

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR
BIJI PETAI (*Parkia speciosa*) TERHADAP DAYA HAMBAT
BAKTERI *Vibrio alginolyticus* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

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

Oleh :

HERPRITA NUR LAILI RAMADHANI

NIM. 125080500111029



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR
BIJI PETAI (*Parkia speciosa*) TERHADAP DAYA HAMBAT
BAKTERI *Vibrio alginolyticus* SECARA *IN VITRO***

SKRIPSI

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

Oleh :

HERPRITA NUR LAILI RAMADHANI

NIM. 125080500111029



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2016

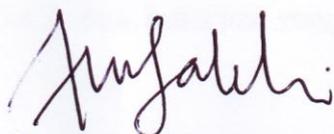
SKRIPSI
PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK KASAR
BIJI PETAI (*Parkia speciosa*) TERHADAP DAYA HAMBAT
BAKTERI *Vibrio alginolyticus* SECARA IN VITRO

Oleh :
HERPRITA NUR LAILI RAMADHANI
NIM. 125080500111029

Telah dipertahankan di depan penguji
pada tanggal 13 Mei 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat
SK Dekan No. :
Tanggal :

Menyetujui,

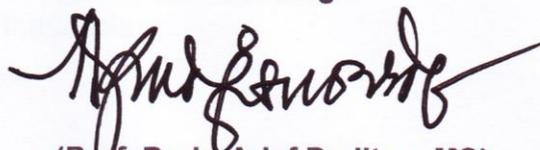
Dosen Penguji I



(M. Fakhri, S.Pi, MP, M.Sc)
NIP. 19860717 201504 1 001

Tanggal: 02 JUN 2016

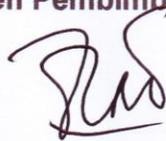
Dosen Pembimbing I



(Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS)
NIP. 19550213 198403 1 001

Tanggal: 02 JUN 2016

Dosen Pembimbing II



(Dr. Ir. Mohamad Fadjar, M.Sc)
NIP. 19621014 198701 1 001

Tanggal:

02 JUN 2016

Mengetahui,
Ketua Jurusan
Manajemen Sumberdaya Perairan



(Dr. Ir. Arning W. Ekawati, MS)

NIP. 19620805 198603 2 001

Tanggal:

02 JUN 2016

PERNYATAAN ORISINILITAS SKRIPSI

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

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



Malang, Mei 2016

Mahasiswa,

Herprita Nur Laili Ramadhani
125080500111029

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. ALLAH SWT yang telah mempermudah, memperlancar dan melindungi selama penelitian.
2. Bapak Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS dan Bapak Dr. Ir. M. Fadjar M.Sc selaku dosen pembimbing, karena atas arahan dan bimbingan beliau, penelitian dapat diselesaikan dengan tepat waktu, serta bimbingan yang selalu mengajarkan saya menjadi manusia yang selalu rendah hati dan disiplin.
3. Bapak M. Fakhri, S.Pi, MP, M.Sc selaku dosen penguji yang telah memberikan arahan dan masukan dalam penyusunan laporan skripsi ini.
4. Mamah Herni Wahjuti, Mas Pringga, Mami Warsiati, Setyo Adi Wibowo yang selalu mendoakan dari jauh dan selalu memberi semangat untuk tidak pernah menyerah akan tugas akhir ini.
5. Laboran Penyakit dan Parasit Ikan serta rekan-rekan tim penyakit skripsweet yang telah banyak membantu penulis dan selalu memberikan dukungan dan motivasi untuk terselesaikannya laporan skripsi ini.
6. Teman-teman Aquasean BP 2012, yang telah ikut serta mendukung penyelesaian skripsi ini dan telah banyak mengukir cerita selama penulis menuntut ilmu di bangku perkuliahan.

Malang, Mei 2016

Penulis

RINGKASAN

HERPRITA NUR LAILI R. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Biji Petai (*Parkia speciosa*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Vibrio alginolyticus* Secara *In Vitro*. Dibawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.** dan **Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc.**

Potensi sumber daya alam kelautan dan perikanan di Indonesia merupakan faktor dominan dalam strategi pembangunan bangsa dan negara. Secara aktif, Indonesia merupakan bagian dari masyarakat dunia yang ikut serta dalam rangka membangun tata ekonomi dunia, salah satunya adalah pembangunan di bidang kelautan dan perikanan. Seiring dengan peningkatan peran sektor kelautan dan perikanan dalam pembangunan nasional, pembangunan sektor ini di masa datang juga akan menghadapi sejumlah tantangan, salah satunya berupa serangan hama dan penyakit ikan yang menjadi penyebab utama kegagalan dalam usaha budidaya. Vibriosis merupakan jenis penyakit yang disebabkan oleh bakteri genus *Vibrio* sp. yang salah satunya adalah *V. alginolyticus*. Bakteri ini merupakan salah satu jenis bakteri patogen yang menyerang ikan budidaya khususnya ikan air laut dan air payau yang dapat menyebabkan terjadinya septisemia dan hemoragik pada ikan. Penggunaan antibiotik serta obat-obat kimia untuk mengatasi permasalahan tersebut dapat menyebabkan terjadinya resistensi pada bakteri dan dapat membahayakan lingkungan perairan. Oleh sebab itu diperlukan suatu bahan alami sebagai pengganti antibiotik yang lebih aman bagi lingkungan perairan yaitu dengan menggunakan ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) yang mengandung senyawa flavonoid, alkaloid, terpenoid, dan fenol yang merupakan senyawa-senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh daya hambat pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* secara *In Vitro*. Penelitian dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari hingga bulan Maret 2016.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen. Penelitian ini menggunakan 5 perlakuan dan 3 ulangan yaitu dengan menggunakan dosis 20 ppt (perlakuan A), 40 ppt (perlakuan B), 60 ppt (perlakuan C), 80 ppt (perlakuan D), dan 100 ppt (perlakuan E). Parameter utama dalam penelitian ini adalah melihat atau mengukur zona hambat yang dihasilkan di sekitar kertas cakram yang dihasilkan dari berbagai dosis yang digunakan. Parameter penunjang dalam penelitian ini adalah suhu inkubator saat penelitian.

Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan rata-rata zona hambat terbesar yaitu pada dosis 100 ppt yaitu sebesar 11,186 mm. Ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) bersifat antibakteri bakteriostatik. Kesimpulan dari hasil penelitian ini bahwa hasil pengaruh daya hambat pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* secara *in vitro* dengan menggunakan uji cakram menunjukkan penggunaan ekstrak kasar biji petai dengan dosis berbeda memberikan pengaruh sangat berbeda nyata terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* dan diperoleh perlakuan terbaik pemberian ekstrak kasar biji petai untuk menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* yaitu sebesar 100 ppt dengan nilai rata-rata zona hambat sebesar 11,186 mm.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT yang telah melimpahkan Rahmat dan Hidayah-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi ini sebagaimana adanya. Adapun penulisan skripsi berjudul “Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Biji Petai (*Parkia speciosa*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Vibrio alginolyticus* Secara *In Vitro*”, laporan ini disusun setelah melalui serangkaian penelitian di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Universitas Brawijaya, Malang. Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana (S-1) pada Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.

Penulis menyadari bahwa dalam penyusunan laporan ini masih terdapat kekurangan. Oleh karena itu, penulis menerima segala saran dan kritik yang membangun demi sempurnanya laporan ini. Akhirnya penulis berharap supaya laporan skripsi ini dapat bermanfaat bagi pembaca.

Malang, Mei 2016

Penulis

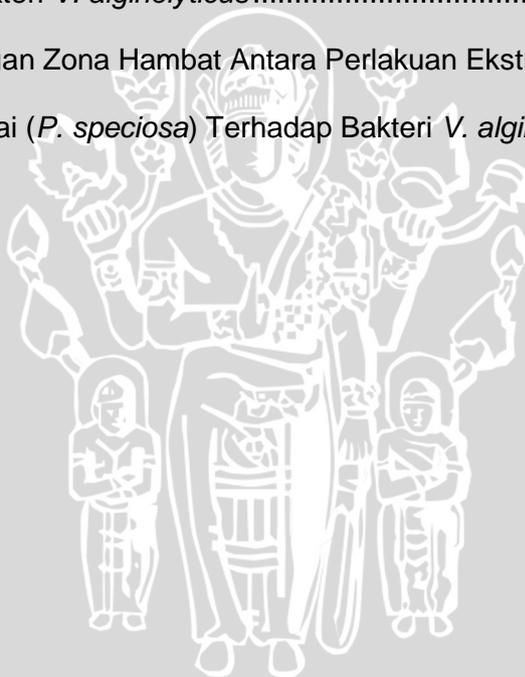
DAFTAR ISI

	Halaman
DAFTAR ISI	iv
DAFTAR GAMBAR	vi
DAFTAR TABEL	vii
DAFTAR LAMPIRAN	viii
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang	1
1.2 Rumusan Masalah.....	4
1.3 Tujuan Penelitian.....	4
1.4 Hipotesis	5
1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	6
2.1 Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	6
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi	6
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	7
2.1.3 Infeksi dan Tanda-Tanda Penyerangan	8
2.2 Petai (<i>P. speciosa</i>)	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi	8
2.2.2 Bahan Aktif Petai	9
2.2.3 Aktivitas Antimikroba	10
2.3 Uji Efektivitas Antibakteri Secara <i>In Vitro</i>	12
2.3.1 Uji Cakram.....	12
3. METODE PENELITIAN	13
3.1 Alat dan Bahan Penelitian	13
3.1.1 Alat Penelitian.....	13
3.1.2 Bahan Penelitian.....	13
3.2 Metode Penelitian.....	13
3.3 Pengambilan Data	14
3.4 Rancangan Penelitian	14
3.5 Prosedur Penelitian	15

3.5.1 Persiapan Penelitian	15
a. Sterilisasi Alat dan Bahan	15
c. Pembuatan Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>)	16
d. Pembuatan media TCBS (<i>Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar</i>)	17
e. Pembuatan media TSB (<i>Tryptitone Soy Broth</i>)	18
f. Pemiakan bakteri <i>V. alginolyticus</i>	18
g. Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) pada Uji Difusi Kertas Cakram	19
3.5.2 Pelaksanaan Penelitian	20
3.6 Parameter Uji	21
3.6.1 Parameter Utama	21
3.6.2 Parameter Penunjang	21
3.7 Analisis Data	21
4. HASIL DAN PEMBAHASAN	22
4.1 Identifikasi Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	22
4.2 Daya Hambat (Zona Bening) Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) terhadap Bakteri <i>V. alginolyticus</i> secara <i>In Vitro</i>	24
4.3 Suhu Inkubator Selama Penelitian	29
5. KESIMPULAN DAN SARAN	31
5.1 Kesimpulan	31
5.2 Saran	31
DAFTAR PUSTAKA	32

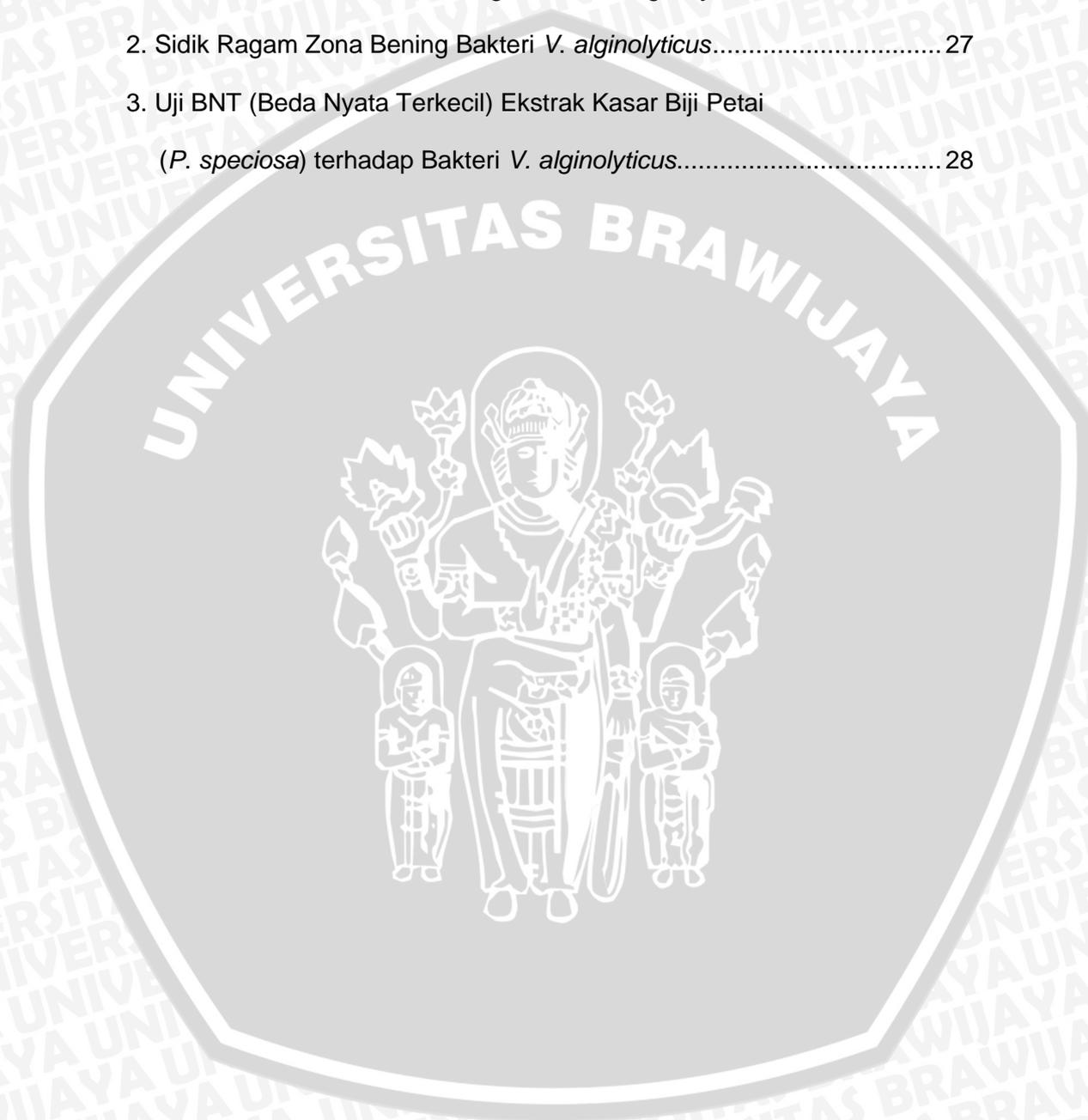
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	7
2. Petai (<i>P. speciosa</i>).....	9
3. Denah Penempatan Uji Cakram	15
4. Hasil Uji Pewarnaan Gram Bakteri <i>V. alginolyticus</i> Perbesaran 1000x.....	24
5. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Bij Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	25
6. Grafik Hubungan Zona Hambat Antara Perlakuan Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	29



