

**UJI SENSITIVITAS EKSTRAK KASAR DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*)
TERHADAP BAKTERI *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO**

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

Oleh:

**MUNIROH ULFAH
NIM. 125080501111026**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

**UJI SENSITIVITAS EKSTRAK KASAR DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*)
TERHADAP BAKTERI *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO**

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

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

Oleh:

**MUNIROH ULFAH
NIM. 125080501111026**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2016**

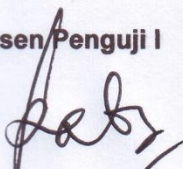
SKRIPSI
UJI SENSITIVITAS EKSTRAK KASAR DAUN KENIKIR (*Cosmos caudatus*)
TERHADAP BAKTERI *Vibrio harveyi* SECARA IN VITRO

Oleh :

MUNIROH ULFAH
125080501111026

Telah dipertahankan di depan penguji
 pada tanggal
 dan dinyatakan telah memenuhi syarat

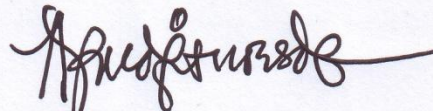
Dosen/Penguji I



(Dr. Ir. Maftuch, M.Si)
 NIP. 19660825 199203 1 001
 Tanggal: 02 JUN 2016

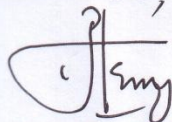
Menyetujui,

Dosen Pembimbing I



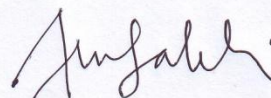
(Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS)
 NIP. 19550213 198403 1 001
 Tanggal: 02 JUN 2016

Dosen Penguji II



(Ir. Heny Suprastyani, MS)
 NIP. 19620904 198701 2 001
 Tanggal: 02 JUN 2016

Dosen Pembimbing II



(M. Fakhri, S.Pi, MP., MSc)
 NIP. 19860717 201504 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 ORISINALITAS 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 oleh orang lain kecuali yang ditulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

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

Malang, Mei 2016

Mahasiswa

UCAPAN TERIMAKASIH

Puji Syukur kehadiran Allah SWT, Tuhan pelimpah kasih dan pencurah rahmat. Berkat karunia dan rahmat-Nya lah, penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi ini tepat pada waktunya tanpa adanya halangan yang berarti. Penulis juga ingin mengucapkan terimakasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Nyoto Hari Purnomo dan Ibu Muyassaroh selaku kedua orang tua, serta adik dan kakak tercinta Muhammad Makhrus dan kakak Fathan mubinna, terimakasih atas doa, bimbingan dan dukungannya dari awal hingga akhir terselesaikannya laporan skripsi ini.
2. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku Dosen Pembimbing I, dan M. Fakhri, S.Pi,MP., MSc., selaku Dosen Pembimbing II yang senantiasa memberikan bimbingan dan masukan selama penelitian hingga penyusunan laporan hasil Skripsi ini selesai.
3. Laboran Lab. Parasit dan Penyakit Ikan (Ibu Titin) FPIK Universitas Brawijaya, yang bersedia membantu dari awal hingga akhir penelitian.
4. Teman - teman tim penyakit yang selalu membantu dan memberikan solusi pada penulis selama penelitian, serta teman-teman tim Skripsi bimbingan Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.
5. Sahabat- sahabat terdekat yang telah memberikan doa, motivasi, dan dukungan secara moril untuk menyelesaikan laporan skripisi ini.

RINGKASAN

MUNIROH ULFAH. Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*Cosmos cadatus*) terhadap Bakteri *V. harveyi* Secara *In Vitro*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS.** dan **M. Fakhri, S.Pi, MP., MSc**

Akuakultur saat ini menjadi penting dan strategis bagi peningkatan produksi perikanan Indonesia. Permasalahan yang sering timbul akibat buruknya kondisi lingkungan budidaya intensif, penggunaan pakan tinggi dan padat tebar tinggi menghasilkan lebih banyak limbah, maka berbagai faktor yang menyebabkan terhambatnya produksi udang perlu diperhatikan agar produksi udang di Indonesia tetap optimal. Salah satu kendala dalam kegiatan perikanan adalah penyakit. Penyakit dapat menimbulkan kematian pada ikan/udang yang dibudidayakan serta menyebabkan kerugian cukup besar terhadap proses budidaya itu sendiri. Bakteri *V. harveyi* merupakan salah satu bakteri yang menimbulkan penyakit *vibriosis* pada ikan atau udang khususnya yang hidup di perairan laut. Pencegahan dan pengobatan telah banyak dilakukan guna menanggulangi penyakit dalam budidaya. Penggunaan antibiotik serta obat-obat kimia untuk mengatasi hal tersebut dapat bersifat resisten terhadap bakteri serta dapat membahayakan lingkungan perairan, sehingga perlu adanya pengobatan alternatif herbal yang lebih aman. Salah satu tanaman yang berkhasiat sebagai antibakteri yaitu daun kenikir (*C. caudatus*) yang mengandung senyawa flavonoid fenol dan saponin yang merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan dari bakteri.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada bulan Januari sampai bulan Maret 2016. Tujuan penelitian ini adalah untuk menjelaskan pengaruh pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) dan menentukan dosis yang efektif terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimental yaitu dengan menguji hubungan suatu sebab dengan akibat yang dilakukan dalam suatu sistem tertutup yang kondisinya terkontrol dan teknik pengambilan datanya dengan cara observasi langsung. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), menggunakan 5 perlakuan dosis ekstrak kasar daun kenikir yaitu : dosis (A) 10 ppt ; (B) 20 ppt ; (C) 30 ppt ; (D) 40 ppt dan (E) 50 ppt. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun kenikir memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Berdasarkan hasil penelitian menunjukkan rata-rata diameter daya hambat terbesar yaitu pada dosis 50 ppt sebesar $4,6 \pm 0,28$ mm. Hubungan antara perbedaan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap diameter daya hambat bakteri *V. harveyi* menghasilkan hubungan atau grafik secara linear, dimana persamaannya didapatkan $y = 0,0117 + 1,869x$ dengan nilai koefisien determinasi $R^2 = 0,8431$.

Kesimpulan dari hasil penelitian ini bahwa hasil uji daya hambat bakteri dengan menggunakan uji cakram menunjukkan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat dari pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dengan dosis efektif sebesar 20 ppt.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT, yang telah memberikan rahmat dan karunia-Nya, serta shalawat serta salam tetap tercurahkan kepada baginda Nabi Muhammad SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan skripsi yang berjudul “Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. cadatus*) terhadap Bakteri *V. harveyi* Secara *In Vitro*”. Skripsi ini merupakan salah satu syarat yang diperlukan untuk memperoleh gelar Sarjana (S-1) Perikanan di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya, Malang. Dalam tulisan ini disajikan pokok-pokok bahasan yang secara umum meliputi pemberian ekstrak kasar dengan dosis yang berbeda terhadap daya hambat bakteri *Vibrio harveyi*.

Penulis menyadari bahwa penulisan skripsi ini masih banyak kekurangannya jauh dari kesempurnaan, untuk itu penulis mengharapkan saran dan kritik yang membangun untuk menyempurnakan skripsi ini. Dengan adanya skripsi ini penulis berharap agar bermanfaat dalam ilmu pengetahuan dan memberikan informasi bagi semua pihak yang membutuhkan.

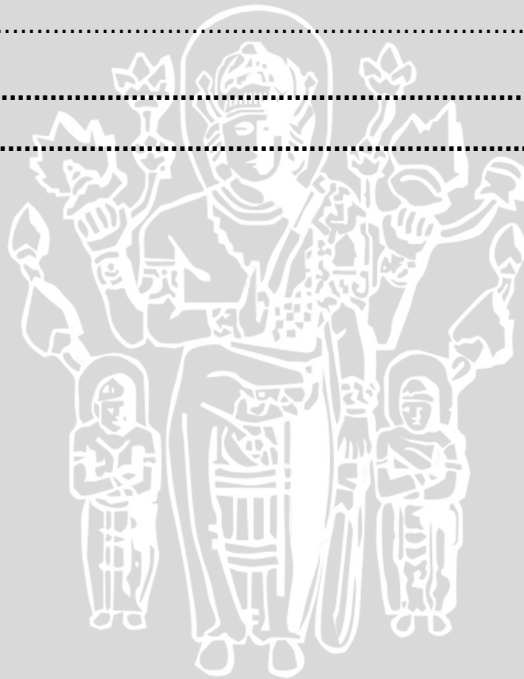
Malang, Mei 2016

Penulis

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
HALAMAN PENGESAHAN.....	ii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
RINGKASAN.....	v
KATA PENGANTAR.....	vi
DAFTAR ISI.....	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Hipotesis.....	4
1.5 Tempat dan Waktu Pelaksanaan Penelitian.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Biologi Bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran.....	6
2.1.3 Reproduksi.....	6
2.1.4 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan.....	7
2.1.5 Faktor-Faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan.....	9
2.1.6 Infeksi Bakteri <i>Vibrio harveyi</i> dan Gejalanya.....	9
2.2 Tanaman Kenikir (<i>Cosmos caudatus</i>).....	10
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	10
2.2.2 Bahan Aktif Daun Kenikir (<i>C. caudatus</i>).....	11
2.2.3 Mekanisme Senyawa daun kenikir (<i>C. caudatus</i>) sebagai Antimikroba.....	11
2.3 Uji Sensitivitas Antibakteri dengan Uji Cakram.....	12
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	14
3.1 Materi Penelitian.....	14
3.1.1 Alat Penelitian.....	14
3.1.2 Bahan Penelitian.....	15
3.2 Metode Penelitian.....	16
3.3 Pengambilan Data.....	16
3.4 Rancangan Penelitian.....	17

3.5	Prosedur Penelitian.....	19
3.5.1	Sterilisasi Alat dan Bahan.....	19
3.5.2	Sterilisasi Tempat Perlakuan.....	20
3.5.3	Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Kenikir.....	20
3.5.4	Pembuatan Media.....	21
3.5.5	Pembiakan Bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	22
3.6	Pelaksanaan Penelitian.....	23
3.6.1	Uji Cakram.....	23
3.7	Parameter Uji.....	25
3.8	Analisa Data.....	25
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
4.1	Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Kenikir terhadap Bakteri <i>V. harveyi</i>	26
4.2	Suhu Inkubator Selama Inkubasi dan Lama Perendaman Kertas Cakram.....	32
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	34
5.1	Kesimpulan.....	34
5.2	Saran.....	33
	DAFTAR PUSTAKA.....	35
	LAMPIRAN.....	39



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Bakteri <i>V. harveyi</i> dengan Pembesaran 1.000x.....	5
2. Fase Pertumbuhan Bakteri.....	7
3. Daun Kenikir (<i>C. caudatus</i>).....	10
4. Denah Penelitian Uji Cakram.....	18
5. Grafik Hubungan Zona Hambat antar Perlakuan Ekstrak Kasar Daun Kenikir (<i>C. caudatus</i>) terhadap Bakteri <i>V. harveyi</i>	32



DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat-alat Penelitian.....	14
2. Bahan-bahan Penelitian.....	15
3. Hasil Rata-rata Zona Bening Bakteri <i>V. harveyi</i>	26
4. Klasifikasi Respon Hambatan.....	30
5. Hasil Perhitungan Sidik Ragam Zona Bening Bakteri <i>V. harveyi</i> ..	30
6. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Ekstrak Kasar Daun Kenikir (<i>C. caudatus</i>) terhadap Bakteri <i>V. harveyi</i>	31



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Hasil Uji Biokimia Bakteri <i>V. harveyi</i>	39
2. Alat dan Bahan Penelitian.....	40
3. Pembuatan Ekstrak Daun Kenikir.....	50
4. Analisis Data Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Kenikir (<i>C. caudatus</i>) terhadap Diameter Hambatan (mm) Bakteri <i>V. harveyi</i> Secara <i>In Vitro</i>	52
5. Hasil Uji Cakram Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Kenikir (<i>C. caudatus</i>) Terhadap Daya Hambat Bakteri <i>V. harveyi</i> ..	54





1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Budidaya udang memberikan kontribusi yang besar bagi produksi sektor perikanan Indonesia. Pada tahun 2002, ekspor produksi udang Indonesia pernah mencapai 50% dari seluruh ekspor perikanan dan menempati urutan lima besar dalam komoditas ekspor non migas. Dalam menjaga kelangsungan produksi udang yang telah memberikan devisa yang besar bagi negara, maka berbagai faktor yang menyebabkan terhambatnya produksi udang perlu diperhatikan agar produksi udang di Indonesia tetap optimal (Felix, Titania, Sila, dan Yuslina, 2011).

Salah satu kendala dalam kegiatan marikultur adalah penyakit pada biota budidaya. Timbulnya penyakit dapat disebabkan karena kondisi perairan yang kurang baik dan kualitas pakan serta induk yang kurang baik. Serangan penyakit yang disebabkan oleh bakteri merupakan kendala utama dalam budidaya perikanan. Salah satu spesies dalam kelompok ini yang paling banyak menyebabkan penyakit dan kematian pada budidaya krustasea adalah *V. harveyi*. Bakteri *V. harveyi* merupakan penyebab penyakit kunang - kunang, karena krustasea yang terinfeksi akan terlihat terang (menyala) dalam keadaan gelap. Krustasea yang terserang *Vibrio* umumnya ditandai dengan gejala klinis, di mana udang terlihat lemah, berwarna merah gelap atau pucat, antena dan kaki renang berwarna merah (Hatmanti, 2003).

Salah satu upaya yang banyak dilakukan untuk menangani permasalahan tersebut adalah penggunaan antibiotik. Akan tetapi penggunaan antibiotik secara terus menerus akan menyebabkan permasalahan baru, yaitu timbulnya

resistensi, penimbunan residu obat - obatan didalam tubuh ikan atau udang, maupun pencemaran lingkungan yang akhirnya dapat mempengaruhi organisme perairan (Prajitno, 2007).

