

**UJI SENSITIVITAS EKSTRAK KASAR BIJI PETAI (*Parkia speciosa*)
TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO**

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

Oleh:
NIKZHA ANIS MAHAROTIN
NIM. 125080507111002



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

2016

**UJI SENSITIVITAS EKSTRAK KASAR BIJI PETAI (*Parkia speciosa*)
TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* 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:

NIKZHA ANIS MAHAROTIN

NIM. 125080507111002



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2016

SKRIPSI

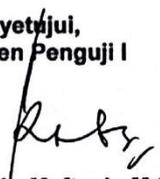
UJI SENSITIVITAS EKSTRAK KASAR BIJI PETAI (*Parkia speciosa*)
TERHADAP BAKTERI *Pseudomonas fluorescens* SECARA IN VITRO

Oleh :

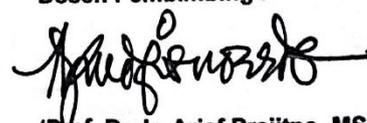
NIKZHA ANIS MAHAROTIN
NIM. 125080507111002

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 1 Juni 2016
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

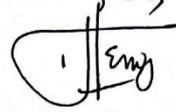
Menyetujui,
Dosen Penguji I


(Dr. Ir. Maftuch, M.Si)
NIP. 19660825 199203 1 001
Tanggal : 15 JUN 2016

Menyetujui,
Dosen Pembimbing I


(Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS)
NIP. 19550213 198403 1 001
Tanggal : 15 JUN 2016

Dosen Penguji II


(Ir. Heny Suprastyani, MS)
NIP. 19620904 198701 2 001
Tanggal : 15 JUN 2016

Dosen Pembimbing II


(Ir. Ellana Sapoesi, MP)
NIP. 19630924 199803 2 002
Tanggal : 15 JUN 2016



Mengetahui,
Ketua Jurusan
(Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS)
NIP. 19620805 198603 2 001
Tanggal : 15 JUN 2016



PERNYATAAN ORISINALITAS

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 tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Apabila kemudian hari terbukti atau dapat dibuktikan skripsi ini hasil jiplakan, maka saya bersedia menerima sanksi atas perbuatan tersebut.

Malang, Juni 2016

Mahasiswa

Nikzha Anis Maharotin



UCAPAN TERIMAKASIH

Syukur alhamdulillah penulis ucapkan ke hadirat Allah SWT, karena atas limpahan rahmat serta karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan laporan skripsi dengan baik dan tepat waktu tanpa ada halangan yang berarti. Penulis juga menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar - besarnya kepada :

1. Ibu dan Bapak yang senantiasa memberikan motivasi, doa dan dukungan demi kelancaran penyelesaian laporan skripsi ini dari awal hingga akhir.
2. Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS selaku Dosen Pembimbing I, dan Ir. Ellana Sanoesi, MP, selaku Dosen Pembimbing II yang senantiasa memberikan bimbingan dan masukan selama penelitian hingga penyusunan laporan skripsi ini selesai.
3. Dr. Ir. Maftuch, M.Si selaku Dosen Penguji I, dan Ir. Heny Suprastyani, MS, selaku Dosen Penguji II, karena atas arahan dan bimbingan yang diberikan kepada penulis.
4. Terima kasih juga saya ucapkan kepada ibu Titin Yuniastutik selaku laboran Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan yang selalu membimbing kami mulai dari kami belum mengerti tentang alat dan bahan selama penelitian serta cara pengerjaannya hingga kami dapat menyelesaikan penelitian kami dengan sukses.
5. Teman – teman seperjuangan yaitu Tim Penyakit Ikan 2012 karena selalu memberikan bantuan dari awal hingga akhir penelitian.

RINGKASAN

NIKZHA ANIS MAHAROTIN. Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Biji Petai (*Parkia speciosa*) Terhadap Bakteri *Pseudomonas fluorescens* Secara *In Vitro*. Di bawah bimbingan **Prof. Dr. Ir. Arief Prajitno, MS** dan **Ir. Ellana Sanoesi, MP**

Kegiatan budidaya perikanan merupakan usaha manusia untuk mengelola beberapa faktor diantaranya adalah faktor budidaya, pengelolaan hama dan penyakit organisme, serta dapat memproduksi organisme yang dibudidayakan. Namun faktor yang menjadi penyebab utama gagalnya kegiatan budidaya adalah faktor penyakit yang disebabkan oleh bakteri *P. fluorescens*. Bakteri ini menyerang ikan air tawar yang menyebabkan luka atau borok pada tubuh ikan. Serangan bakteri ini dapat diatasi dengan penggunaan antibiotik namun dalam jangka panjang dapat menimbulkan dampak negatif yakni munculnya strain bakteri yang resisten terhadap antibiotik. Oleh karena itu, diperlukan bahan alami untuk mengatasi permasalahan tersebut salah satunya menggunakan biji petai (*P. speciosa*). Biji petai mengandung senyawa alkaloid, terpenoid dan flavonoid yang memiliki aktivitas antibakteri.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya Malang, pada 18 Januari - 16 Maret 2016. Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *P. fluorescens*.

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu menguji hubungan sebab dengan akibat yang dilakukan dalam suatu sistem tertutup dengan kondisi terkontrol. Rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan menggunakan 5 dosis perlakuan ekstrak kasar biji petai yaitu, perlakuan (A) 12,5 ppt ; (B) 25 ppt ; (C) 37,5 ppt ; (D) 50 ppt dan (E) 62,5 ppt. Masing - masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak kasar biji petai memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap zona hambat bakteri *P. fluorescens*. Berdasarkan penelitian yang dilakukan, zona hambat terbesar terdapat pada perlakuan E (62,5 ppt) sebesar 14,09 mm. Hubungan antara perbedaan dosis ekstrak kasar biji petai terhadap diameter zona hambat bakteri *P. fluorescens* membentuk grafik secara linier dengan persamaan $y = 9,48 + 0,124x$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) = 0,908 dan nilai koefisien korelasi (r) 0,95.

Kesimpulan penelitian ini adalah uji daya hambat ekstrak kasar biji petai terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* menggunakan uji difusi kertas cakram berpengaruh sangat nyata dengan nilai diameter zona hambat 7,47 mm – 14,09 mm dan setelah pengamatan selama 48 jam ekstrak kasar biji petai bersifat bakteriosidal (membunuh pertumbuhan bakteri) terhadap *P. fluorescens*.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Allah SWT atas limpahan rahmat dan hidayah-Nya, sehingga laporan skripsi dengan judul “Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *P. fluorescens* Secara *In Vitro*” ini terselesaikan. Laporan ini disusun berdasarkan hasil penelitian yang telah dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada 18 Januari – 16 Maret 2016. Laporan skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan (S.Pi) pada Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Kelautan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari bahwa laporan skripsi ini masih belum sempurna, sehingga penulis mengharapkan kritik dan saran yang membangun demi perbaikan dan kesempurnaan laporan ini. Penulis berharap laporan skripsi ini dapat bermanfaat dan memberikan informasi yang berguna bagi pembaca.