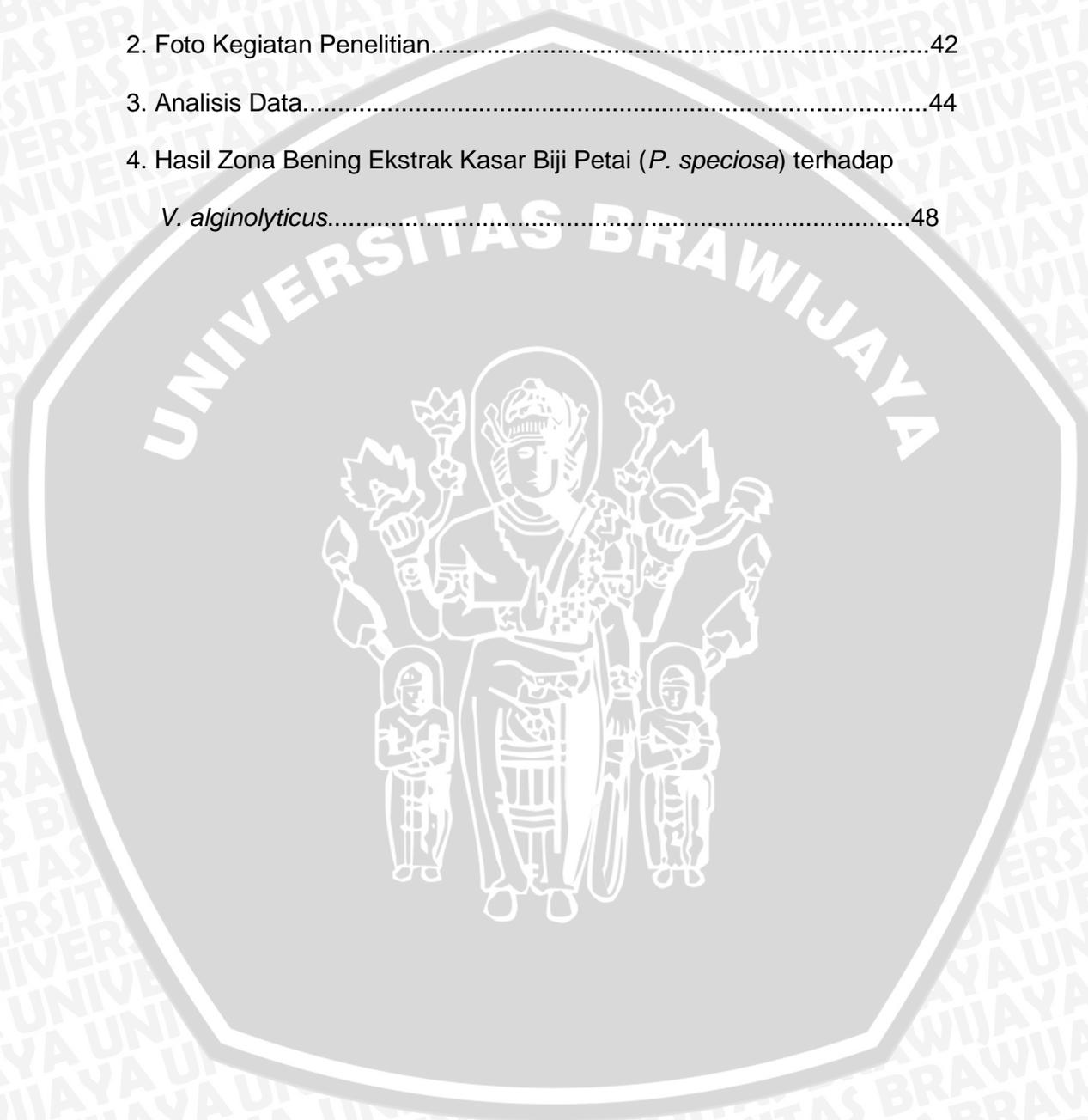
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Hasil Rata – Rata Zona Bening Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	27
2. Sidik Ragam Zona Bening Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	27
3. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) terhadap Bakteri <i>V. alginolyticus</i>	28



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Foto Alat dan Bahan Penelitian.....	37
2. Foto Kegiatan Penelitian.....	42
3. Analisis Data.....	44
4. Hasil Zona Bening Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) terhadap <i>V. alginolyticus</i>	48



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Sumber daya alam (SDA) kelautan dan perikanan yang terbentang luas di Nusantara merupakan potensi besar Negara Indonesia. Kondisi tersebut merupakan aset yang sangat mahal sekaligus sebagai faktor unggulan kompetitif yang tidak dimiliki oleh negara-negara lain. Potensi sumber daya alam kelautan dan perikanan tersebut adalah faktor dominan dalam strategi pembangunan bangsa dan negara Indonesia. Secara aktif, Indonesia merupakan bagian dari masyarakat dunia yang ikut serta dalam pergaulan dunia dalam rangka membangun tata ekonomi dunia baru, salah satunya adalah pembangunan dibidang kelautan dan perikanan. Seiring dengan peningkatan peran sektor kelautan dan perikanan dalam pembangunan nasional, pembangunan sektor ini dimasa datang juga akan menghadapi sejumlah tantangan, salah satunya berupa serangan hama dan penyakit ikan yang menjadi penyebab utama kegagalan dalam usaha budidaya (Syarief, 2011).

Penyakit ikan didefinisikan sebagai segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan suatu fungsi atau struktur dari organ-organ tubuh atau sebagian organ tubuh, baik secara langsung maupun tidak langsung. Pada prinsipnya penyakit yang menyerang ikan tidak datang begitu saja, melainkan melalui proses interaksi antara tiga faktor yaitu kondisi lingkungan (kualitas air), kondisi inang (ikan) dan adanya jasad patogen (jasad penyakit). Dengan demikian, timbulnya serangan penyakit adalah hasil interaksi yang tidak selaras antara lingkungan, ikan, dan jasad atau organisme penyakit. Interaksi yang tidak selaras ini menyebabkan stres pada ikan, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimiliki menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit (Kordi, 2005).

Penyakit bakterial pada ikan adalah salah satu penyakit yang dapat menimbulkan kerugian yang tidak sedikit. Selain dapat mengakibatkan ikan mati, penyakit ini dapat mengakibatkan menurunnya kualitas daging ikan yang terinfeksi. Bakteri patogen pada ikan dapat bersifat sebagai infeksi primer atau sekunder. Penyakit akibat infeksi bakteri di Indonesia dapat mengakibatkan kematian sekitar 50-100% (Supriyadi dan Rukyani, 1990 dalam Wiyanto, 2010).

Salah satu jenis bakteri patogen yang biasa menyerang ikan budidaya yaitu *Vibrio* sp. Penyakit yang dihasilkan oleh bakteri patogen genus *Vibrio* sp, terutama spesies *Vibrio alginolyticus* yang biasa kita sebut dengan istilah vibriosis. Vibriosis adalah penyakit bakterial yang disebabkan oleh infeksi patogen golongan *Vibrio* dan menyebabkan kematian ikan mencapai lebih dari 80% pada budidaya ikan di jaring apung. Penyakit vibriosis menyerang hampir semua jenis ikan air laut yang dibudidayakan. Terdapat beberapa istilah yang mengacu pada penyakit vibriosis ini, antara lain *red pest*, *saltwater furunculosis*, *boil disease*, dan *ulcer disease*. *Vibrio alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. anguillarum*, dan *V. marinus* bersifat sangat ganas dan berbahaya baik pada budidaya ikan air laut maupun air payau karena dapat bertindak sebagai patogen primer dan sekunder (Ilmiah, Sukenda, Widanarni, dan Harris, 2012).

V. parahaemolyticus dan *V. alginolyticus* merupakan penyebab kematian pada ikan laut hingga mencapai 80–90%. Kedua jenis bakteri tersebut merupakan penyebab kematian yang potensial pada ikan kerapu. Infeksi bakteri patogen *Vibrio* ini diduga sebagai penyebab rendahnya laju sintasan (*Survival Rate*) pada pembenihan ikan kerapu tikus, yaitu hanya berkisar 1,2 – 2,9% (Raza'i, 2010).

Hingga saat ini bahan yang sering digunakan untuk menanggulangi penyakit pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Penggunaan antibiotik dalam jangka waktu lama akan mempunyai

beberapa kelemahan yaitu dapat menimbulkan resistensi terhadap bakteri, memerlukan biaya yang cukup mahal, dan dapat mencemari lingkungan. Antibiotik diberikan melalui pakan, perendaman, atau penyuntikan, sehingga residu antibiotik dapat terakumulasi pada ikan (Maryono dan Sundana, 2002 dalam Indriani, Prayitno, dan Sarjito, 2014). Berdasarkan hal tersebut, maka perlu dilakukan upaya lain untuk mengobati penyakit pada ikan yaitu dengan menggunakan bahan alami yang berasal dari tumbuhan atau fitofarmaka.

Menurut BPPOM (2005) dalam Wahjuningrum, Astrini, dan Setiawati (2013), fitofarmaka mempunyai beberapa keunggulan dibandingkan kegiatan penanggulangan penyakit lainnya, antara lain yaitu dapat dibuat dengan teknik yang sederhana dan tidak menimbulkan kerusakan lingkungan untuk pemakaian dalam jangka waktu yang lama. Fitofarmaka adalah sediaan bahan alam dari tanaman yang telah terbukti keamanan dan khasiatnya secara ilmiah dengan uji praklinis dan uji klinis, sehingga bahan baku serta produk jadinya telah distandardisasi oleh pihak-pihak berwenang.

Salah satu bahan alami dari tanaman yang mengandung senyawa antibakteri adalah petai (*P. speciosa*). Tanaman petai dapat ditemukan di beberapa negara tropis seperti Indonesia, Malaysia, dan Thailand. Bijinya yang biasa dikonsumsi sebagai sayuran, hidangan pelengkap, atau penyedap rasa untuk masakan (Hasim, Faridah dan Kurniawati, 2015). Biji petai diketahui mengandung senyawa alkaloid, terpenoid, flavonoid, dan fenolik (Kamisah, Qodriyah, Jaarin dan Othman, 2013). Senyawa fenol, flavonoid, terpenoid merupakan senyawa metabolit sekunder yang diduga merupakan golongan senyawa bioaktif yang dapat menghambat pertumbuhan mikroba (Nursal, Wulandari dan Juwita, 2006).

Berdasarkan hal tersebut, maka peneliti melakukan penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) sebagai antibakteri

terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* dengan metode uji cakram. Penelitian ini diharapkan dapat mengetahui potensi petai yang telah banyak dikenal dapat bermanfaat dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* yang merupakan bakteri patogen dalam usaha budidaya perikanan air payau dan air laut.

1.2 Rumusan Masalah

Penggunaan antibiotik untuk mengobati ikan yang terinfeksi oleh penyakit merupakan langkah yang tidak tepat, karena dapat menimbulkan resistensi terhadap bakteri, oleh karena itu perlu dilakukan upaya pengobatan lain pada ikan yaitu dengan menggunakan bahan alami yang berasal dari tumbuhan atau fitofarmaka, salah satu tanaman yang berpotensi sebagai bahan pengobatan yaitu tanaman petai (*P. speciosa*). Berdasarkan latar belakang masalah ini belum diketahui pengaruh pemberian ekstrak kasar biji petai terhadap daya hambat bakteri *V. alginolyticus* dengan dosis 20 ppt, 40 ppt, 60 ppt, 80 ppt dan 100 ppt. Berhubungan dengan hal tersebut, maka diperoleh rumusan masalah dalam penelitian ini yaitu:

- Apakah pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) memiliki daya hambat terhadap bakteri *V. alginolyticus* dengan dosis 20 ppt, 40 ppt, 60 ppt, 80 ppt dan 100 ppt ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk menjelaskan pengaruh daya hambat pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* secara *In Vitro*.

1.4 Hipotesis

H_0 : diduga pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) dengan dosis berbeda tidak berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *V. alginolyticus*.

H_1 : diduga pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) dengan dosis berbeda berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *V. alginolyticus*.