Berdasarkan permasalahan diatas, perlu adanya bahan alternatif yang lebih aman yang dapat digunakan dalam pengendalian penyakit ikan. Salah satu alternatifnya adalah dengan menggunakan bahan alami yang bersifat anti parasit, anti jamur, anti bakteri, dan anti viral. Adapun keuntungan menggunakan bahan alami antara lain relatif lebih aman, mudah diperoleh, murah, tidak menimbulkan resistensi, serta relatif tidak berbahaya terhadap lingkungan sekitarnya (Sugianti, 2005). Hal tersebut juga sesuai dengan pendapat Karimy, Julendra, Hayati, Sofyan, Damayanti dan Priyowidodo (2013), kelebihan menggunakan bahan - bahan alami yaitu aman bagi lingkungan, bersifat antibakteri, murah dan mudah untuk didapatkan. Salah satu bahan alami yang bersifat antibakteri yaitu daun kenikir (*Cosmos caudatus*) yang mengandung saponin, alkaloid, flavonoid pada batang dan daun, fenol dan terpenoid. Daun Kenikir memiliki aktifitas antimikroba baik pada bakteri gram positif, bakteri gram negatif dan fungi.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Dwiyanti, Ibrahim dan Trimulyono, (2014), dihasilkan bahwa ekstrak daun kenikir berpengaruh terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *Bacillus cereus* secara *in vitro* dengan konsentrasi ekstrak daun kenikir yang daya hambatnya paling optimal ialah konsentrasi 90% dengan rata - rata diameter daya hambat sebesar 11,5 mm.

Penelitian yang menggunakan ekstrak kasar daun kenikir untuk menghambat bakteri *V. harveyi* belum pernah dilakukan. Oleh karena itu dilakukan penelitian ini untuk menjelaskan pengaruh ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*.

1.2 Perumusan Masalah

Penyakit merupakan kendala utama dalam kegiatan budidaya dan salah satu penyebabnya yaitu adanya patogen penyakit seperti bakteri *V. harveyi*. Bakteri *V. harveyi* merupakan salah satu bakteri yang menimbulkan vibriosis pada udang, ikan dan kerang – kerangan. Penggunaan obat - obatan kimia dan antibiotik dalam upaya penanggulangan penyakit diketahui mampu mengakibatkan resistensi bakteri. Penggunaan antibiotik dalam waktu lama akan menimbulkan sejumlah masalah utamanya bakterial dan residu yang dapat mencemari lingkungan. Karena itu diperlukan senyawa antibakteri dari bahan alami yang aman dan tidak menimbulkan efek samping berbahaya. Oleh karena itu diperlukan alternatif pengobatan dari bahan alami yang lebih ramah lingkungan dan tidak menimbulkan resistensi bakteri. Salah satu bahan alami sebagai pengganti antibiotik yang lebih aman bagi lingkungan perairan yaitu dengan menggunakan ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) yang mengandung senyawa flavonoid dan saponin merupakan senyawa yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Berdasarkan latar belakang di atas maka didapatkan perumusan masalah sebagai berikut:

- Bagaimana pengaruh pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) dengan uji cakram terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* ?
- Berapa dosis pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) yang efektif dalam menghambat bakteri *V. harveyi* ?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah

- Untuk menjelaskan pengaruh pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*

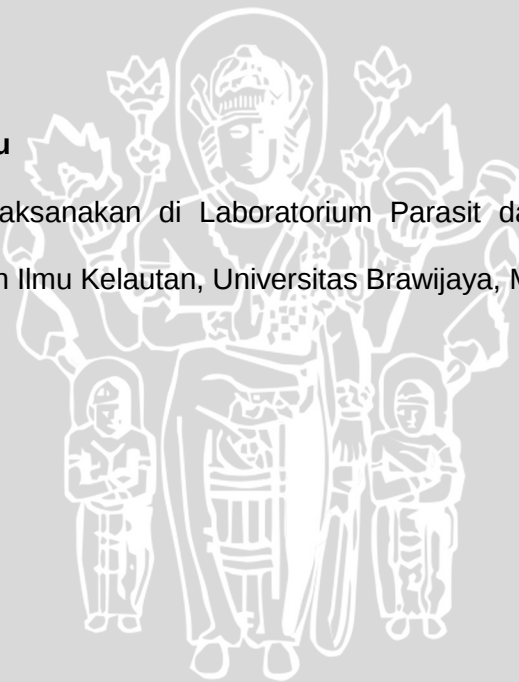
- Untuk menentukan dosis yang efektif dalam pemberian ekstrak kasar daun kenikir *C. caudatus* terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*.

1.4 Hipotesis

- H_0 : Pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) dengan dosis yang berbeda tidak mempengaruhi daya hambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.
- H_1 : Pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) dengan dosis yang berbeda dapat mempengaruhi daya hambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

1.5 Tempat dan Waktu

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



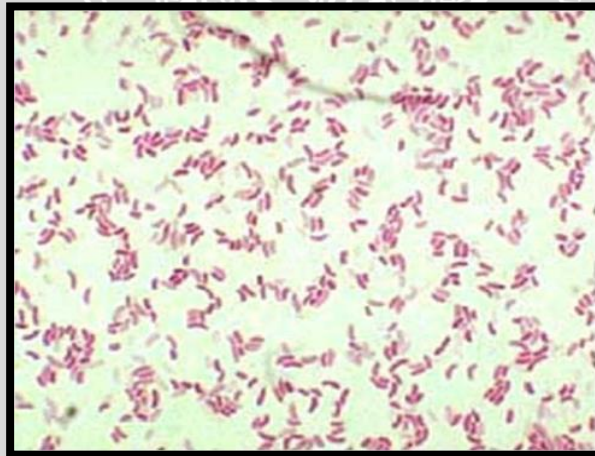
2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Bakteri *Vibrio harveyi*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Garrity, Bell dan T.G.Lilbur (2004), bakteri *V. harveyi* memiliki klasifikasi sebagai berikut ini :

Kingdom : Bacteria
Phylum : Proteobacteria
Order : Vibrionales
Family : Vibrionaceae
Genus : *Vibrio*
Spesies : *Vibrio harveyi*



Gambar 1. *V. harveyi* dengan perbesaran 1.000x (Rizka,2013)

Menurut Ghufuran dan Kordi (2005), *Vibrio* sp. adalah bakteri yang tergolong dalam famili Vibrionaceae, yang mempunyai tubuh berbentuk batang serta mempunyai kemampuan untuk bergerak karena dilengkapi dengan flagel. Bakteri ini tergolong bakteri yang paling ganas menyerang ikan - ikan laut

budidaya. Pada ikan yang sehat, bakteri ini sering ditemukan dibagian usus (*intestine*).

Vibrio termasuk dalam bakteri gram negatif, sel tunggal berbentuk batang pendek yang bengkok (koma), berukuran panjang 1,4 – 5,0 μm dan lebar 0,3 – 1,3 μm , bersifat motil dan mempunyai flagel. *Vibrio* bersifat anaerob fakultatif, yaitu dapat hidup baik dengan atau tanpa oksigen. Semua jenis *vibrio* adalah motil (bergerak) dan mempunyai kutub flagella dengan sarung pelindung (Pelczar dan Chan, 2008).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Prajitno (2007), bakteri *vibrio* spp. dan virus termasuk patogen oportunistik yang hidupnya tidak sepenuhnya tergantung oleh inangnya (host). Sifat yang dimiliki ini menyebabkan bakteri ada dimana - mana. Penyakit dapat terjadi apabila kondisi lingkungan memburuk sebagai akibat timbunan limbah organik (> 30 ppm) serta bahan cemaran lainnya.

Bakteri *Vibrio* spp. termasuk bakteri yang tersebar luas pada lingkungan perairan laut dan sering diisolasi dari ikan, udang - udangan, kerang - kerangan dan makanan laut lainnya. Terjadinya kematian masal pada budidaya seabream (*Sparus auratus*) di Israel karena penanganan ikan kurang baik serta infeksi bakteri *V. hareyi* sebagai patogen sekunder (Prajitno, 2005).

2.1.3 Reproduksi

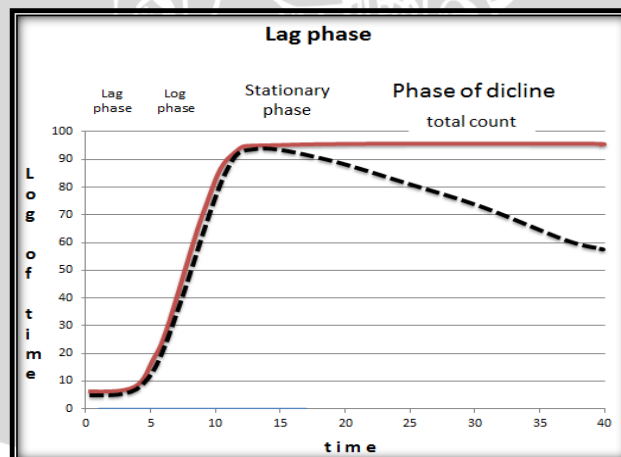
Secara umum bakteri bereproduksi dengan pembelahan. Selanjutnya diikuti pemanjangan sel kemudian pembentukan membran sel melintang dan dinding sel secara berurutan. Pada bakteri, membran melintang yang baru dan dinding sel tumbuh ke dalam dari lapisan luar, yang melibatkan mesosom septal. Membran melintang dibentuk sebagai jalan untuk memisahkan dua sister kromosom (kromosom kembar) yang dibentuk saat replikasi kromosom. Ini

diakhiri dengan peletakan kromosom pada membran sel (Brooks, Butel dan Morse, 2001).

Hal tersebut sesuai dengan pendapat Pelczar dan Chan (2008), bahwa proses reproduksi paling umum didalam daur pertumbuhan yang biasa pada populasi bakteri adalah pembelahan sel secara biner melintang yakni suatu proses reproduksi aseksual, setelah pembentukan dinding sel melintang maka satu sel tunggal membelah menjadi dua sel.

2.1.4 Pertumbuhan dan Perkembangbiakan

Pertumbuhan pada bakteri atau mikroorganisme lain biasanya mengacu pada perubahan di dalam hasil panen sel dan bukan perubahan individu organisme. Inokulum hampir selalu mengandung ribuan organisme, pertumbuhan menyatakan pertambahan jumlah dan atau massa melebihi yang ada di dalam inokulum asalnya. Selama fase pertumbuhan seimbang, pertambahan massa bakteri berbanding lurus dengan perubahan komponen seluler yang lain seperti DNA, RNA dan protein (Pelczar dan Chan,2008).



Gambar 2. Fase Pertumbuhan Bakteri

(Duguid, Marmion dan Swain,1978)

Kurva pertumbuhan bakteri disajikan pada **Gambar 2**. Menurut Duguid, Marmion dan Swain (1978), terdapat empat fase utama pertumbuhan bakteri, yaitu:

- a) Fase lag, adalah fase dimana belum ada kegiatan penambahan sel, akan tetapi kemungkinan terjadi perubahan ukuran sel dan terjadi aktifitas metabolik. Pada fase ini, sel bakteri melakukan adaptasi untuk pertumbuhan terhadap lingkungan hidupnya.
- b) Fase eksponensial, pada fase ini sel - sel membelah dengan laju yang konstan dan merupakan sebagai akibat dari pembelahan biner. Jumlah sel bakteri pada fase ini meningkat sepuluh kali lipat dalam jangka waktu tertentu, mereka akan meningkatkan 100 kali lipat dan atau 1000 kali lipat dalam periode waktu tertentu.
- c) Fase stasioner, pada fase ini pertumbuhan eksponensial berhenti, laju multiplikasi berkurang sampai berhenti sama sekali dan sel - sel masuk ke dalam fase diam. Secara teori terjadi keseimbangan antara pertumbuhan dan kematian pada sel bakteri. Pada fase ini, sel bakteri masih melakukan aktifitas metabolik yakni dengan metabolisme endogen dengan menyediakan energi dan zat yang diperlukan untuk mempertahankan hidup.
- d) Fase kematian, pada fase ini terjadi penurunan laju pertumbuhan dan juga penurunan jumlah sel bakteri. Hal tersebut disebabkan karena nutrisi yang dibutuhkan sel bakteri sudah habis dan kondisi lingkungan yang tidak sesuai.

Aktivitas dan pertumbuhan bakteri dipengaruhi oleh faktor abiotik yaitu faktor fisik seperti suhu, cahaya, tekanan osmose dan radiasi. Selain itu juga faktor kimia seperti pH, salinitas, bahan organik dan zat - zat kimia lain. Bakteri *Vibrio* spp. termasuk jenis bakteri halofit yakni bakteri yang dapat hidup pada salinitas yang tinggi dan dapat tumbuh dengan baik pada kondisi alkali (Prajitno, 2007).

2.1.5 Faktor - faktor yang Mempengaruhi Pertumbuhan

a. Lingkungan

Laju pertumbuhan dan aktivitas bakteri dipengaruhi oleh beberapa faktor abiotik, diantaranya yaitu pH, suhu, nutrisi, tekanan osmosis, pengeringan dan lain sebagainya. Suhu dan pH merupakan faktor yang penting bagi pertumbuhan bakteri, karena masing - masing spesies bakteri mempunyai suhu dan pH optimum untuk pertumbuhannya (Waluyo, 2007).

b. Nutrien

Pada umumnya, bakteri memperoleh nutrisi atau makanan melalui dua cara, yaitu secara autotrof dan heterotrof. Bakteri autotrof adalah kelompok bakteri yang dapat membuat makanannya sendiri. Artinya, kelompok bakteri tersebut membuat makanannya dengan cara mengubah materi zat anorganik menjadi zat organik sebagai bahan makanannya. Sedangkan bakteri heterotrof adalah bakteri yang tidak mampu membuat makanannya sendiri. Dalam hal ini, pemenuhan kebutuhan makanan sangat bergantung pada kehadiran makhluk hidup lain, makhluk hidup yang sudah mati dan bangkai (Sudjadi dan Laila, 2006).

2.1.6 Infeksi Bakteri *Vibrio harveyi* dan Gejalanya

Proses infeksi bakteri diawali dengan menempel atau melekat pada sel inang. Setelah bakteri mempunyai kedudukan yang tetap untuk menginfeksi, bakteri tersebut mulai memperbanyak diri dan menyebar secara langsung melalui jaringan atau aliran darah. Infeksi bakteri ini dapat bersifat sementara atau menetap. Pada proses infeksi ini bakteri akan menyebar kedalam tubuh serta mencapai jaringan yang cocok untuk memperbanyak diri (Jawetz, Melnick, dan Adelberg, 1992).

