Classis	: Dicotyledoneae
Ordo	: Umbelliferales
Familia	: Umbelliferae
Genus	: <i>Apium</i>
Species	: <i>Apium graveolens</i> L.

Adapun morfologi dari daun seledri (*A. graveolens* L.) dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. Seledri (*Apium graveolens* L.)

Tanaman seledri merupakan tanaman semak yang dapat hidup setinggi sekitar 50 cm dan memiliki bau aromatik yang khas. Selain itu seledri memiliki batang pendek tidak berkayu, bersegi, beralur, beruas bercabang tegak dan warnanya hijau pucat. Pada daun seledri berbentuk menjari tidak teratur,

berlekuk-lekuk dan majemuk serta menyirip, jumlah anak daun seledri 3-7 helai dengan panjang daun 2-7,5 cm dan lebar 2-5 cm. Bunga majemuk berbentuk payung dan berwarna hijau. Buah seledri berbentuk kotak atau kerucut dengan warna hijau kekuningan. Akar tanaman seledri berbentuk akar tunggang dengan cabang-cabang akar (Putera, 2008).

Menurut Rukmana (1995), seledri merupakan tanaman berbentuk semak atau rumput yang dapat tumbuh setahun atau dua tahun. Susunan tubuh dari tanaman seledri terdiri atas daun, tangkai daun, batang dan akar. Pada daun seledri bersifat majemuk, menyirip ganjil dengan anak daun antara 3-7 helai. Tepi daun pada umumnya beringgit dengan pangkal maupun ujungnya runcing. Tulang-tulang daun menyirip dengan ukuran panjang 2-7,5 cm dan lebarnya 2-5 cm. Tangkai daun tumbuh tegak ke atas atau ke pinggir batang, panjangnya sekitar 5 cm, berwarna hijau atau keputih-putihan.

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Tanaman seledri merupakan tanaman yang memiliki nilai ekonomi yang baik. Tanaman seledri dapat tumbuh baik di dataran tinggi maupun dataran rendah sesuai dengan varietasnya. Suhu optimum pertumbuhan tanaman seledri yaitu 15-25° C (Duaja, 2012).

Menurut Yogi (2015), asal-usul tanaman seledri sudah lama dikenal di Indonesia yaitu sejenis tumbuhan liar asli di dataran asia, terutama di Mediterania sekitar Laut Tengah. Seledri merupakan salah satu jenis sayuran daerah subtropis yang beriklim dingin, cocok dikembangkan di daerah yang mempunyai ketinggian tempat antara 1.000- 2.000 meter di atas permukaan laut, udara yang sejuk serta cukup mendapat sinar matahari.

2.1.3 Bahan Kimia Daun Seledri (*A. graveolens* L.)

Salah satu tanaman yang dimanfaatkan sebagai obat tradisional adalah tanaman seledri (*A. graveolens* L.). Kandungan kimia dari tanaman seledri (*A.*

graveolens L.) secara umum mengandung flavonoid, alkaloid, apigenin, saponin, tanin, minyak atsiri, beberapa vitamin dan mineral (Gusniwati, 2009).

Seledri merupakan tanaman yang dapat tumbuh di dataran rendah dan dataran tinggi. Adapun kandungan yang terdapat pada tumbuhan seledri yaitu flavonoid, saponin, tanin, minyak atsiri, apigenin, kolin, vitamin A, B, C dan zat pahit asparagin (Majidah *et al.*, 2014).

Santoso *et al.*, (2012), menyatakan bahwa alkaloid merupakan suatu senyawa yang mempunyai kemampuan sebagai antibakteri, dimana mekanisme kerja senyawa alkaloid diduga dengan cara mengganggu komponen penyusunan peptidoglikan pada sel bakteri sehingga lapisan dinding sel tidak mampu terbentuk secara utuh yang pada akhirnya dapat menyebabkan kematian sel.

Tanin merupakan salah satu senyawa yang dapat mengendapkan protein. Tanin dapat bekerja sebagai antibakteri karena memiliki sifat dalam inaktivasi enzim, inaktivasi fungsi materi genetik yang berada pada sel bakteri dan menembus dinding sel bakteri (Sulastrianah *et al.*, 2014).

Menurut Retnowati *et al.*, (2011), senyawa saponin memiliki kemampuan sebagai antibakteri dikarenakan senyawa saponin dapat merusak membran sitoplasma. Rusaknya membran sitoplasma menyebabkan sifat permeabilitas membran sel berkurang sehingga transport zat ke dalam dan keluar sel menjadi tidak terkontrol.

2.1.4 Aktivitas Antimikroba

Zat antimikroba merupakan suatu senyawa yang dapat membunuh atau menghambat pertumbuhan mikroorganisme. Selain itu, antimikroba dapat berfungsi sebagai obat yang mampu menghambat (bakteriostatik) atau membunuh mikroba (bakteriosida) yang dapat merugikan pada manusia atau makhluk hidup lainnya (Sarip *et al.*, 2014). Menurut Majidah *et al.*, (2014), flavonoid, saponin dan tanin merupakan kandungan bersifat antibakteri yang

dimiliki oleh seledri (*A. graveolens* L.). Pada flavonoid ada tiga mekanisme antibakteri yaitu dengan cara menghambat sintesis asam nukleat, menghambat fungsi membran sitoplasma, dan menghambat metabolisme energi.

Adapun menurut Sabir (2005), mengatakan bahwa flavonoid dapat menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom, dan lisosom sebagai hasil interaksi antara flavonoid dengan DNA bakteri. Sedangkan menurut Naim (2004), flavonoid memiliki sifat lipofilik sehingga dimungkinkan akan merusak membran sel bakteri.

2.2 Biologi Bakteri *V. alginolyticus*

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Antoko (2014), klasifikasi dari bakteri *V. alginolyticus* adalah sebagai berikut:



Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Ordo	: Vibrionales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: Vibrio
Species	: <i>Vibrio alginolyticus</i>

Menurut Felix *et al.* (2011), bakteri *V. alginolyticus* merupakan bakteri gram negatif, katalase positif, oksidasi positif, termasuk ke dalam bakteri motil dan berukuran 0,8-1,2 cm yang berwarna kuning pada media TCBSA.

Adapun morfologi dari *V. alginolyticus* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. *Vibrio alginolyticus* (Luturmas dan Pattinasarany, 2010).

2.2.2 Infeksi dan Tanda Penyerangan

Penyakit yang menyerang ikan-ikan budidaya laut dan payau merupakan masalah yang sangat serius ditangani terutama yang disebabkan oleh bakteri *Vibrio*. Penularan bakteri *Vibrio* dapat ditularkan melalui air atau kontak langsung antar ikan dan menyebar sangat cepat pada ikan-ikan yang dipelihara dengan kepadatan tinggi. Adapun penginfeksi bakteri *Vibrio* pada ikan kerapu stadia juvenil akan menyebabkan ikan menjadi lemah, berwarna kusam kehitaman dan menimbulkan produksi lendir berlebihan. Di tingkat parah pada sirip punggung dan sirip ekor gripis dengan permukaan kulit menghitam seperti terbakar (Rahayu, 2009).

Bakteri *V. alginolyticus* merupakan organisme yang hidup normal pada lingkungan akuatik tetapi pada kondisi tertentu dapat berubah menjadi patogen. Adapun gejala klinis ikan yang terserang bakteri *V. alginolyticus* yaitu terjadi peradangan, ikan terlihat kemerahan, nekrosis dan ulser. Selain itu ikan yang terinfeksi memperlihatkan perilaku cenderung diam tidak mau makan atau berenang berputar-putar dan produksi lendir meningkat (Ilmiah *et al.*, 2012).

Menurut Felix *et al.*, (2011), udang atau larva ikan yang terserang *Vibrio* secara umum ditandai dengan gejala klinis udang terlihat lemah, berwarna merah gelap atau pucat, antena dan kaki renang berwarna merah.

2.3 Uji Aktivitas Anti Mikroba *In Vitro*

2.3.1 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Pengujian MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) adalah merupakan suatu metode yang biasa digunakan dalam pengujian aktivitas zat antimikroba secara *in vitro*. Adapun pengujian yang dilakukan dengan cara menentukan konsentrasi terendah dari zat tersebut yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan dari pada mikroorganisme yang diuji (Schegel dan Schmidt, 1994 dalam Priyatmoko, 2008).

2.3.2 Uji Cakram

Menurut Rostinawati (2009), metode penentuan aktivitas antibakteri secara *in vitro* dikelompokkan menjadi dua metode, antara lain yaitu:

1. Metode Turbidimetri (metode tabung)

Metode turbidimetri merupakan suatu metode yang menggunakan medium cair dalam tabung reaksi. Pengamatan dilakukan dengan melihat kekeruhan yang terjadi akibat dari pertumbuhan bakteri. Kadar antibakteri ditentukan dengan menggunakan spektrofotometer. Adapun, kelebihan dari metode ini adalah hasil dapat dibaca lebih cepat dari cara difusi agar, yaitu sekitar 3 atau 4 jam setelah inkubasi.

2. Metode Difusi Agar (Metode lempeng)

Metode difusi agar merupakan suatu metode yang menggunakan media agar padat dan reservoir yang dapat berupa cakram kertas, silinder atau cekungan yang dibuat pada media padat. Larutan uji akan berdifusi dari pencadang ke permukaan media agar padat yang telah diinokulasi bakteri. Selanjutnya Bakteri akan terhambat pertumbuhannya dengan pengamatan berupa lingkaran atau zona disekeliling pencadang.

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan dalam penelitian dapat dilihat pada Tabel 1 dan Lampiran 1.