Malang, Juni 2016

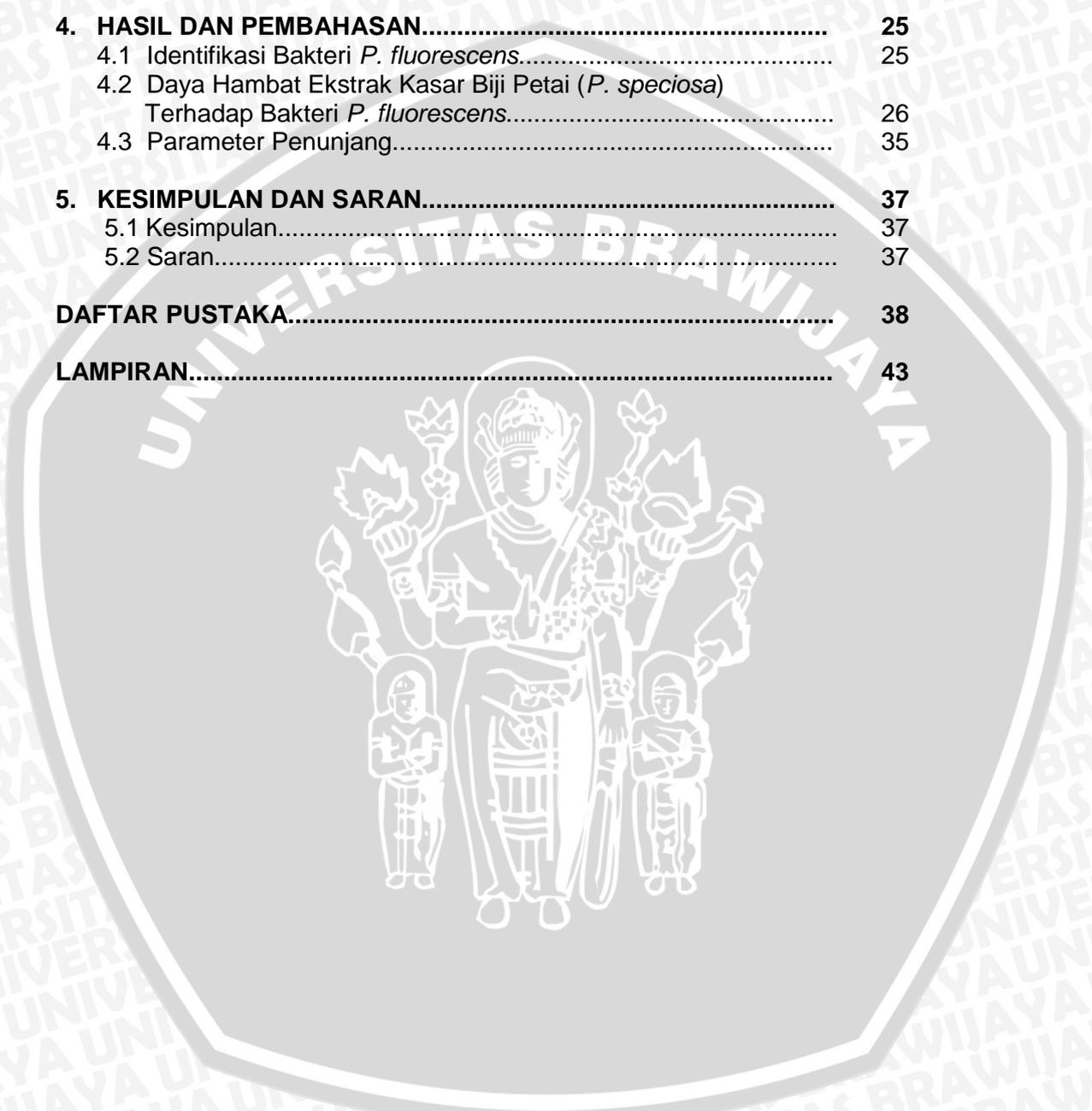
Penulis

DAFTAR ISI

Halaman

PERNYATAAN ORISINALITAS SKRIPSI	i
UCAPAN TERIMA KASIH	ii
RINGKASAN	iii
KATA PENGANTAR.....	iv
DAFTAR ISI.....	v
DAFTAR GAMBAR.....	vii
DAFTAR TABEL.....	viii
DAFTAR LAMPIRAN.....	ix
1. PENDAHULUAN.....	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah.....	3
1.3 Tujuan Penelitian.....	3
1.4 Manfaat Penelitian.....	3
1.5 Hipotesis.....	4
1.6 Waktu dan Tempat Penelitian.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA.....	5
2.1 Biologi Biji Petai (<i>Parkia speciosa</i>).....	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran.....	6
2.1.3 Bahan Aktif Biji Petai.....	7
2.1.4 Aktivitas Antimikroba.....	7
2.2 Biologi Bakteri <i>Pseudomonas fluorescens</i>	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi.....	8
2.2.2 Habitat dan Penyebaran.....	9
2.2.3 Pertumbuhan.....	10
2.2.4 Infeksi <i>P. fluorescens</i>	10
2.3 Uji Sensitivitas Antibakteri dengan Uji Cakram.....	11
3. METODOLOGI PENELITIAN.....	13
3.1 Materi Penelitian.....	13
3.1.1 Alat Penelitian.....	13
3.1.2 Bahan Penelitian.....	13
3.2 Metode Penelitian.....	13
3.3 Rancangan Penelitian.....	14
3.4 Prosedur Penelitian.....	15
3.4.1 Uji Pendahuluan Penentuan Dosis Biji Petai.....	15
3.4.2 Sterilisasi Alat dan Bahan.....	16
3.4.3 Sterilisasi Tempat Perlakuan.....	17

3.4.4	Pembuatan Ekstrak Kasar Biji Petai.....	17
3.4.5	Pembuatan Media.....	18
3.4.6	Pembiakan Bakteri <i>P. fluorescens</i>	20
3.5	Pelaksanaan Uji Cakram.....	21
3.6	Parameter Uji.....	23
3.7	Analisa Data.....	23
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN.....	25
4.1	Identifikasi Bakteri <i>P. fluorescens</i>	25
4.2	Daya Hambat Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Bakteri <i>P. fluorescens</i>	26
4.3	Parameter Penunjang.....	35
5.	KESIMPULAN DAN SARAN.....	37
5.1	Kesimpulan.....	37
5.2	Saran.....	37
	DAFTAR PUSTAKA.....	38
	LAMPIRAN.....	43

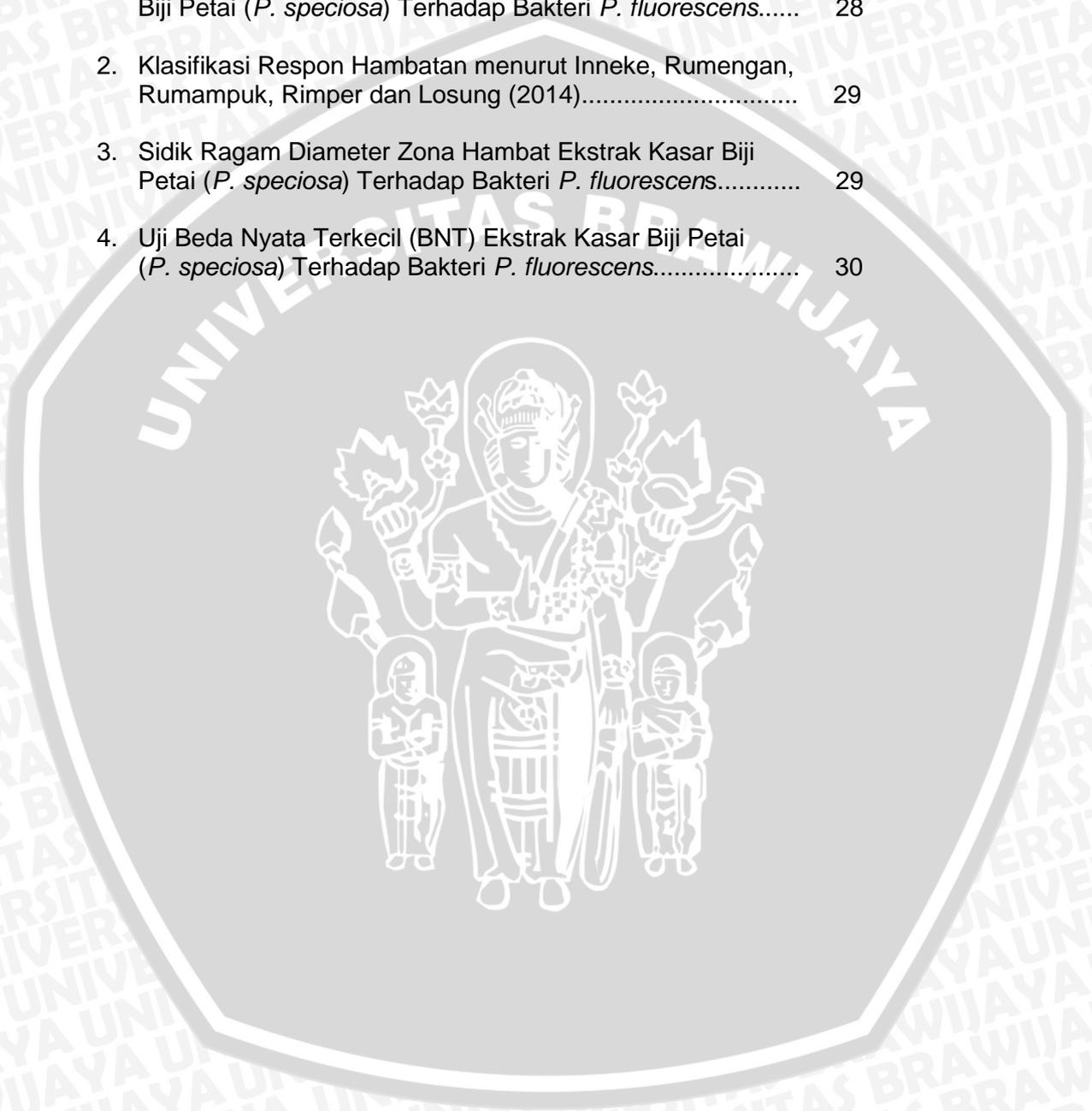


DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Biji Petai (<i>Parkia speciosa</i>).....	6
2. Bakteri <i>P. fluorescens</i>	9
3. Denah Penelitian Uji Cakram.....	15
4. Hasil uji pewarnaan gram bakteri <i>P. fluorescens</i> dengan perbesaran 1000x.....	26
5. Hasil Zona Hambat Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Bakteri <i>P. fluorescens</i>).....	27
6. Grafik Hubungan Antara Dosis Ekstrak Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Diameter Zona Hambat Bakteri <i>P. fluorescens</i>	31
7. Struktur Kimia Senyawa Flavonoid.....	33
8. Struktur Kimia Senyawa Saponin.....	34
9. Struktur Kimia Senyawa Tanin.....	35