Menurut Ghufran dan Kordi (2005), ikan yang tergolong penyakit vibriosis memperlihatkan gejala - gejala antara lain: ikan kehilangan nafsu makan

(anorexia), kulit ikan menjadi gelap, insang ikan pucat, sering terjadi pembengkakan pada kulit yang lama kelamaan akan pecah menjadi luka (bisul) dan mengeluarkan cairan nanah berwarna kuning kemerah - merahan.

2.2 Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.)

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Sharifuldin (2014), klasifikasi dari daun kenikir adalah sebagai berikut:

Division	: Tracheophyta
Subdivision	: Spermatophytina
Infradivision	: Angiospermae
Class	: Magnoliopsida
Superorder	: Asteranae
Order	: Asterales
Family	: Asteraceae
Genus	: Cosmos
Species	: <i>Cosmos caudatus</i> Kunth.



Gambar 3. Daun Kenikir (*C. caudatus* K.) (Kerthyasa dan Yuliani, 2013).

Kenikir merupakan tanaman herbal musiman yang mempunyai batang berbentuk seperti pipa yang bergaris - garis membujur. Daun bertangkai panjang menyirip, berbau damar bila diremas. Bunga terdapat pada ujung batang

berwarna lembayung berbintik - bintik kuning di tengahnya. Buah keras berbentuk jarum (Hidayat, Rodame dan Napitupulu, 2015).

Menurut Hidayat, Sri dan Sofia (2008), tanaman kenikir dapat tumbuh dengan baik di dataran rendah sampai ketinggian 700 m dpl pada kondisi tanah yang liat, gembur, dan berdrainase baik. Kenikir menyukai tempat yang terbuka dengan sinar matahari penuh sepanjang hari. Sebagian besar budidayanya dilakukan dengan menggunakan biji karena tanaman kenikir memang mudah sekali tumbuh karena berada ditanah yang gembur dan sedikit lembab.

2.2.2 Bahan Aktif Daun Kenikir (*C. caudatus* K.)

Menurut Hariana (2013), daun kenikir memiliki kandungan senyawa yang bersifat antimikroba seperti saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri. Menurut Cheng, Ismail, Anthony, Chuan Ng, Hamid, dan Nisak (2015), *cosmos caudatus* memiliki berbagai kandungan senyawa bioaktif, seperti asam askorbat, proantosianidin, asam klorogenat, dan catechin. Selain itu *C. caudatus* memiliki antioksidan tinggi dan dapat dijadikan sebagai obat untuk penyakit diabetes, hipertensi dan inflamasi.

Kenikir sebagai antioksidan, memiliki kandungan senyawa fenolik dan sifat anti kanker dari tanaman. Setiap 100 gram kenikir mengandung 21,41 mg fenolik, kenikir juga mengandung antioksidan yang sangat tinggi yaitu sekitar 2.400 mg (Mohamed, Khee, Shuid, Muhammad, Suhaimi, Othman, Babji, dan Soelaiman, 2012).

2.2.3 Mekanisme Senyawa Daun Kenikir (*C. caudatus*) sebagai Antimikroba

Antimikroba adalah suatu zat yang mampu mengganggu pertumbuhan serta metabolisme mikroba. Apabila zat tersebut mampu mengganggu pertumbuhan dan metabolisme bakteri disebut antibakteri. Mekanisme kerja antimikroba antara lain dengan jalan merusak dinding sel, selanjutnya merusak

membran sitoplasma, men-deanturasi protein sel dan menghambat kerja enzim dalam sel (Prajitno, 2007).

Flavonoid merupakan senyawa aktif yang berfungsi untuk mengganggu sintesis dinding bakteri sehingga terjadi kebocoran plasma yang diakhiri dengan lisisnya bakteri, selain itu flavonoid berfungsi untuk menghambat DNA gyrase, aktivitas enzim ATPase bakteri dan juga dapat menghambat metabolisme energi bakteri. Alkaloid merupakan senyawa yang lebih berefek pada bakteri gram positif dibanding pada bakteri gram negatif. Alkaloid bekerja sebagai DNA interkalator dan penghambat sintesis DNA dengan cara menghambat topoisomerase (Dewi, Joharman dan Budiarti, 2013).

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

Menurut Harmita dan Radji (2008), metode cakram merupakan cara yang mudah untuk menetapkan kerentanan organisme terhadap antibiotik dengan cara menginokulasi pelat agar dengan biakan dan membiarkan antibiotik berdifusi ke media agar. Cakram yang telah mengandung antibiotik diletakkan di permukaan pelat agar yang mengandung organisme yang diuji. Konsentrasi menurun sebanding dengan luas bidang difusi. Pada jarak tertentu pada masing – masing cakram, antibiotik terdifusi sampai pada titik antibiotik tersebut tidak lagi menghambat pertumbuhan mikroba. Efektivitas antibiotik ditunjukkan oleh zona hambatan. Zona hambatan tampak sebagai area jernih atau bersih yang mengelilingi cakram tempat zat dengan aktivitas antimikroba terdifusi. Diameter zona dapat diukur dengan penggaris dan hasil dari eksperimen ini merupakan satu antibiogram.

Menurut Kusmiyati dan Aguatini (2007), metode kertas cakram adalah metode dimana meletakkan kertas cakram yang telah direndam dengan larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, maka pertumbuhan bakteri diamati untuk memastikan ada atau tidaknya daerah

hambatan disekeliling kertas cakram. Sedangkan metode pengenceran adalah metode yang mengencerkan zat antimikroba dan dimasukkan ke dalam tabung reaksi yang ditambahkan sejumlah mikroba uji yang telah ditentukan jumlahnya. Pada selang waktu yang telah di tentukan, maka dilakukan pemindahan dari tabung reaksi ke dalam tabung lain yang berisi media steril dan kemudian diinkubasikan dan diamati penghambatan pertumbuhan dari mikroba atau bakteri tersebut. Hal tersebut sesuai dengan pendapat Trianto, Wibowo, Suryono dan Rahayu (2004), bahwa untuk pengukuran zona hambatan, apabila uji yang dilakukan menunjukkan hasil yang positif pada diameter zona hambat yang telah diukur maka hasil tersebut (x) dikurangi dengan 6 mm dimana diketahui sebagai ukuran dari kertas cakram.

Pada penelitian yang dilakukan oleh Putri (2014), ekstrak daun kenikir mampu menghambat bakteri *Salmonella typhi* sebesar 9,5 mm pada konsentrasi 10 mg/ml, konsentrasi 15 mg/ml menunjukkan diameter zona hambat sebesar 13,3 mm, konsentrasi 20 mg/ml menunjukkan diameter zona hambat sebesar 16,5 mm, konsentrasi 25 mg/ml menunjukkan diameter zona hambat sebesar 20,3 mm, dan konsentrasi 30 mg/ml diameter zona hambat juga terus mengalami kenikan yaitu sebesar 24,2 mm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak metanol daun keikir memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi*.

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan untuk penelitian disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Alat - alat Penelitian

No	Alat	Kegunaan
1.	Tabung reaksi	Sebagai tempat untuk peremajaan bakteri di media miring
2.	Rak Tabung Reaksi	Sebagai tempat meletakkan tabung reaksi
3.	Erlenmeyer	Sebagai tempat pembuatan media
4.	Pinset	Sebagai alat untuk mengambil kertas cakram
5.	Gelas ukur	Sebagai tempat mengukur media cair
6.	<i>Beaker glass</i>	Sebagai tempat tabung reaksi saat proses sterilisasi
7.	Inkubator	Sebagai tempat inkubasi bakteri
8.	Jarum osse	Sebagai alat untuk mengambil dan menanam bakteri
9.	Mikropipet	Sebagai alat untuk mengambil larutan ukuran 100-1000 μ l
10.	<i>Autoclave</i>	Sebagai untuk mensterilisasi alat dan bahan
11.	Lemari pendingin	Sebagai tempat penyimpanan bakteri dan bahan
12.	Blender	Sebagai alat menghaluskan bahan kering menjadi simplisia
13.	Timbangan digital	Sebagai alat untuk menimbang dengan ketelitian 10^{-3}
14.	Timbangan analitik	Sebagai alat untuk menimbang dengan ketelitian 10^{-2}
15.	Oven	Sebagai alat untuk mengeringkan petri setelah proses sterilisasi
16.	<i>Laminary Air Flow (LAF)</i>	Sebagai tempat penanaman bakteri dalam kondisi steril
17.	Bunsen	Sebagai alat untuk pembakaran dan pengkondisian steril
18.	<i>Sprayer</i>	Sebagai tempat alkohol
19.	<i>Rotary vacum evaporator</i>	Sebagai alat untuk memisahkan cairan dan padatan pada proses pembuatan ekstrak
20.	<i>Blue tip</i>	Sebagai alat untuk menuang campuran bakteri dalam media TSB
21.	Spatula	Sebagai alat untuk mengaduk ekstrak
22.	Nampan	Sebagai tempat untuk meletakkan alat dan bahan
23.	Cawan petri	Sebagai tempat untuk menanam bakteri dan meletakkan kertas cakram

No	Alat	Kegunaan
24.	Vortex	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
25.	Hot plate	Sebagai alat untuk memanaskan media
26.	Gunting	Sebagai alat untuk memotong benang
27.	Toples kaca	Sebagai tempat saat proses maserasi
28.	Botol film	Sebagai tempat untuk mengencerkan ekstrak

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan untuk penelitian disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Bahan – bahan Penelitian

No	Bahan	Kegunaan
1.	Daun Kenikir (<i>C. caudatus</i>)	Sebagai bahan ekstrak yang akan diujikan daya hambat
2.	Bakteri <i>V. harveyi</i>	Sebagai bahan penelitian
3.	<i>Thiosulphate Citrat Bile Salt Sucrose Agar</i> (TCBSA)	Sebagai media hidup bakteri <i>V. harveyi</i>
4.	<i>Tryptic Soy Agar</i> (TSA)	Sebagai media peremajaan bakteri
5.	<i>Tryptitone Soy Broth</i> (TSB)	Sebagai media pengencer bakteri
6.	Alkohol 70%	Sebagai bahan aseptis
7.	DMSO 10%	Sebagai pelarut ekstrak
8.	Etanol 96%	Sebagai bahan pelarut saat proses maserasi
9.	Akuades	Sebagai pelarut media
10.	Spirtus	Sebagai bahan bakar pada bunsen
11.	Kertas Saring	Sebagai bahan untuk menyaring hasil maserasi
12.	Tali	Sebagai bahan untuk mengikat alat saat proses sterilisasi
13.	<i>Aluminium foil</i>	Sebagai bahan untuk menutupi seluruh bagian toples kaca saat proses maserasi
14.	Kertas berkas atau Koran	Sebagai bahan pembungkus alat saat proses sterilisasi
15.	Kertas Cakram ukuran 6 mm	Sebagai bahan untuk mengetahui besar zona bening dari ekstrak yang digunakan
16.	Kertas label	Sebagai pemberi tanda pada setiap perlakuan
17.	Kapas	Sebagai bahan untuk menutup alat saat proses sterilisasi
18.	Tisu	Sebagai bahan untuk mengeringkan alat setelah dicuci
19.	NaCl	Sebagai bahan campuran dari media TCBSA
20.	KCl	Sebagai bahan campuran dari media TCBSA
21.	MgSO ₄	Sebagai bahan campuran media TCBSA

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen. Menurut Hartanto (2003), penelitian eksperimental adalah penelitian yang ingin menguji hubungan suatu sebab (*cause*) dengan akibat (*effect*). Pengujian dilakukan dalam suatu sistem tertutup, yang kondisinya terkontrol. Terdapat beberapa unsur dalam penelitian eksperimental, yaitu adanya situasi (kelompok) kontrol dan kelompok uji atau kelompok perlakuan, serta adanya intervensi peneliti (perlakuan). Kegunaan dari rancangan eksperimental adalah mendapatkan informasi yang relevan dengan permasalahan penelitian secara maksimal, dengan materi, biaya dan waktu yang minimal. Sehingga penelitian menjadi lebih efektif dan efisien dalam hal waktu, biaya, tenaga dan analisa statistiknya.

Penelitian dengan menggunakan metode eksperimental ini bersifat menguji, artinya semua variable yang diuji harus diukur dengan menggunakan instrumen pengukuran atau tes yang sudah dibakukan (Hamdi dan Bahrudin, 2014). penelitian eksperimen merupakan jenis penelitian yang dikembangkan untuk mempelajari fenomena dalam kerangka korelasi sebab - akibat. Selain itu penelitian eksperimen ini merupakan suatu bentuk rancangan penelitian yang memperlakukan dan memanipulasi subjek penelitian dengan kontrol secara ketat (Rajab, 2008).

3.3 Pengambilan Data

Teknik pengambilan data pada penelitian ini dengan cara observasi langsung. Menurut Mania (2008), observasi adalah cara atau metode menghimpun keterangan maupun data yang dilakukan dengan mengadakan pengamatan dan pencatatan secara sistematis terhadap fenomena yang sedang dijadikan sasaran pengamatan. Melalui kegiatan observasi dapat diperoleh gambaran dan keterangan yang lebih jelas tentang masalah yang diteliti. Observasi harus dilakukan secara sistematis dan terarah, bukan dengan secara

kebetulan saja. Dalam hal ini, observasi serta pencatatnya sedapat mungkin dilakukan menurut prosedur dan aturan - aturan tertentu sehingga hasil observasi memberi kemungkinan untuk ditafsirkan secara ilmiah.

3.4 Rancangan Penelitian

Penelitian ini menggunakan Rancangan acak Lengkap (RAL). Menurut Tapehe (2015), RAL banyak digunakan untuk percobaan laboratorium dan rumah kaca karena satuan - satuan percobaan selain perlakuan dapat diatur sehingga memenuhi homogenitas.