Tabel 1. Alat yang digunakan pada saat penelitian

No	Alat	Fungsi
1.	<i>Autoclave</i>	Sebagai alat untuk mensterilisasi alat dan bahan yang hendak digunakan
2.	Timbangan digital	Sebagai alat untuk menimbang dengan ketelitian 10^{-2}
3.	Timbangan Analitik	Sebagai alat untuk menimbang dengan ketelitian 10^{-3}
4.	Lemari pendingin	Sebagai wadah penyimpanan bahan penelitian
5.	Inkubator	Sebagai wadah penyimpanan bakteri uji
6.	<i>Rotary vacum evaporator</i>	Sebagai alat untuk mendapatkan ekstrak kasar daun seledri
7.	<i>Laminar Air Flow</i>	Sebagai tempat pengkulturan bakteri dalam keadaan steril
8.	Spektrofotometer	Sebagai alat untuk mengetahui nilai absorbansi dari bakteri pada media TSB
9.	Toples kaca	Sebagai wadah perendaman daun seledri saat proses maserasi
11.	<i>Blender</i>	Sebagai alat untuk menggiling daun seledri kering
12.	<i>Hot plate</i>	Sebagai alat pemanas media
13.	<i>Washing bottle</i>	Sebagai tempat menyimpan akuades
14.	Mikropipet	Sebagai alat untuk mengambil larutan dalam skala mikrometer
15.	Sprayer	Sebagai tempat untuk menyimpan alkohol 70 %
16.	Jangka Sorong	Sebagai alat untuk mengukur zona hambat bakteri
17.	<i>Blue tip</i>	Sebagai alat untuk tempat larutan yang diambil dengan mikropipet
18.	<i>Cutton swap</i>	Sebagai alat untuk menggoreskan bakteri pada media saat hendak uji cakram
19.	Cawan petri	Sebagai wadah pengkulturan bakteri
20.	Tabung reaksi	Sebagai wadah dari larutan
21.	Erlenmeyer 250 ml dan 500 ml	Sebagai wadah dari media TCBSA dan TSB
22.	Rak tabung reaksi	Sebagai tempat tabung reaksi
23.	Gelas ukur 10 ml dan 100 ml	Sebagai alat untuk mengukur volume larutan
24.	Jarum ose	Sebagai alat untuk mengambil dan mengkultur bakteri pada media miring
25.	Spatula	Sebagai alat mengambil bahan dan pengaduk
26.	Corong	Sebagai alat membantu memasukkan larutan

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini disajikan pada Tabel 2 dan Lampira 1.

Tabel 2. Bahan yang digunakan saat penelitian.

No	Bahan	Fungsi
1.	Daun seledri (<i>A. graveolens</i> L.)	Sebagai bahan yang hendak diuji kemampuan daya hambatnya
2.	Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	Sebagai bahan uji
3.	Alkohol 70 %	Sebagai bahan pengkondisian aseptis pada tangan
4.	TCBSA (<i>Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar</i>)	Sebagai media agar dalam pengujian cakram
5.	TSB (<i>Tryptone Soy Broth</i>)	Sebagai media cair dalam pengujian MIC
6.	Etanol 96 %	Sebagai bahan pelarut daun seledri pada proses perendaman
7.	NaCl	Sebagai bahan untuk membuat Nafis
8.	Spiritus	Sebagai bahan bakar dari bunsen
9.	<i>Aluminium Foil</i>	Sebagai bahan untuk menutup ujung tabung reaksi dan erlenmeyer pada saat disterilkan
10.	Kertas cakram	Sebagai bahan untuk mengetahui besar daya hambat ekstrak kasar daun seledri
11.	Kertas saring	Sebagai bahan untuk menyaring ekstrak basah daun seledri
12.	Kapas	Sebagai bahan untuk menutup tabung reaksi
13.	Benang kasur	Sebagai bahan untuk mengikat kertas bekas pada saat proses sterilisasi
14.	<i>Tissue</i>	Sebagai bahan pembersih
15.	Kertas label	Sebagai penanda
16.	Plastik	Sebagai pembungkus media yang sudah steril
17.	Kertas bekas	Sebagai bahan untuk membungkus alat yang hendak disterilkan
18.	DMSO 10%	Sebagai pelarut ekstrak
19.	Aquades	Sebagai bahan untuk membuat Nafis

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Dimana penelitian eksperimen merupakan penelitian yang dilakukan untuk mengetahui ada tidaknya akibat dari “sesuatu” yang dikenakan pada subjek selidik. Atau dengan istilah lain penelitian eksperimen mencoba meneliti ada tidaknya hubungan sebab akibat (Arikunto, 1995). penelitian ini dilakukan yaitu

untuk mengetahui sebab akibat dari uji daya hambat ekstrak kasar seledri (*A. graveolens L.*) terhadap bakteri *V. alginolyticus*.

3.2.2 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan dalam penelitian ini adalah menggunakan rancangan acak lengkap (RAL). RAL (Rancangan Acak Lengkap) merupakan suatu rancangan yang paling sederhana di antara rancangan-rancangan percobaan yang baku lainnya (Gaspersz, 1991).

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

Keterangan:

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

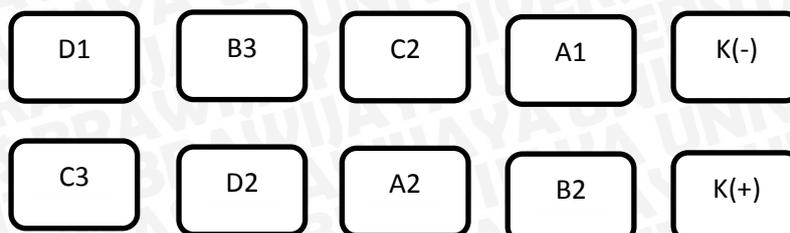
μ : Nilai tengah umum

T_i : Pengaruh perlakuan ke - i

\sum_{ij} : Pengaruh galat percobaan dari perlakuan ke - i dan ulangan ke - j

Dalam penelitian, adapun perlakuan yang diamati yaitu pengaruh perbedaan dosis ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens L.*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* pada cawan petri. Pengamatan dilakukan berdasarkan pengukuran besarnya zona hambat yang muncul pada medium agar padat dengan satuan millimeter (mm).

Dalam penelitian ini pengukuran yang dilakukan menggunakan 4 perlakuan dan 3 ulangan beserta kontrol positif dan kontrol negatif. Denah penelitian dapat dilihat pada Gambar 3.





Gambar 3. Denah Penelitian.

Keterangan:

Perlakuan A : Bakteri *V. alginolyticus* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L.) dengan dosis 10 ppm.

Perlakuan B : Bakteri *V. alginolyticus* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L.) dengan dosis 25 ppm.

Perlakuan C : Bakteri *V. alginolyticus* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L.) dengan dosis 40 ppm.

Perlakuan D : Bakteri *V. alginolyticus* ditanam pada media diberi ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L.) dengan dosis 55 ppm.

K(+) : Bakteri *V. alginolyticus* ditanam pada media diberi antibiotik Choramphenicol

K(-) : Bakteri *V. alginolyticus* ditanam pada media diberi larutan DMSO 10%

1,2,3 : Ulangan

3.3 Tahapan Penelitian

3.3.1 Persiapan Penelitian

A. Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi alat dan bahan dilakukan dengan autoklaf dengan cara sebagai berikut:

- Alat-alat yang akan digunakan terlebih dahulu dicuci menggunakan sabun cuci sampai bersih, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan koran dan diikat menggunakan benang.

- Diambil air secukupnya dan dituang ke dalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam autoklaf dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris.
- Oven dinyalakan dengan menekan tombol ON, 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 autoklaf.
- Tekan tombol OFF, ditunggu beberapa saat sampai suhu menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka kran uap lalu penutup autoklaf di buka dengan cara simetris.
- Alat-alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil.
- Setelah alat disterilkan kemudian alat-alat disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.

B. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L.)

Pada pembuatan ekstrak kasar daun seledri terlebih dahulu disiapkan tanaman seledri segar sebanyak 6 kg, lalu dipisahkan seledri antara daun dan batangnya. Selanjutnya daun seledri segar sebanyak 1 kg di cuci bersih dan dipotong kecil-kecil, lalu dikeringkan dengan cara di angin-anginkan. Setelah daun seledri kering, kemudian dihaluskan dengan cara diblender dan diperoleh serbuk daun seledri sebanyak 350 gr. Kemudian serbuk daun seledri disimpan diruangan yang kedap udara.

Serbuk daun seledri kering sebanyak 100 gr dimaserasi dengan menggunakan etanol 96% sebanyak 600 ml pada toples kaca yang ditutup dengan alumunium foil dengan perbandingan 1:6 b/v selama 24 jam dengan 6 jam pertama dilakukan pengadukan sesekali dan 18 jam berikutnya didiamkan. Setelah 24 jam hasil rendaman disaring dengan kertas saring dan ditempatkan

pada erlenmeyer. Setelah proses penyaringan dilakukan proses evaporasi dengan menggunakan *vacum evaporator*, dimana cairan hasil maserasi dimasukkan ke dalam labu evaporator. Selanjutnya semua rangkaian alat disambungkan dengan aliran listrik dan proses evaporasi menggunakan suhu 40°C. Pada labu evaporator dibiarkan larutan etanol memisah dengan zat aktif yang terdapat di dalam labu dan tunggu hingga aliran etanol berhenti menetes pada labu penampung. Setelah evaporasi selesai, hasil evaporasi kemudian diambil dengan menggunakan sendok bahan. Hasil yang diperoleh dari serbuk daun seledri kasar 100 gr didapatkan hasil evaporasi sebanyak 6,57 gr ekstrak, kemudian hasil ekstrak daun seledri tersebut dimasukkan ke dalam botol film dan disimpan ke dalam kulkas.

C. Pembuatan Media Hidup Bakteri *V. alginolyticus*

1. Pembuatan Media TSA (*Tryptic Soy Agar*)

Langkah-langkah membuat media TSA (*Tryptic Soy Agar*) adalah sebagai berikut:

- Media TSA (*Tryptic Soy Agar*) ditimbang 1,2 gram dengan timbangan digital dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer.
- Media dilarutkan dengan aduades sebanyak 30 ml dan dipanaskan dengan *hot plate*.
- Setelah itu media dituang ke dalam 4 tabung reaksi sebanyak 7 ml disetiap tabung reaksinya.
- Tabung reaksi ditutup kapas dan dibungkus aluminium foil serta diikat dengan tali.
- Media disterilkan dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.

- Tabung reaksi yang berisi media steril dimiringkan dengan kemiringan 30° dan ditunggu menjadi padat.

2. TSB (*Tryptic Soy Broth*)

Langkah-langkah membuat media TSB (*Tryptic Soy Broth*) adalah sebagai berikut:

- TSB ditimbang sebanyak 1,95 gram dan dilarutkan dalam 65 ml akuades dalam erlenmeyer kemudian diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kuning.
- Setelah itu erlenmeyer ditutup dengan kapas dan aluminium foil lalu dibungkus dengan kertas perkamen dan diikat dengan benang kasar.
- Kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C dan selama 15 menit.
- Media yang akan digunakan untuk pembiakan bakteri dibiarkan dingin karena bakteri akan mati bila diinokulasi pada media yang masih panas.