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rata – Rata Zona Hambat Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Bakteri <i>P. fluorescens</i>	28
2. Klasifikasi Respon Hambatan menurut Inneke, Rumengan, Rumampuk, Rimper dan Losung (2014).....	29
3. Sidik Ragam Diameter Zona Hambat Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Bakteri <i>P. fluorescens</i>	29
4. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Bakteri <i>P. fluorescens</i>	30



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Dokumentasi Alat dan Bahan Penelitian.....	43
2. Dokumentasi Kegiatan Penelitian.....	48
3. Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) pada Uji Difusi Kertas Cakram.....	49
4. Laporan Hasil Uji Biokimia.....	50
5. Hasil Uji Cakram Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) Terhadap Daya Hambat Bakteri <i>P. fluorescens</i> Pada Lima Perlakuan Dengan Tiga Ulangan.....	51
6. Analisa Data Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Biji Petai (<i>P. speciosa</i>) terhadap Bakteri <i>P. fluorescens</i> secara <i>In Vitro</i>	54



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Kegiatan budidaya perikanan merupakan usaha manusia untuk mengelola beberapa faktor. Faktor - faktor tersebut diantaranya adalah faktor budidaya, pengelolaan hama dan penyakit organisme, serta dapat memproduksi organisme yang dibudidayakan (Reksono, Hamdani dan Yuniarti, 2012). Salah satu penyebab utama gagalnya kegiatan budidaya adalah faktor penyakit. Berdasarkan penyebabnya, penyakit ikan dapat dikelompokkan menjadi penyakit mikrobial dan *non*-mikrobial. Penyakit mikrobial disebabkan oleh jenis mikroba patogen atau parasit salah satunya adalah bakteri (Afrianto, Liviawaty, Jamaris dan Hendi, 2015).

Menurut Dwidjoseputro (1985), dalam bahasa Yunani, bakteri berasal dari kata “bakterion” yang artinya tongkat atau batang. Dari hal tersebut, “bakterion” digunakan untuk mengartikan sekelompok mikroorganisme yang bersel satu, tidak berklorofil (meskipun ada pengecualiannya), berkembang biak dengan membelah diri, dan berbentuk sangat minimalis (kecil) sehingga hanya dapat dilihat dengan menggunakan alat bantu mikroskop.

Salah satu bakteri yang dapat menyebabkan penyakit dalam budidaya ialah bakteri *P. fluorescens*. *P. fluorescens* merupakan spesies bakteri yang banyak ditemukan pada air tawar (Darak dan Barde, 2015). Bakteri ini menyebabkan penyakit *septicemia* dan *ulcer* terlebih pada kondisi ikan yang sedang stres. Gejalanya adalah munculnya borok atau luka terbuka pada tubuh ikan yang menyebabkan ikan menjadi sangat lemah (Afrianto *et al.*, 2015).

Untuk mengatasi terjadinya penyakit akibat infeksi bakteri sebagian besar pembudidaya ikan di Indonesia menggunakan antibiotik dan obat - obatan. Tingkat keberhasilan penggunaan antibiotik ini sangat bervariasi tergantung pada

lokasi dan waktu penggunaan. Penggunaan antibiotik secara terus - menerus yang tidak terkontrol dapat menyebabkan resistensi bakteri patogen terhadap bahan kimia tersebut (Hatmanti, Nuchsin dan Darmayati, 2008). Ditambahkan oleh Sumino, Supriyadi dan Wardiyanto (2013), penggunaan antibiotik dalam jangka panjang dalam budidaya skala besar kurang efisien, karena harganya yang mahal, sehingga diperlukan alternatif pengganti antibiotik sebagai pengobatan dan pencegahan penyakit yang efektif tetapi murah, tidak menyebabkan resisten terhadap bakteri dan ramah lingkungan salah satunya dengan menggunakan biji petai.

Menurut Mangoting, Irawan dan Abdullah (2006), petai mengandung senyawa kimia yaitu saponin, flavonoid, dan folifenol. Ditambahkan oleh Kamisah, Qodriyah, Jaarin dan Othman (2013), biji petai mengandung senyawa alkaloid, terpenoid dan flavonoid. Senyawa-senyawa tersebut diketahui memiliki aktivitas antibakteri.

Menurut Sunanto (1992), petai (*P. speciosa* Hassk.) termasuk dalam suku Mimosaceae yang berasal dari Malaysia. Tanaman ini berbentuk pohon, tingginya mencapai 5 - 25 m dan bercabang banyak serta kulit batang berwarna coklat kemerah - merahan. Daunnya menyirip ganda, bunganya ketika masih muda (belum tumbuh benang - benang sari dan putik - putiknya) berwarna hijau, keras dan berbentuk bonggol, bunga ini setelah dewasa penuh ditumbuhi oleh benang - benang sari dan putik - putik berwarna kuning sehingga ukurannya membesar dan empuk seperti spon, dalam bahasa Jawa disebut dengan "Pendul". Ditambahkan oleh Susilo (2012), bahwa petai bermanfaat sebagai obat sembelit atau sakit perut yang disebabkan oleh bakteri *Helicobacter pylori* (Ramayanthi, Prasetyo dan Garna, 2013).

Penelitian dengan menggunakan obat alami sebagai antibakteri bertujuan sebagai antibiotik yang lebih aman untuk lingkungan dibandingkan dengan obat

– obatan dari bahan kimia. Kelebihan obat alami yaitu aman bagi lingkungan, bersifat antibakteri, murah dan mudah untuk didapatkan. Penggunaan biji petai diharapkan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* sebagai patogen ikan air tawar karena petai mengandung senyawa kimia seperti flavonoid, saponin dan tanin.

1.2 Rumusan Masalah

P. fluorescens merupakan salah satu bakteri yang menimbulkan berbagai penyakit pada ikan air tawar. Penggunaan antibiotik serta obat – obat kimia untuk mengatasi hal tersebut dapat bersifat resisten terhadap bakteri serta dapat membahayakan lingkungan perairan biota budidaya. Oleh karena itu diperlukan suatu bahan alami sebagai pengganti antibiotik yang lebih aman bagi lingkungan perairan yaitu dengan menggunakan biji petai (*P. speciosa*). Menurut Pitojo dan Zumiaty (2006), biji petai mengandung senyawa kimia saponin, flavonoida dan polifenol yang bersifat antibakteri. Berdasarkan uraian di atas dapat dirumuskan permasalahan sebagai berikut:

- Bagaimanakah pengaruh pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) dengan uji cakram terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*.

1.4 Manfaat Penelitian

Manfaat penelitian ini adalah untuk membuktikan pengaruh pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro*.

1.5 Hipotesis

H_0 : Diduga pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) dengan dosis yang berbeda tidak berpengaruh terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.

H_1 : Diduga pemberian ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) dengan dosis yang berbeda berpengaruh terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*.

1.6 Waktu dan Tempat Penelitian

Penelitian ini dilaksanakan pada 18 Januari – 16 Maret 2016 di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Biji Petai (*P. speciosa* Hassk.)

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Susilo (2012), biji petai diklasifikasikan sebagai berikut :

Divisio : Magnoliophyta

Kelas : Magnoliopsida

Ordo : Fabales

Famili : Fabaceae

Genus : Parkia

Species : *P. speciosa* Hassk.

Menurut Pitojo dan Zumiati (2006), tanaman petai berbentuk pohon, berakar tunggang berwarna coklat, tingginya mencapai 15 meter. Batang berkayu, bulat, bercabang, berwarna coklat kemerahan. Daun majemuk, pangkalnya membulat, ujung daun runcing, panjang berkisar 20 cm dan lebar sekitar 3 cm, berwarna hijau, memiliki bunga majemuk berbentuk bonggol dan menggantung, dan kelopakinya bertaju (tidak kaku), memiliki benang sari berjumlah 10 dan pangkal mahkota melekat pada benang sari, tangkai sarinya memanjang, berbentuk ganda dan berwarna kuning, pangkal mahkota melekat berwarna putih kekuningan. Buah polong dan menggantung serta pada satu tangkai biasanya terdapat lebih dari satu polong. Ketika muda, buahnya berwarna hijau dan ketika sudah menua berwarna hitam serta pada biji memiliki tekstur tebal, pipih yang ketika muda berwarna hijau dan ketika sudah tua atau masak warnanya berubah menjadi kuning. Ditambahkan oleh Susilo (2012), tiap – tiap satu buah petai yang biasanya disebut sepapan petai (Gambar 1) mempunyai biji benih antara 12 - 18 biji.