1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Januari hingga Maret 2016.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Bakteri *V. alginolyticus*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi bakteri *V. alginolyticus* menurut Garrity, Bell dan Lillburn (2004) adalah sebagai berikut:

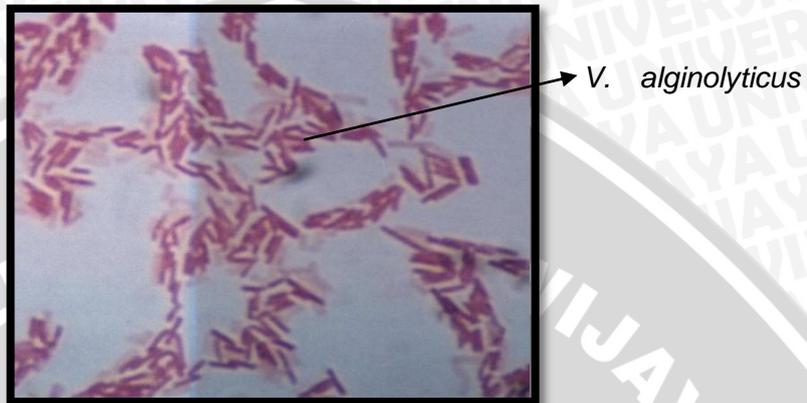
Kingdom	: Bacteria
Filum	: Proteobacteria
Kelas	: Gammaproteobacteria
Ordo	: Vibrionales
Family	: Vibrionaceae
Genus	: Vibrio
Spesies	: <i>V. alginolyticus</i>

Bakteri vibrio adalah bakteri gram negatif yang berbentuk batang bengkok, oksidase dan katalase bersifat positif, dapat memfermentasikan glukosa tanpa menghasilkan gas dan mempunyai flagel polar. Bakteri ini sangat umum dijumpai di air payau dan laut. Sebagian bersifat saproba namun ada beberapa spesies yang menyebabkan penyakit vibriosis pada hewan akuatik termasuk ikan (Desrina, Taslihan, Ambariyanto, dan Suryaningrum, 2006).

Koloni berwarna kuning pada media TCBSA yang berukuran 0.8-1.2 μm merupakan koloni bakteri *V. alginolyticus*. Ciri lain dari bakteri ini yaitu gram negatif, motil, berbentuk batang bengkok, memiliki flagella yang bercabang ke samping dan bergerombol dalam media (Noel dan Gustafson, 1984).

Koloni berbentuk batang, motil, gram negatif, dapat tumbuh pada media TCBSA, tumbuh pada NaCl 1-8%, dapat mensintesa sukrosa, tumbuh menyebar memenuhi permukaan atau swarming pada TSA dan fermentatif atau anaerob, tidak menghasilkan gas dari proses fermentasi glukosa, menghasilkan asam dari

proses fermentasi glukosa, maltosa, dekstrosa dan manosa, berarti bakteri ini termasuk kedalam genus *Vibrio* yang diidentifikasi sebagai *V. alginolyticus* (Johny dan Roza, 2014). Adapun gambar bakteri *V. alginolyticus* disajikan pada Gambar 1.



Gambar 1. *V. alginolyticus* dengan Perbesaran 1000x (Luturmas dan Pattinasarany, 2010)

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Gomathi, Vinothkumar dan Arunagiri (2013), genus *Vibrio* mencakup lebih dari 35 spesies termasuk *V. alginolyticus* yang memiliki habitat di lingkungan laut. Spesies ini secara geografis menyebar luas ke seluruh dunia dan dapat ditemukan pada perairan laut maupun estuaria. *V. alginolyticus* mampu berkembang biak pada air asin dengan suhu air tinggi.

Menurut Ming-Xia, He-Yang, Gang dan Tian-Ling (2011), penyebaran *V. alginolyticus* dipengaruhi oleh beberapa faktor, salah satunya yaitu faktor lingkungan, faktor lingkungan yang paling penting adalah salinitas, spesies ini hanya dapat dijumpai pada perairan dengan salinitas tinggi yaitu lebih dari 11,5‰. Selain itu, suhu juga berperan dalam penyebaran spesies ini. Dijelaskan pula oleh Bauman, et al. (1984) dalam Prajitno (2007), suhu optimum untuk pertumbuhan *Vibrio* spp. berkisar antara 20⁰-35⁰C dan termasuk jenis bakteri halofit yang dapat tumbuh secara optimall pada salinitas 20-30 ppt.

2.1.3 Infeksi dan Tanda-Tanda Penyerangan

V. alginolyticus menginfeksi ikan melalui berbagai rute yaitu *intramuscular* (IM), *intravena* (IV) dan *intraperitoneal* (IP) (Murdjani, 2002 dalam Nursyirwani, Asmara, Wahyuni, dan Triyanto, 2011). Vibriosis menyebabkan gejala septicemia dengan luka menyebar pada kulit, nekrosis pada hati, ginjal, dan jaringan yang lain. *V. alginolyticus* menyerang ikan dan organisme lainnya dimulai dari bagian lendir (mukus) yang diproduksi oleh tubuh sebab lendir merupakan lapisan pertama pertahanan ikan. Gejala klinis infeksi *Vibrio* yaitu terjadi septicemia, hemoragik pada kulit, insang, ekor, jaringan otot, dan permukaan serosal, borok pada kulit. Limpa ikan yang terinfeksi akan mengalami pembengkakan dan berwarna merah cerah, secara histologis hati, ginjal, limpa, dan mukosa usus mengalami nekrosis (Ilmiah, *et al.*, 2012).

Gejala klinis awal yang terlihat pada ikan yang diinfeksi dengan *V. alginolyticus* yaitu nafsu makan berkurang, lesu, berenang miring, ginjal pucat. Ikan yang sakit dan mati menunjukkan gejala ginjal pucat, borok pada tubuh, dan mulut merah. Luka pada tubuh terlihat setelah 6 hari pasca infeksi, yang makin lama makin besar dan menjadi borok berdiameter 2 cm. Sebagian ikan uji mati tanpa adanya gejala klinis eksternal (Desrina, *et al.*, 2006).

2.2 Petai (*P. speciosa*)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi Petai (*P. speciosa*) menurut Susilo (2012), adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Plantae
Divisio	: Magnoliophyta
Kelas	: Magnoliopsida
Ordo	: Fabales
Famili	: Leguminosae

Genus : Parkia

Species : *P. speciosa* Hassk.

Petai (*P. speciosa* Hassk.) merupakan pohon tahunan tropis dari suku polong-polongan. Tanaman ini berbentuk pohon dengan tinggi mencapai 5-25 m, bercabang banyak dengan kulit batang berwarna coklat kemerah-merahan dan daunnya menyirip ganda. Bunganya ketika masih muda berwarna hijau, keras dan berbentuk bongkol. Bentuk buahnya berpolong-polong, berisi biji-biji yang apabila ketika masih muda agak lunak dan agak keras setelah menjadi tua. Buah petai mulanya berwarna hijau muda, kemudian semakin lama menjadi hijau tua dan akan berwarna hitam setelah masak (Susilo, 2012). Jumlah biji dalam satu buah bisa mencapai 20 biji, yang berwarna hijau ketika masih muda dan terbalut oleh selaput agak tebal berwarna coklat terang. Buah petai akan mengering jika masak dan biji-bijinya akan terlepas dengan sendirinya (Agoes, 2010). Adapun gambar petai disajikan pada Gambar 2.



Gambar 2. Petai (*P. speciosa*) (Kamisah, et al., 2013)

2.2.2 Bahan Aktif Petai

Biji tanaman petai memiliki banyak kandungan bahan alam yang berkhasiat seperti karbohidrat, protein, lemak, fosfor, zat besi, sulfur, vitamin A, vitamin C, sukrosa, fruktosa, glukosa, tanin, saponin, flavonoida dan polifenol (Susilo, 2012).

Menurut Kamisah, *et al.* (2013), hampir semua senyawa kimia utama terdapat dalam biji. Senyawa fenolik juga terdapat pada hampir semua bagian tanaman. Pada biji, terpenoid dideteksi dengan menggunakan kromatografi gas yaitu *β -sitosterol*, *stigmasterol*, *lupeol*, *campesterol*, dan *squalene*. Terdapat flavonoid seperti *quercetin*, *myricetin*, *luteolin*, *kaempferol*, atau *apigenin* terdeteksi dalam ekstrak etanol ketika disaring menggunakan sebuah pengujian kadar logam kolorimetri. Selain itu, alkaloid juga ditemukan pada tanaman. Biji juga mengandung polysulfides siklik, yaitu, *hexathionine*, *tetrathiane*, *trithiolane*, *pentathiopane*, *pentathiocane*, dan *tetrathiepane* yang berperan terhadap bau tajam dan rasa yang kuat. Menurut Fathaiya, Suhaila, dan Nordin (1995), biji petai memiliki polysulfides siklik antibakteri yang menunjukkan aktivitas antibakteri.

Yuharmen, Eryanti, dan Nurbalatif (2002) dalam Sitepu, Suada, dan Susrama (2012), mengungkapkan bahwa flavonoid dapat merusak membran sel bakteri karena flavonoid adalah senyawa yang bersifat lipofilik. Dijelaskan pula bahwa efek antimikroba dari senyawa terpenoid juga memiliki kemampuan untuk merusak membran sel bakteri. Senyawa lain sebagai antibakteri menurut Karou (2005), yaitu senyawa alkaloid berperan dengan menyisip pada DNA sehingga merubah struktur ikatan DNA dengan menghambat sintesis DNA dengan cara menghambat kerja enzim topoisomerase. Senyawa fenol menurut Singh (2005), memiliki mekanisme kerja dalam menghambat pertumbuhan bakteri dengan cara inaktivasi protein (enzim) pada membran sel.

2.2.3 Aktivitas Antimikroba

Antibakteri atau antimikroba yaitu bahan yang dapat membunuh atau menghambat aktivitas mikroorganisme dengan berberbagai macam cara. Senyawa antimikroba terdiri atas beberapa kelompok berdasarkan mekanisme daya kerja atau tujuan penggunaannya. Bahan antimikroba dapat secara fisik

atau kimia dan berdasarkan tujuan penggunaannya dapat berupa desinfektan, antiseptic, sterilizer, sanitizer dan sebagainya (Lutfi, 2004). Menurut Johnny dan Roza (2014), antimikroba adalah obat pembasmi mikroba, khususnya mikroba yang merugikan ikan. Yang dimaksud dengan mikroba disini terbatas pada jasad renik dan tidak termasuk kelompok parasit. Obat yang digunakan untuk membasmi mikroba, penyebab infeksi pada ikan, ditentukan harus memiliki sifat toksisitas selektif setinggi mungkin. Artinya, obat tersebut haruslah bersifat sangat toksik untuk mikroba, tetapi relatif tidak toksik untuk hospes.

Mekanisme penghambatan terhadap pertumbuhan bakteri oleh senyawa antibakteri dapat berupa perusakan dinding sel dengan cara menghambat pembentukannya atau mengubahnya setelah selesai terbentuk, perubahan permeabilitas membran sitoplasma sehingga menyebabkan keluarnya bahan makanan dari dalam sel, perubahan molekul protein dan asam nukleat, penghambatan kerja enzim, dan penghambatan sintesis asam nukleat dan protein. Dalam bidang farmasi, bahan antibakteri dikenal dengan nama antibiotik, yaitu suatu substansi kimia yang dihasilkan oleh mikroba dan dapat menghambat pertumbuhan mikroba lain. Senyawa antibakteri dapat bekerja sebagai bakteristatik, bakterisidal, dan bakterilitik (Pelczar dan Chan, 1986).

Antibakteri digolongkan sebagai bakteristatik apabila bakteri tidak mengalami kematian dan juga tidak tumbuh pada konsentrasi tersebut. Antibakteri digolongkan sebagai bakteriosidal apabila pada konsentrasi tersebut bakteri mengalami kematian. Senyawa antibakteri bekerja dengan cara berinteraksi dengan dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan juga berdifusi ke dalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat (bakteristatik) dan atau mati (bakteriosidal). Selain itu, senyawa antibakteri juga dapat menembus membran dan berinteraksi dengan material genetik sehingga bakteri mengalami mutasi (Wiyanto, 2010).

2.3 Uji Efektivitas Antibakteri Secara In Vitro

2.3.1 Uji Cakram

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. Metode difusi adalah salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan dengan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling cakram (Kusmiyati dan Agustini, 2007).

Metode yang digunakan dalam uji antibakteri yaitu dengan metode difusi cakram kertas. Metode ini dilakukan dengan meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji diatas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Pencelupan cakram pada larutan uji hingga seluruh permukaan cakram basah. Pengamatan dilakukan setelah bakteri diinokulasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat zona bening disekitar cakram. Pemilihan metode ini karena mudah dan sederhana untuk menentukan aktivitas antibakteri sampel yang diuji (Mulyadi, Wuryanti, dan Ria, 2013).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Alat dan Bahan Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain timbangan analitik, *autoclave*, lemari pendingin, *hotplate*, cawan petri, *laminar air flow*, spektrofotometer, cuvet, inkubator, toples kaca, tabung reaksi, rak tabung reaksi, beaker glass, erlenmeyer, gelas ukur, jarum osse, *triangle*, spatula, pinset, bunsen, *rotary vacuum evaporator*, mikropipet, blender, jangka sorong digital, corong, dan *vortex*.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini antara lain yaitu biji petai (*P. speciosa*), bakteri *V. alginolyticus*, alkohol 70%, TCBSA (*Thiosulfat Citrate Bilesalt Sucrose Agar*), TSB (*Tryptitone Soy Broth*), DMSO 10%, etanol 96%, tali kasur, tissue, kapas, kertas saring, akuades, *aluminium foil*, spiritus, kertas cakram 6 mm, kertas koran, dan kertas label.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian ini yaitu metode eksperimental. Menurut Subana dan Sudrajat (2005), penelitian percobaan atau eksperimen adalah penelitian yang melihat dan meneliti adanya akibat setelah subjek dikenai perlakuan pada variabel bebasnya. Adanya kontrol terhadap variabel luar atau paling tidak pengaruh kondisi disekitar subjek penelitian. Sedangkan menurut Margono (2005), penelitian eksperimen menggunakan suatu percobaan yang dirancang secara khusus yang berfungsi membangkitkan data yang diperlukan untuk menjawab pertanyaan penelitian.