3. Peremajaan bakteri *V. alginolyticus*

Bakteri *V. alginolyticus* diperoleh dari isolat murni yang berasal dari Balai Besar Budidaya Air Payau Jepara pada tanggal 25 Januari 2016. Peremajaan bakteri dilakukan dengan menggunakan media agar TSA (*Tryptic Soy Agar*). Adapun langkah-langkah pembuatannya antara lain disiapkan tabung reaksi yang sudah berisi media TSA agar miring yang sudah dibuat terlebih dahulu. Setelah itu diambil bakteri dengan menggunakan jarum ose. Digoreskan bakteri *V. alginolyticus* yang ada di ose ke media TSA agar miring dengan metode gores. Setelah itu tabung media yang berisi TSA dimasukkan ke dalam inkubator dengan suhu antara 30-35°C selama 24 jam.

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

Langkah-langkah membuat media TCBSA (*Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar*) adalah sebagai berikut:

- TCBSA yang digunakan merk OXOID dengan dosis 80 gram/l.

- Ditimbang 31,68 gram TCBSA.
- TCBSA Dimasukkan dalam Erlenmeyer berisi 360 ml akuades.
- Erlenmeyer ditutup dengan kapas dan kertas perkamen/*aluminium foil*.
- Setelah itu diaduk pada kondisi hangat diatas *hot plate* 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.
- Pada media yang tidak langsung digunakan dapat disimpan dalam lemari pendingin.

5. Cara Memperoleh Bakteri *V. alginolyticus* dengan Kepadatan 10^7 cfu/ml

Adapun langkah yang dilakukan dalam pembiakan dan untuk mendapatkan bakteri *V. alginolyticus* 10^7 cfu/ml yaitu:

- Larutan TSB disiapkan terlebih dahulu.
- Jarum ose dipanaskan di atas bunsen hingga berpijar agar tidak terjadi kontaminasi
- Setelah dingin, jarum ose disentuh pada larutan murni bakteri *V. alginolyticus* dan dicelupkan pada media TSB yang sudah dingin dan diinkubasi selama 24 jam.
- Lalu kekeruhan bakteri disamakan dengan kekeruhan bakteri Mc Farlan 10^8 . Ketika disamakan dan terlihat kekeruhan bakteri 10^8 maka diambil 1 ml bakteri dari media TSB dan diencerkan dengan menggunakan Na Fisiologis 9 ml lalu didapatkan bakteri dengan kepadatan 10^7 cfu/ml.
- Petridisk yang sudah berisi media TCBSA dipersiapkan terlebih dahulu.
- Bakteri dibiakkan dengan menyelupkan *cutton swap* pada bakteri yang sudah diencerkan.

- Digoreskan bakteri pada media agar yang ada di cawan petri dengan metode gores agar bakteri tidak terlalu menumpuk.
- Media TCBSA diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu tertentu selama 24 jam.

3.3.2 Pelaksanaan Penelitian

A. UJI MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Uji MIC dilakukan yaitu untuk mengetahui dosis minimum yang digunakan untuk menghambat pertumbuhan bakteri dengan menggunakan filtrat simplisa seledri (*A. graveolens* L.). Pengamatan MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dilakukan dengan cara pengamatan kualitatif, yaitu dengan melihat adanya kekeruhan pada media uji yang menandakan bahwa bakteri tersebut tumbuh dan bila media uji bening berarti menandakan tidak adanya pertumbuhan dari bakteri.

Adapun prosedur pelaksanaan dari uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) yaitu penentuan konsentrasi dilakukan dengan langkah membuat stok dosis 10000 ppm, kemudian dilakukan pengenceran berseri mulai dari 10000 ppm, 1000 ppm, 100 ppm, 10 ppm, 1 ppm, 0,1 ppm, 0,01 ppm dan 0 ppm dengan menggunakan DMSO 10%. Untuk memperoleh DMSO 10% dengan cara melarutkan 1 ml DMSO 100% dengan 9 ml aquadest murni kemudian di vortex sampai homogen. Setelah dilakukan persiapan ekstrak dengan konsentrasi yang ditentukan kemudian dipersiapkan bakteri pada media cair TSB yang dikultur pada tabung reaksi.

Media TSB sebanyak 9 ml disiapkan untuk setiap tabung reaksi yang telah ditentukan dan diberi label sesuai perlakuan kemudian disterilisasi dengan autoklaf. Setelah media agak dingin dimasukkan bakteri *V. alginolyticus* dengan menggunakan ose kemudian divortex agar homogen. Setelah kultur bakteri pada media cair kemudian dimasukkan ekstrak daun seledri (*A. graveolens* L.) yang

telah dipersiapkan sebelumnya ke tabung dengan konsentrasi yang telah ditentukan kemudian divortex hingga homogen. Langkah selanjutnya yaitu semua tabung diinkubasi selama 24 jam pada suhu $\pm 35^{\circ}\text{C}$. Setelah 24 jam dilihat kekeruhan masing-masing tabung reaksi kemudian ditentukan konsentrasi yang paling jernih atau tidak keruh dan absorbansinya yang mendekati kontrol positif.

Pada uji MIC pertama diperoleh kisaran konsentrasi 10 ppm, sehingga dilakukan lagi uji MIC yang ke dua untuk mendapatkan dosis lanjutan yaitu 7 ppm, 8 ppm, 9 ppm, 10 ppm, 11 ppm, 12 ppm dan 13 ppm. Hasil uji MIC ke dua diperoleh hasil yang mendekati kontrol positif yaitu pada konsentrasi 10 ppm sehingga pada uji cakram konsentrasi yang dipakai 10 ppm, 25 ppm, 40 ppm dan 55 ppm.

B. Uji Difusi kertas Cakram

Metode difusi kertas cakram merupakan salah satu metode yang paling umum digunakan dalam uji antibakteri, karena dengan metode ini dapat mengetahui kemampuan antibakteri pada suatu sampel uji. Uji cakram digunakan untuk mengetahui kemampuan ekstrak dalam konsentrasi tertentu yang dapat menghambat bakteri yang bersifat bakteriostatik (menghambat bakteri) setelah diinkubasi selama 48 jam atau membunuh bakteri (bakteriosidal).

Hal ini terlihat setelah media diinkubasi selama 24 jam akan terbentuk zona bening disekitar kertas cakram dan apabila setelah 48 jam zona bening tersebut terlihat semakin berkurang atau zona bening terlihat ditumbuhi bakteri maka antibakteri tersebut bersifat bakteriostatik.

Prosedur pelaksanaan dari uji cakram yaitu menyiapkan media TCBSA pada cawan petri kemudian bakteri *V. alginolyticus* dioleskan secara merata pada media TCBSA dengan *cotton swap*. Selanjutnya disiapkan kertas cakram

steril ukuran 6 mm direndam ke dalam ekstrak kasar daun seledri pada tiap dosis yang telah ditentukan selama 15 menit. Setelah itu ditiriskan dan diletakkan pada media TCBSA dan diberi kertas label pada masing-masing cawan petri sebagai penanda konsentrasi, kemudian diinkubasi pada suhu ruang $\pm 35^{\circ}\text{C}$ selama 24 jam. Setelah itu diukur diameter zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong. Adapun peletakan kertas cakram dalam petridisk harus memenuhi kaidah-kaidah antara lain: jarak kertas cakram dengan tepi petridisk tidak boleh kurang dari 15 mm dan pada saat meletakkan kertas cakram tidak boleh sedikitpun bergeser, karena akan mengurangi validasi pengukuran. Untuk mengetahui sifat antibakteri bersifat bakteriostatik atau bakteriosida maka dilakukan pengamatan selama 48 jam.

3.4 Parameter Uji

3.4.1 Parameter Utama

Parameter utama dalam penelitian ini menggunakan parameter kuantitatif, yaitu data yang diperoleh dari hasil pengukuran daerah hambat ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L.) terhadap bakteri *V. alginolyticus* pada setiap perlakuan yang terlihat di sekitar kertas cakram. Pada daerah bening disekitar kertas cakram sebagai petunjuk bahwa ekstrak kasar daun seledri bekerja menghambat bakteri *V. alginolyticus* dan pengukurannya dilakukan menggunakan jangka sorong dengan ketelitian pengukuran 0,1 mm.

3.4.2 Parameter Penunjang

Parameter penunjang adalah parameter uji pada penelitian yaitu lama perendaman kertas cakram pada ekstrak daun seledri (*A. graveolens* L.)

3.5 Analisa Data

Pada data yang didapatkan dari hasil penelitian dilakukan analisa secara statistik dengan mempergunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai

dengan rancangan yang digunakan yaitu menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dan untuk mengetahui pengaruh perlakuan dilakukan analisa sidik keragaman. Jika di dapat hasil yang berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan dengan notasi dan dilanjutkan dengan perhitungan polinomial orthogonal.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

Pada uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dilakukan dengan menggunakan berbagai macam dosis dari ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens L.*) yang bertujuan untuk mengetahui dosis terkecil dalam menghambat bakteri *V. alginolyticus*. Hal ini sesuai dengan pernyataan Munfaati *et al.*, (2015), Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dilakukan untuk mengetahui konsentrasi terendah pada ekstrak yang mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Hasil uji MIC yang dilakukan menunjukkan adanya perbedaan setiap perlakuan setelah dilakukan pengamatan dengan menggunakan spektrofotometer seperti yang ditunjukkan pada Tabel 3.

Tabel 3. Hasil Pengamatan Uji MIC Menggunakan Spektrofotometer

No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Warna
1	10.000	1,280	Bening
2	1000	1,170	Bening
3	100	1,248	Bening
4	10	1,401	Bening
5	1	1,351	Keruh
6	0,1	1,462	Keruh
7	0,01	1,335	Keruh
8	0	1,118	Keruh
9	Kontrol (-)	1,467	Keruh
10	Kontrol (+)	1,413	Bening

Keterangan:

Tabung No. 4 : Konsentrasi 10 ppm mendekati kontrol positif

Kontrol (-) : Perlakuan tidak ditambahkan antibakteri

Kontrol (+) : Perlakuan ditambahkan antibakteri

Berdasarkan hasil spektrofotometer pada tabung nomor empat yaitu pada konsentrasi 10 ppm menghasilkan nilai absorbansi sebesar 1,401, yang mana nilai absorbansi ini mendekati kontrol positif yaitu sebesar 1,413. Selain pembacaan spektrofotometer, pada saat pengamatan warna, perlakuan pada konsentrasi 10 ppm menunjukkan warna jernih dan absorbansinya mendekati

kontrol positif sehingga dilanjutkan dengan uji MIC kedua dengan konsentrasi ekstrak daun seledri 7 ppm, 8 ppm, 9 ppm, 10 ppm, 11 ppm, 12 ppm dan 13 ppm. Berikut merupakan hasil spektrofotometer dari Uji MIC kedua pada Tabel 4.