Gambar 1. Biji Petai (*P. speciosa*) (Kamisah et al., 2013).

Di Jawa dikenal dua jenis tanaman petai yaitu petai jenis gajah dan petai jenis kacang. Dinamakan petai jenis gajah karena ukurannya cukup besar atau jumbo. Tanaman jenis ini menghasilkan buah petai pada setiap buahnya berisi sebanyak 15 - 18 biji yang panjangnya mencapai 25 - 30 cm. Sementara petai jenis kacang dapat menghasilkan buah petai yang setiap buahnya hanya mengandung 10 - 12 biji dan panjangnya hanya sekitar 20 cm. Ukuran bijinya lebih kecil jika dibandingkan dengan petai jenis gajah. Tanaman petai dapat tumbuh dengan baik di tempat – tempat yang terbuka atau tidak terlindungi pepohonan lain karena tanaman petai ini sangat membutuhkan sinar matahari sepanjang hari (Susilo, 2012).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Sunarjono (2013), tanaman pete tumbuh baik didataran rendah sampai dataran tinggi yaitu pada ketinggian sekitar 700 mdpl. Pete dapat tumbuh pada jenis tanah latosol sampai tanah berlempung yang mengandung kapur dengan pH tanah 5 - 6,5. Tanaman pete tumbuh baik didaerah yang beriklim basah sampai agak kering, namun tidak dapat tumbuh pada keadaan yang sangat kering kritis. Di daerah iklim basah, pohon pete sering dihinggapi lumut pada batangnya (*lichenes*) dan benalu. Di daerah iklim kering, tanaman ini sering diserang oleh penyakit busuk batang *Cortisum* sp., yang miseliumnya berwarna merah jambu sampai kemerahan.

Menurut Susilo (2012), di berbagai daerah di Indonesia, ternyata petai mempunyai nama - nama yang berlainan dalam penyebutannya. Adapun di daerah Ambon disebut dengan Pateh, di daerah Batak Karo disebut dengan Parira, di daerah Batak Toba disebut dengan Pelia, di daerah Lampung disebut dengan Petar, di Jawa Tengah dan Jawa Timur disebut dengan Pete. Namun, secara umum di Indonesia disebut dengan Petai. Secara konvensional (tradisional) sebagai indikator, tanaman petai dapat tumbuh dengan baik jika di daerah tersebut tumbuh pula tanaman cengkeh.

2.1.3 Bahan Aktif Biji Petai

Biji buah petai berbau menusuk yang mengandung *sistina* dan dilapisi kulit tipis berwarna keputih - putihan pada waktu masih muda, dan dilapisi kulit agak tebal serta berlendir berwarna kekuning - kuningan. Petai sering ditumbuhi cendawan berwarna putih ketika sudah menua. Biji buah petai mengandung mineral yang kaya akan kalori antara lain, energi sebanyak 142 kalori; protein sebanyak 10,4 mg; kalsium 95 mg; fosfor 115 mg; besi 1,2 mg; vitamin B1 sebanyak 0,17 mg; dan Vitamin C sebanyak 36 mg (Sunanto, 1992).

Menurut Kamisah *et al.*, (2013), biji petai diketahui mengandung senyawa alkaloid, terpenoid dan flavonoid. Senyawa - senyawa tersebut diketahui memiliki aktivitas antibakteri. Ditambahkan oleh Azizi, Salman, Norulain dan Omar (2010), bahwa biji petai dapat dimanfaatkan sebagai salah satu makanan matang atau mentah karena nilai gizi tinggi. Biji petai juga diketahui memiliki senyawa kimia penting yang membentuk *polysulfides* yang digunakan untuk pengobatan aktivitas antibakteri, ginjal, saluran kencing dan infeksi kandung kemih.

2.1.4 Aktivitas Antimikroba

Zat antimikroba adalah zat yang dapat mengganggu pertumbuhan atau metabolisme mikroba. Berdasarkan aktivitasnya, zat antimikroba dibedakan menjadi 2 jenis, yaitu yang memiliki aktivitas bakteriostatik atau menghambat

pertumbuhan bakteri dan yang memiliki aktivitas bakteriosidal atau membunuh bakteri. Aktivitas antimikroba ditandai dengan terbentuknya suatu zona bening atau zona hambat di sekitar kertas cakram (Saskiawan dan Hasanah, 2015).

Menurut Hasim, Faridah dan Kurniawati (2015), dalam metode skrining fitokimia secara kualitatif mendeteksi keberadaan senyawa fitokimia tertentu ada pada pete. Pada uji fitokimia menggunakan N-heksana, petai terbukti mengandung saponin, flavonoid, tanin, dan steroid. Sedangkan pada uji fitokimia menggunakan etil asetat, senyawa yang terkandung adalah alkaloid, saponin, flavonoid, tanin, dan triterpenoid, serta pada uji fitokimia menggunakan etanol 70%, senyawa yang terkandung adalah alkaloid, saponin, tanin, dan triterpenoid.

2.2 Biologi Bakteri *Pseudomonas fluorescens*

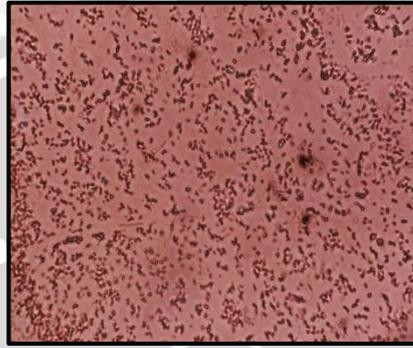
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi

Menurut Siegrist (2010), klasifikasi dan morfologi *P. fluorescens* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gamma Proteobacteria
Order	: Pseudomonadales
Family	: Pseudomonadaceae
Genus	: <i>Pseudomonas</i>
Species	: <i>P. fluorescens</i>

Bakteri *P. fluorescens* (Gambar 2) merupakan bakteri yang berbentuk batang dengan ukuran sel 0.5 – 1.0 x 1.5 – 5.0 µm, motil dengan satu atau lebih flagella, merupakan bakteri gram negatif, bersifat aerob, tidak membentuk spora dan katalase positif, menggunakan H₂ atau karbon sebagai sumber energinya, beberapa spesies bersifat patogen bagi tanaman, kebanyakan tidak dapat

tumbuh pada kondisi masam (pH 4.5) (Hamastuti, Elysa, Juliastuti dan Hendrianie, 2012). Ditambahkan oleh Pelczar dan Chan (1986), struktur dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks dan berlapis tiga, yaitu lapisan luar berupa lipoprotein, lapisan tengah yang berupa peptidoglikan dan lapisan dalam berupa lipopolisakarida.



Gambar 2. Bakteri *P. fluorescens* dengan perbesaran 1000x (Dokumentasi pribadi, 2016).

Menurut Arwiyanto, Maryudani dan Azizah (2007), koloni bakteri *P. fluorescens* berbentuk bulat, tepi rata, fluidal dan mengandung siderofor yaitu pigmen berwarna kuning yang berfungsi mengikat Fe. Pigmen warna kuning (*siderofor*) ini ada karena bakteri *P. fluorescens* berdifusi pada medium. Secara individu, bakteri berbentuk batang dengan ukuran 0,5 - 1,0 – 1,5 - 4,0 m.

2.2.2 Habitat dan Penyebaran

Menurut Moore, Tindall, Santos, Pieper, Ramos dan Palleroni (2006), *Pseudomonas* adalah genus organisme yang dapat ditemukan dimana - mana jika terdapat senyawa yang mengandung karbon (C). Mereka memanfaatkan senyawa tersebut sebagai sumber gizi dan kemampuan beradaptasi genetik serta untuk metabolisme. *Pseudomonas* berpotensi hidup pada kisaran suhu 4 - 42°C, dan pH antara 4 - 8.

P. fluorescens merupakan sebagian spesies mikroba tanah yang umumnya mendiami sekitar akar tanaman. Karena fleksibilitas gizi, bakteri ini secara luas digunakan dalam proses bioteknologi dan merupakan sistem model

yang penting untuk menggambarkan mekanisme molekuler. *P. fluorescens* dapat mengikat logam beracun seperti aluminium (Al), gallium (Ga), besi (Fe), dan kalsium (Ca) (Lemire, Auger, Bignucolo, Appanna dan Appanna, 2010).