3.3 Pengambilan Data

Teknik pengambilan data dalam penelitian ini dilakukan dengan cara observasi langsung, yaitu penyelidik mengadakan pengamatan terhadap gejala-gejala subjek yang diselidiki baik secara langsung dalam situasi yang sebenarnya maupun yang sengaja dibuat untuk keperluan khusus (Surachmad, 1896).

3.4 Rancangan Penelitian

Rancangan penelitian yang digunakan adalah rancangan acak lengkap. Menurut Tanujaya (2013), pengacakan yang dilakukan dalam percobaan ini dilakukan secara lengkap dan tidak adanya sumber keragaman lain yang diperkirakan sebelumnya maka hanya terdapat satu sumber keragaman dalam model RAL. Model linier untuk percobaan yang dilakukan dengan RAL adalah sebagai berikut:

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

Keterangan:

μ : Nilai rerata umum (*mean*)

α : kontribusi perlakuan ke-*i*

ε : sisaan dari perlakuan ke-*i* pada ulangan ke-*j*

Y_{ij} : nilai respons dari perlakuan ke-*i* pada ulangan ke-*j* yang teramati

Penelitian dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) dengan perlakuan yang diberikan adalah perbedaan dosis terhadap bakteri *V. alginolyticus*. Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat yang tepat dalam penggunaan ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*). Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali dan perlakuan tersebut diperoleh total

sampel sebanyak 5 perlakuan dengan kontrol positif dan negatif. Tingkat dosis yang digunakan dalam penelitian ini yaitu:

K (+) : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar biji petai 200 ppt

K (-) : Perlakuan dengan konsentrasi DMSO 10%

A : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar biji petai 20 ppt

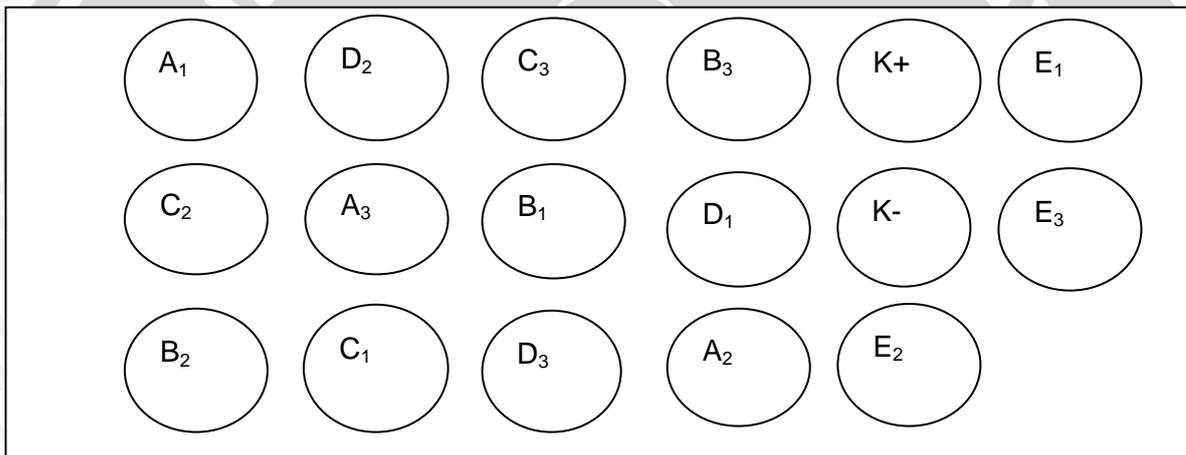
B : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar biji petai 40 ppt

C : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar biji petai 60 ppt

D : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar biji petai 80 ppt

E : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar biji petai 100 ppt

Denah penempatan tiap perlakuan disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Denah Penempatan Uji Cakram

Keterangan:

K : Kontrol positif (+) dan negatif (-)

A - E : Perlakuan

1 - 3 : Ulangan

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Persiapan Penelitian

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

- Semua alat-alat dicuci dengan menggunakan sabun dan ditunggu hingga kering.
- Setelah kering, alat dibungkus dengan menggunakan plastik tahan panas atau dibungkus dengan menggunakan kertas koran. Sterilisasi bahan

dilakukan dengan cara memasukkan bahan ke dalam erlenmeyer atau ke dalam tabung reaksi dengan menutup ujung mulutnya dengan menggunakan kapas.

- Akuades dimasukkan ke dalam ruang sterilisasi sampai menutup sistem pemanas (*heater*), kemudian alat dan bahan yang sudah siap disterilisasi, dimasukkan ke dalam *autoclave*.
- *Autoclave* ditutup rapat dengan cara mengencangkan baut secara simetris.
- *Autoclave* dinyalakan pada posisi ON (ke atas), dan temperatur diputar pada posisi maksimal.
- Setelah mencapai suhu 121°C dan tekanan menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15 menit dengan cara membuka dan atau menutup kran uap yang berada di bagian atas tutup *autoclave*.
- *Autoclave* dimatikan pada posisi OFF, lalu klep dibuka secara perlahan sampai jarum menunjukkan angka 0 dan tutup *autoclave* dapat dibuka.

b. Sterilisasi Tempat Perlakuan

Tempat perlakuan yang akan digunakan harus steril untuk menghindari kontaminan. Tangan laboran yang akan bersinggungan, meja dan barang di sekitar tempat perlakuan harus selalu dalam kondisi yang aseptis. Sterilisasi tempat perlakuan dapat dilakukan dengan cara kimia yaitu menggunakan cairan alkohol yang diberikan ke tangan dan barang yang akan digunakan.

c. Pembuatan Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*)

- Biji petai segar diambil sebanyak 3,5 kg, kemudian dicuci dan ditiriskan hingga kering.
- Biji petai dipotong tipis-tipis, lalu diangin-anginkan.
- Biji petai kering selanjutnya dioven selama 72 jam dengan suhu 50⁰ C yang bertujuan untuk mengurangi kadar air dari biji sehingga mudah untuk

mendapatkan senyawa antibakterinya, lalu didapatkan 750 gram bubuk kering biji petai.

- Persiapan perendaman (*maserasi*) dimana serbuk biji petai sebanyak 500 gram dimaserasi dalam etanol 96% sebanyak 2500 mililiter selama 1x24 jam dalam suhu kamar.
- Larutan yang didapat kemudian disaring dengan kertas saring lalu diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak biji petai sebanyak 11,55 gram.

d. Pembuatan media TCBS (*Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar*)

- TCBSA dosis 80 gram/l ditimbang sebanyak 35,2 gram.
- NaCl ditimbang sebanyak 7,36 gram, MgSO₄ 2,78 gram dan KCl 0,3 gram, dimasukkan ke dalam erlenmeyer dan dicampur dengan akuades 400 ml, kemudian erlenmeyer ditutup dengan kapas dan *aluminium foil*, lalu disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Media TCBSA sebanyak 35,2 gram dimasukkan ke dalam erlenmeyer berisi campuran NaCl 7,36 gram, MgSO₄ 2,78 gram, KCl 0,3 gram, dan akuades 400 ml yang telah disterilisasi.
- Media diaduk pada kondisi hangat diatas *hotplate* sampai tercampur rata. Media yang akan dipakai dibiarkan dingin hingga mencapai suhu $\pm 30^{\circ}\text{C}$ karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.
- Media dituang pada cawan petri steril dan ditunggu hingga dingin hingga membentuk agar. Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin dengan diberi label, dan dipanaskan kembali apabila ingin digunakan.

e. Pembuatan media TSB (*Tryptitone Soy Broth*)

- TSB ditimbang sebanyak 0,32 gram, kemudian dimasukkan dalam erlenmeyer berisi 10 ml akuades dan dicampur dengan 0,184 gram NaCl, 0,069 gram MgSO₄ dan 0,007 gram KCl.
- TSB diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kuning.
- Erlenmeyer ditutup kapas dan *aluminium foil* dan diikat dengan benang kasur.
- Media disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Setelah dingin, TSB dapat digunakan untuk reinokulasi bakteri dari TCBSA miring ke media cair. Media yang akan digunakan untuk pembiakan bakteri dibiarkan dingin karena bakteri akan mati bila diinokulasi pada media yang masih panas.

f. Pembiakan bakteri *V. alginolyticus*

- TSB disiapkan sebanyak 0,32 gram dalam erlenmeyer berisi 10 ml akuades.
- Jarum osse dipanaskan di atas bunsen hingga berpijar untuk membunuh mikroorganisme, setelah dingin jarum osse disentuh ke biakan murni *V. alginolyticus* pada agar miring sebanyak 2 osse, lalu jarum osse dicelupkan ke media TSB.
- TSB dibiarkan selama 24 jam dengan suhu 33⁰ C di dalam inkubator.
- Setelah 24 jam, media TSB akan berubah menjadi keruh yang menandakan bahwa bakteri telah tumbuh.
- Setelah itu untuk mengetahui kepadatan hasil pembiakan bakteri, dilakukan pengukuran dengan larutan pembanding *Mac Farland*, apabila kepadatan tidak sesuai maka dilakukan pengenceran bertingkat hingga diperoleh

kepadatan yang dikehendaki. Kepadatan bakteri *V. alginolyticus* yang digunakan adalah 15×10^8 sel/ml.

- Cawan petri yang berisi media TCBSA disiapkan, kemudian biakan bakteri dari media TSB diambil dengan menggunakan mikropipet sebanyak 0,1 ml, lalu ditetaskan dan diratakan ke seluruh permukaan media agar dengan menggunakan *triangle*, dan media TCBSA diinkubasi di dalam inkubator selama 48 jam dengan suhu 33°C .

g. Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) pada Uji Difusi Kertas Cakram

Penentuan dosis ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) dalam penelitian ini berdasarkan hasil uji pendahuluan, dimana dosis 200 ppt sudah dapat menghambat bakteri *V. alginolyticus*. Perlakuan dosis yang digunakan dalam penelitian ini adalah 20 ppt, 40 ppt, 60 ppt, 80 ppt, dan 100 ppt, dengan ditambahkan larutan DMSO 10% sebagai pelarut atau pengencer.

- Dosis 20 ppt

Ekstrak kasar biji petai ditimbang sebanyak 0,3 gram dan DMSO 10% ditambahkan sebanyak 2,7 ml sehingga menghasilkan ekstrak kasar biji petai sebanyak 3 ml dengan dosis 20 ppt.

- Dosis 40 ppt

Ekstrak kasar biji petai ditimbang sebanyak 0,6 gram dan DMSO 10% ditambahkan sebanyak 2,4 ml sehingga menghasilkan ekstrak kasar biji petai sebanyak 3 ml dengan dosis 40 ppt.

- Dosis 60 ppt

Ekstrak kasar biji petai ditimbang sebanyak 0,9 gram dan DMSO 10% ditambahkan sebanyak 2,1 ml sehingga menghasilkan ekstrak kasar biji petai sebanyak 3 ml dengan dosis 60 ppt.

- Dosis 80 ppt

Ekstrak kasar biji petai ditimbang sebanyak 1,2 gram dan DMSO 10% ditambahkan sebanyak 1,8 ml sehingga menghasilkan ekstrak kasar biji petai sebanyak 3 ml dengan dosis 80 ppt.

- Dosis 100 ppt

Ekstrak kasar biji petai ditimbang sebanyak 1,5 gram dan DMSO 10% ditambahkan sebanyak 1,5 ml dan menghasilkan ekstrak kasar biji petai sebanyak 3 ml dengan dosis 100 ppt.

3.5.2 Pelaksanaan Penelitian

- TSB dibiarkan selama 24 jam dengan suhu 33⁰ C di dalam inkubator.
- Langkah pertama yaitu cawan petri yang telah terdapat media TCBSA disiapkan terlebih dahulu.
- Ekstrak kasar biji petai untuk uji cakram disiapkan sesuai dosis yang telah ditentukan.
- Kertas cakram steril ukuran 6 mm direndam ke dalam ekstrak kasar biji petai dengan dosis yang ditentukan selama 15 menit.
- Penanaman bakteri pada media TCBSA dilakukan dengan metode tebar yaitu dengan cara mengambil biakan bakteri dari media TSB dengan mikropipet sebanyak 0,1 ml, kemudian ditetaskan pada permukaan media agar, dan diratakan dengan menggunakan *triangle* hingga merata ke seluruh permukaan media.
- Kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak kasar biji petai ditiriskan dan diletakkan pada permukaan media agar dan ditekan sedikit agar ekstrak kasar biji petai meresap pada media agar. Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh bergeser karena akan mengurangi validasi pengukuran.

- 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. Kemudian diinkubasi pada suhu ruang 33°C selama 24 jam.
- Hasil dibaca setelah diinkubasi pada suhu ruang 33°C selama 48 jam dengan mengukur zona hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong digital. Apabila pada daerah bening terlihat adanya pertumbuhan bakteri, maka dosis tersebut bersifat bakteristatis, namun jika sebaliknya maka dosis tersebut bersifat bakteriosidal.