Tabel 4. Hasil Pengamatan Uji MIC Kedua Menggunakan Spektrofotometer

No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Warna
1	7	1,429	Bening
2	8	1,442	Bening
3	9	1,442	Bening
4	10	1,409	Bening
5	11	1,398	Keruh
6	12	1,421	Keruh
7	13	1,407	Keruh
9	Kontrol (-)	1,467	Keruh
10	Kontrol (+)	1,413	Bening

Keterangan:

Tabung No. 4 : Konsentrasi 10 ppm mendekati kontrol positif

Kontrol (-) : Perlakuan tidak ditambahkan antibakteri

Kontrol (+) : Perlakuan ditambahkan antibakteri

Hasil uji MIC kedua diperoleh bahwa perlakuan yang absorbansi mendekati kontrol positif terdapat pada konsentrasi 10 ppm. Selanjutnya ditentukan konsentrasi yang dapat dijadikan perlakuan untuk uji cakram yaitu pada konsentrasi 10 ppm, 25 ppm, 40 ppm, dan 55 ppm.

4.2 Uji Cakram

Uji cakram dilakukan untuk mengetahui kemampuan daya hambat ekstrak daun seledri (*A. graveolens* L.) yang ditandai dengan adanya daya hambat (zona bening) di daerah kertas cakram. Daya hambat (zona bening) ditandai dengan tidak ditumbuhkannya bakteri *V. alginolyticus* di daerah sekitar cakram ukuran 6 mm yang telah direndam oleh ekstrak daun seledri (*A. graveolens* L.) dengan konsentrasi yang berbeda-beda. Hasil perhitungan rata-rata pengamatan zona bening dengan menggunakan empat perlakuan dosis yang berbeda dengan tiga ulangan disajikan pada Tabel 5.

Tabel 5. Hasil Rata-Rata Pengamatan Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L.) Terhadap Bakteri *V. alginolyticus*

Perlakuan	Ulangan			Total (mm)	Rerata ± Standart Deviasi (mm)
	1 (mm)	2 (mm)	3 (mm)		
A (10 ppm)	1,65	1,95	1,49	5,09	1,69 ± 0,23
B (25 ppm)	2,58	1,72	1,71	6,01	2,01 ± 0,32
C (40 ppm)	2,77	2,73	2,32	7,82	2,60 ± 0,24
D (55 ppm)	2,85	3,88	3,79	10,52	3,50 ± 0,57
Total				29,44	

Pada Tabel pengamatan zona bening diperoleh nilai diameter rata-rata zona bening tertinggi pada perlakuan D (55 ppm) yaitu sebesar 3,50 mm. Sedangkan nilai diameter rata-rata zona bening terendah diperoleh pada perlakuan A (10 ppm) yaitu sebesar 1,69 mm.

Hasil pengamatan diameter zona bening pada uji cakram di setiap perlakuan penelitian diperoleh hasil zona bening yang berbeda. Diameter zona bening hasil penelitian dipengaruhi oleh jumlah dosis yang digunakan, dimana semakin tinggi dosis yang digunakan maka diameter zona bening yang dihasilkan juga semakin besar.

Widyana *et al.*, (2014), menyatakan bahwa respon hambat dari suatu bahan aktif dapat diklasifikasikan pada empat respon seperti yang disajikan pada Tabel 6.

Tabel 6. Klasifikasi Respon Hambatan Menurut Widyana *et al.*, (2014).

No	Diameter Zona Bening (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
1.	>20	Sangat kuat
2.	11-19	Kuat
3.	5-10	Sedang
4.	<5	Lemah

Berdasarkan Tabel klasifikasi respon hambat diatas, maka dapat ditentukan bahwa respon hambat ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L.) terhadap bakteri *V. alginolyticus* termasuk ke dalam respon hambatan pertumbuhan lemah. Hal ini dikarenakan diameter zona bening yang dihasilkan berada pada jarak < 5 mm.

Kemudian untuk mengetahui pengaruh perbedaan perlakuan ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L.) terhadap zona bening, maka dilakukan uji sidik ragam. Berikut merupakan hasil Tabel uji sidik ragam yang disajikan pada Tabel 7. Untuk perhitungan lengkapnya dapat dilihat pada Lampiran 9.

Tabel 7. Hasil Analisa Sidik Ragam Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L.) Terhadap Bakteri *V. alginolyticus*

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	5,71	1,9	11,06**	4,07	7,59
Acak	8	1,38	0,17			
Total	11					

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata

Pada Tabel sidik ragam didapatkan hasil bahwa uji daya hambat ekstrak kasar daun seledri terhadap bakteri *V. alginolyticus* berbeda sangat nyata. Hal ini dikarenakan nilai F. Hitung lebih besar dari pada nilai F 5% dan F 1% atau nilai dari 11,06 lebih besar dari 4,07 dan 7,59. Maka H_0 ditolak yang berarti perlakuan tersebut berbeda sangat nyata. Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang disajikan pada Tabel 8.

Tabel 8. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Zona Bening Setelah Pemberian Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L.) Terhadap Bakteri *V. alginolyticus*

Rerata Perlakuan	A (10 ppm)	B (25 ppm)	C (40 ppm)	D (55 ppm)	Notasi
	5,09	6,01	7,82	10,52	
A (10 ppm)	5,09	-	-	-	a
B (25 ppm)	6,01	0,92 ^{ns}	-	-	a
C (40 ppm)	7,82	2,73**	1,81**	-	b
D (55 ppm)	10,52	5,43**	4,51**	2,7**	c

Keterangan:

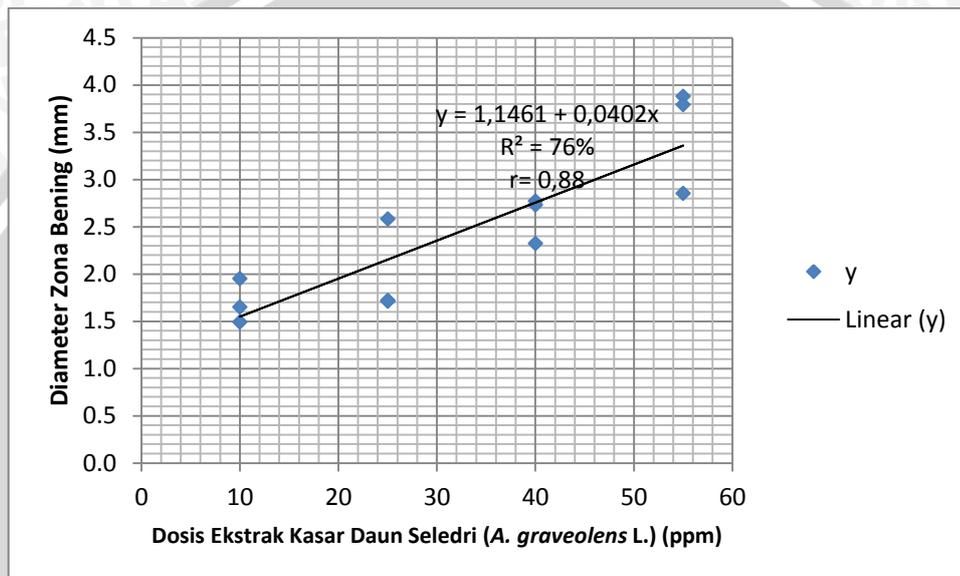
ns : tidak berbeda nyata

* : berbeda nyata

** : berbeda sangat nyata

Pada hasil Tabel uji BNT diperoleh nilai perlakuan A tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap semua perlakuan sehingga diberi notasi a. Perlakuan B terhadap perlakuan A memberikan pengaruh yang tidak berbeda nyata maka diberi notasi a. Perlakuan C memberikan pengaruh berbeda sangat

nyata terhadap perlakuan B sehingga diberi notasi b. Sedangkan perlakuan D memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A, B, dan C maka diberi notasi c. Kemudian untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antar perlakuan dengan zona bening maka perlu dilakukan uji polinomial orthogonal yang berupa grafik disajikan pada Gambar. 4, untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran.9.



Gambar 4. Grafik Hubungan Zona Hambat antar Perlakuan Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens L.*) Terhadap Bakteri *V. alginolyticus*

Berdasarkan grafik hubungan zona hambat antar perlakuan ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens L.*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* menunjukkan perpotongan garis secara linear dengan persamaan $y = 1,1416 + 0,0402x$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 76% dan koefisien korelasi (r) sebesar 0,88. Hubungan antara pemberian ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens L.*) dalam menghambat bakteri *V. alginolyticus* dengan rata-rata diameter zona bening yang dihasilkan menunjukkan respon yang meningkat seiring dengan bertambahnya dosis ekstrak kasar daun seledri yang diberikan yaitu dari dosis 10 ppm, 25 ppm, 40 ppm dan 55 ppm.

Peningkatan dosis yang semakin besar mengakibatkan diameter zona bening yang terbentuk semakin besar pula hal ini terkait karena kandungan senyawa aktif yang yang diberikan semakin besar akan memberikan daya hambat (zona bening) yang besar. Hal ini sesuai menurut Munfaati *et al.*, (2015), menyatakan bahwa konsentrasi yang tinggi dapat mengakibatkan penurunan jumlah koloni bakteri dikarenakan konsentrasi yang tinggi mengandung senyawa antibakteri yang lebih banyak sehingga semakin banyak senyawa antibakteri yang diserap oleh bakteri, menyebabkan pertumbuhan bakteri menjadi terhambat.

Ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L.) memiliki senyawa kimia yang bersifat antibakteri, salah satu senyawa tersebut adalah flavonoid. Flavonoid merupakan suatu kandungan khas yang terdapat pada tumbuhan hijau, dimana merupakan suatu senyawa metabolit sekunder yang dapat menghambat pertumbuhan sel (Pinem, 2007).