2.2.3 Pertumbuhan

Menurut Arwiyanto *et al.* (2007), semua isolat *P. fluorescens* tumbuh baik pada kisaran pH antara 6 sampai 7 serta suhu antara 20°C - 41°C. Pada medium yang mengandung NaCl semua bakteri tumbuh sampai pada konsentrasi NaCl sebesar 2%.

Kurva pertumbuhan bakteri dibuat dengan tujuan untuk melihat fase - fase pertumbuhan dari masing - masing bakteri, yaitu fase lag, eksponensial, stasioner dan kematian. Pada beberapa bakteri tidak terlihat adanya fase lag karena pengukuran dilakukan satu jam sekali, sehingga perubahan yang terjadi dalam rentang waktu kurang dari satu jam tidak diketahui. Fase kematian juga tidak terlihat karena pembuatan kurva pertumbuhan dengan metode tidak langsung ini tidak dapat membedakan sel mati serta sel yang hidup, sehingga seolah - olah tidak ada fase kematian (Dwipayana dan Ariesyady, 2009).

2.2.4 Infeksi *P. fluorescens*

Menurut Afrianto *et al.* (2015), *P. fluorescens* adalah patogen ikan air tawar. Bakteri ini dapat menyebabkan penyakit pada beberapa ikan diantaranya adalah ikan *silver carp* (*H. molitrix*), *bighead* (*A. nobilis*), ikan mas (*C. auratus*), *tench* (*T. tinca*), *grass carp* (*C. idella*), dan *black carp* (*M. piceus*). Ciri khas bakteri ini adalah penyebab infeksi sekunder pada ikan, tetapi patogenitasnya lebih rendah. Bagian yang diserang umumnya sirip dan ekor yang dapat menyebabkan kematian massal, dimana terjadi lesi hemoragik pada kulit dan dasar sirip dan *hemoragi petechial* terlihat jelas pada insang, ginjal, hati, lumen dan submuka usus. Serangan penyakit ini akibat manajemen pemeliharaan yang

kurang baik, kekurangan oksigen, perubahan temperatur air yang drastis, dan kekurangan pakan.

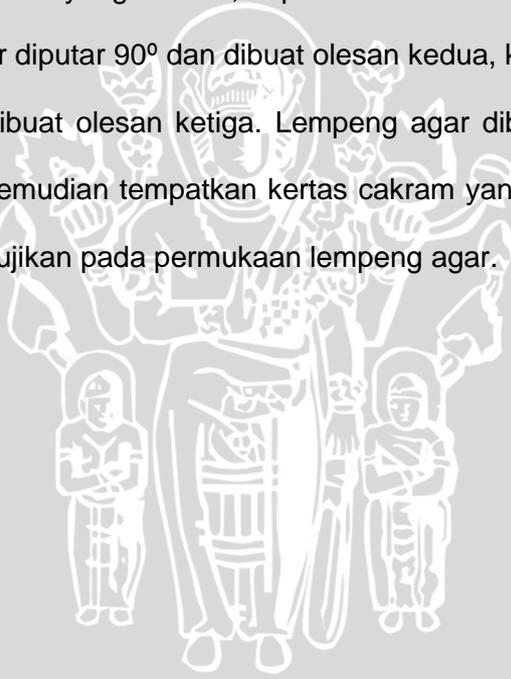
Menurut Lesmana dan Dermawan (2004), *Pseudomonas* sp. merupakan salah satu bakteri penyebab pendarahan pada kulit dan terdapat luka atau borok. Terkadang dapat menyebabkan perut ikan menjadi kembung yang disebut dengan dropsi. Biasanya serangan *Pseudomonas* diikuti dengan serangan virus jika ikan dalam keadaan rentan atau lemah akibat tidak diberi makan, pakan tidak cocok, suhu yang terlalu dingin, stress dan atau jika kondisi perairan tidak baik.

Menurut Attia, Mesalhy, Galil dan Fathi (2012), penyakit bakteri antara ikan disebabkan oleh berbagai patogen dan merupakan masalah ekonomi yang signifikan pada kegiatan akuakultur. *P. fluorescens* adalah patogen untuk berbagai jenis ikan termasuk *grass carp* (*C. idellus*), *black carp* (*M. piceus*), dan ikan nila (*O. niloticus*). Infeksi ikan oleh *P. fluorescens* akan membentuk penyakit yang disebut *Red Skin* yang ditandai dengan pendarahan, sisik terlepas, dan ulserasi pada sirip. Wabah penyakit ini sering timbul ketika terjadi kondisi stress.

2.3 Uji Sensitivitas Antibakteri dengan Uji Cakram

Aktivitas antimikroba diuji dengan menggunakan metode kertas cakram. Caranya adalah tempatkan kertas cakram dilapiskan atas media *Nutrient Agar* (NA) dan *Yeast Peptone Dekstrose* (YPD) pada cawan petri yang sudah diinokulasi dengan mikroba uji, kemudian kertas cakram ditetesi sampel sebanyak 20 μ L. Setelah itu, materi uji diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Zona hambat yang terbentuk menunjukkan aktivitas antimikroba dan diukur diameternya, dalam uji aktivitas antimikroba ini digunakan *kloram fenikol* sebagai kontrol positif bakteri, *nistatin* sebagai kontrol positif khamir dan akuades sebagai kontrol negatif (Saskiawan dan Hasanah, 2015).

Menurut Roihanah, Sukoso dan Andayani (2012), uji cakram yaitu pengujian antimikroba dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba dan dibandingkan dengan antibiotik *kanamycin*. Lempeng *Trypton Soya Agar* (TSA) ditandai dengan nama, tanggal dan mikroorganisme yang akan diuji. Kapas lidi (*cotton swab*) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji, dengan kepadatan $0,1 \text{ CFU.ml}^{-1}$, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut. Mikroorganisme kemudian disebar pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan. Untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian lempeng agar diputar 90° dan dibuat olesan kedua, kemudian lempeng agar diputar 45° dan dibuat olesan ketiga. Lempeng agar dibiarkan mengering kurang lebih 5 menit, kemudian tempatkan kertas cakram yang sudah direndam dengan sampel yang diujikan pada permukaan lempeng agar.



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Lampiran 1, meliputi *autoclave*, *blender*, botol film, cawan petri, erlenmeyer, *hot plate*, *Laminar Air Flow*, lemari pendingin, inkubator, toples kaca, tabung reaksi, rak tabung reaksi, gelas ukur, jarum *osse*, spatula, timbangan sartorius, *micropipet*, jangka sorong digital, bunsen, *rotary vacuum evaporator*, *vortex mixer*, nampan, gunting, corong, korek gas, *blue tip* dan pinset.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian disajikan pada Lampiran 1, meliputi biji petai (*P. speciosa*), bakteri *P. fluorescens*, alkohol 70%, etanol 96%, PSA (*Pseudomonas Selective Agar*), TSB (*Tryptic Soy Broth*), tali, *tissue*, kapas, DMSO 10%, kertas saring, aquades, *aluminium foil*, spiritus, kertas cakram ukuran 6 mm, kertas koran atau bekas dan kertas label.

3.2 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan pada penelitian ini yaitu dengan metode eksperimen. Menurut Setyanto (2005), metode eksperimen mengandung beberapa hal yaitu, suatu penelitian yang berusaha melihat hubungan sebab akibat dari satu atau lebih variabel independen dengan satu atau lebih variabel kontrol, peneliti melakukan manipulasi terhadap satu atau lebih variabel independen, manipulasi berarti merubah secara sistematis sifat (nilai - nilai) dan variabel bebas sesuai dengan tujuan penelitian. Kemudian mengelompokkan subyek penelitian (lazim disebut responden) kedalam kelompok eksperimen dan kelompok kontrol. Dalam desain klasik, kelompok eksperimen adalah kelompok

subyek yang akan dikenai perlakuan. Sedangkan yang dimaksud dengan perlakuan adalah mengenakan variabel bebas yang sudah dimanipulasi kepada kelompok eksperimen. Sedangkan kelompok kontrol adalah kelompok subyek yang tidak dikenai perlakuan, membandingkan kelompok eksperimen yang dikenai perlakuan dengan kelompok kontrol yang tidak dikenai perlakuan. Pengaruh hubungan sebab akibat antara variabel independen dengan variabel dependen diperoleh dari selisih skor observasi masing - masing kelompok tersebut.