Menurut Sastrosupadi (2000), model untuk Rancangan Acak Lengkap yaitu sebagai berikut :

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

Keterangan :

Y_{ij} = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke i dan ulangan ke j

μ = nilai rata - rata

T_i = pengaruh perlakuan ke- i

ε_{ij} = pengaruh kesalahan (galat) percobaan perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

Penelitian dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) dengan perlakuan yang diberikan adalah perbedaan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap bakteri *V. harveyi*. Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat yang tepat dalam penggunaan ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*). Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak tiga kali, sedangkan perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 5 perlakuan dan 2 kontrol, kontrol positif dan kontrol negatif. Sehingga tiap perlakuan dapat dilihat pada gambar sebagai berikut ini :

E ₂	B ₁	C ₁	A ₂	E ₁	K(+)
C ₂	E ₂	D ₁	B ₂	D ₂	K(-)
A ₃	D ₃	E ₃	C ₃	B ₃	

Gambar 4. Denah Penelitian Uji Cakram

Keterangan :

K (+) : Perlakuan kontrol (+) dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 200 ppt

K (-) : Perlakuan kontrol (-) tanpa diberi ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 0 ppt

Perlakuan A : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 10 ppt.

Perlakuan B : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 20 ppt.

Perlakuan C : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 30 ppt.

Perlakuan D : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 40 ppt.

Perlakuan E : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) 50 ppt.

1, 2, dan 3 : Sebagai ulangan

3.5 Prosedur Penelitian

3.5.1 Sterilisasi Alat dan Bahan

Sterilisasi merupakan hal penting yang harus dilakukan sebelum dimulai percobaan yang bertujuan untuk membunuh semua mikroorganisme yang tidak dikehendaki yang menempel pada alat maupun bahan. Adapun langkah - langkah dalam sterilisasi yaitu:

- Pertama mencuci semua alat – alat dan ditunggu hingga kering.
- Setelah kering, alat dibungkus dengan menggunakan kertas koran. Sterilisasi bahan dilakukan dengan cara memasukkan bahan ke dalam erlenmeyer atau ke dalam tabung reaksi.
- Mulut tabung reaksi ataupun erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas hingga benar – benar rapat lalu dibungkus dengan menggunakan kertas aluminium foil dan dirapatkan dengan menggunakan tali.
- Alat dan bahan yang sudah siap disterilisasi, dimasukkan kedalam keranjang sterilisasi.
- Memasukkan aquades kedalam ruang sterilisasi sampai menutup sistem pemanas (*heater*), untuk mencegah penimbunan kapur pada elemen pemanas.
- Keranjang yang sudah berisi alat maupun bahan yang akan disterilisasi dimasukkan kedalam *autoclave*.
- *Autoclave* ditutup dengan cara menutup tuas secara diagonal agar seimbang kekuatannya pada saat penutupan.
- Klep keluarnya uap (*safety valve*) dipastikan pada posisi berdiri atau tegak.
- *Autoclave* dinyalakan pada posisi ON (ke atas), dan temperatur diputar pada posisi maksimal.
- Ditunggu hingga keluar uap air lalu klep ditutup atau arah ke samping.
- Ditunggu sampai jarum menunjukkan suhu sterilisasi (121°C).

- Temperatur diturunkan sampai lampu pada *sterilizing* berwarna kuning dan timer diatur pada posisi 15 menit.
- Setelah alarm berbunyi maka pertanda sterilisasi berakhir dan temperatur diturunkan minimal.
- *Autoclave* dimatikan pada posisi OFF, lalu klep dibuka secara perlahan sampai jarum menunjukkan angka 0 dan tutup *autoclave* dapat dibuka.

3.5.2 Sterilisasi Tempat Perlakuan

Selain alat dan bahan, sterilisasi tempat perlakuan juga penting dilakukan karena bertujuan untuk menghindari terjadinya kontaminasi dengan mikroorganisme lain yang tidak diinginkan. Tempat perlakuan seperti meja dan semua barang yang akan digunakan untuk penelitian benar – benar dalam kondisi aseptis. Sterilisasi tempat perlakuan ini dapat dilakukan dengan cara sterilisasi kimia menggunakan alkohol 70% serta dapat dilakukan dengan sterilisasi fisika menggunakan pemijaran dengan api bunsen maupun menggunakan penyinaran dengan sinar UV.

3.5.3 Pembuatan Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*)

Proses pembuatan ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- Menyiapkan daun kenikir yang didapatkan dari Balai Medika Tanaman Obat Batu, Jawa Timur sebanyak 1 kg.
- Selanjutnya, dikeringkan dengan cara dioven, suhu yang digunakan pada saat pengovenan yaitu 40 – 50°C. Pengovenan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air dari daun sehingga mudah untuk mendapatkan senyawa antibakterinya.
- Setelah dioven, dilakukan proses penggilingan dengan menggunakan blender.

- Setelah bahan yang digunakan sudah siap, kemudian dilakukan persiapan perendaman (maserasi) serbuk daun kenikir sebanyak 200 gram dimaserasi dalam larutan etanol 96% sebanyak 1 liter dengan perbandingan 1 : 5 selama 3 x 24 jam dilakukan pada suhu kamar. Menurut Sundari (2010), etanol merupakan pelarut polar yang banyak digunakan untuk mengekstrak komponen polar suatu bahan alami dan dikenal sebagai pelarut universal. Senyawa yang terkandung dalam daun dapat diserap oleh etanol 96%. Pelarut etanol dapat memberikan serapan karena pelarut yang digunakan bukan pelarut murni. Sehingga, serapan tersebut merupakan serapan yang terkandung dalam etanol.
- Larutan yang sudah didapat kemudian disaring menggunakan kertas saring, lalu diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator*
- Didapatkan ekstrak daun kenikir berupa pasta.

3.5.4 Pembuatan Media

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

Prosedur pembuatan media TCBSA yang digunakan untuk uji cakram adalah sebagai berikut:

- TCBSA ditimbang sebanyak 35,2 gram kemudian dilarutkan dengan 400 ml akuades dan dicampur dengan 7,36 gram NaCl, 2,78 gram MgSO₄ dan 0,3 gram KCl.
- Erlenmeyer ditutup kapas dan *aluminium foil* kemudian media dihomogenkan pada kondisi hangat diatas *hotplate* sampai tercampur rata.
- Media ditunggu hingga tidak terlalu panas kemudian dituangkan kedalam cawan petri dan ditunggu hingga padat.

- Media yang tidak langsung digunakan disimpan dalam lemari pendingin, apabila akan digunakan maka dapat dipanaskan kembali.

b. Media Tryptitone Soy Broth (TSB)

Prosedur pembuatan media *Tryptitone Soy Broth* (TSB) yang digunakan untuk pengenceran bakteri dalam metode sebar adalah sebagai berikut:

- TSB ditimbang sebanyak 0,32 gram dilarutkan dalam 10 ml akuades dalam erlenmeyer kemudian dicampur dengan 0,184 gram NaCl, 0,069 gram $MgSO_4$ dan 0,007 gram KCl.
- Erlenmeyer ditutup kapas dan *aluminium foil* kemudian media dihomogenkan pada kondisi hangat diatas *hotplate* sampai tercampur rata. kemudian TSB disterilkan dalam autoklaf pada suhu $121^{\circ}C$ selama 15 menit.
- Media TSB yang telah dingin dapat digunakan untuk reinokulasi bakteri dari TSA miring ke media cair

3.5.5 Pembiakan Bakteri *Vibrio harveyi*

Bakteri *V. harveyi* merupakan bakteri gram negatif yang sering menyerang pada ikan air laut. Pada penelitian ini, bakteri *V. harveyi* yang digunakan adalah bakteri isolat murni yang diperoleh dari Balai Budidaya Air Payau Jepara. Pengidentifikasian bakteri dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri tersebut adalah bakteri *V. harveyi*, maka diperlakukan pengujian biokimia yaitu dengan melakukan uji gram untuk menentukan bakteri tersebut adalah bakteri gram positif atau bakteri gram negatif (Lampiran 1).

Menurut Kismiyati, Subakti, Yusuf dan Kusdarwati (2009), pewarnaan gram bertujuan untuk menentukan apakah bakteri tersebut termasuk didalam kelompok bakteri gram positif atau kelompok bakteri gram negatif. Cara kerja dari pewarnaan gram yaitu suspensikan bakteri dengan ose, kemudian letakkan pada

objek dan difiksasi, tetesi dengan larutan gram A yang mengandung kristal violet, kemudian tetesi dengan larutan gram B yang mengandung lugol, tetesi dengan larutan gram C yang mengandung alkohol, dan yang terakhir tetesi dengan larutan gram D yang mengandung safranin.

Adapun prosedur yang dilakukan dalam pembiakan bakteri *V. harveyi* adalah sebagai berikut:

- Pertama yang harus dilakukan yaitu dicuci peralatan yang digunakan seperti erlenmeyer, sendok bahan dan spatula, lalu disiapkan media TCBSA miring.
- Jarum ose dipanaskan diatas bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum ose disentuhkan kebiakan murni *V. harveyi* kemudian digores secara zig - zag. Media TCBSA dibiarkan 12 - 24 jam dalam inkubator pada suhu 33°C.

3.6 Pelaksanaan Penelitian

3.6.1 Uji Cakram

Menurut Mulyadi, Wuryanti dan Ria (2013), metode difusi kertas cakram adalah salah satu metode yang paling umum digunakan dan dipilih dalam uji antibakteri, karena metode ini mudah dan sederhana dalam menentukan aktivitas antibakteri sampel yang diuji. Menurut Wasilah (2015), uji cakram digunakan untuk mengetahui pada konsentrasi tertentu yang dapat menghambat bakteri yang bersifat bakteriostatik (menghambat bakteri) setelah diinkubasi selama 24 jam, maupun bakteriosidal (membunuh bakteri) setelah diinkubasi selama 48 jam. Kertas cakram yang telah direndam dengan zat antibakteri diletakkan di atas media agar yang telah ditanam dengan mikroorganisme yang diuji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antibakteri terlihat sebagai

wilayah yang jernih di sekitar pertumbuhan mikroorganisme. Prosedur pelaksanaan uji cakram sebagai berikut:

- Disiapkan cawan petri yang telah terdapat media TCBSA dan dosis ekstrak daun kenikir (*C. caudatus*) untuk uji cakram.
- Dilakukan penanaman bakteri pada media TCBSA dengan menggunakan metode sebar kemudian diratakan pada seluruh permukaan media agar hingga merata.
- Direndam kertas cakram steril ukuran 6 mm ke dalam ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) selama 15 menit berdasarkan dosis perlakuan yang telah ditentukan.
- Kemudian kertas cakram yang telah direndam dalam ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) ditiriskan dan diletakkan pada permukaan lempeng agar.
- Jarak kertas cakram dengan tepi cawan petri tidak boleh kurang dari 15 mm. Jika jumlah kertas cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram tidak boleh kurang dari 24 mm dan saat meletakkan kertas cakram tidak boleh bergeser, karena mengurangi validasi pengukuran.
- Seluruh perlakuan dilakukan secara aseptis di *Laminary Air Flow* (LAF)
- Dibaca hasil setelah diinkubasi pada suhu ruang 33°C selama 24 jam dengan mengukur diameter daya hambat yang terbentuk di sekitar kertas cakram menggunakan jangka sorong digital.

Menurut Irianto (2005), teknik isolasi bakteri dapat dilakukan dengan beberapa cara yaitu secara goresan (*streaking*), atau secara sebar ulas (*spread plating*) pada media padat dalam cawan petri. Kedua cara tersebut memiliki kekurangan dan kelebihan. Pada cara sebar ulas, kemungkinan memperoleh pathogen lebih besar karena sampel yang diambil dari hewan yang sakit atau air paling tidak sebanyak 1 gram atau 1 ml. Adapun secara goresan dilakukan hanya

dengan menyentuhkan ujung *jarum osse*, jarum inokulasi atau *cutton bud* steril pada bagian – bagian tertentu hewan yang diteliti (misalnya lembar insang, bagian luka atau borok, mucus atau *ascites*) selanjutnya digoreskan pada media.

3.7 Parameter uji

Parameter uji terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama yaitu diameter daerah hambatan yang diukur dengan menggunakan kertas cakram yang dinyatakan dengan mm. Parameter penunjangnya adalah suhu inkubasi, pH media dan lama perendaman kertas cakram.

3.8 Analisis Data

Data hasil zona hambat dianalisis secara deskriptif dengan membandingkan diameter zona hambat antar perlakuan. Semua analisa akan diulang sebanyak tiga kali dari masing – masing perlakuan dan diuji secara statistik dengan menggunakan *Analysis of Variance* (ANOVA) sesuai rancangan yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) pada tingkat kepercayaan 95% ($\alpha = 0,05$) dan 99% ($\alpha = 0,01$). Analisis digunakan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variable bebas) terhadap parameter yang diukur. Apabila nilai uji F memiliki hasil berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka akan dilanjutkan dengan Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antar dua perlakuan.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Daya Hambat Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*) terhadap Bakteri *V. harveyi*

Hasil pengamatan selama penelitian mengenai uji daya hambat ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*, dapat dilihat ditabel dan gambar hasil penelitian zona bening yang disajikan pada Lampiran 5.

Pada penelitian ini dosis yang digunakan antara lain 10 ppt, 20 ppt, 30 ppt, 40 ppt, dan 50 ppt. Kemampuan daya antibakterial ekstrak terhadap bakteri ditentukan dengan cara mengukur diameter daya hambat atau zona bening yang muncul di sekitar kertas cakram. Hasil uji daya hambat pada penelitian yang dilakukan diperoleh tidak adanya pertumbuhan bakteri *V. harveyi* disekitar kertas cakram yang telah direndam ekstrak kasar daun kenikir dengan menggunakan perlakuan dosis yang berbeda. Hasil data pengukuran daya hambat ditunjukkan pada Tabel 3. dibawah ini.

Tabel 3. Hasil rata – rata pengukuran diameter daya hambat (mm) ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi*

Perlakuan (ppm)	Ulangan			Total (mm)	Rata - rata (mm)
	1	2	3		
A (10 ppt)	1,34	2,66	1,90	5,9	1,97 ± 0,66
B (20 ppt)	2,85	4,57	3,49	10,91	3,64 ± 0,87
C (30 ppt)	4,02	3,35	3,68	11,05	3,68 ± 0,34
D (40 ppt)	4,20	4,22	4,28	12,7	4,23 ± 0,04
E (50 ppt)	4,35	4,91	4,56	13,82	4,6 ± 0,28
Total				54,38	

Semua dosis yang diujikan menunjukkan adanya zona bening disekitar kertas cakram yang telah direndam dengan ekstrak kasar daun kenikir.