Menurut Bontjura (2015), Flavonoid termasuk dalam senyawa fenolik alam yang potensial sebagai antioksidan dan mempunyai bioaktivitas sebagai obat. Dalam beberapa hal, senyawa flavonoid dapat berperan sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi aktivitas dari mikroorganisme seperti bakteri atau virus. Adapun mekanisme antibakteri flavonoid pada bakteri atau virus yaitu pertama dengan cara menghambat sintesis asam nukleat. Kedua dengan menghambat fungsi membran sitoplasma, merusak fluiditas membran pada regio hidrofilik dan hidrofobik sehingga fluiditas lapisan luar dan lapisan dalam membran akan mengalami penurunan. Cara ketiga yaitu dengan menghambat metabolisme energi.

Menurut Yunus *et al.*, (2009), mengatakan bahwa Ion H^+ dari senyawa fenol dan turunannya (flavonoid) bekerja dengan cara mengganggu fungsi membran sitoplasma. Proses mengganggunya dengan cara menyerang gugus

polar (gugus fosfat) sehingga molekul fosfolipida pada dinding sel bakteri akan terurai menjadi gliserol, asam karboksilat dan asam fosfat. Fosfolida tidak mampu mempertahankan bentuk membran sitoplasma. Akibatnya, membran sitoplasma akan bocor dan bakteri mengalami hambatan pertumbuhan yang bahkan dapat terjadi kematian.

Mekanisme kerja dari ekstrak kasar daun seledri adalah mengganggu pembentukan dinding sel atau permeabilitas membran sel. Dari hasil penelitian uji daya hambat ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L.) terhadap bakteri *V. alginolyticus* secara *in vitro* memberikan efek antibakteri pada bakteri *V. alginolyticus*. Untuk menghambat aktivitas bakteri dapat dilakukan dengan cara pemberian antibakteri penghambat secara kimia. Dari cara aktivitas antibakteri dibagi menjadi dua yaitu antibakteri bersifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) dan antibakteri bersifat bakteriosida (mampu membunuh bakteri).

Hal ini sesuai dengan pendapat Yunus *et al.*, (2009) menyatakan kemampuan suatu obat dapat dikatakan bersifat bakteriostatik apabila bahan yang digunakan dapat menghambat pertumbuhan bakteri sedangkan dikatakan bersifat bakteriosidal apabila bahan tersebut mematikan bentuk vegetatif bakteri. Pada hasil penelitian daerah hambatan di sekitar kertas cakram terlihat jernih pada perlakuan pengamatan selama 24 jam dan dilanjutkan dengan pengamatan ke 48 jam bahwa zona bening tersebut semakin berkurang. Hal ini menunjukkan bahwa daun seledri tersebut dalam menginfeksi bakteri *Vibrio alginolyticus* bersifat bakteriostatik.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 KESIMPULAN

Berdasarkan hasil penelitian tentang uji daya hambat ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L.) terhadap bakteri *V. alginolyticus* secara *In vitro* diperoleh hasil pemberian ekstrak kasar daun seledri berpengaruh mampu menghambat bakteri *V. alginolyticus* dan bersifat bakteriostatik dilihat dari diameter zona bening perlakuan. Diameter daya hambat yang dihasilkan semakin meningkat seiring dengan semakin tingginya dosis perlakuan yang digunakan. Perlakuan dengan dosis 10 ppm sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* dengan ukuran diameter rata-rata zona bening 1,69 mm dengan persamaan $y = 1,14161 + 0,0402x$ dengan koefisien determinasi (R^2) sebesar 76% dan koefisien korelasi (r) sebesar 0,88.

5.2 SARAN

Berdasarkan hasil penelitian uji daya hambat ekstrak kasar daun seledri (*A. graveolens* L.) terhadap bakteri *V. alginolyticus* secara *in vitro* disarankan menggunakan ekstrak kasar daun seledri untuk menghambat bakteri *V. alginolyticus* dan disarankan melakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo*.

DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous. 2014. Kementerian Kelautan dan Perikanan Republik Indonesia. <http://kkp.go.id/assets/uploads/2015/03/LAKIP-KKP-2014.pdf>
- Antoko, R. D. 2014. Pengaruh Larutan Kulit Buah Manggis (*Garcinia mangostana* L.) Sebagai Antibakteri Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus* Secara *In Vitro*. Skripsi. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya. Malang.
- Arikunto, S. 1995. Manajemen Penelitian. Rineka Cipta: Jakarta.
- Bontjura, S., O. A. Waworuntu dan K. V. Siagian. 2015. Uji Efek Antibakteri Daun Leilem (*Clerodendrum minahassae* L.) Terhadap Bakteri *Streptococcus mutans*. Jurnal Ilmiah Farmasi - UNSRAT. Vol 4 No.4.
- Duaja, M. D., Nelyati., H. Tindaon. 2012. Evaluasi Pertumbuhan dan Hasil Seledri (*Apium graveolens* L.) Pada Perbedaan Jenis Bahan Dasar Dan Dosis Pupuk Organik Cair. Vol 4 No.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, Vol. 3, No. 2, Hal. 85-99.
- Gaspersz, V. 1991. Teknik Analisis Dalam Penelitian Percobaan. Tarsito: Bandung.
- Gusniwati, R. 2009. Isolasi dan Penetapan Kadar Apigenin Pada Ekstrak Seledri (*Apium graveolens* L.) Secara KCKT. Sripsi. Fakultas Farmasi Universitas Andalas. Padang.
- Handoro, N.D. 2013. Efek Antimikroba Dekok Seledri (*Apium graveolens* L.) Terhadap *Shigella dysenteriae* Secara *In vitro*. Skripsi. Malang: Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya.
- Ilmiah., Sukenda., Widanarni., dan E. Harris. 2012. Isolasi dan Karakterisasi *Vibrio* Patogen Pada Ikan Kerapu Macan *Epinephelus fuscoguttatus*. Jurnal Akuakultur Indonesia.
- Luturmas, A dan Pattinasarany, A. Y. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri *Vibrio alginolyticus* Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Sebagai Faktor Virulensi Bakteri Patogen. Seminar Nasional Basic Science II.
- Majidah, D., D.W.A. Fatmawati dan A. Gunadi. 2014. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Seledri (*Apium Graveolens* L.) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus Mutans* Sebagai Alternatif Obat Kumur. Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa 2014. Fakultas Kedokteran Gigi, Universitas Jember.

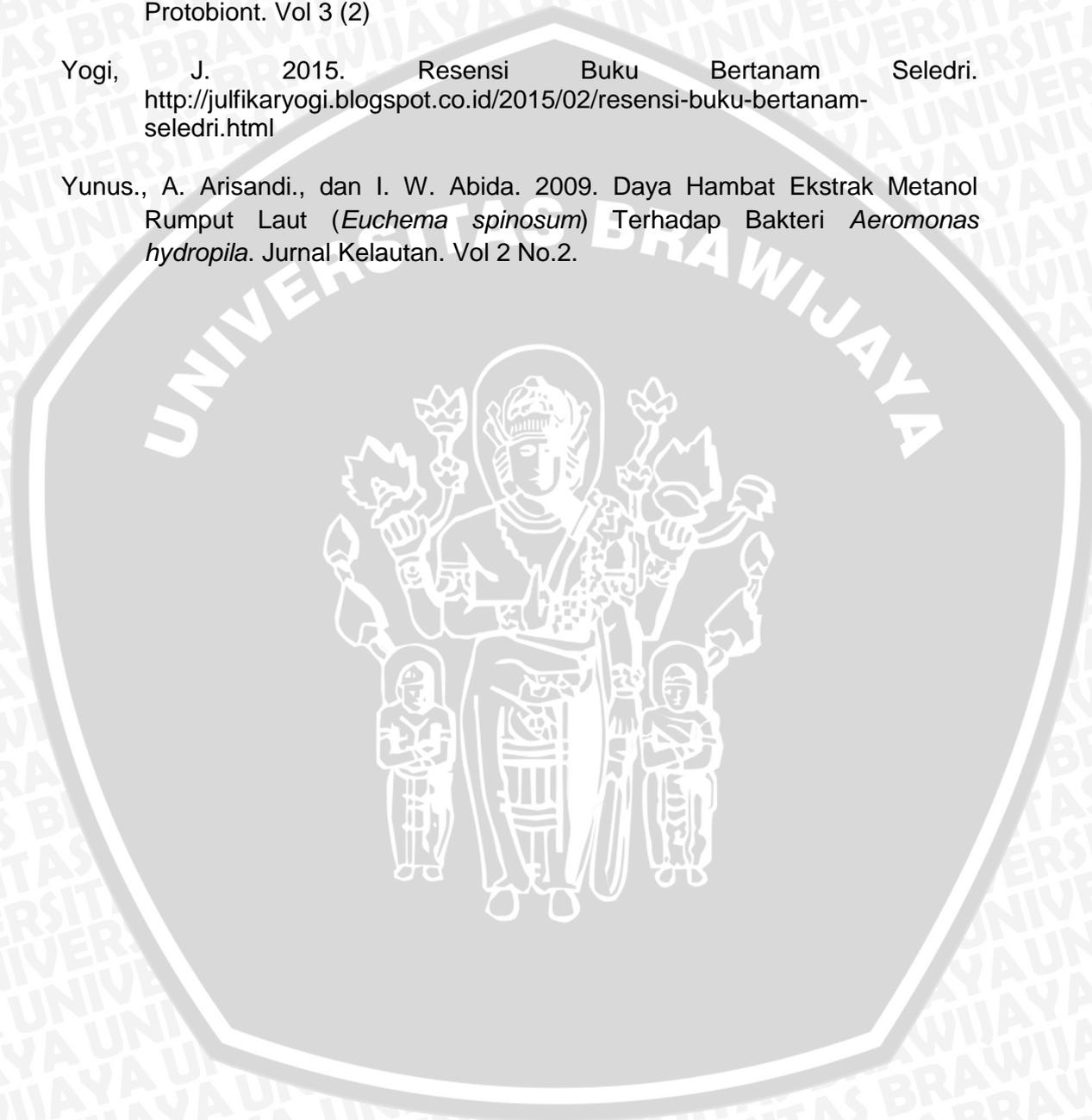
- Munfaati, P. N., E. Ratnasari dan G. Trimulyono. 2015. Aktivitas Senyawa Antibakteri Ekstrak Herba Meniran (*Phyllanthus niruri*) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Shigella dysenteriae* Secara *In Vitro*. Lentera Bio. Vol.4 No.1
- Naim, R. (2004). *Senyawa Antimikroba dari Tanaman* [Online]. Tersedia: <http://www2.kompas.com/kompas-cetak/0409/15/sorotan/1265264.htm> (7 Desember 2015).
- Pinem, L. J. 2007. Perbedaan Lingkungan dan Masa Tanam Seledri (*Apium graveolens* L.) Terhadap Senyawa Bioaktif Apigenin. IPB: Bogor.
- Pelczar, M. J dan E. C. S. Chan. 1986. Dasar – Dasar Mikrobiologi I. UI Press : Jakarta. 443 hlm.
- Prajitno, A. 2005. Diktat Parasit dan Penyakit Ikan. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. Universitas Brawijaya: Malang. 105 hlm.
- Priyatmoko, W. 2008. Aktivitas Antibakteri Karang Lunak Hasil Transplantasi (*Sinularia* Sp.) Pada Dua Kedalaman Berbeda Di Perairan Pulau Pramuka Kepulauan Seribu, Dki Jakarta. IPB: Bogor.
- Putera, C. A. P. P. 2008. Survei Hama dan Penyakit Pada Pertanaman Seledri (*Apium graveolens* L.) di Desa Ciherang, Kecamatan Pacet, Kabupaten Cianjur, Jawa Barat. Institut Pertanian Bogor: Bogor.
- Rahayu, A. M. 2009. Keragaman dan Keberadaan Penyakit Bakterial dan Parasitik Benih Kerapu Macan *Epinephelus fuscoguttatus* di Karamba Jaring Apung Balai Desa Farming Kepulauan Seribu, Jakarta. IPB: Bogor.
- Retnowati, Y., N. Bialangi dan N. W. Posangi. 2011. Pertumbuhan Bakteri *Stapylococcus aureus* Pada Media Yang Diekspos Dengan Infus Daun Sambilotto. Saintek. Vol.6 No.2
- Rostinawati, T. 2009. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L.) Terhadap *Escherichia coli*, *Salmonella typhi* dan *Staphylococcus aureus* Dengan Metode Difusi Agar. Penelitian Mandiri. Fakultas Farmasi. UNPAD: Jatinangor.
- Rukmana, R. 1995. Bertanam Seledri. Kanisius: Jawa Barat.
- Sarip, M., E. Amri., dan V. Fitriani. 2014. Daya Antimikroaba Sari Akar Mambu (*Millettia cericea* W. & A.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli* dan *Salmonella typhi*. STKIP PGRI Sumatera Barat: Padang.
- Sabir, A. 2005. "Aktivitas Antibakteri Flavonoid Propolis *Trigona* sp terhadap bakteri *Streptococcus mutans* (*in vitro*)". *Majalah Kedokteran Gigi*. 38, (3), 135-141.
- Santoso, R. M., D. Praharani dan Purwanto. 2012. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Pare (*Momordica charantia*) dalam Menghambat Pertumbuhan *Streptococcus viridans*. Artikel Ilmiah.