3.3 Rancangan Penelitian

Menurut Sastrosupadi (2002), Rancangan Acak Lengkap (RAL) digunakan untuk percobaan yang mempunyai media atau tempat percobaan yang seragam sehingga kondisi lingkungan tempat penelitian dalam keadaan sama. RAL dirumuskan sebagai berikut :

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

Keterangan :

μ : nilai rerata harapan (*mean*)

τ : pengaruh faktor perlakuan

ε : pengaruh galat

Dalam penelitian secara *in vitro* ini, perlakuan yang diamati adalah pengaruh perbedaan pemberian dosis ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *P. fluorescens* pada cawan petri selama 24 jam dan 48 jam. Pengamatan dilakukan berdasarkan pengukuran besarnya zona hambat yang muncul pada medium agar padat dengan satuan milimeter (mm). Penelitian ini menggunakan lima perlakuan dengan tiga ulangan beserta kontrol positif dan kontrol negatif sebagai berikut :

K (+) : Perlakuan kontrol (+) dengan dosis ekstrak kasar biji petai 250 ppt.

K (-) : Perlakuan kontrol (-) dengan dosis ekstrak kasar biji petai 0 ppt.

A : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar biji petai 12,5 ppt.

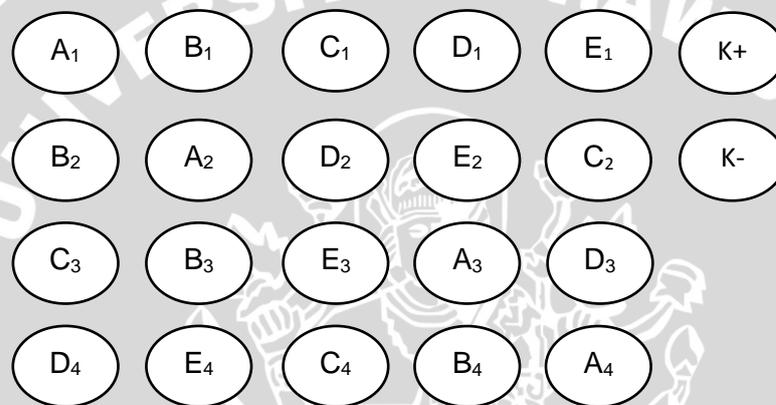
B : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar biji petai 25 ppt.

C : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar biji petai 37,5 ppt.

D : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar biji petai 50 ppt.

E : Perlakuan dengan dosis ekstrak kasar biji petai 62,5 ppt.

Denah penelitian uji cakram disajikan pada Gambar 3.



Gambar 3. Denah Penelitian Uji Cakram

Keterangan gambar :

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

A - E : Perlakuan

1 - 3 : Ulangan

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Uji Pendahuluan Penentuan Dosis Biji Petai

Uji pendahuluan pada kegiatan awal penelitian dilakukan dengan melakukan uji kertas cakram difusi pada media PSA yang sudah ditanam bakteri *P. fluorescens* dengan menggunakan ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) sebagai antibakteri. Dalam uji pendahuluan, dosis ekstrak kasar biji petai adalah 300 ppm, 400 ppm, 500 ppm, 600 ppm, 700 ppm, 800 ppm, 900 ppm dan 1000

ppm. Sedangkan kepadatan bakteri yang digunakan adalah 10^7 sel/ml, sesuai dengan larutan standar Mc. Farland. Hasil dari uji pendahuluan didapatkan bahwa dosis 500 ppm sudah menghambat bakteri *P. fluorescens*.

3.4.2 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 dengan menggunakan sabun dan ditunggu hingga kering.
- Setelah kering, alat dibungkus dengan menggunakan kertas bekas atau 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 ke dalam keranjang sterilisasi.
- Memasukkan aquades ke dalam 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 ke dalam *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 dan diambil alat yang sudah disterilisasi lalu disimpan dalam kotak penyimpanan sementara bahan yang sudah disterilisasi disimpan dalam lemari pendingin.

3.4.3 Sterilisasi Tempat Perlakuan

Sterilisasi tempat perlakuan penting dilakukan karena bertujuan untuk menghindari terjadinya kontaminasi dengan mikroorganisme lain yang tidak diinginkan. Sterilisasi tempat perlakuan dapat dilakukan dengan cara kimia menggunakan alkohol 70% maupun cara fisika dengan pembakaran langsung maupun dengan penyinaran sinar UV. Pada penelitian ini, sterilisasi tempat perlakuan dilakukan dengan menggunakan sinar UV yang terdapat pada *Laminar Air Flow*.

3.4.4 Pembuatan Ekstrak Kasar Biji Petai

Proses pembuatan ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) dilakukan dengan cara sebagai berikut:

- Menyiapkan biji petai sebanyak 500 gr yang didapatkan dari perkebunan di daerah Batu, Jawa Timur, kemudian dibersihkan dari kotoran dengan cara dicuci dengan air sampai bersih kemudian ditiriskan.

- Biji petai dipotong tipis – tipis untuk mempercepat proses pengovenan selama 24 jam. Suhu yang digunakan pada saat pengovenan yaitu 40 - 50°C. Pengovenan ini bertujuan untuk mengurangi kadar air dari biji petai sehingga mudah untuk mendapatkan senyawa antibakterinya.
- Biji petai yang sudah kering dihaluskan menggunakan *blender* kemudian didapatkan serbuk biji petai sebanyak 250 gr yang ditimbang menggunakan timbangan digital.
- Selanjutnya serbuk biji petai dimasukkan kedalam toples kaca ukuran 3L dan dimaserasi dengan etanol 96% sebanyak 1000 ml selama 1 x 24 jam. Menurut Masitha (2011), maserasi merupakan ekstraksi dingin, dimana simplisia direndam didalam pelarut dan dilakukan pengadukan hingga pelarut menarik atau melarutkan senyawa yang diinginkan secara maksimal. Etanol 96% dipilih karena lebih mudah menguap dibandingkan air.
- Kemudian toples kaca ditutup *aluminium foil* dan diikat dengan karet gelang dan dibiarkan selama 1 hari dengan sesekali diaduk.
- Setelah 1 hari, filtrat disaring dan dipisahkan dengan residu.
- Filtrat diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* dan didapatkan ekstrak kental biji petai sebanyak 11,55 gr.
- Untuk penentuan dosis ekstrak biji petai dapat dilihat pada Lampiran 3.

3.4.5 Pembuatan Media

a. PSA (*Pseudomonas Selective Agar*)

Penelitian ini menggunakan media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*).

Langkah – langkah dalam pembuatan PSA sebagai berikut:

- Ditimbang PSA sebanyak 13,6 gram.
- PSA dilarutkan ke dalam erlenmeyer yang berisi aquades sebanyak 200 ml.

- PSA diaduk dengan menggunakan spatula hingga benar - benar larut secara homogen. Setelah larut sempurna, erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas sampai rapat kemudian ditutup lagi dengan kertas aluminium foil dan dirapatkan dengan penali.
- Kemudian disterilisasi dengan menggunakan *autoclave* pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Media ditunggu hingga hangat lalu media dituang ke dalam cawan petri dalam kondisi steril.
- Media ditunggu hingga memadat dan siap untuk digunakan. Apabila media tidak langsung digunakan, maka media diberi label dan disimpan dalam lemari pendingin agar tidak terkontaminasi.

b. TSB (*Tryptic Soy Broth*)

TSB (*Tryptic Soy Broth*) merupakan media yang digunakan untuk kultur bakteri *P. fluorescens*. Langkah yang dilakukan dalam pembuatan media TSB yaitu:

- Ditimbang TSB sebanyak 0,6 gram dan dimasukkan ke dalam erlenmeyer 100 ml.
- Ditambahkan aquades sebanyak 20 ml, diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kekuningan.
- Erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas hingga rapat lalu dibungkus dengan menggunakan kertas *aluminium foil* dan diikat dengan menggunakan benang kasur agar benar – benar tertutup rapat.
- Media disterilisasi menggunakan *autoclave* dengan suhu 121°C selama 15 menit.
- Setelah sterilisasi selesai, media dibiarkan dingin karena bakteri akan mati apabila diinokulasi pada media yang masih panas.

3.4.6 Pemiakan Bakteri *P. fluorescens*

Penelitian ini menggunakan bakteri *P. fluorescens* yang didapat dari isolat murni berasal dari Balai Besar Budidaya Air Payau Jepara. Isolat murni ini kemudian diremajakan pada media agar miring yaitu dengan menggunakan media PSA (*Pseudomonas Selective Agar*). Hal ini sesuai dengan pernyataan Mulyadi, Wuryanti dan Purbowatiningrum (2013), cara meremajakan bakteri yaitu mengambil bakteri satu mata osse dari stok bakteri yang akan digunakan. Kemudian dilakukan inokulasi dalam media *Nutrient broth* (NB) dan diinkubasi selama 24 jam pada suhu 37°C. Lalu menyiapkan 2 buah media NB dengan 1 media sebagai kontrol negatif (tanpa diinokulasi bakteri) sebagai pembanding terjadinya pertumbuhan bakteri pada media yang telah diinokulasi. Perlakuan diulang 3 kali untuk regenerasi pertama yang selanjutnya digunakan untuk uji.