Berdasarkan pengamatan menunjukkan hasil pengukuran diameter daya hambat ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap bakteri *V. harveyi*. Hasil rata-rata diameter daya hambat perlakuan A (10 ppt) sebesar $1,97 \pm 0,66$ mm, perlakuan B (20 ppt) sebesar $3,64 \pm 0,87$ mm, perlakuan C (30 ppt) sebesar $3,68 \pm 0,87$ mm, perlakuan D (40 ppt) sebesar $4,23 \pm 0,04$ mm dan perlakuan E (50 ppt) sebesar $4,6 \pm 0,28$. Hasil rata - rata diameter daya hambat tertinggi pada perlakuan E (50 ppt) sebesar $4,6 \pm 0,28$ mm, dan hasil rata - rata diameter daya hambat terendah pada perlakuan A (10 ppt) yaitu sebesar $1,97 \pm 0,66$ mm. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan jumlah kandungan bahan aktif yang terdapat pada setiap konsentrasi ekstrak kasar daun kenikir. Menurut Hariana (2013), daun kenikir memiliki kandungan senyawa yang bersifat antimikroba seperti saponin, flavonoid, polifenol, dan minyak atsiri. Berdasarkan penelitian yang dilakukan oleh Putri (2014), ekstrak daun kenikir mampu menghambat bakteri *Salmonella typhi* sebesar 9,5 mm pada konsentrasi 10 mg/ml, konsentrasi 15 mg/ml menunjukkan diameter zona hambat sebesar 13,3 mm, konsentrasi 20 mg/ml menunjukkan diameter zona hambat sebesar 16,5 mm, konsentrasi 25 mg/ml menunjukkan diameter zona hambat sebesar 20,3 mm, dan konsentrasi 30 mg/ml diameter zona hambat juga terus mengalami kenaikan yaitu sebesar 24,2 mm. Hal ini menunjukkan bahwa ekstrak daun kenikir memiliki potensi sebagai antibakteri terhadap bakteri *Salmonella typhi*.

Berdasarkan uji daya hambat ekstrak kasar daun kenikir dapat dilihat bahwa semakin tinggi perlakuan yang diberikan, maka zona hambat atau zona bening yang terbentuk semakin melebar. Pernyataan tersebut sesuai dengan pendapat Katno, Sari dan Agus (2009), diameter zona bening atau zona hambat yang dihasilkan oleh suatu ekstrak berbanding lurus dengan jumlah konsentrasi ekstrak yang digunakan, sehingga perbedaan besar kecilnya zona bening atau

zona hambat yang dihasilkan masing - masing konsentrasi berbanding dengan jumlah bahan aktif yang digunakan.

Berdasarkan pernyataan di atas bahwa ekstrak kasar daun kenikir mampu menghambat pertumbuhan bakteri yang ditimbulkan oleh adanya senyawa flavonoid yang terkandung di dalam ekstrak kasar daun kenikir. Menurut Rahayu (2013), flavonoid merupakan senyawa yang mudah larut dalam pelarut polar seperti etanol, butanol, dan aseton. Flavonoid merupakan golongan terbesar dari senyawa fenol, senyawa fenol mempunyai sifat efektif menghambat pertumbuhan virus, bakteri, dan jamur. Menurut Purwanto (2015), besarnya diameter zona hambat yang terbentuk dipengaruhi oleh tinggi rendahnya senyawa atau zat aktif yang terkandung di dalam fraksi tersebut. Tinggi rendahnya suatu konsentrasi yang digunakan tergantung pada jumlah kandungan bahan aktif yang terdapat di dalam bahan penelitian tersebut. Menurut Indriani (2007), hubungan konsentrasi ekstrak dengan zona hambat bakteri berbanding lurus, yaitu semakin tinggi konsentrasi ekstrak maka semakin tinggi zona hambat yang dihasilkan. Menurut Purwanto (2015), selain faktor konsentrasi, jenis bahan antimikroba juga menentukan kemampuan menghambat pertumbuhan bakteri. Perbedaan besarnya hambatan untuk masing – masing konsentrasi dapat disebabkan oleh perbedaan besar kecilnya konsentrasi, banyak sedikitnya kandungan zat aktif antimikroba yang terkandung dalam ekstrak, kecepatan difusi bahan antimikroba ke dalam medium dan inkubasi, pH lingkungan, komponen media, ukuran inokulum, waktu inkubasi dan aktivitas metabolik mikroorganisme.

Penghambatan bakteri yang terjadi dimungkinkan karena adanya reaksi suatu senyawa kimia sebagai antibakteri. Senyawa flavonoid merupakan salah satu senyawa kimia yang terkandung dalam daun kenikir. Flavonoid mempunyai aktivitas antibakteri karena flavonoid mempunyai kemampuan berinteraksi

dengan DNA bakteri dan menghambat fungsi membran sitoplasma bakteri dengan mengurangi fluiditas dari membran dalam dan membran luar sel bakteri. Akhirnya terjadi kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri membran dan membran tidak berfungsi sebagaimana mestinya, termasuk untuk melakukan perlekatan dengan substrat. Hasil interaksi tersebut menyebabkan terjadinya kerusakan permeabilitas dinding sel bakteri, mikrosom dan lisosom. Ion hidroksil secara kimia menyebabkan perubahan komponen organik dan transport nutrisi sehingga menimbulkan efek toksik terhadap sel bakteri (Sudirman, 2014).

Menurut Ariyanti (2012), mekanisme yang menyebabkan penghambatan dalam pertumbuhan bakteri diduga disebabkan oleh adanya interaksi senyawa fenol dan turunannya dengan sel bakteri. Senyawa – senyawa ini berikatan dengan protein pada bakteri melalui ikatan non spesifik membentuk kompleks protein fenol. Pada konsentrasi rendah, terbentuk kompleks protein fenol dengan ikatan yang lemah dan segera mengalami peruraian, kemudian merusak membran sitoplasma dan menyebabkan kebocoran isi sel, sehingga pertumbuhan bakteri terhambat. Sedangkan pada konsentrasi tinggi, zat tersebut berkoagulasi dengan protein seluler dan membran sitoplasma mengalami lisis. Menurut Dwidjoseputro (1994), senyawa fenol masuk ke dalam sel bakteri melewati dinding sel bakteri dan membran sitoplasma, di dalam sel bakteri senyawa fenol menyebabkan penggumpalan (denaturasi) protein penyusun protoplasma sehingga dalam keadaan demikian metabolisme menjadi inaktif, dan pertumbuhan bakteri menjadi terhambat.

Menurut Inneke, Rumengan, Rumampuk, Rimper dan Losung (2005), menyatakan bahwa respon hambat dari suatu bahan aktif dapat diklasifikasikan pada respon hambatan yang disajikan pada Tabel 4 sebagai berikut:

Tabel 4. Klasifikasi Respon Hambatan Menurut Inneke *et al.*, (2005)

No.	Diameter zona bening	Respon Hambatan
1.	< 5 mm	Lemah
2.	5 – 10 mm	Sedang
3.	11 – 20 mm	Kuat
4.	21 - 30 mm	Sangat kuat

Berdasarkan data, diketahui bahwa pada perlakuan A (10 ppt), B (20 ppt), C (30 ppt), D (40 ppt), E (50 ppt), termasuk kedalam klasifikasi respon hambatan lemah karena hasil rata - rata zona bening yang dihasilkan < 5 mm. Untuk mengetahui nilai dari kenormalan data, maka dilakukan uji kenormalan data yang ditunjukkan pada Lampiran 4. Kemudian dilanjutkan dengan perhitungan sidik ragam untuk mengetahui pengaruh dari setiap perlakuan. Hasil sidik ragam pengaruh pemberian ekstrak kasar daun kenikir dengan dosis yang berbeda terhadap bakteri *V. harveyi* seperti yang ditunjukkan pada Tabel 5, untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 4.

Tabel 5. Hasil Perhitungan Sidik Ragam Diameter Daya Hambat Bakteri *V. harveyi*.

Sumber Keragaman	D _b	JK	KT	F _{hitung}	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	12,25	3,06	10,93**	3,48	5,99
Acak	10	2,78	0,28			
Total	14					

Keterangan : ** = Berbeda Sangat Nyata

Pada tabel sidik ragam didapatkan hasil bahwa uji daya hambat ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap bakteri *V. harveyi* berbeda sangat nyata. Hal ini dikarenakan nilai F. hitung lebih besar dari pada nilai F 5% dan F 1% atau nilai dari 10,93 lebih besar dari nilai 3,48 dan 5,99. Maka Ho ditolak yang berarti perlakuan tersebut berbeda sangat nyata. Selanjutnya dilakukan

perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan, hasil perhitungan dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Hasil Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*) Terhadap Diameter Daya Hambat Bakteri *V. harveyi*.

Rata – rata Perlakuan	A (1,97)	B (3,64)	C (3,68)	D (4,23)	E (4,6)	Notasi
A (1,97)	-	-	-	-	-	a
B (3,64)	1,67 **	-	-	-	-	b
C (3,68)	1,71**	0,04 ^{ns}	-	-	-	b
D (4,23)	2,26**	0,59 ^{ns}	0,55 ^{ns}	-	-	b
E (4,6)	2,63**	0,96 ^{ns}	0,92 ^{ns}	0,37 ^{ns}	-	b

Keterangan :

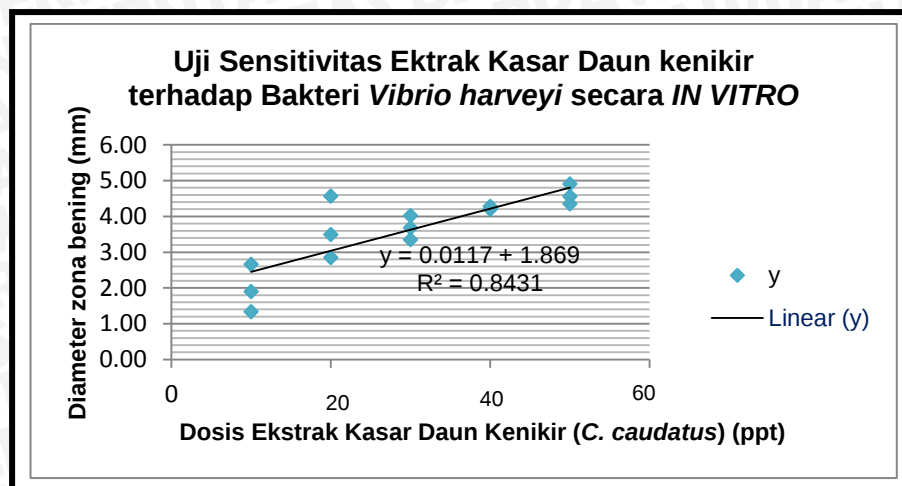
ns : tidak berbeda nyata

* : berbeda nyata

** : berbeda sangat nyata

Pada hasil uji BNT (Tabel 6) diketahui bahwa perlakuan yang paling efektif yakni pada perlakuan B (20 ppt), hal ini dikarenakan pada perlakuan B menunjukkan perbedaan yang sangat nyata dengan perlakuan A (10 ppt), namun terlihat tidak berbeda nyata pada perlakuan C (30 ppt), D (40 ppt), E (50 ppt). Sehingga dapat diambil kesimpulan bahwa konsentrasi efektif ekstrak kasar daun kenir yakni pada perlakuan B (20 ppt), karena pada konsentrasi tersebut ekstrak kasar daun kenir sudah mampu menghambat dengan baik.

Untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antara perlakuan dengan parameter yang diuji yaitu daya hambat bakteri *V. harveyi*, maka dilakukan uji polinomial orthogonal. Hasil perhitungan uji polinomial orthogonal yang berupa grafik disajikan pada Gambar 5, untuk perhitungan lengkapnya disajikan pada Lampiran 4.



Gambar 5. Grafik Hubungan Daya Hambat antar Perlakuan Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*) terhadap Bakteri *V. harveyi*.

Berdasarkan Gambar 5, grafik hubungan daya hambat antar perlakuan ekstrak kasar daun kenikir terhadap bakteri *V. harveyi* menunjukkan perpotongan garis secara linier dengan persamaan $y = 0,0117 + 1,869x$ dengan koefisien nilai determinasi (R^2) sebesar 0,8431 dan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9182. Nilai korelasi (r) mendekati angka 1, hal ini menunjukkan bahwa sumbu Y dipengaruhi oleh sumbu X. Jika nilai r mendekati 1 maka hubungan antara variabel X dan variabel Y sempurna dan positif (hubungan kuat sekali) dan jika nilai r mendekati 0 maka hubungan antara variabel X dan variabel Y lemah sekali atau tidak ada hubungan sama sekali (Poniwatie, 2012). Pada dosis 10 ppt hingga 50 ppt grafik mengalami peningkatan atau bertambah besarnya daya hambat, hasil perhitungan lengkapnya pada Lampiran 4. Hal tersebut menunjukkan bahwa ekstrak kasar daun kenikir mampu menghambat pertumbuhan dari bakteri *V. harveyi*.

4.2 Suhu Inkubator Selama Inkubasi dan Lama Perendaman Kertas Cakram

Pada penelitian ini parameter penunjang yang digunakan adalah suhu pada saat proses inkubasi, pH media dan lama perendaman kertas cakram. Proses pertumbuhan bakteri setelah ditanam dan diberi perlakuan dalam penelitian ini adalah di inkubasi selama 24 jam. Selama masa inkubasi tersebut,

suhu yang digunakan adalah 33°C, pada suhu tersebut bakteri *V. harveyi* sudah dapat tumbuh dengan baik. Hal ini sesuai dengan pernyataan Prajitno (2005), suhu optimum yang digunakan untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio* berkisar antara 30°C - 35°C. Sedangkan pada suhu 40°C dan 45°C bakteri tidak dapat tumbuh serta pada suhu 55°C bakteri akan mengalami kematian.

Parameter penunjang yang kedua yaitu pH, merupakan parameter lingkungan yang harus diperhatikan untuk menunjang pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Hasil pengukuran pH pada media TCBSA menggunakan pH paper menunjukkan pH media sebesar 7. Hal ini didukung oleh pernyataan Pelczar dan Chan (2008), pada umumnya, pH optimum pada pertumbuhan bakteri yaitu 6,5 dan 7,5.