Sulastrianah., Imran dan E. S. Fitria. 2014. Uji Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata* L.) Dan Daun Sirih (*Piper betle* L.) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Escherichia coli*.

Widyana, W., S. Khotimah., dan. Lovadi. 2014. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Lumut *Octoblepharum albidum Hedw* Terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus epidermidis* dan *Pseudomonas aeruginosa*. Jurnal Protobiont. Vol 3 (2)

Yogi, J. 2015. Resensi Buku Bertanam Seledri. <http://julfikaryogi.blogspot.co.id/2015/02/resensi-buku-bertanam-seledri.html>

Yunus., A. Arisandi., dan I. W. Abida. 2009. Daya Hambat Ekstrak Metanol Rumput Laut (*Euchema spinosum*) Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila*. Jurnal Kelautan. Vol 2 No.2.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat dan Bahan Penelitian



Tabung reaksi



Beaker glass



Sendok bahan



Jarum ose



Erlenmeyer



Gelas ukur



Timbangan digital



Timbangan Sartorius



Hot plate



Lemari es bahan



Lemari es media



Autoklaf

Lampiran 1 (Lanjutan)



Spektrofotometer



Micropipet



Inkubator



Korek apl



Pipet volume dan bola hisap



Jangka Sorong



Botol film



Vortex



Laminar Air Flow



Cawan petri



Corong kaca



Rak tabung



Blue Tip



Vaccum Roraty Evaporator

Lampiran 1 (Lanjutan): Bahan Penelitian



Tali Kasur



Hydrobat



Kertas Label



Aluminium foil



Plastik wrap



Kapas dan Tissue



Masker



Alkohol



Bunsen



DMSO 10 %



TSB



Etanol 96%



Nafis



Bakteri *V. Alginolyticus*



Lampiran 2. Hasil Uji Biokimia Bakteri *Vibrio Alginolyticus* BPBAP Jepara



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 : BBPAP Jepara
 Metode : Cowan and stell's, Manual for Identification of medical bacteria
 Hasil :

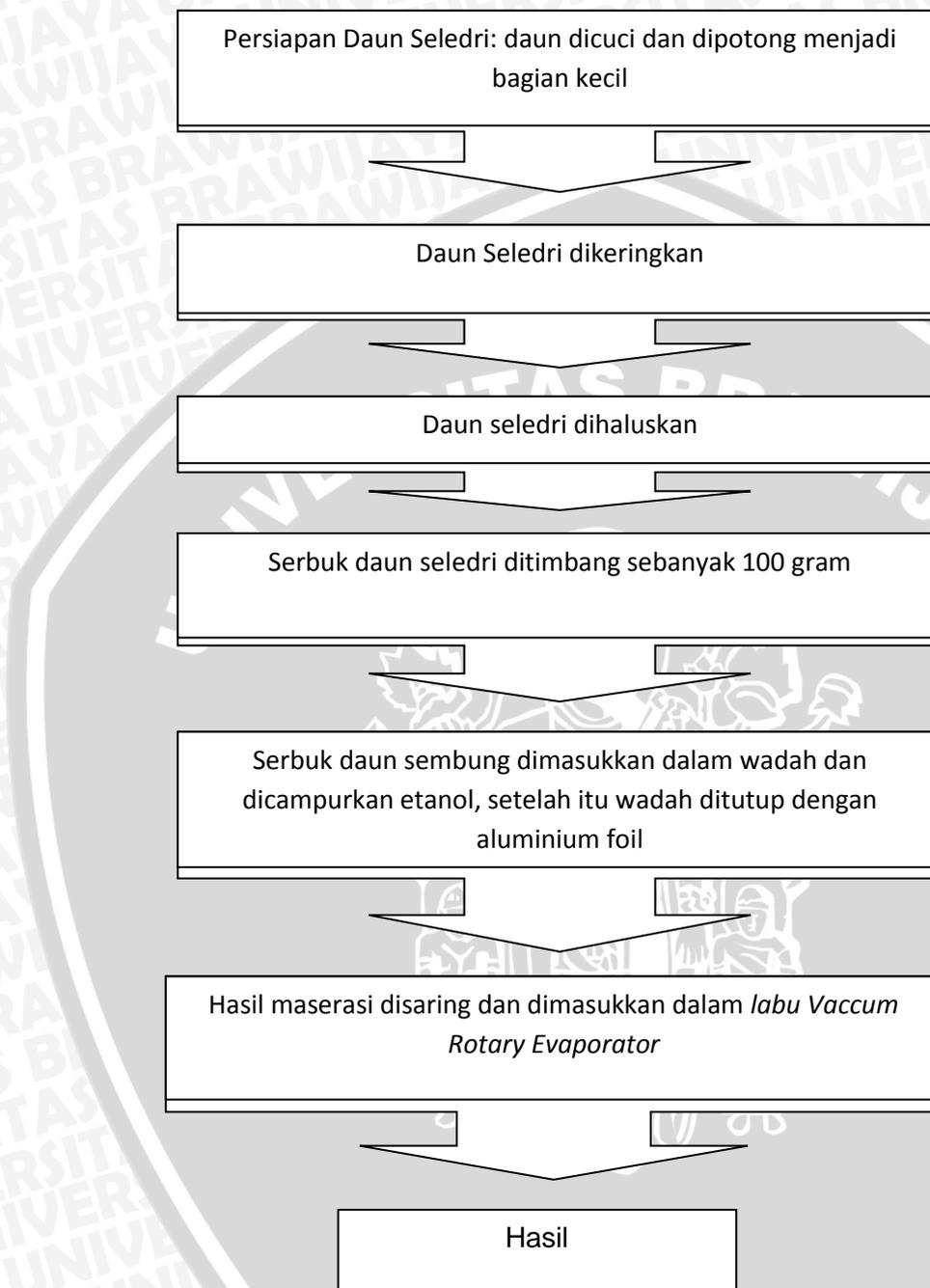
Uji Bio Kimia	<i>Vibrio alginolyticus</i>
TCBS	+
Bentuk	batang
Cat Gram	-
Swaming	+
Growth with 0% NaCl	-
Arginine decarboxilase	-
Lysine decarboxilase	+
Ornithine decarboxilase	+
Nitrat reduced	+
Oxidase	+
Gas from Glucose	-
Indol	+
ONPG	-
VP	+
Resisten to :	
0/129 10 µg	+
0/129 150 µg	-
ampicillin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