Untuk mendapatkan bakteri dalam bentuk cair, maka bakteri diremajakan kembali dengan metode gores menggunakan media cair yaitu TSB (*Tryptic Soy Broth*). Langkah yang dilakukan pada pemiakan bakteri *P. fluorescens* yaitu:

- Menyiapkan larutan media TSB yang telah dingin.
- Jarum osse dipanaskan di atas bunsen hingga berpijar untuk menghindari terjadinya kontaminasi.
- Setelah dingin, jarum osse disentuh pada biakan murni yang terdapat pada media PSA dan dicelupkan pada media TSB yang telah dingin.
- Media TSB dibiarkan selama 24 jam didalam inkubator dengan suhu 33°C.
- Setelah 24 jam, media TSB berubah menjadi keruh yang menandakan bahwa bakteri telah tumbuh. Kemudian bakteri dilihat kepadatannya dengan tabung Mc. Farland dan didapatkan kepadatan bakteri 10^7 CFU/ml. Menurut Rotty, Fatimawali dan Tjitrosantoso (2015), bakteri diambil dengan jarum osse dan disuspensikan dengan cara dimasukkan ke dalam tabung berisi 5 ml larutan

NaCl fisiologis steril 0,9%. Suspensi yang terbentuk disetarakan dengan standard Mc. Farland No. 0,5 yaitu $1,5 \times 10^8$ CFU/ml.

- Menyiapkan cawan petri yang sudah berisi media PSA.
- Bakteri dibiakkan dengan metode cawan sebar (*spread plate*).
- Ambil suspensi cairan sebanyak 0,1 ml dengan *micropipet* dan *blue tip* kemudian teteskan diatas permukaan agar yang telah memadat.
- Batang drugal diambil kemudian disemprot dengan alkohol dan dipanaskan diatas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.
- Kemudian disebar dengan menempelkan pada permukaan agar supaya tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar.
- Media PSA diinkubasi di dalam inkubator dengan suhu 33°C selama 24 jam.

3.5 Pelaksanaan Uji Cakram

Difusi kertas cakram ialah kertas cakram saring yang berisi obat yang digunakan kemudian ditempatkan pada permukaan media padat yang telah diinokulasi bakteri uji pada bagian permukaannya. Setelah diinkubasi, diukur diameter zona hambat disekitar cakram yang fungsinya untuk mengukur daya hambat kekuatan obat terhadap bakteri yang diuji (Jawetz, Meinick dan Adelbergs, 2001).

Pembuatan kertas cakram dilakukan dengan menyiapkan potongan kertas dibuat kertas cakram berdiameter 6 mm yang dibuat dari kertas saring Whatman, diletakan dalam cawan petri kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 20 menit, kemudian kertas cakram yang telah disterilkan tersebut ditetesi larutan uji masing - masing ekstrak dengan berbagai konsentrasi

dan kontrol positif serta kontrol negatif masing - masing sebanyak 15 μL (Miranti, Prasetyorini dan Suwary, 2013).

Prosedur pelaksanaan uji cakram adalah sebagai berikut :

- Menyiapkan cawan petri yang sudah terdapat media PSA sebanyak 20 ml.
- Disiapkan masing – masing dosis ekstrak kasar biji petai yang akan diujikan.
- Disiapkan bakteri pada media TSB dengan kepadatan 10^7 CFU.ml⁻¹
- Penanaman bakteri pada media PSA dilakukan dengan metode cawan sebar.
- Kemudian ambil suspensi cairan sebanyak 0,1 ml dengan *micropipet* kemudian teteskan diatas permukaan agar yang telah memadat.
- Batang drugal diambil kemudian disemprot dengan alkohol dan dipanaskan diatas bunsen beberapa saat, kemudian didinginkan dan ditunggu beberapa detik.
- Kemudian disebar dengan menempelkan pada permukaan media agar agar tetesan suspensi merata, penyebaran akan lebih efektif bila cawan ikut diputar. Penanaman bakteri ini dilakukan pada *Laminar Air Flow* dengan kondisi yang tetap steril agar tidak terjadi kontaminasi.
- Selanjutnya kertas cakram steril berukuran 6 mm direndam selama 15 menit pada masing – masing dosis yang ditentukan.
- Kertas cakram ditiriskan dan diletakkan pada lempeng agar yang sudah ditanami bakteri.
- Diinkubasi selama 24 jam dengan suhu ruang yaitu 33°C.
- Setelah diinkubasi selama 24 jam, diukur diameter zona hambat yang ada disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong untuk mengetahui pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antibakteri yang terdapat pada ekstrak kasar biji petai.

- Selanjutnya untuk mengetahui ekstrak kasar biji petai bersifat bakteriostatik (menghambat pertumbuhan bakteri) atau bersifat bakteriosidal (membunuh bakteri) maka dilakukan pengamatan setelah 48 jam.

Jarak kertas cakram dengan tepi cawan petri tidak boleh kurang dari 15 mm. Jika jumlah kertas cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram tidak boleh kurang dari 24 mm. Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh bergeser, karena akan mengurangi validasi pengukuran. Untuk dokumentasi pelaksanaan uji cakram disajikan pada Lampiran 2.

3.6 Parameter Uji

Parameter uji terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama yaitu diameter zona hambat yang diukur dengan menggunakan kertas cakram yang dinyatakan dengan satuan milimeter (mm). Parameter penunjangnya adalah suhu inkubasi dan lama perendaman kertas cakram pada masing - masing dosis ekstrak biji petai yang telah ditentukan.

3.7 Analisa 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 perlakuan. Kemudian untuk mengetahui hubungan antar perlakuan dengan diameter zona hambat dilakukan uji polinomial orthogonal.



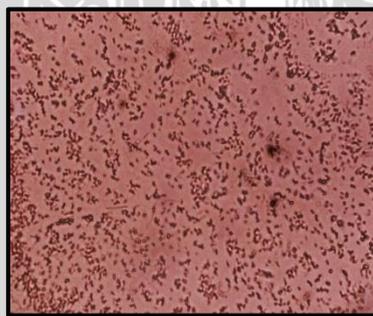
4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Identifikasi Bakteri *P. fluorescens*

Proses identifikasi bakteri dilakukan untuk memastikan bahwa bakteri yang digunakan adalah *P. fluorescens*. Proses identifikasi bakteri ini meliputi pengamatan morfologi warna koloni bakteri. Jika bakteri yang diuji berwarna ungu, maka bakteri tersebut adalah bakteri gram positif namun jika berwarna merah, bakteri tersebut adalah bakteri gram negatif. Pada penelitian ini, proses identifikasi bakteri dilakukan dengan uji pewarnaan gram. Menurut Rostinawati (2008), pewarnaan gram digunakan untuk mengetahui morfologi sel bakteri serta untuk membedakan bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif pada pewarnaan gram berwarna ungu disebabkan zat warna kristal violet – yodium tetap dipertahankan meskipun diberi larutan pemucat aseton alkohol, sedangkan bakteri gram negatif berwarna merah sebab kompleks tersebut larut pada saat pemberian larutan pemucat aseton alkohol sehingga mengambil warna merah safranin.

Cara kerja dari pewarnaan gram yaitu bakteri diambil sebanyak satu ose, kemudian diletakkan pada obyek dan difiksasi. Kemudian ditetesi dengan larutan kristal violet sebagai pewarna primer yang akan memberi warna mikroorganisme, lalu ditetesi dengan lugol sebagai mordan atau pelarut organik seperti alkohol. Kemudian ditetesi dengan alkohol untuk membilas atau melunturkan kelebihan zat warna pada sel bakteri dan yang terakhir tetesi dengan safranin untuk mewarnai kembali sel - sel yang telah kehilangan pewarna utama setelah perlakuan dengan alkohol. Tahap selanjutnya dikeringkan dengan menggunakan kertas serap dan tambahkan minyak imersi untuk memperjelas obyek dan amati di bawah mikroskop. Bila hasil pewarnaan diperoleh bakteri berwarna merah maka bakteri tersebut adalah bakteri gram

negatif, sedangkan bila diperoleh bakteri berwarna ungu maka bakteri tersebut adalah gram positif. Pada hasil uji pewarnaan didapatkan hasil bahwa bakteri *P. fluorescens* merupakan bakteri gram negatif. Menurut Fitri dan Yasmin (2011), perbedaan warna pada bakteri gram positif dan gram negatif menunjukkan bahwa adanya perbedaan struktur dinding sel antara kedua jenis bakteri tersebut. Bakteri gram positif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan peptidoglikan yang tebal sedangkan bakteri gram negatif memiliki struktur dinding sel dengan kandungan lipid yang tinggi. Ditambahkan oleh Waluyo (2011), dinding sel bakteri gram negatif lebih kompleks dibandingkan bakteri gram positif. Perbedaan utama adalah adanya lapisan membran luar. Membran ini menyebabkan dinding sel bakteri gram negatif kaya akan lipid (11 – 22%). Lapisan membran luar pada bakteri gram negatif mempunyai struktur sebagai unit membran. Lapisan ini tidak hanya terdiri dari fosfolipida seperti membran plasma, tetapi mengandung lipid lainnya, polisakarida dan protein. Untuk dokumentasi hasil uji pewarnaan gram bakteri *P. fluorescens* disajikan pada Gambar 4, dan hasil uji biokimia bakteri disajikan pada Lampiran 4.