3.6 Parameter Uji

3.6.1 Parameter Utama

Parameter utama adalah parameter uji yang berupa ukuran zona bening yang dihasilkan setelah uji difusi kertas cakram dengan menggunakan ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) dalam satuan milimeter (mm).

3.6.2 Parameter Penunjang

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

3.7 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Hal ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji beda nyata terkecil (BNT) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

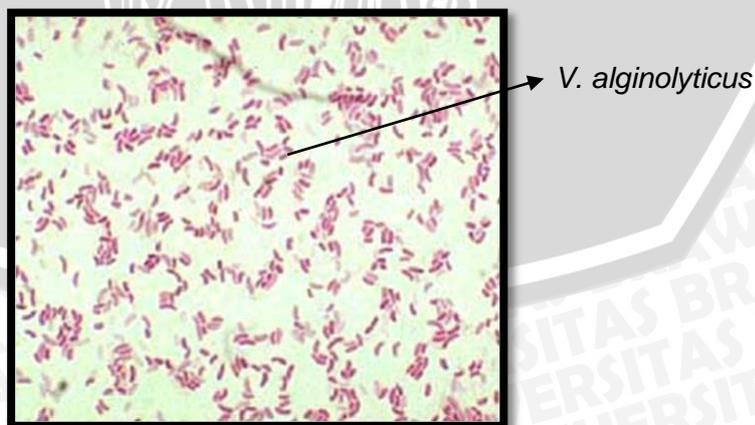
4.1 Identifikasi Bakteri *V. alginolyticus*

Proses identifikasi bakteri dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan dalam penelitian ini adalah bakteri *V. alginolyticus*. Menurut Firnanda, Sugito, Fakhurrrazi, dan Ambarwati (2013), untuk identifikasi bakteri, koloni yang menciri, kemudian ditanam kembali pada *triple sugar iron agar* (TSIA), katalase, oksidase, glukosa, laktosa, sukrosa, maltosa, arabinosa, sitrat, urea, MR-VP, motiliti, inositol dan ornitin (MIO), LIA (diaminase dan dekarboksilase). Menurut Kusen, Tumbol dan Manopo (2015), identifikasi bakteri dilakukan melalui serangkaian pengamatan koloni dan morfologi bakteri melalui pewarnaan gram, dilanjutkan dengan uji biokimia.

Proses identifikasi bakteri dalam penelitian ini dilakukan dengan menggunakan uji pewarnaan gram. Menurut Samsundari (2006), pewarnaan gram merupakan salah satu metode untuk mengetahui morfologi bakteri, yang bermanfaat untuk mengetahui apakah biakan bakteri masuk dalam golongan gram positif atau gram negatif. Cara pengujiannya yaitu isolat bakteri diambil 1 ose dan digores-goreskan pada permukaan preparat steril, dan dikeringkan di atas api bunsen. Setelah kering, bakteri ditetesi dengan reagen A (Kristal Violet), tunggu selama satu menit, lalu dibilas dengan air. Bakteri kembali dikeringkan di atas api bunsen, lalu ditetesi dengan reagen B (Lugol) selama satu menit, bilas kembali dengan air dan dikeringkan. Setelah kering, bakteri ditetesi dengan reagen C (Ethanol 95%), tunggu selama 30 detik, lalu dibilas dengan air. Kemudian, bakteri ditetesi dengan reagen D (Safranin), tunggu selama dua menit, lalu dibilas dengan air dan dikeringkan. Tahap selanjutnya tambahkan minyak emersi dan amati di bawah mikroskop dengan perbesaran 1000x.

Bila hasil pewarnaan didapatkan bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif, sedangkan bila didapatkan bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut adalah gram positif. Pada hasil uji pewarnaan didapatkan hasil bahwa bakteri *V. alginolyticus* berwarna merah yang berarti merupakan bakteri gram negatif. Menurut Romadhon, Subagiyo, dan Margino (2012), bakteri gram positif akan memberikan warna ungu ketika diberi cat gram. Warna ungu tersebut terjadi karena dinding sel bakteri mengikat cat kristal violet (Gram A) yang diperkuat oleh iodine (Gram B) dan kristal violet tersebut tidak akan hilang pada waktu diberi cat peluntur (Gram C), sehingga tidak terpengaruh pada saat diberi cat penutup (Gram D) yang berwarna merah.

Perbedaan warna pada bakteri gram positif dan gram negatif menunjukkan bahwa adanya perbedaan struktur dinding sel antara kedua jenis bakteri tersebut. Menurut Firnanda, *et al.* (2013), bakteri gram negatif mempunyai dinding sel yang mengandung lipid, lemak, atau substansi seperti lemak dengan persentase yang lebih tinggi. Dalam proses pewarnaan gram, pencucian dengan alkohol akan menyebabkan lemak tersebut terekstraksi sehingga bakteri berwarna merah atau merah muda karena menyerap zat warna safranin. Adapun gambar hasil uji pewarnaan bakteri disajikan pada Gambar 4.



Gambar 4. Hasil Uji Pewarnaan Gram Bakteri *V. alginolyticus* dengan Perbesaran 100x

4.2 Daya Hambat (Zona Bening) Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) terhadap Bakteri *V. alginolyticus* secara *In Vitro*

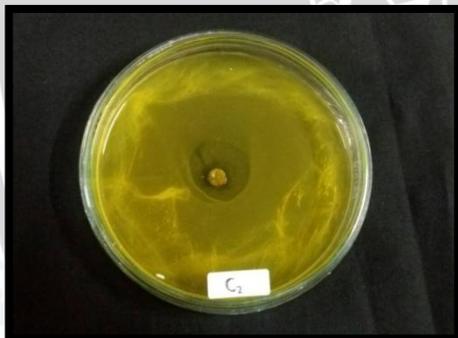
Berdasarkan pengamatan selama penelitian yang dilakukan didapatkan daya antibakterial ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *V. alginolyticus* dengan adanya zona bening disekitar kertas cakram yang disajikan pada Gambar 5, sementara hasil zona bening semua perlakuan dengan tiga kali ulangan disajikan pada Lampiran 4.



Perlakuan A dengan dosis 20 ppt



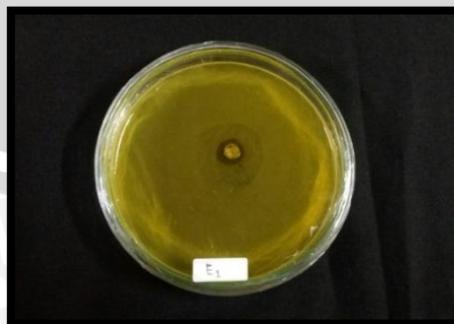
Perlakuan B dengan dosis 40 ppt



Perlakuan C dengan dosis 60 ppt



Perlakuan D dengan dosis 80 ppt



Perlakuan E dengan dosis 100 ppt

Gambar 5. Hasil Uji Daya Hambat Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) terhadap Bakteri *V. alginolyticus*

Berdasarkan hasil pengamatan terhadap uji *in vitro* diperoleh bahwa ekstrak kasar biji petai dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*, yang terlihat dari terbentuknya zona bening disekitar kertas cakram, dimana zona bening tersebut menunjukkan zona hambat pertumbuhan bakteri. Setiap dosis menghasilkan zona hambat yang berbeda, hal ini menunjukkan bahwa setiap dosis menghasilkan respon daya hambat yang berbeda terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*. Semakin besar dosis yang digunakan, maka semakin besar pula zona hambat yang diperoleh, artinya aktivitas antibakteri ekstrak biji petai semakin meningkat dengan meningkatnya dosis ekstrak tersebut. Sebagaimana menurut Nursal, *et al.* (2006), bahwa dengan konsentrasi ekstrak yang semakin tinggi maka kemampuan antibakterinya juga semakin besar. Ajizah (2004), juga berpendapat bahwa dengan meningkatnya konsentrasi semakin besar kadar bahan aktif yang berfungsi sebagai antibakteri, sehingga kemampuannya dalam menghambat pertumbuhan bakteri juga semakin besar.

Kemampuan daya hambat ekstrak biji petai terhadap daya hambat bakteri *V. alginolyticus* tergolong kuat. Hal ini sesuai dengan Pernyataan Soetjipto (2008), bahwa diameter zona hambat 20 mm atau lebih dikategorikan sangat kuat, zona hambat 10 sampai 20 mm kuat, 5 sampai 10 mm sedang, dan diameter kurang 5 mm berarti lemah. Adapun perlakuan yang digunakan dalam penelitian ini yaitu pada perlakuan A (20 ppt) didapat rata-rata zona bening sebesar 5,96 mm, yang termasuk dalam klasifikasi respon hambat sedang. Pada perlakuan B (40 ppt) didapat rata-rata zona bening sebesar 8,72 mm, yang termasuk dalam klasifikasi respon hambat sedang. Pada perlakuan C (60 ppt) didapat rata-rata zona bening sebesar 8,86 mm, yang termasuk dalam klasifikasi respon hambat sedang. Pada perlakuan D (80 ppt) didapat rata-rata sebesar 10,19 mm yang termasuk dalam klasifikasi respon hambat kuat, dan pada

perlakuan E (100 ppt) didapat rata-rata sebesar 11,19 mm yang termasuk dalam klasifikasi respon hambat kuat.

Hasil perhitungan rata-rata zona bening dengan menggunakan empat perlakuan dosis yang berbeda dengan tiga ulangan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Hasil Rata – Rata Zona Bening Bakteri *V. alginolyticus*

Perlakuan	Ulangan			Total Perlakuan	Rata - rata Perlakuan
	1	2	3		
A (20 ppt)	5,29	5,7	6,94	17,88	5,96 ± 0,88
B (40 ppt)	7,94	8,24	9,97	26,15	8,716 ± 1,10
C (60 ppt)	9,32	8,83	8,45	26,6	8,866 ± 0,44
D (80 ppt)	10,7	9,4	10,46	30,56	10,186 ± 0,69
E (100 ppt)	10,9	11,66	11,81	33,56	11,186 ± 0,95
Total				134,75	

Rata-rata zona hambat terbesar terdapat pada perlakuan E dengan dosis 100 ppt yaitu sebesar 11,186 mm, hal ini mungkin disebabkan karena adanya kandungan senyawa flavonoid yang lebih besar dibandingkan pada konsentrasi yang lain, sedangkan hasil rata – rata daya hambat terkecil terdapat pada perlakuan A dengan dosis 20 ppt yaitu sebesar 5,96 mm, hal ini diduga karena bakteri telah resisten pada konsentrasi tersebut sehingga tidak memberikan daya hambat yang maksimal. Untuk mengetahui pengaruh perbedaan perlakuan ekstrak kasar biji petai terhadap zona hambat, maka dilakukan uji sidik ragam. Berikut adalah tabel uji sidik ragam yang disajikan pada Tabel 2, sedangkan untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 3.

Tabel 2. Sidik Ragam Zona Bening Bakteri *V. alginolyticus*

Sumber Keragaman	dB	Jk	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	46,583	11,713	16,52**	3,48	5,99
Acak	10	7,095	0,709			
Total	14					

Keterangan : ** Berbeda sangat nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan tingkat penggunaan ekstrak kasar biji petai berpengaruh sangat nyata terhadap daerah hambatan pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*. Hal ini dikarenakan nilai F. Hitung lebih besar dari pada nilai F5% dan F1% atau nilai 16,52 lebih besar dari nilai 3,48 dan 5,99. Maka H_0 ditolak yang berarti perlakuan tersebut berbeda sangat nyata, artinya penggunaan ekstrak kasar biji petai pada dosis berbeda-beda memberikan pengaruh yang berbeda secara sangat nyata terhadap luas daerah hambatan bagi pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*. Selanjutnya untuk mengetahui pengaruh antar perlakuan dilakukan uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang disajikan pada Tabel 3, sedangkan untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 3.

Tabel 3. Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) terhadap Bakteri *V. alginolyticus*

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	E	Notasi
		5,96	8,716	8,866	10,186	11,186	
A (20 ppt)	5,96	-	-	-	-	-	a
B (40 ppt)	8,716	2,756**	-	-	-	-	b
C (60 ppt)	8,866	2,906**	0,15 ^{ns}	-	-	-	b
D (80 ppt)	10,186	4,226**	1,47 ^{ns}	1,32 ^{ns}	-	-	b
E (100ppt)	11,186	5,226**	2,47**	2,32**	1 ^{ns}	-	c

Keterangan :

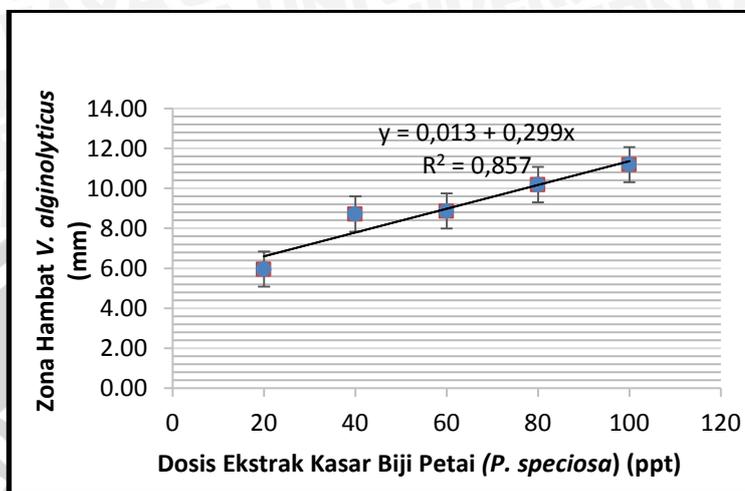
^{ns} : Tidak Berbeda Nyata

* : Berbeda Nyata

** : Berbeda Sangat Nyata

Pada hasil tabel uji BNT (Tabel 3) diketahui bahwa pada perlakuan A tidak memberikan pengaruh berbeda nyata terhadap semua perlakuan, sedangkan pada perlakuan B, C, dan D tidak memberikan pengaruh yang berbeda nyata antar perlakuan tersebut, namun berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A dan E. Pada perlakuan E memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap semua perlakuan yang juga merupakan perlakuan terbaik dengan rata-rata perlakuan sebesar 11,186 mm. Selanjutnya, untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antara perlakuan dengan parameter yang diuji maka perlu

dilakukan perhitungan uji polinomial ortogonal. Hasil perhitungan uji polinomial orthogonal yang berupa grafik disajikan pada Gambar 5, sedangkan untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 2.