Parameter penunjang selanjutnya yaitu lama perendaman kertas cakram. Ukuran kertas cakram yang digunakan yaitu 6 mm. Lama perendaman kertas cakram ini bertujuan agar ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) benar - benar menyerap sehingga mampu menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dengan baik. Lama perendaman kertas cakram pada penelitian ini adalah 15 menit. Hal ini didukung oleh pernyataan Mutschler (1991), 15 menit merupakan waktu yang optimal karena ekstrak sudah menyerap dengan sempurna dalam kertas cakram, sehingga dapat disimpulkan bahwa pada waktu 15 menit adalah lama perendaman terbaik untuk mengetahui daya hambat bakteri *V. harveyi* selama inkubasi.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang uji sensitivitas ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) terhadap bakteri *V. harveyi* secara *in vitro* dapat disimpulkan bahwa:

- Ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) memberikan pengaruh terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.
- Pemberian ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) menghasilkan perlakuan yang paling efektif yaitu pada perlakuan B dengan dosis 20 ppt menghasilkan rata - rata daya hambat sebesar $3,64 \pm 0,87$ mm, diameter daya hambat tertinggi yaitu pada perlakuan E (50 ppt) sebesar dengan rata - rata $4,6 \pm 0,28$, dan hasil rata - rata daya hambat terendah yaitu pada perlakuan A dengan dosis 10 ppt sebesar $1,97 \pm 0,66$ mm.
- Grafik hubungan daya hambat antar perlakuan ekstrak kasar daun kenikir terhadap bakteri *V. harveyi* menunjukkan perpotongan garis secara linier dengan persamaan $y = 0,0117 + 1,869x$ dengan koefisien nilai determinasi (R^2) sebesar 0,8431 dan koefisien korelasi (r) sebesar 0,9182.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan untuk menggunakan ekstrak kasar daun kenikir (*C. caudatus*) sebagai obat alami untuk menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dengan dosis efektif yaitu 20 ppt, dan perlu dilakukan penelitian lanjutan untuk dapat mendapatkan dosis yang optimal.

DAFTAR PUSTAKA

- Ajitama, P., D. Suryanto dan Y. Djayus. 24. Jenis-jenis Bakteri Gram Negatif Potensial Patogen Pada Ikan Kerapu Lumpur (*Epinephelus tauvina*) Di Keramba Jaring Apung Perairan Belawan. *Jurnal Aquacoatmarine*. **5** (4): 132-146.
- Ariyanti, N.K., I.B.G.Darmayasa dan S.K. Sudirga. 2012. Daya Hambat Ekstrak Kulit Daun Lidah Buaya (*Aloe barbadensis* Miller) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 dan *Escherichia coli* ATCC 25922. *Jurnal Biologi*. **16** (1): 1-4.
- Brooks, G. F., J. S. Butel dan S. A. Morse. 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Penerbit Salemba Medika. Jakarta. 528 hlm.
- Cheng, S., A. Ismail, J. Anthony, O.C.Ng, A.A. Hamid, and M.Y.B Nisak. 2015. Eight Weeks of *Cosmos caudatus* (Ulam Raja) Supplementation Improves Glycemic Status in Patients with Type 2 Diabetes: A Randomized Controlled Trial. *Hindawi Publishing Corporation*. pp. 7.
- Dewi, I.K., Joharman dan L.Y. Budiarti. 2013. Perbandingan Daya Hambat Ekstrak Etanol dengan Sediaan Sirup Herbal Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L.) terhadap Pertumbuhan *Shigella dysenteriae* *in vitro*. *Berkala Kedokteran*. **9** (2): 191-198.
- Dwidjoseputro, D. 1994. Dasar - Dasar Mikrobiologi. Djambatan. Jakarta. 6 hlm.
- Dwiyanti, W., I. Muslimin dan G. Trimulyono. 2014. Pengaruh Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*) terhadap Pertumbuhan Bakteri *Bacillus cereus* secara *in vitro*. *LenteraBio*. **3** (1): 1-5.
- Duguid, J. P., B. P. Marmoni dan R. H. A. Swain. 1978. Medikal Microbiology. Churchill Livingstone. *Edinburgh*. 666 hlm.
- Felix, F., T.T. Nugroho, S. Silalahi dan Y. Octavia. 2011. Skrining Bakteri *Vibrio* sp Asli Indonesia Sebagai Penyebab Penyakit Udang Berbasis Teknik 16s Ribosomal DNA. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. **3** (2): 85-99.
- Garrity, G.M., J.A. Bell, and T.G. Lilburn. 2004. Taxonomic Outline of The Prokaryotes Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Bergey's Manual Trust. pp 401.
- Ghufran, H. M. dan Kordi K. 2005. Budidaya Ikan Laut di Karamba Jaring Apung. Rineka Cipta : Jakarta. 206 hlm.
- Hamdi, A. S. dan E. Bahrudin. 2014. Metode Penelitian Kuantitatif Aplikasi dalam Pendidikan. Deepublish. Yogyakarta. 171 hlm.
- Hatmanti, A. 2003. Penyakit Bakterial Pada Budidaya Krustasea serta Cara Penanganannya. *Oseana*. **28** (3): 1-10.

- Hariana, A. 2013. Tumbuhan Obat dan Khasiatnya. Penebar Swadaya. Jakarta. 411 hlm.
- Harmita dan M. Radji. 2008. Buku Ajar Analisis Hayati. Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 167 hlm.
- Hartanto, R. 2003. Modul Metodologi Penelitian. Universitas Diponegoro. Semarang. 24 hlm.
- Hidayat, R.S., Rodame, R.M. Napitupulu. 2015. Kitab Tumbuhan Obat. Penebar Swadaya. Jakarta. 416 hlm.
- Hidayat, S., S. Wahyuni dan S. Andaluxia. 2008. Seri Tumbuhan Obat Berpotensi Hias. Media Komputindo. Jakarta. 251 hlm.
- Indriani, N. 2007. Aktivitas Antibakteri Daun Senggugu (*Clerodendrom serratum* L. Spr.). *Skripsi*. FMIPA Institut Pertanian Bogor. 38 hlm.
- Inneke, F.M., Rumengan, N.D Rumampuk, J. Rimper dan F. Losung. 2014. Produksi dan Uji Aktivitas Antimikroba Senyawa Bioaktif yang Diekstrak dari Rotifer (*Brachionus rotundiformis*) Strain Lokal. *Jurnal LPPM Bidang Sain dan Teknologi*. **1** (1): 1-15.
- Jawetz, E., J. L Melnick, E. A. Adelberg. 1992. Mikrobiologi Untuk Profesi Kesehatan. Terjemahan Oleh G. Bonang. 1986. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 846 hlm.
- Katno., S. Haryanti dan A. Triyono. 2009. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Sembung (*Blumea balsamifera*(L.) DC.) terhadap Pertumbuhan Mikroba *E. coli*, *S. aureus* dan *C. albicans*. *Jurnal Tanaman Obat Tradisional*. **2** (1): 33 – 36.
- Karimy, M.F., H. Julendra., S.N Hayati, A. Sofyan, E. Damayanti dan D. Priyowidodo. 2013. Efektifitas Ekstrak Daun Kenikir (*Cosmos caudatus*), Daun Mengkudu (*Morinda citrifolia*), dan Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) dalam Sediaan Granul Larut Air sebagai Koksidiostat Alami. *JITV*. **18** (2): 88-98.
- Kerthyasa, T.G. dan I. Yuliani. 2013. Sehat Holistik Secara Alami. Pustaka. Jakarta. 631 hlm.
- Kismiyati, Subekti, Sri., Yusuf, R. Wahid Nur dan Kusdarwati, Rhayu. 2009. Isolasi identifikasi bakteri Geam negatif pada luka ikan mas koki (*Carassius auratus*) Akibat infeksi ektoparasit Argulus sp . Jurnal ilmiah perikanan dan kelautan. **1** (2). 129-134.
- Kusmiyati dan N.W.S. Agustini. 2007. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. *Jurnal Biodiversitas*. **8** (1): 48-53.
- Mania, S. 2008. Observasi Sebagai Alat Evaluasi Dalam Dunia Pendidikan Dan Pengajaran. *Lentera Pendidikan*. **11** (2): 220-233.

- Mohamed, N., S.G.S. Khee., A.N. Shuid., N. Muhammad., F. Suhaimi., F. Othman., A.S. Babji and I.N. Soelaiman. 2012. The Effects of *Cosmos caudatus* on Structural Bone Histomorphometry in Ovariectomized Rats. *Hindawi Publishing Corporation*. pp. 6.
- Mulyadi, M., Wuryanti., P. Ria. 2013. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang – Alang (*Imperata cylindrica*) dalam Etanol melalui Metode Difusi Cakram. *Jurnal Chem Info*. 1(1):35-42.
- Mutschler, E. 1991. *Dinamika Obat*. Buku Ajar Farmakologi dan Toksikologi. ITB. Bandung. 205 hlm.
- Pelczar, M.J. dan E.C.S Chan. 2008. *Dasar-dasar Mikrobiologi*. Uji Press. Jakarta. 443 hlm.
- Prajitno, A. 2007. *Penyakit Ikan – Udang: Bakteri*. UM Press. Malang. 115 hlm.
- _____. 2005. *Diktat Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan*. Fakultas Perikanan Universitas Brawijaya. Malang. 104 hlm.
- Purwanto, Sigit. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Fraksi Aktif Ekstrak Daun Senggani (*Melastoma matabathricum* L.) terhadap *Escherichia coli*. *Jurnal Keperawatan Sriwijaya*. 2 (2):1-9.
- Putri, D.N. 2014. Uji Aktifitas Antimikroba Ekstrak Metanol Daun Kenikir (*Cosmos caudatus* Kunth.) terhadap Bakteri *Salmonella typhi*. Fakultas Sains dan Teknologi, Universitas Islam Negeri Maulana Malik Ibrahim. Malang. 17 hlm.
- Rahayu, P. 2013. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Buah Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) terhadap Pertumbuhan *Candida albicans*. *Skripsi*. Fakultas Kedokteran Gigi Universitas Hasanuddin. 45 hlm.
- Rajab, W. 2008. *Buku Ajar Epidemiologi Untuk Mahasiswa Kebidanan*. Penerbit Buku Kedokteran EGC. Jakarta. 163 hlm.
- Sastrosupadi, A. 2000. *Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi*. Kanisius. Yogyakarta. 53 hlm.
- Sharifuldin, M.B.M.A. 2014. *Profiling And Quantification Of Cosmos Caudatus Kunth And Centella Asiatica Linn. And in Vvtro Anti Cancer Activity Of Cosmos Caudatus*. Thesis. 148 hlm.
- Sudirman, T. A. 2014. Uji Efektivitas Ekstrak Daun Salam (*Eugenia polyantha*) terhadap Pertumbuhan *Staphylococcus aureus* Secara *in vitro*. *Skripsi*. FKG Universitas Hasanuddin. Makassar. 66 hlm.
- Sudjadi, B dan S. Laila. 2006. *Biologi Sains dalam Kehidupan*. Yudhistira. 139 hlm.
- Sugianti, B. 2005. *Pemanfaatan Tumbuhan Obat Tradisional dalam Pengendalian Penyakit Ikan*. Sekolah Pasca Sarjana Institut Pertanian Bogor. Bogor. 37 hlm.

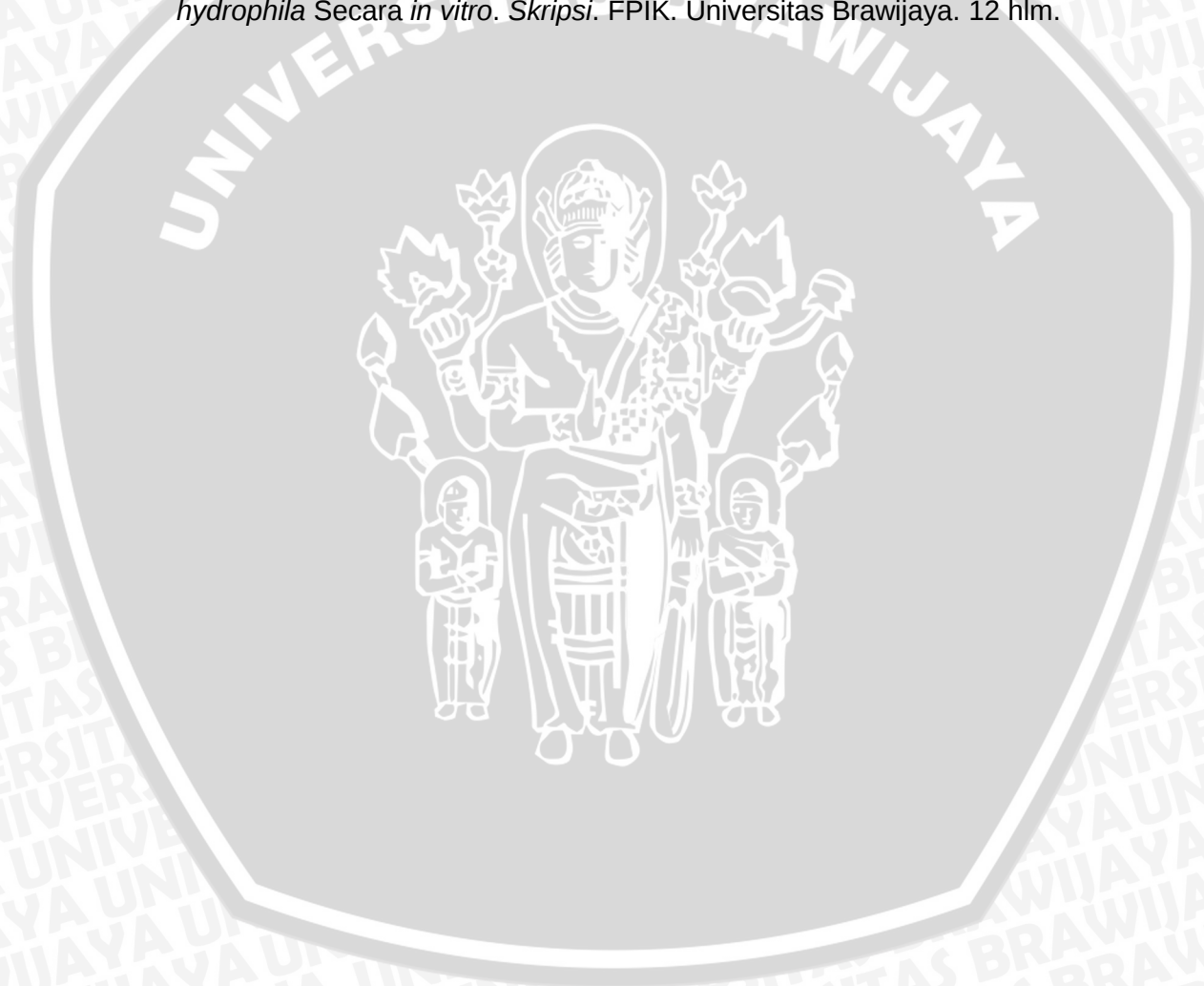
Sundari, I. 2010. *Identifikasi Senyawa dalam Etanol Biji Buah Merah (Pandanus conoideus Lamk.* Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. 67 hlm.