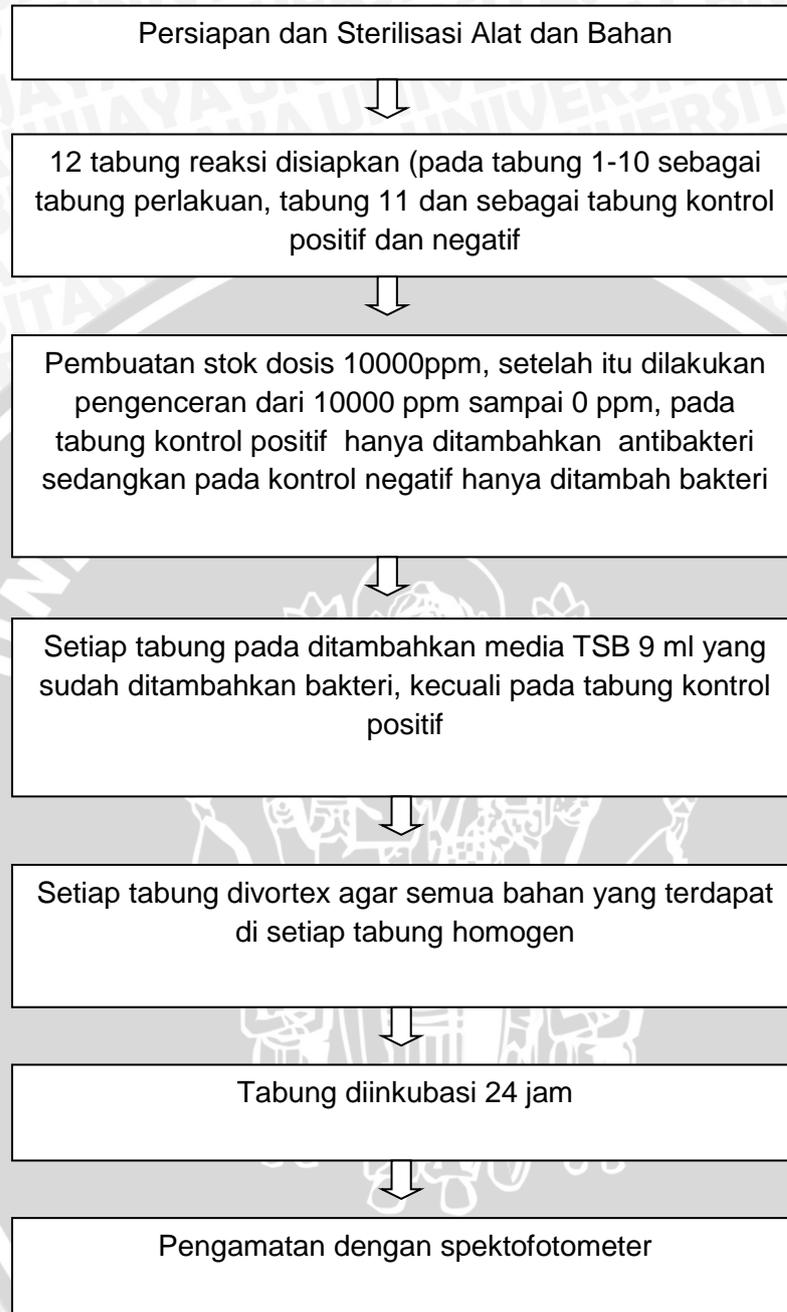
Lab. Mikrobiologi BBPAP Jepara

Penyelia

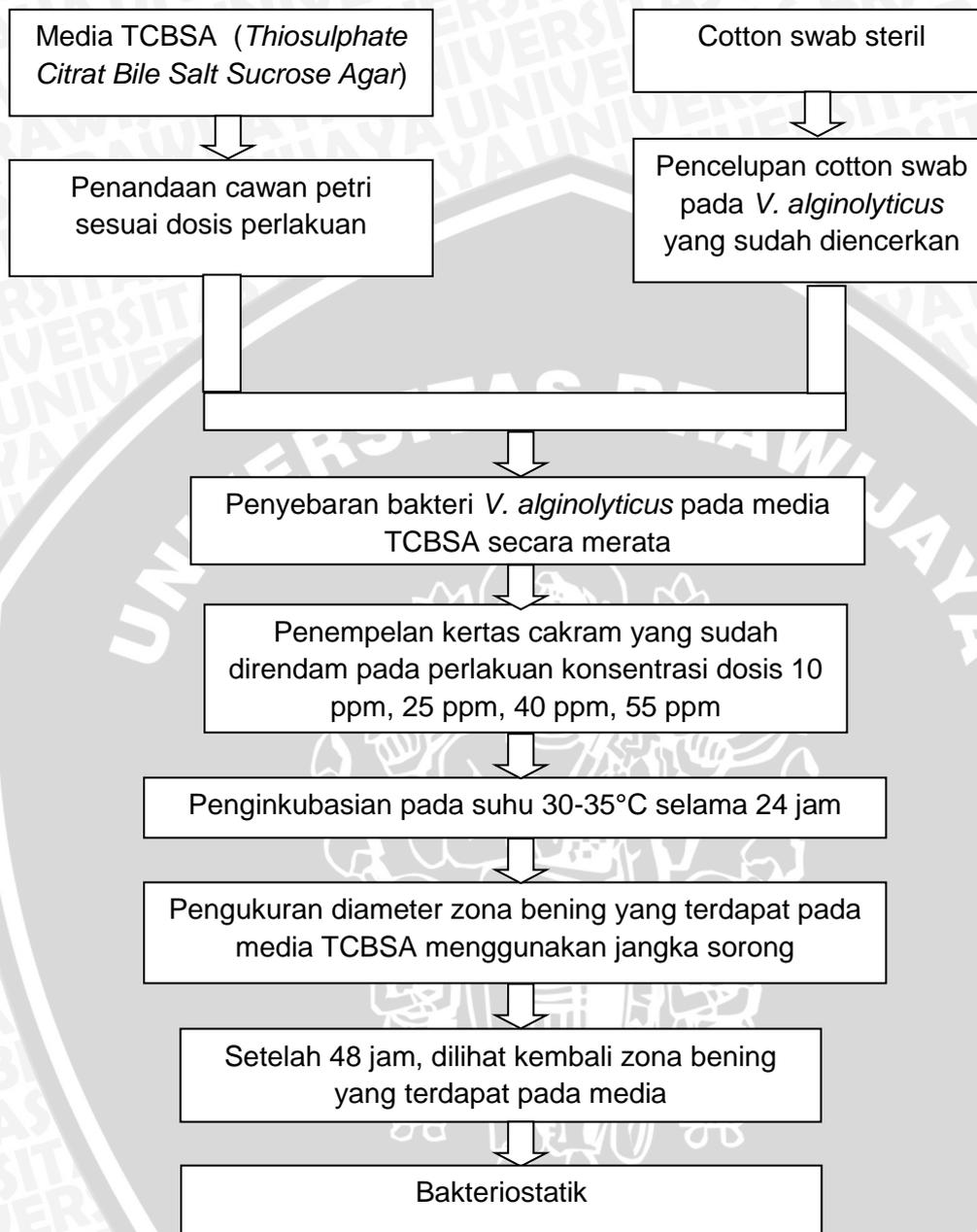
 Sri Murti Astuti, SP.



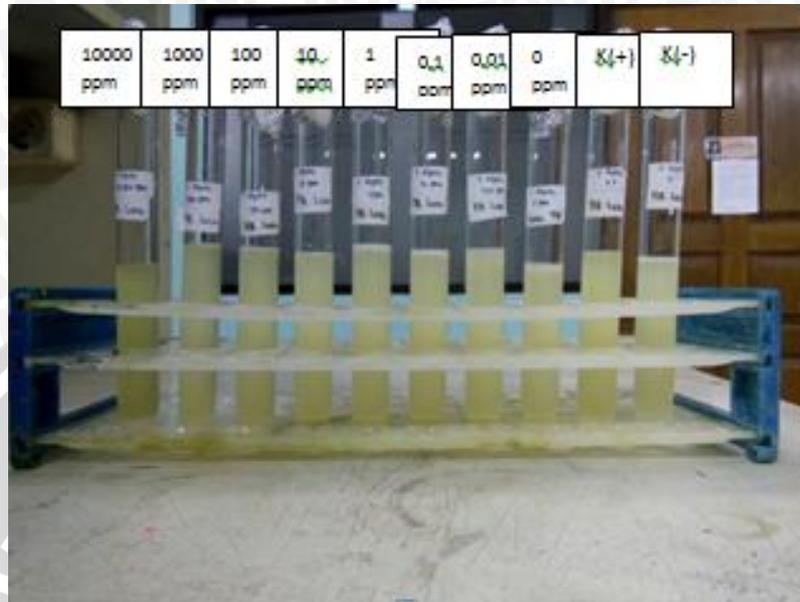
Lampiran 3. Skema Kerja Proses Ekstraksi Daun Seledri (*A. graveolens* L.)

Lampiran 4. Skema Kerja Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*)

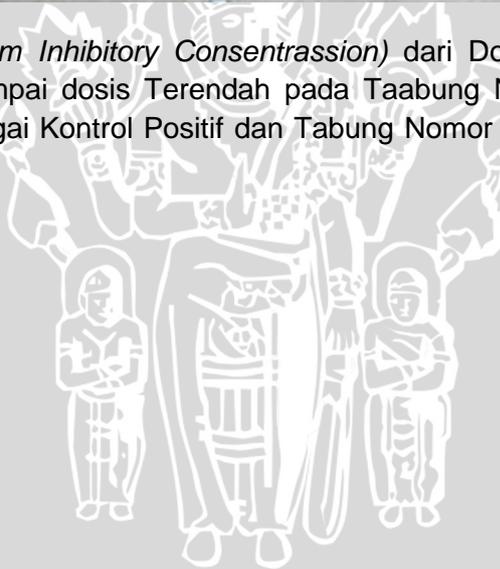
Lampiran 5. Skema Kerja Uji Cakram



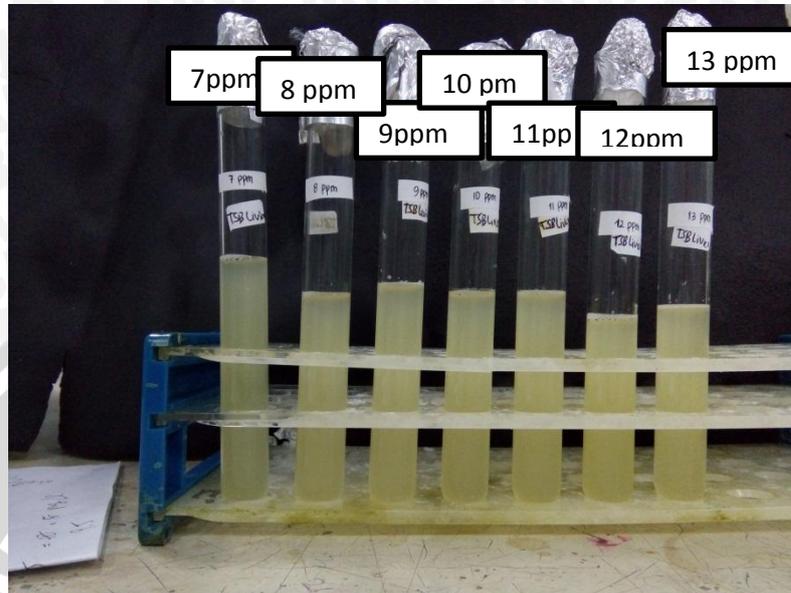
Lampiran 6. Hasil Uji MIC Pertama dari Ekstrak Kasar Daun Seledri Dengan Konsentrasi 0 ppm, 0,01 ppm, 0,1 ppm, 1 ppm, 10 ppm, 100 ppm, 1000 ppm, 10.000 ppm, K(+) dan K(-).



Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentrassion*) dari Dosis Tertinggi pada Taabung Nomor 1 sampai dosis Terendah pada Taabung Nomor 8 kemudian Tabung Nomor 9 sebagai Kontrol Positif dan Tabung Nomor 10 sebagai Kontrol Negatif.



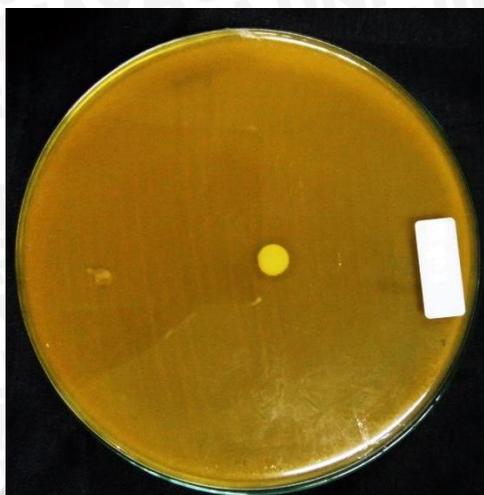
Lampiran 7. Hasil Uji MIC Kedua dari Ekstrak Kasar Daun Seledri Dengan Konsentrasi 7 ppm, 8 ppm, 9 ppm, 10 ppm, 11 ppm, 12 ppm, 13 ppm.



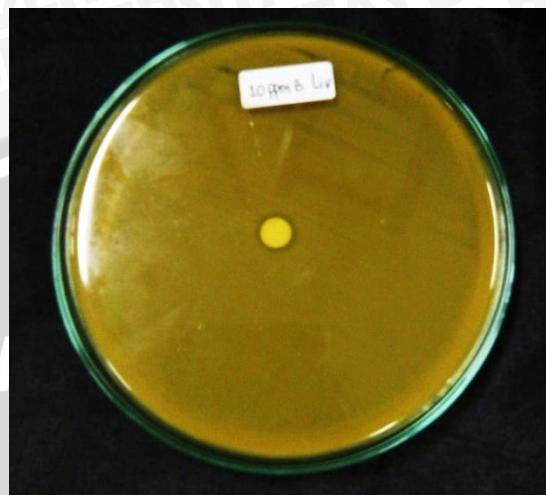
Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibitory Concentration*) dari Dosis 7 ppm, 8 ppm, 9 ppm, 10 ppm, 11 ppm, 12 ppm dan 13 ppm.



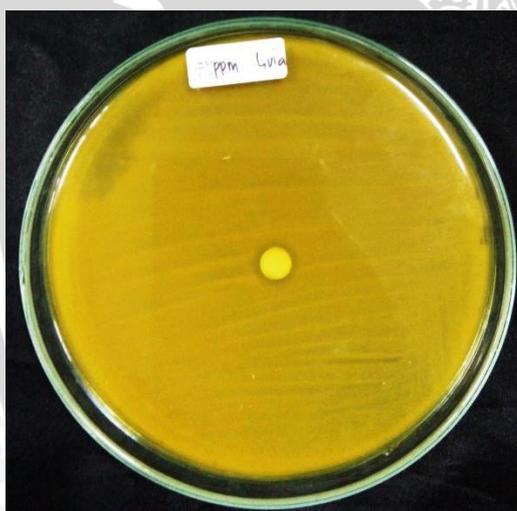
Lampiran 8. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L.) Terhadap Bakteri *V. Alginolyticus*.



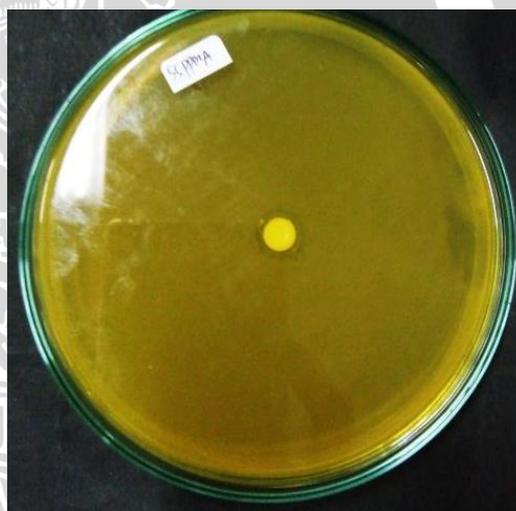
10 ppm



25 ppm



40 ppm



55 ppm

Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L.) Terhadap Bakteri *V. alginolyticus*.

Lampiran 9. Analisis Data Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L.) Terhadap Diameter Hambatan (mm) Bakteri *V. alginolyticus* Secara *In Vitro*

- Data Rata-Rata Diameter Hambatan (mm) Bakteri *V. alginolyticus*

Perlakuan	Ulangan			Total (mm)	Rerata ± Standart Deviasi (mm)
	1 (mm)	2 (mm)	3 (mm)		
A (10 ppm)	1,65	1,95	1,49	5,09	1,69 ± 0,23
B (25 ppm)	2,58	1,72	1,71	6,01	2,01 ± 0,32
C (40 ppm)	2,77	2,73	2,32	7,82	2,60 ± 0,24
D (55 ppm)	2,85	3,88	3,79	10,523	3,50 ± 0,57
Total				29,443	

- Perhitungan

FK	$\frac{29,443^2}{3 \times 4}$	72,24
JK Total	$(A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + D3^2) - FK$	7,09
JK Perlakuan	$\frac{\Sigma A^2 + \Sigma B^2 + \Sigma C^2 + \Sigma D^2}{3} - FK$	5,71
JK Acak	JK Total – JK Perlakuan	1,38
KT	JK/db	1,903

- Tabel Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	5,71	1,903	11,063	4,07	7,59
Acak	8	1,38	0,172			
Total	11					

F 5% < F hitung > F 1% = berbeda sangat nyata

Karena F hitung lebih besar dari F tabel maka diperoleh hasil berbeda sangat nyata. Sehingga dilanjutkan uji BNT

- Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

$$SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ acak}}{ulangan (r)}} = \sqrt{\frac{2 \times 0,172}{3}} = 0,337$$

$$BNT \ 5\% = T \text{ tabel } 5\% \text{ (db acak)} \times SED = 0,86$$

$$BNT \ 1\% = T \text{ tabel } 1\% \text{ (db acak)} \times SED = 1,26$$

Lampiran 9 (Lanjutan)

- Tabel Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Rerata Perlakuan	A (10 ppm)	B (25 ppm)	C (40 ppm)	D (55 ppm)	Notasi
	5,09	6,01	7,82	10,52	
A (10 ppm)	5,09	-	-	-	a
B (25 ppm)	6,01	0,92 ^{ns}	-	-	a
C (40 ppm)	7,82	2,73 ^{**}	1,81 ^{**}	-	b
D (55 ppm)	10,52	5,43 ^{**}	4,51 ^{**}	2,7 ^{**}	c

Keterangan:

- (ns) non signifikan
- (*) berbeda nyata
- (**) berbeda sangat nyata

Untuk perlakuan terbaik dari uji BNT adalah D – C – B – A. Selanjutnya dilakukan uji polynomial orthogonal

- Tabel Uji Polinomial Ortogonaal

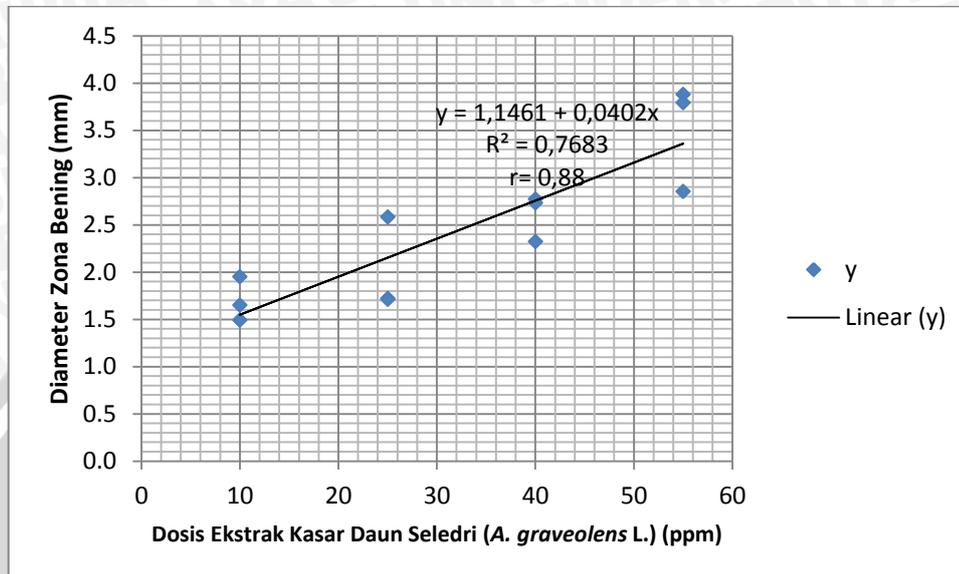
Perlakuan	Total (Ti)	Perbandingan (Ci)		
		Linier	Kuadratik	Kubik
A (10 ppm)	5,09	-3	1	-1
B (25 ppm)	6,01	-1	-1	3
C (40 ppm)	7,82	1	-1	-3
D (55 ppm)	10,52	3	1	1
Q = $\sum Ci \times Ti$		18,1	1,78	0
Kr = ($\sum Ci^2 / Kr$)		20 x 3 = 60	4 x 3 = 12	20 x 3 = 60
JK = Q²/Kr		5,46	0,264	0,00

1. Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hitung	F5%	F1%
1. Perlakuan	3	5,724			4,07	7,51
Linier	1	5,460	5,460	31,65		
Kuadratik	1	0,264	0,264	1,53		
Kubik	1	0,00	0,0	0,0		
2. Acak	8	1,38	0,1725			
Total	11	11,448				

Lampiran 9 (Lanjutan)

- Grafik Uji Sensivitas Ekstrak Kasar Daun Seledri (*A. graveolens* L.) Terhadap Bakteri *Vibrio Alginolyticus* Secara *In Vitro*



x	y
10	1,69
25	2,01
40	2,60
55	3,50

Keterangan:

- x : Konsentrasi Ekstrak (ppm)
- y : Zona Hambat (mm)