Gambar 6. Grafik Hubungan Zona Hambat Antara Perlakuan Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *V. alginolyticus*

Berdasarkan Gambar 6, grafik hubungan antara penambahan dosis perlakuan ekstrak kasar biji petai terhadap zona hambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* menunjukkan perpotongan garis secara linear dengan persamaan $y = 0,013 + 0,299x$ dengan koefisien nilai determinasi (R^2) sebesar 0,857. Hubungan antara pemberian ekstrak kasar biji petai dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* menghasilkan rata-rata daya hambat yang meningkat seiring dengan meningkatnya dosis ekstrak. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak kasar biji petai mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*.

Adanya zona hambat yang terbentuk pada uji *in vitro* dalam penelitian ini menunjukkan bahwa dalam ekstrak kasar biji petai terdapat senyawa aktif yang memiliki sifat antibakteri, sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Biji petai mengandung beberapa senyawa metabolit sekunder yang berperan sebagai antibakteri, salah satunya adalah flavonoid. Mekanisme kerja flavonoid

sebagai antibakteri adalah membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler dan terlarut sehingga dapat merusak membran sel bakteri dan diikuti dengan keluarnya senyawa intraseluler (Nuria, Faizatun, dan Sumantri, 2009). Menurut Volk dan Wheeler (1988) dalam Prajitno (2007), senyawa flavonoid dapat merusak membran sitoplasma yang dapat menyebabkan bocornya metabolit penting dan menginaktifkan sistem enzim bakteri. Kerusakan ini memungkinkan nukleotida dan asam amino merembes keluar dan mencegah masuknya bahan-bahan aktif ke dalam sel.

Berdasarkan hasil penelitian ini dapat diketahui bahwa ekstrak kasar biji petai memiliki sifat bakteriostatik atau ekstrak hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*. Hal ini diketahui dari pengamatan setelah inkubasi selama 48 jam, yaitu diperoleh ukuran zona bening yang semakin mengecil. Menurut Pelczar dan Chan (1986), antibakteri bersifat bakteriostatik atau bakterisida bergantung dari konsentrasinya. Ekstrak kasar bersifat bakterisidal karena ekstrak mampu membunuh bakteri dan bakteristatis karena ekstrak kasar hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri. Edberg (1983), menambahkan bahwa senyawa antibakteri bekerja dengan cara berinteraksi dengan dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan juga berdifusi ke dalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat (bakteriostatik) dan atau mati (bakteriosidal). Selain itu senyawa antibakteri juga dapat menembus membran dan berinteraksi dengan material genetik sehingga bakteri mengalami mutasi.

4.3 Suhu Inkubator Selama Penelitian

Parameter penunjang yang digunakan pada penelitian ini adalah suhu inkubasi. Suhu yang digunakan saat inkubasi pada penelitian ini yaitu 33°C, pada suhu tersebut *V. alginolyticus* sudah dapat tumbuh dengan baik, yang ditandai dengan berubahnya warna media menjadi kuning pekat yang sebelumnya

berwarna hijau. Hal ini sesuai dengan pernyataan Mewengkang (2010), bahwa suhu optimum untuk pertumbuhan *Vibrio* adalah 37°C. Prajitno (2005) menambahkan, suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio* spp. berkisar antara 30°C - 35°C. Sedangkan pada suhu 4°C dan 45°C bakteri tersebut tidak dapat tumbuh dan pada suhu 55°C akan mati.



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian diperoleh kesimpulan bahwa ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) berpengaruh terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* dengan nilai rata-rata zona hambat tertinggi pada perlakuan E dengan dosis 100 ppt yaitu sebesar 11,186 mm, dan ekstrak kasar biji petai memiliki sifat hambatan bakteriostatik terhadap pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus*.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan untuk menggunakan ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) untuk menghambat pertumbuhan bakteri *V. alginolyticus* dengan dosis tertinggi 100 ppt, dan disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis optimalnya. Selain itu juga disarankan adanya penelitian lebih lanjut secara *in vivo* dengan menggunakan ikan yang terserang bakteri *V. alginolyticus*.

DAFTAR PUSTAKA

- Agoes, A. 2010. Tanaman Obat Indonesia. Penerbit Salemba Medika. Jakarta. 134 hlm.
- Ajizah, A. 2004. Sensitivitas *Salmonella typhimurium* Terhadap Ekstrak Daun *Psidium guajava* L. *Bioscientiae*. **1**(1): 31-38
- Desrina., A. Taslihan., Ambariyanto., S. Suryaningrum. 2006. Uji Keganasan Bakteri *Vibrio* Pada Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*). *Ilmu Kelautan*. **11**(3): 119-125.
- Edberg, S. C. 1893. Tes Kerentanan Antimikroba Dalam Antibiotika dan Infeksi. Alih Bahasa: Chandra Sanusi. CV. EGC. Penerbit Buku Kedokteran. Jakarta. 219 hlm.
- Fathaiya, J., M. Suhaila, L. Md. Nordin. 1995. Hypoglycaemic Effect of Stigmast-4-en-3-one From *Parkia speciosa* Empty Pod. *Food Chemistry*. **54**: 9-13.
- Firnanda, R., Sugito., Fakhurrrazi dan D. V. S. Ambarwati. 2013. Isolasi *Aeromonas hydrophila* Pada Sisik Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) yang Diberi Tepung Daun Jaloh (*Salix tetrasperma* Roxb). *Jurnal Medika Veterinaria*. **7**(1): 22-24.
- Garrity, G.M., J.A. Bell dan T.G. Lilburn. 2004. Taxonomic Outline of The Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Second Edition. New York. 399 hlm.
- Gomathi, R.S., R. Vinothkumar dan K. Arunagiri. 2013. Isolation and Identification Vibrios From Marine Seafood Samples. *Int.J.Curr.Microbiol App.Sci*. **2**(2): 36-43.
- 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 Pharmaceuticall Research*. **7**(4): 239-243.
- Ilmiah., Sukenda., Widanarni dan E. Harris. 2012. Isolasi dan Karakterisasi *Vibrio* Patogen Pada Ikan Kerapu Macan *Epinephelus fuscoguttatus*. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **11**(1): 28-37.
- Indriani, A.D., S.B Prayitno dan Sarjito. 2014. Penggunaan Ekstrak Jahe Merah (*Zingiber officinale* var. Rubrum) Sebagai Alternatif Pengobatan Ikan Nila (*Oreochromis niloticus*) Yang Diinfeksi Bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Journal of Aquaculture Management and Technology*. **3**(3): 58-65.
- Johnny, F dan D. Roza. 2014. Infeksi Bakteri *Vibrio alginolyticus* Pada Lumba-Lumba Hidung Botol, *Tursiops aduncus* Yang Dipelihara Di Lovina, Singaraja, Bali. *Berita Biologi*. **13**(3): 295-300.

- Kamisah, Y., F. Othman., M.S. Qodriyah dan K. Jaarin. 2013. *Parkia speciosa* Hassk.: A Potential Pyhtomedicine. *Hindawi Publishing Corporation Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*. **20**(13): 1-6.
- Karou, D., Savadogo A., Canini A., Yamaeogo S., Montesano S., Simpore J., Colizzi V., Traore S.A. 2005. Antibacterial Activity of Alkaloids from *Sida acuta*. *African Journal of Biotechnology*. **4**(12): 1452-1457.
- Kordi, M. Ghufran H. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. PT. Rineka Cipta. Jakarta. 190 hlm.
- _____. 2005. Budidaya Ikan Laut di Keramba Jaring Apung. Rineka Cipta. Jakarta. 233 hlm.
- Kusen, K. O., R. A. Tumbol dan H. Manoppo. 2015. Identifikasi Penyakit Bakterial Pada Benih Sidat (*Anguilla marmorata*) di Balai Budidaya Air Tawar Tatelu. *Jurnal Budidaya Perairan*. **3**(1): 68-73.
- Kusmiyati dan N.W.S Agustini. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Biodiversitas*. **8**(1): 48-53.
- Leon, L. D., M. R. Lopez dan L. Moujir. 2010. Antibacterial Properties of Zeylasterone a Triterpenoid Isolated from *Maytenus blepharacles* against *Staphylococcus aureus*. *Microbial Research*. **12**: 2-10.
- Lutfi. 2004. Kimia Lingkungan. Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta. 67 hlm.
- Luturmas, A., A. Y. Pattinasarany. 2010. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri *Vbrio alginolyticus* Pada Ikan Kerapu Tikus (*Cromileptes altivelis*) Sebagai Faktor Virulensi Bakteri Patogen. *Prooseiding Seminar Nasional Basic Science II*. FPIK. Universitas Pattimura. 36-42 hlm.
- Margono, S. 2005. Metodologi Penelitian Pendidikan. PT. Rineka Cipta. Jakarta. 270 hlm.
- Mewengkang, H. W. 2010. Identifikasi *Vibrio* sp. Pada Gonad Ikan Cakalang (*Katsuwonus pelamis* L.). *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **6**(1): 18-21.
- Ming-Xia, C., L. He-Yang ., L. Gang dan Z. Tian-Ling. 2011. Distribution of *Vibrio alginolyticus*-Like Species in Shenzhen Coastal Waters, China. *Journal of Microbiology*. **42**: 994-896.
- Mulyadi, M., Wuryanti dan P. Ria S. 2013. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-Alang (*Imperata cylindrica*) Dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram. *Chem Info*. **1**(1): 35-42.
- Noel, A.M.S dan K.R. Gustafson. 1984. Marine Pharmacologyin 2003-2004: Antitumor And Cytotoxic Compounds. *European Journal of Cancer*. **42**: 2357-2387.
- Nuria, M. C., A. Faizatun dan Sumantri. 2009. Ui Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha cuircas* L.) terhadap Bakteri

Staphylococcus aureus ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Jurnal Ilmu-Ilmu Pertanian*. **5**: 26-37.

Nursal., S. Wulandari dan W.S. Juwita. 2006. Bioaktivitas Ekstrak Jahe (*Zingiber officinale* Roxb.) Dalam Menghambat Pertumbuhan Koloni Bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus subtilis*. *Jurnal Biogenesis*. **2**(2): 64-66.

Nursyirwani., W. Asmara., A.E.T.H. Wahyuni dan Triyanto. 2011. Isolasi Bakteri Asam Laktat Dari Usus Ikan Kerapu Macan (*Epinephelus fuscoguttatus*) dan Potensinya Sebagai Antivibrio. *Ilmu Kelautan*. **16**(2): 70-77.

Pelczar, M.J., E.C.S. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi 1. Penerbit Universitas Indonesia (UI Press). Jakarta. 443 hlm.

Prajitno, A. 2005. Diktat Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan. Universitas Negeri Malang. Malang. 103 hlm.

_____. 2007. Penyakit Ikan-Udang: Bakteri. Universitas Negeri Malang. Malang. 115 hlm.

Raza'i, T.S. 2010. Uji Spesifitas Antibodi IGM Grouper (*Cromileptes altivelis*) – Anti Adhesin *V. alginolyticus* Dengan Teknik Western Blotting. *Jurnal Dinamika Maritim*. **2**(1): 67-70.

Romadhon, Subagiyo dan S. Margino. 2012. Isolasi dan Karakterisasi Bakteri Asam Laktat Dari Usus Udang Penghasil Bakteriosin Sebagai Agen Antibakteria Pada Produk-Produk Hasil Perikanan. *Jurnal Saintek Perikanan*. **8**(1): 59-64.

Samsundari, S. 2006. Pengujian Ekstrak Temulawak dan Kunyit Terhadap Resistensi Bakteri *Aeromonas hydrophilla* yang Menyerang Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Gamma*. **2**(1): 71-83.

Singh, I.P., S.B. Bharate. 2005, Anti-HIV Natural Products. *Journal Current Science*. **89**(2):269-290

Sitepu, I.S.Br., I.K. Suada dan I.GK. Susrama. 2012. Uji Aktivitas Antimikroba Beberapa Ekstrak Bumbu Dapur Terhadap Pertumbuhan Jamur *Curvularia lunata* (Wakk.) Boed. dan *Aspergillus flavus* Link. *E-Jurnal Agroekoteknologi Tropika*. **1**(2): 107-114.

Soetjipto, H. 2008. Aktivitas Antibakteri Minyak Atsiri dan Toksisitas Ekstrak Bunga Legetan (*Spilanthes paniculata* Wall.). *Berkala Ilmiah Biologi*. **2**(7): 53-59.