Tapehe, Y. 2015. *Statistika dan Rancangan Percobaan.* EGC. Jakarta. 144 hlm.

Trianto, A., E. Wibowo, Suryono dan R. Septa. 2004. Ekstrak Daun Mangrove *Aegiceras corniculatum* sebagai Antibakteri *Vibrio harveyi* dan *Vibrio parahaemolyticus*. *Jurnal Ilmu Kelautan.* **9** (4): 186-189.

Waluyo, L. 2009. *Mikrobiologi lingkungan.* UMM Press : Malang. 100 hlm.

Wasilah, N. 2015. Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Belimbing Wuluh (*Averrhoa bilimbi* L) terhadap Daya Hambat Bakteri *Aeromonas hydrophila* Secara *in vitro*. *Skripsi.* FPIK. Universitas Brawijaya. 12 hlm.



LAMPIRAN

Lampiran 1. Hasil Uji Biokimia Bakteri *V. harveyi*


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


KAN
 Laboratorium Pengujian
 123-301-1234

LAPORAN HASIL UJI

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

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

Lab. Mikrobiologi BBPAP Jepara
 Polyelia

 Sri Murti Astuti, SP.


Lampiran 2. Alat dan Bahan Penelitian



Cawan Petri



Autoclave



Inkubator



Oven



Autoclave Destruksi



Rak Tabung

Lampiran 2. (Lanjutan)



Lemari Pendingin Penyimpanan Bakteri



Lemari Pendingin Penyimpanan Bahan



Timbangan Analitik



Timbangan Digital



Laminary Air Flow



Hot Plate

Lampiran 2. (Lanjutan)



Vortex Mixer



Micropipet dan Blue



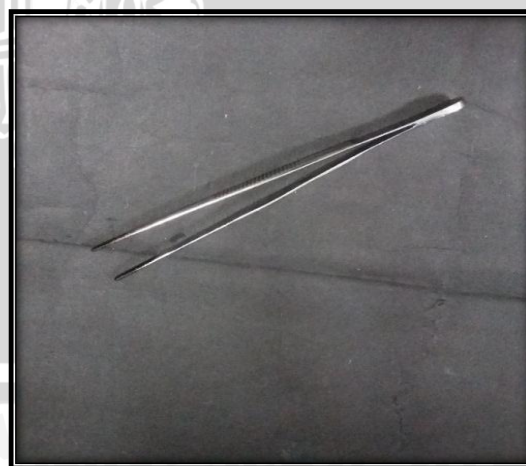
Bunsen dan Korek Api



Aluminium Foil dan Plastik Wrap



Erlenmeyer

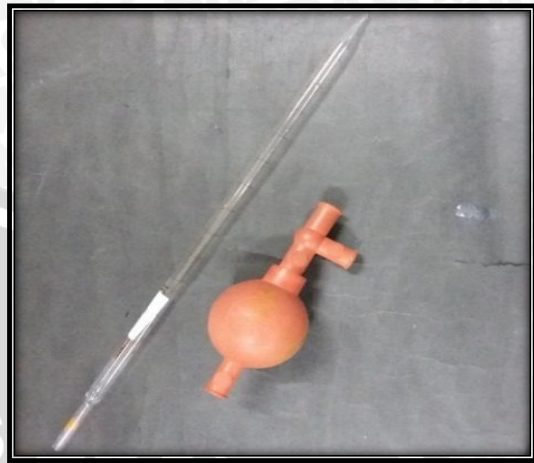


Pinset

Lampiran 2. (Lanjutan)



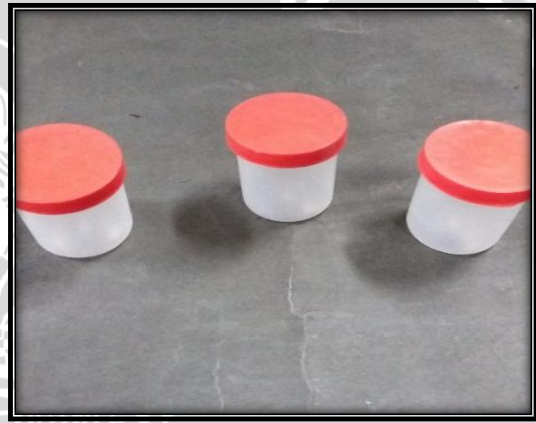
Corong Kaca



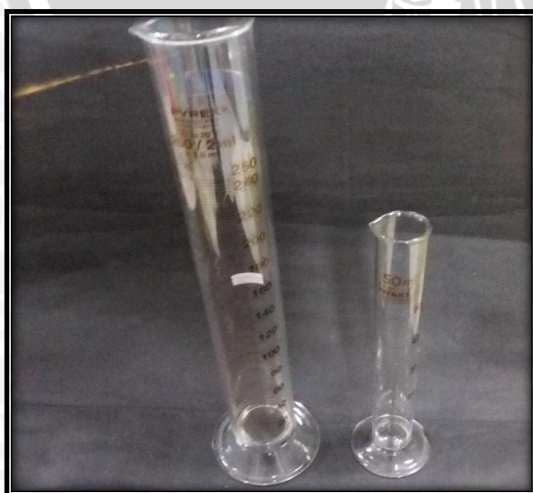
Pipet Volume dan Bola



Rotary Evaporator



Botol film



Gelas Ukur



Toples Kaca

Lampiran 2. (Lanjutan)



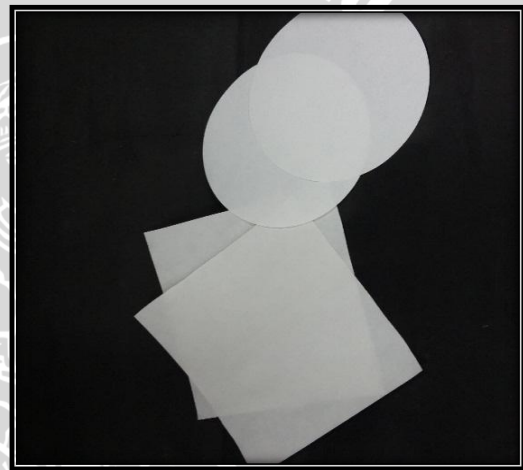
Nampan



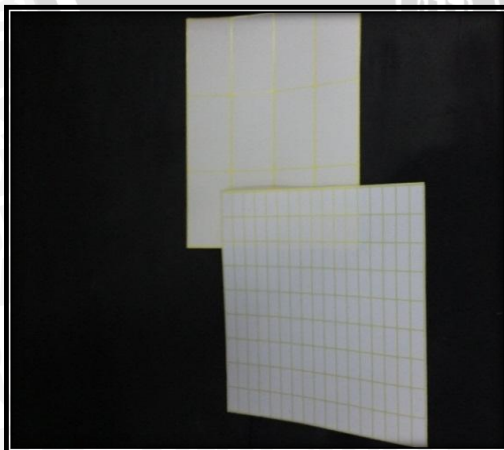
Botol Sprayer



Gunting dan Cutter



Kertas Saring

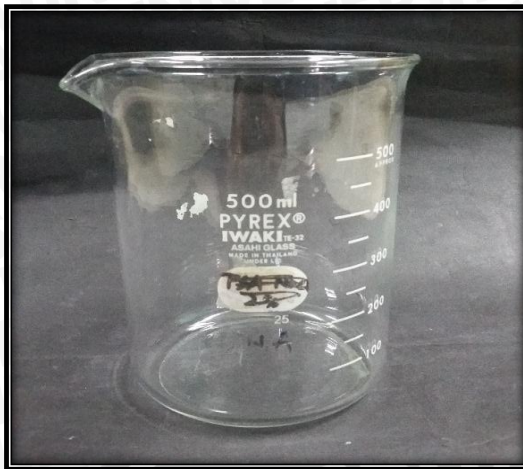


Kertas Label



Benang Kasur

Lampiran 2. (Lanjutan)



Beaker Glass



Sendok Media



Spatula



Triangle



Tabung Reaksi



Jangka Sorong Digital

Lampiran 2. (Lanjutan)



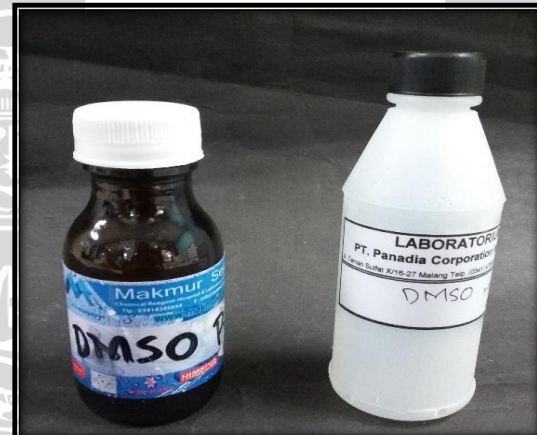
Kapas



Tissue



Alkohol 70% dan Ethanol



DMSO 10%



Kertas Cakram Diameter 6



Aquades Hydrobatt

Lampiran 2. (Lanjutan)



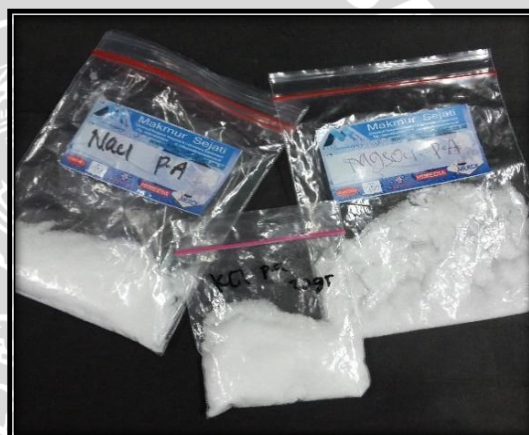
TCBSA



TSB



TSA



NaCl, KCl dan $MgSO_4$



Isolat Murni Bakteri *V. harveyi*

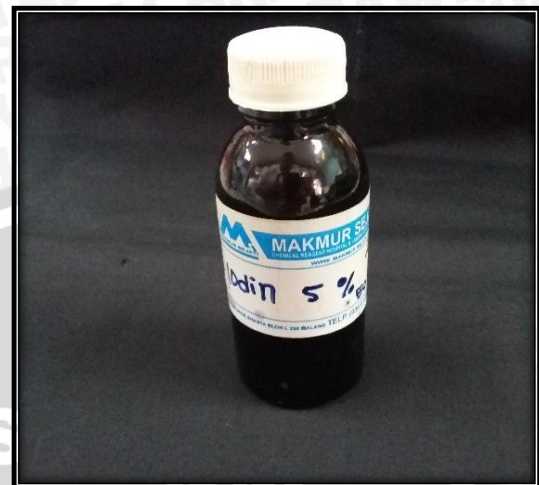


Ekstrak Daun Kenikir (*C. caudatus*)

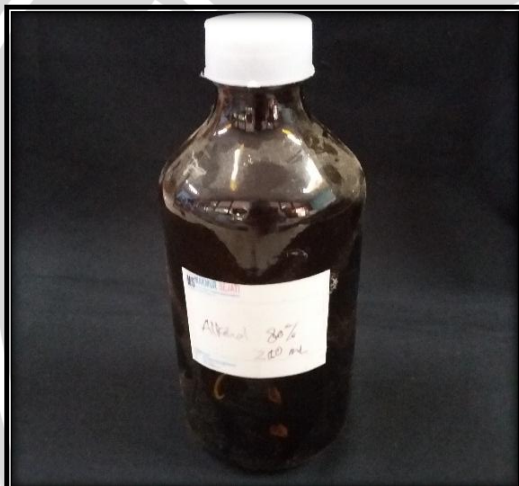
Lampiran 2. (Lanjutan)



Kristal violet



Iodin 5%



Alkohol 80%



Safranin



Pipet tetes

Lampiran 3. Pembuatan Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*)



Disiapkan tanaman
Kenikir



Daun dikeringkan



Diberi Ethanol 90%



Dihaluskan daun kenikir hingga
menjadi bubuk



Dilakukan maserasi selama 3
X 24 jam



Disaring hasil maserasi

Lampiran 3. (Lanjutan)



Dilakukan evaporasi



Dihasilkan ekstrak daun kenikir (*C. caudatus*)



Lampiran 4. Analisis Data Pengaruh Daya Antibakteri Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*) terhadap Diameter Hambatan (mm) Bakteri *V. harveyi* Secara *in vitro*

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

Perlakuan	Ulangan			Total (mm)	Rata - rata (mm)	Stadar deviasai
	1	2	3			
A (10 ppt)	1,34	2,66	1,90	5,9	1,97	± 0,66
B (20 ppt)	2,85	4,57	3,49	10,91	3,64	± 0,87
C (30 ppt)	4,02	3,35	3,68	11,05	3,68	± 0,34
D (40 ppt)	4,20	4,22	4,28	12,7	4,23	± 0,04
E (50 ppm)	4,35	4,91	4,56	13,82	4,6	± 0,28
Total				54,38		