Subana, H.M dan Sudrajat. 2005. Dasar-Dasar Penelitian Ilmiah. CV. Pustaka Setia. Bandung. 240 hlm.

Surachmad, W. 1998. Pengantar Penelitian Ilmiah Dasar. Tarsito. Bandung. 118 hlm.

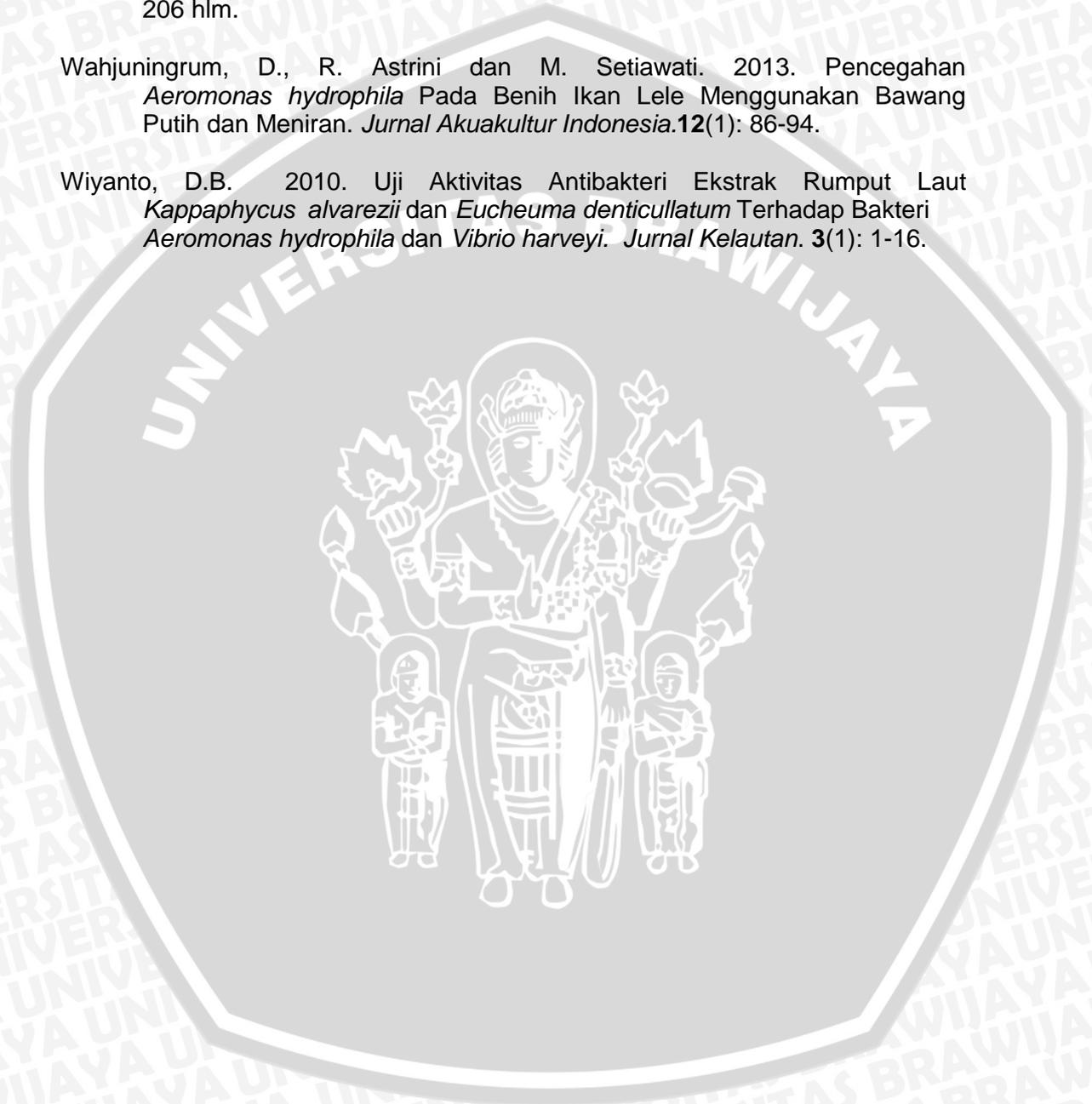
Susilo, J. 2012. Budidaya Petai Prospek Pasar Terbuka. Yogyakarta. Penerbit Pustaka Baru Press. 13 hlm.

Syarief, A. 2011. Laporan Pemantauan Stasiun Karantina Ikan Kelas I Hang Nadim Batam. 40 hlm.

Tanjaya, B. 2013. Penelitian Percobaan. PT Remaja Rosdakarya. Bandung. 206 hlm.

Wahjuningrum, D., R. Astrini dan M. Setiawati. 2013. Pencegahan *Aeromonas hydrophila* Pada Benih Ikan Lele Menggunakan Bawang Putih dan Meniran. *Jurnal Akuakultur Indonesia*.12(1): 86-94.

Wiyanto, D.B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus alvarezii* dan *Euचेuma denticullatum* Terhadap Bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *Vibrio harveyi*. *Jurnal Kelautan*. 3(1): 1-16.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Foto Alat dan Bahan Penelitian



Inkubator



Autoclave



Autoclave Destruksi



Laminary Air Flow



Timbangan Sartorius



Timbangan Digital

Lampiran 1. (Lanjutan)



Hot Plate



Lemari Pendingin Penyimpan Bahan



Lemari Pendingin Penyimpan Bakteri



Oven



Rak Tabung Reaksi



Tabung Reaksi

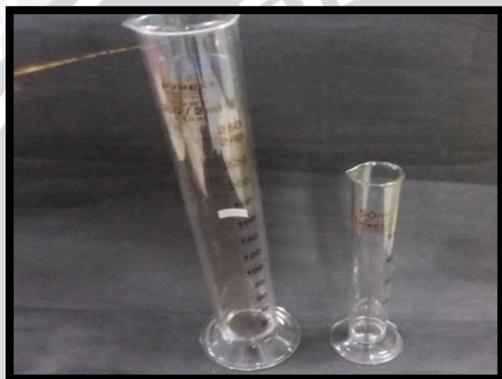
Lampiran 1. (Lanjutan)



Cawan Petri



Erlenmeyer



Gelas Ukur



Corong Kaca



Bola Hisap dan Pipet Volume

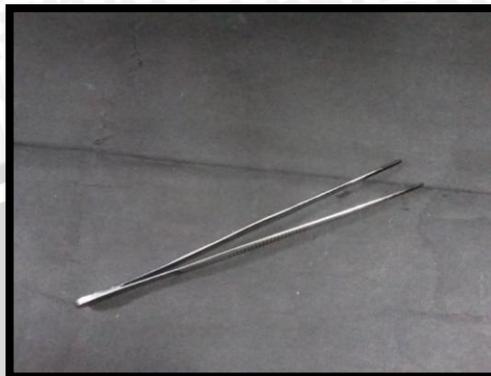


Triangle

Lampiran 1. (Lanjutan)



Spatula



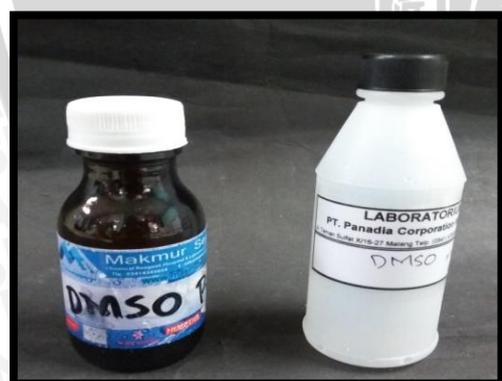
Pinset



Bunsen



Kapas



DMSO 10%

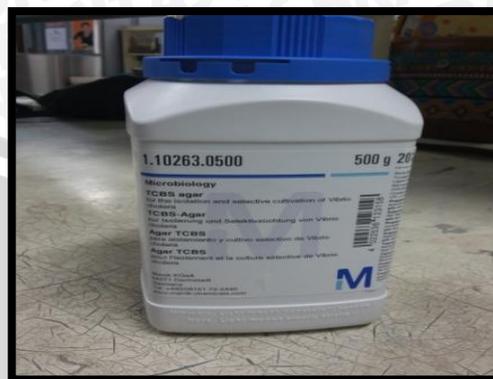


Etanol 96% dan Alkohol 70%

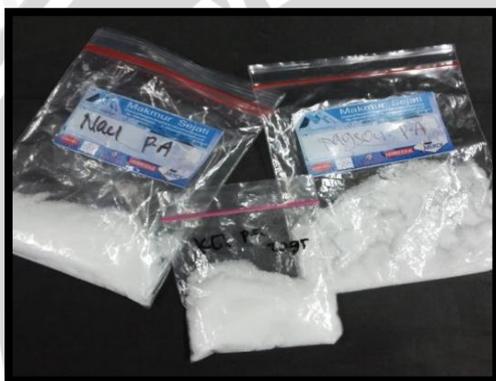
Lampiran 1. (Lanjutan)



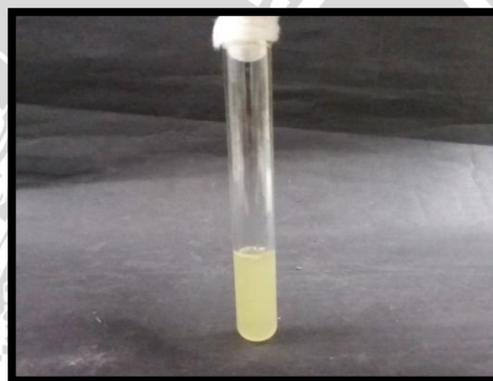
Kertas Cakram



TCBSA



NaCl, KCl, MgSO₄



TSB *V. alginolyticus*



Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*)

Lampiran 2. Foto Kegiatan Penelitian



Proses Maserasi



Proses Maserasi



Proses Evaporasi



Penimbangan Media TCBSA

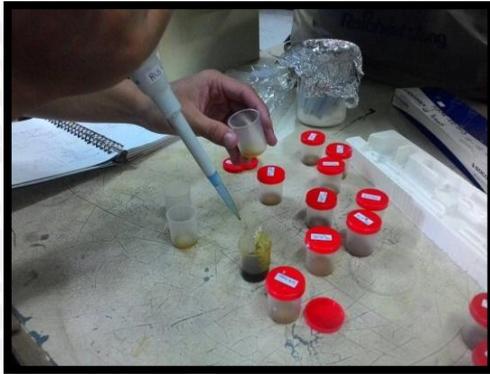


Pembuatan Media TCBSA



Penuangan Media TCBSA

Lampiran 2. (Lanjutan)



Penentuan Dosis Ekstrak



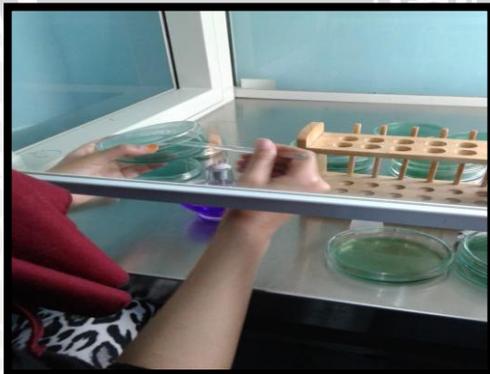
Penghomogenan Ekstrak dengan Pelarut



Perendaman Kertas Cakram dalam Ekstrak



Pengenceran Bakteri



Penumbuhan Bakteri Pada Media Agar



Peletakan Kertas Cakram Pada Media Agar

Lampiran 3. Analisis Data Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) terhadap Diameter Hambatan (mm) Bakteri *V. alginolyticus* Secara *In Vitro*

- Data Rata – Rata Zona Hambat (mm) Bakteri *V. alginolyticus*

Perlakuan	Ulangan			Total Perlakuan	Rata - rata Perlakuan
	1	2	3		
A (20 ppt)	5,29	5,7	6,94	17,88	5,96 ± 0,88
B (40 ppt)	7,94	8,24	9,97	26,15	8,716 ± 1,10
C (60 ppt)	9,32	8,83	8,45	26,6	8,866 ± 0,44
D (80 ppt)	10,7	9,4	10,46	30,56	10,186 ± 0,69
E (100 ppt)	10,9	11,66	11,81	33,56	11,186 ± 0,95
Total				134,75	

Perhitungan :

1. Perhitungan JK

FK	1210,504
JK Total	53,678
JK Perlakuan	46,583
JK Acak	7,095

Perhitungan:

a. Faktor Koreksi (FK)

$$\begin{aligned}
 &= \frac{G^2}{N} \\
 &= \frac{134,75^2}{15} \\
 &= 1210,504
 \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned}
 &= (A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + E3^2) - FK \\
 &= (5,29^2 + 5,7^2 + \dots + 11,81^2) - 1210,504 \\
 &= 53,678
 \end{aligned}$$

c. JK Perlakuan

$$\begin{aligned}
 &= \frac{\sum (\sum x_i)^2}{r} - FK \\
 &= \frac{(TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2)}{3} - FK \\
 &= \frac{(17,88^2 + 26,15^2 + 26,6^2 + 30,56^2 + 33,56^2)}{3} - 1210,504
 \end{aligned}$$

Lampiran 3. (Lanjutan)

$$= 46,583$$

d. JK galat = JK Total - JK Perlakuan

$$= 53,678 - 46,583$$

$$= 7,095$$

e. db Total = $(n \times r) - 1$

$$= (5 \times 3) - 1$$

$$= 14$$

f. db Perlakuan = $n - 1$

$$= 5 - 1$$

$$= 4$$

g. db Galat = db Total - db Perlakuan

$$= 14 - 4$$

$$= 10$$

2. Tabel Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	dB	Jk	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	46,583	11,713	16,52**	3,48	5,99
Acak	10	7,095	0,709			
Total	14					

Keterangan : ** 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)

$$SED = \sqrt{\frac{2 \times kt \text{ acak}}{r}} = \sqrt{\frac{2 \times 0,709}{3}} = 0,687$$

BNT 5% = T tabel 5%(db acak) x SED = 1,53

BNT 1% = T tabel 1%(db acak) x SED = 2,177



Lampiran 3. (Lanjutan)

- Tabel Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Rata - rata Perlakuan	5,96	8,716	8,866	10,186	11,186	Notasi
5,96	-	-	-	-	-	a
8,716	2,576**	-	-	-	-	b
8,866	2,57**	0,15 ^{ns}	-	-	-	b
10,186	4,226**	1,47 ^{ns}	1,32 ^{ns}	-	-	b
11,186	5,226**	2,47**	2,32**	1 ^{ns}	-	c

Keterangan :

^{ns} : Tidak Berbeda
Nyata

* : Berbeda Nyata

** : Berbeda Sangat Nyata

Urutan perlakuan terbaik dari uji BNT adalah E - D /C/B - A. Selanjutnya dilakukan uji polinomial orthogonal.