Perhitungan:

$$\begin{aligned}
 1. \text{ Faktor Koreksi (FK)} &= \frac{G^2}{N} \\
 &= \frac{54,38^2}{15} \\
 &= 197,15
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 2. \text{ Jumlah Kuadrat (Total)} &= \sum_{xij}^2 - FK \\
 &= (A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + E3^2) - FK \\
 &= (1,34^2 + 2,66^2 + 1,90^2 + \dots + 4,56^2) - FK \\
 &= 15,03
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 3. \text{ Jumlah Kuadrat (Perlakuan)} &= \frac{\sum (\sum X_i)^2}{r} - FK \\
 &= \frac{TA^2 + TB^2 + TC^2 + TD^2 + TE^2}{r} - FK \\
 &= \frac{5,9^2 + 10,91^2 + 11,05^2 + 12,7^2 + 13,82^2}{3} - 197,15 \\
 &= \frac{34,81 + 119,0281 + 190,9924 + \dots}{3} - 197,15 \\
 &= 12,25
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 4. \text{ JK galat} &= \text{JK Perlakuan} - \text{JK Total} \\
 &= 15,03 - 12,25 \\
 &= 2,78
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 5. \text{ db Total} &= (n \times r) - 1 \\
 &= (5 \times 3) - 1 \\
 &= 14
 \end{aligned}$$

Lampiran 4. (Lanjutan)

6. db Perlakuan = $n - 1$
 = $5 - 1$
 = 4
7. db Galat = db Total – db Perlakuan
 = $14 - 4$
 = 10

- Tabel Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F _{hitung}	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	12,25	3,06	10,93**	3,48	5,99
Acak	10	2,78	0,28			
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)

$$SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ Acak}}{\pi (\text{Ulangan})}} = \sqrt{\frac{2 \times (0,28)}{3}} = 0,43$$

$$\text{BNT 5\%} = T \text{ tabel 5\% (db acak)} \times SED = 0,98$$

$$\text{BNT 1\%} = T \text{ tabel 1\% (db acak)} \times SED = 1,36$$

- Tabel Uji BNT (Beda Nyata Terkecil)

Rata – rata Perlakuan	A (1,97)	B (3,64)	C (3,68)	D (4,23)	E (4,6)	Notasi
A (1,97)	-	-	-	-	-	A
B (3,64)	1,67 **	-	-	-	-	B
C (3,68)	1,71 **	0,04 ^{ns}	-	-	-	B
D (4,23)	2,26 **	0,59 ^{ns}	0,55 ^{ns}	-	-	B
E (4,6)	2,63 **	0,96 ^{ns}	0,92 ^{ns}	0,37 ^{ns}	-	B

Keterangan :

(ns) non signifikan

(*) Berbeda nyata

(**) Berbeda sangat nyata

Lampiran 4. (Lanjutan)

- Tabel Uji Polinomial Orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)			
		Linier	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	5,9	-2	2	-1	1
B	10,91	-1	-1	2	-4
C	11,05	0	-2	0	6
D	12,7	1	-1	-2	-4
E	13,82	2	2	1	1
$Q = \sum C_i \cdot T_i$		17,63	-6,27	4,34	-8,42
Hasil Kuadrat		10	14	10	70
$Kr = (\sum C_i^2) \cdot r$		30	42	30	210
$JK = Q^2 / Kr$		10,36056	0,936021	0,627853	0,337602

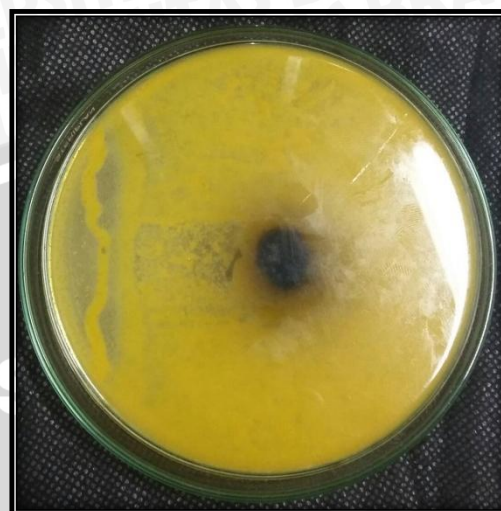
- Tabel Sidik Ragam Regresi

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F _{hitung}	F 5%	F 1%
1. Perlakuan	4	12,26204			3,48	5,99
Linier	1	10,36056	10,36056	37,304	**	
Kuadratik	1	0,936021	0,936021	3,370216	ns	
Kubik	1	0,627853	0,627853	2,260634	ns	
Kuartik	1	0,337602	0,337602	1,215561	ns	
2. Acak	10	2,7773	0,277733			
Total	14					

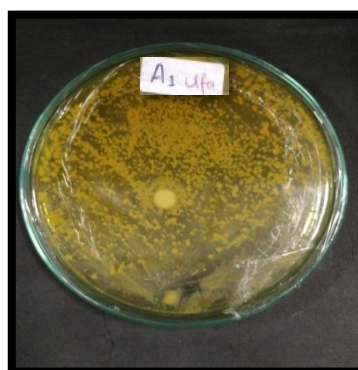
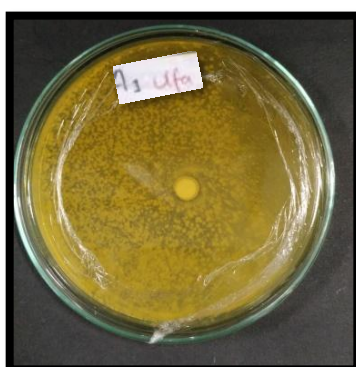
Lampiran 5. Hasil Uji Cakram Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Daun Kenikir (*C. caudatus*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *V. harveyi*



Perlakuan K (-)

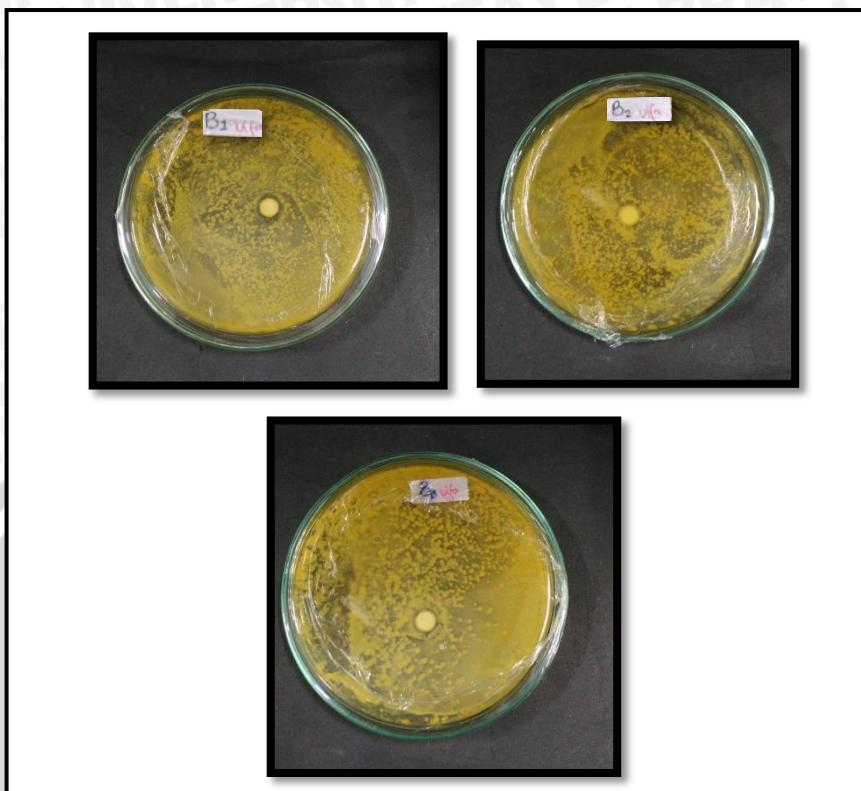


Perlakuan K (+) 100%

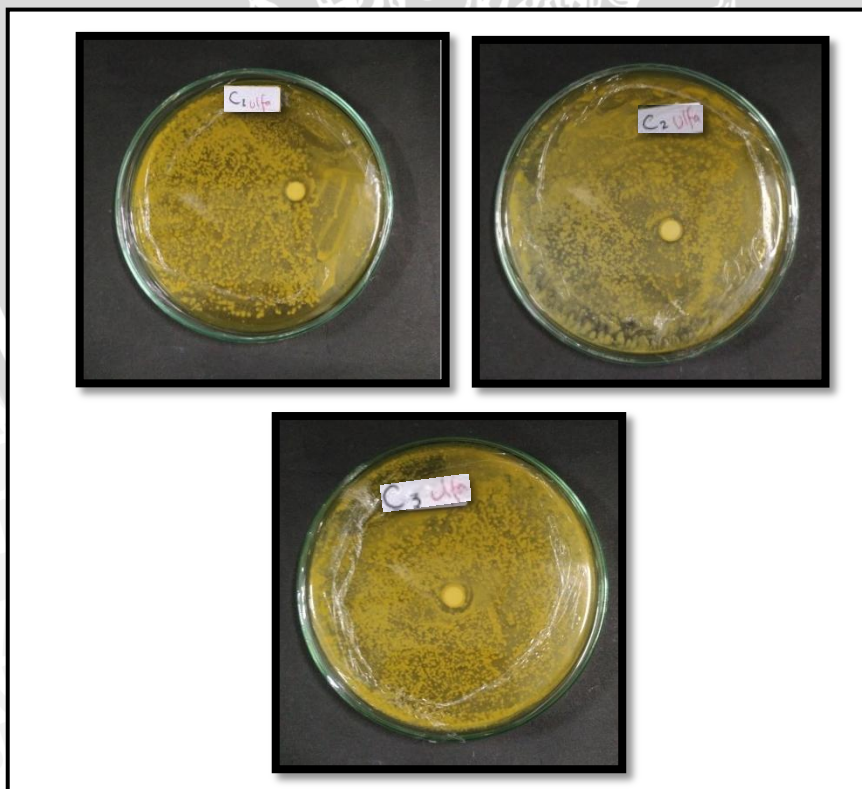


Perlakuan A1, A2, A3 (10 ppt)

Lampiran 5. (Lanjutan)

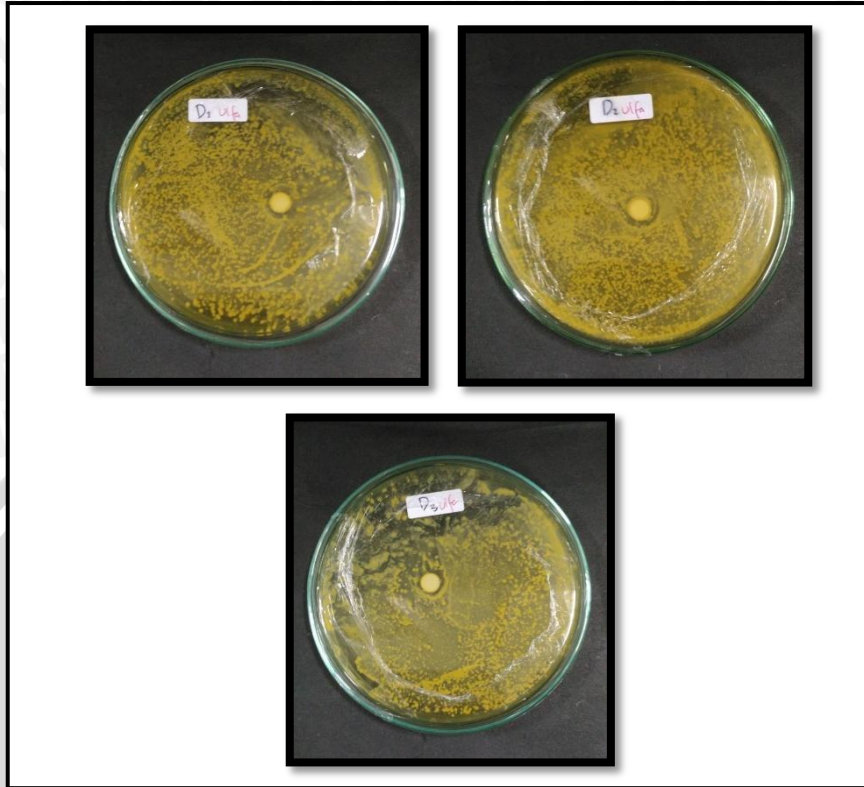


Perlakuan B1, B2, B3 (20 ppt)

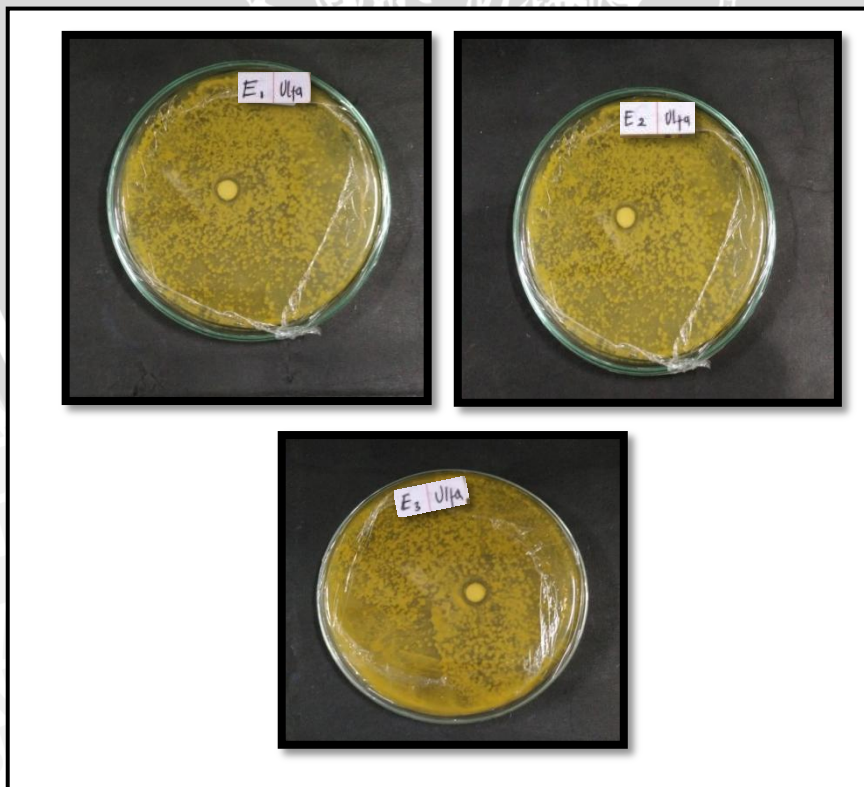


Perlakuan C1, C2, C3 (30 ppt)

Lampiran 5. (Lanjutan)



Perlakuan D1, D2, D3 (40 ppt)



Perlakuan E1, E2, E3 (50 ppt)