- Tabel Uji Polinomial Ortogonal

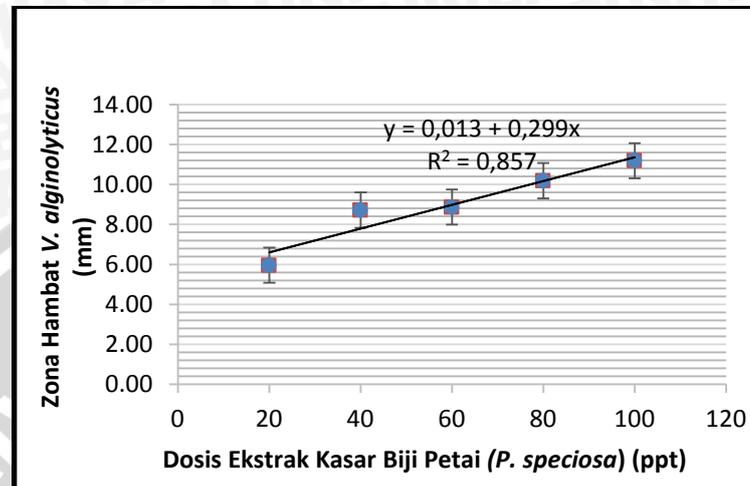
Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A (10%)	17,88	-2	2	-1	1
B (20%)	26,15	-1	-1	2	-4
C (30%)	26,6	0	-2	0	6
D (40%)	30,56	1	-1	-2	-4
E (50%)	33,56	2	2	1	1
$Q = \sum Ci \cdot Ti$		35,77	-7,03	6,86	-15,8
$Kr = (\sum Ci^2) \cdot r$		30	42	30	210
$JK = Q^2 / Kr$		42,649	1,176	1,568	1,188

1. Tabel Sidik Ragam Regresi

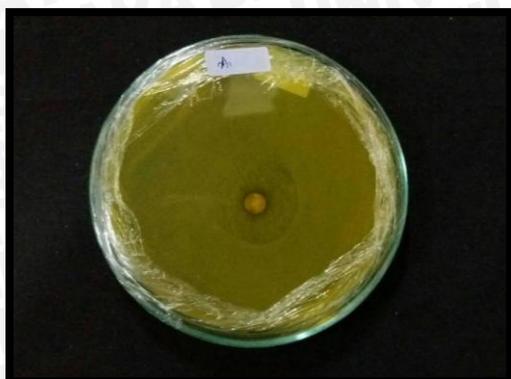
Sumber Keragaman	db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	4	46,583			3,48	5,99
Linier	1	42,649	42,649	60,153	**	**
Kuadratik	1	1,176	1,176	1,658	ns	ns
Kubik	1	1,568	1,568	2,211	ns	ns
Kuartik	1	1,188	1,188	1,675	ns	ns
2. Acak	10	7,095	0,709			
Total	14	53,678				

Lampiran 3. (Lanjutan)

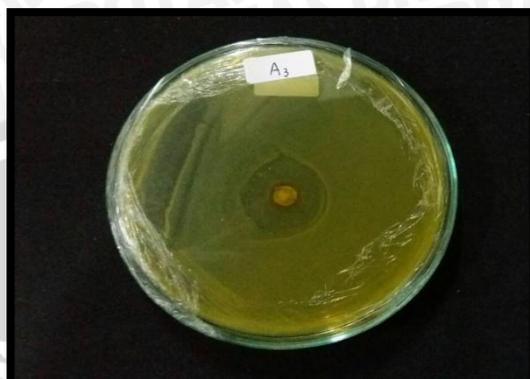
- Grafik Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. alginolyticus* Secara *In Vitro*



Lampiran 4. Hasil Uji Cakram Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. alginolyticus*



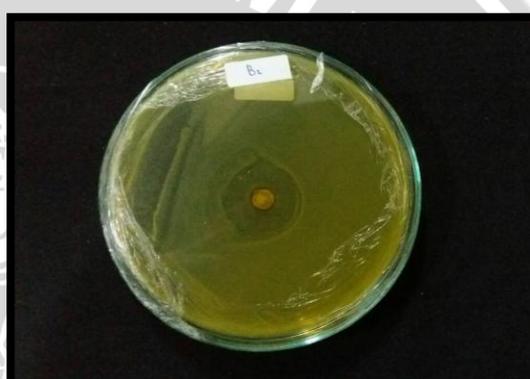
A1 (20 ppt)



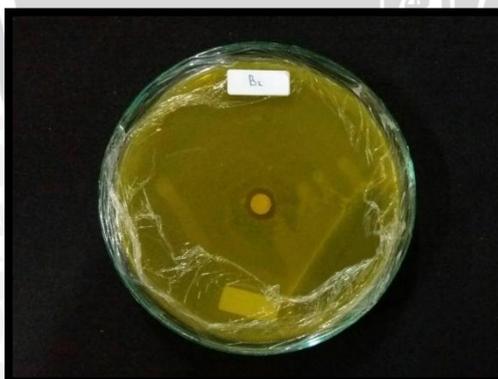
A2 (20 ppt)



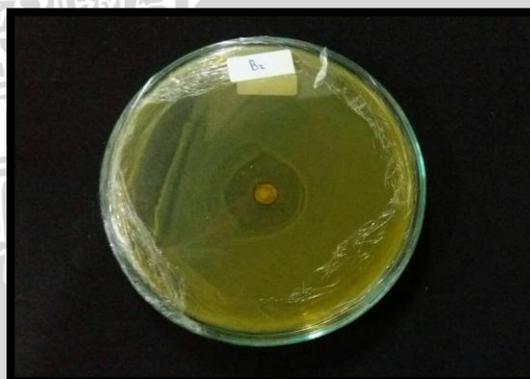
A3 (20 ppt)



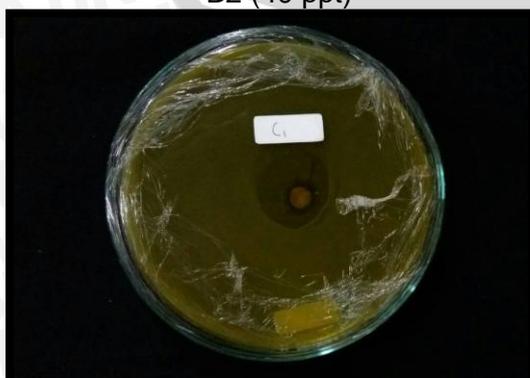
B1 (40 ppt)



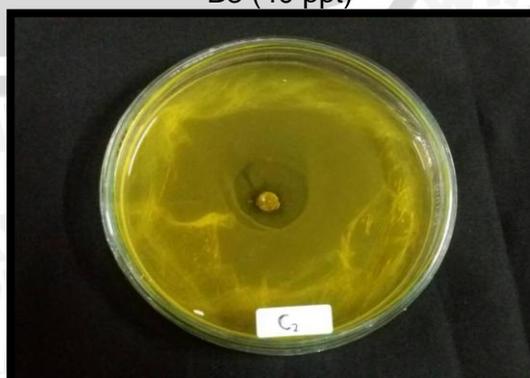
B2 (40 ppt)



B3 (40 ppt)

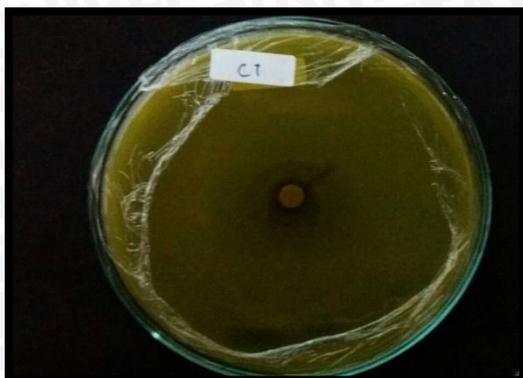


C1 (60 ppt)

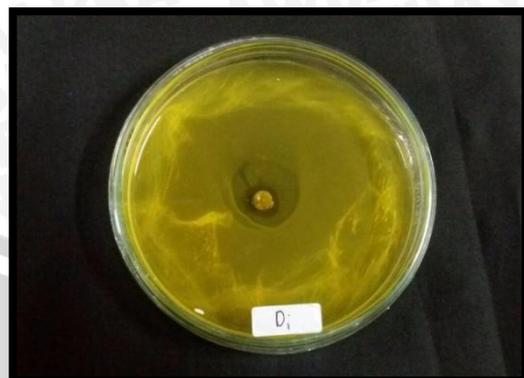


C2 (60 ppt)

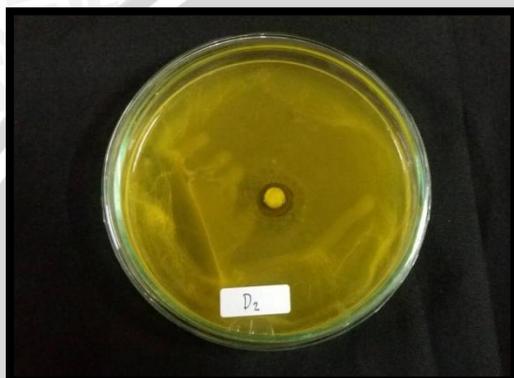
Lampiran 4. (Lanjutan)



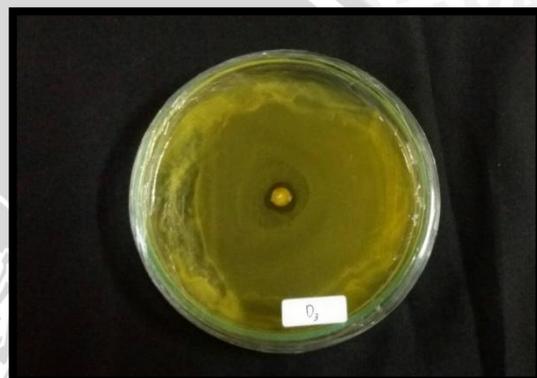
C3 (60 ppt)



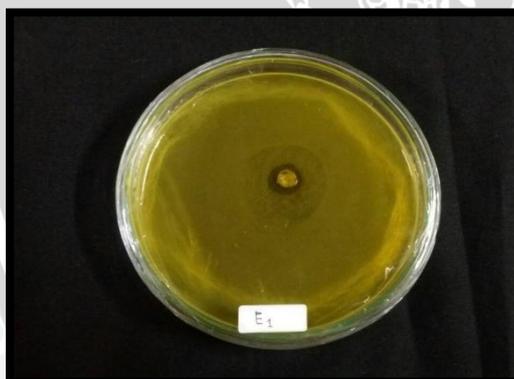
D1 (80 ppt)



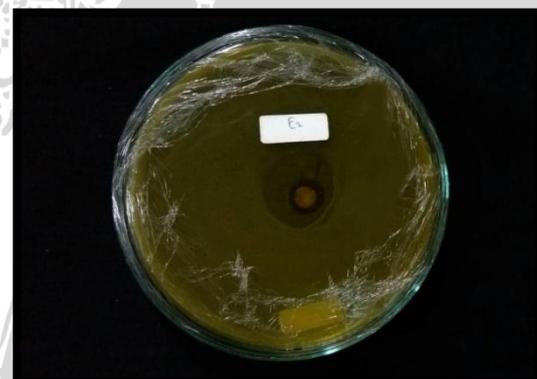
D2 (80 ppt)



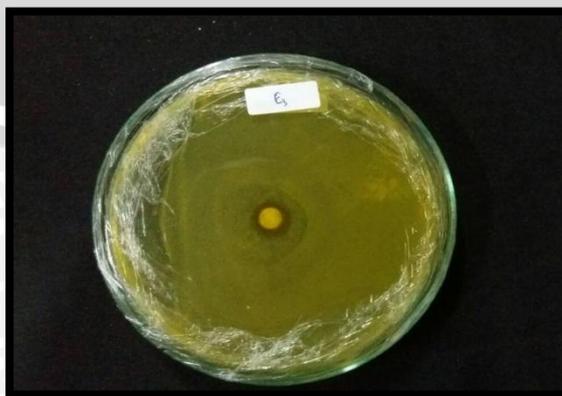
D3 (80 ppt)



E1 (100 ppt)



E2 (100 ppt)



E3 (100 ppt)