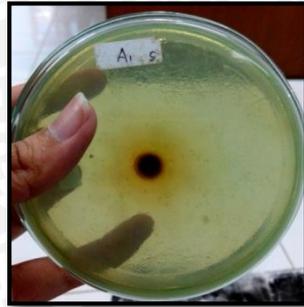


Gambar 4. Hasil uji pewarnaan gram bakteri *P. fluorescens* dengan perbesaran 1000x (Dokumentasi pribadi, 2016).

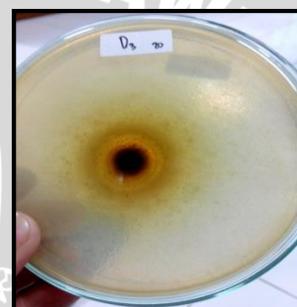
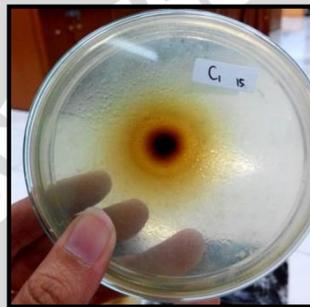
4.2 Daya Hambat Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *P. fluorescens*

Berdasarkan hasil pengamatan selama penelitian mengenai uji daya hambat ekstrak kasar biji petai terhadap bakteri *P. fluorescens* pada tiap

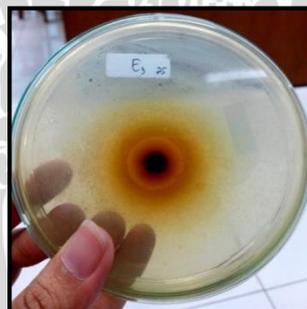
perlakuan disajikan pada Gambar 5, sedangkan dokumentasi masing - masing perlakuan dengan tiga kali ulangan disajikan pada Lampiran 5.



Perlakuan A dengan dosis 12,5 ppt Perlakuan B dengan dosis 25 ppt



Perlakuan C dengan dosis 37,5 ppt Perlakuan D dengan dosis 50 ppt



Perlakuan E dengan dosis 62,5 ppt

Gambar 5. Hasil Zona Hambat Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *P. fluorescens*

Berdasarkan Gambar 5, kemampuan antibakteri ekstrak terhadap bakteri uji ditentukan dengan mengukur diameter zona hambat yang muncul di sekitar kertas cakram. Pengukuran zona hambat ini dilakukan pada 24 jam dan 48 jam setelah penanaman bakteri dengan tujuan untuk mengetahui ekstrak biji petai bersifat menghambat (bakteriostatik) atau membunuh (bakteriosidal)

pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Pada penelitian, dosis yang digunakan pada perlakuan A (12,5 ppt), B (25 ppt), C (37,5 ppt), D (50 ppt) dan perlakuan E (62,5 ppt). Dari gambar zona hambat diatas, terlihat bahwa semakin tinggi dosis, zona hambat yang dihasilkan semakin besar. Sedangkan semakin rendah dosis, zona hambat semakin kecil. Zona hambat ini muncul karena ekstrak memiliki senyawa – senyawa aktif yang bersifat antibakteri. Hal ini dimungkinkan karena karena kandungan senyawa aktif yang terkandung dalam ekstrak tersebut sebanding dengan naiknya dosis. Sesuai dengan pendapat Prajitno (2007), semakin tinggi konsentrasi, maka daerah hambatan yang terbentuk juga semakin lebar setelah masa inkubasi 24 jam daerah hambatan tetap tampak jernih dan dapat dikatakan pada konsentrasi ini bakteri bersifat bakteriosidal. Kemudian dilanjutkan dengan perhitungan rata – rata zona hambat. Hasil perhitungan rata – rata zona hambat menggunakan lima perlakuan dengan tiga ulangan disajikan pada Tabel 1.

Tabel 1. Rata – Rata Zona Hambat Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *P. fluorescens*

Perlakuan (ppt)	Ulangan (mm)			Rata-rata (mm)
	1	2	3	
A (12,5)	6,59	7,72	8,1	7,47 ± 0,79
B (25)	9,11	11,38	11,76	10,75 ± 1,43
C (37,5)	10,54	11,61	12,07	11,41 ± 0,79
D (50)	12,69	13,7	12,63	13,01 ± 0,61
E (62,5)	14,49	13,58	14,19	14,09 ± 0,46

Berdasarkan Tabel 1, didapatkan nilai diameter rata – rata zona hambat terbesar pada perlakuan E (62,5 ppt) yaitu $14,09 \pm 0,46$ mm dan nilai diameter rata – rata terendah pada perlakuan A (12,5 ppt) yaitu sebesar $7,47 \pm 0,79$ mm. Hal ini dimungkinkan karena perbedaan jumlah kandungan bahan aktif yang terdapat pada setiap dosis ekstrak kasar biji petai. Sesuai pendapat Indriani (2007), hubungan dosis ekstrak dengan zona hambat bakteri berbanding lurus, yaitu semakin tinggi dosis ekstrak maka semakin tinggi zona hambat yang

dihasilkan Untuk mengetahui klasifikasi respon daya hambat disajikan pada Tabel 2.

Tabel 2. Klasifikasi Respon Hambatan menurut Inneke, Rumengan, Rumampuk, Rimper dan Losung, (2014)

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 tabel klasifikasi respon daya hambat diatas, maka dapat ditentukan bahwa respon hambat ekstrak kasar biji petai terhadap bakteri *P. fluorescens* pada perlakuan A (12,5 ppt) dan B (25 ppt) dengan nilai diameter zona hambat masing – masing $7,47 \pm 0,79$ mm dan $10,75 \pm 1,43$ mm tergolong respon hambat sedang, sedangkan pada perlakuan C (37,5 ppt), D (50 ppt) dan E (62,5 ppt) dengan nilai diameter zona hambat masing – masing $11,41 \pm 0,79$ mm; $13,01 \pm 0,61$ mm dan $14,09 \pm 0,46$ mm tergolong respon hambat kuat.

Kemudian untuk mengetahui pengaruh perlakuan ekstrak kasar biji petai terhadap zona hambat yang dihasilkan, maka dilakukan uji sidik ragam (Tabel 3) dan untuk perhitungan selengkapnya disajikan pada Lampiran 6.

Tabel 3. Sidik Ragam Diameter Zona Hambat Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *P. fluorescens*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	76,95	19,238	24,88**	3,48	5,99
Acak	10	7,73	0,773			
Total	14	84,68				

Keterangan : ** = Berbeda Sangat Nyata

Pada tabel sidik ragam diatas, didapatkan hasil bahwa uji sensitivitas ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) terhadap bakteri *P. fluorescens* adalah berbeda sangat nyata. Hal ini dikarenakan nilai F Hitung lebih besar dari F 5 % dan F 1% yaitu nilai 24,88 lebih besar dari nilai 3,48 dan 5,99. Maka H_0 ditolak yang artinya perlakuan tersebut memberikan perbedaan sangat nyata.

Selanjutnya untuk mengetahui perbedaan antar perlakuan dilakukan Uji BNT (Beda Nyata Terkecil) yang disajikan pada Tabel 4, untuk perhitungan selengkapnya disajikan pada Lampiran 6.

Tabel 4. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *P. fluorescens*

Rata-rata perlakuan	A (7,47)	B (10,75)	C (11,41)	D (13,01)	E (14,09)	Notasi
A (7,47)	-	-	-	-	-	a
B (10,75)	3,28**	-	-	-	-	b
C (11,41)	3,94**	0,66 ^{ns}	-	-	-	b
D (13,01)	5,54**	2,26**	1,6*	-	-	c
E (14,09)	6,62**	3,34**	2,68**	1,08 ^{ns}	-	c

Keterangan :

BNT 1% = 1,625 BNT 5% = 1,142

ns : *non significant* (tidak berbeda nyata)

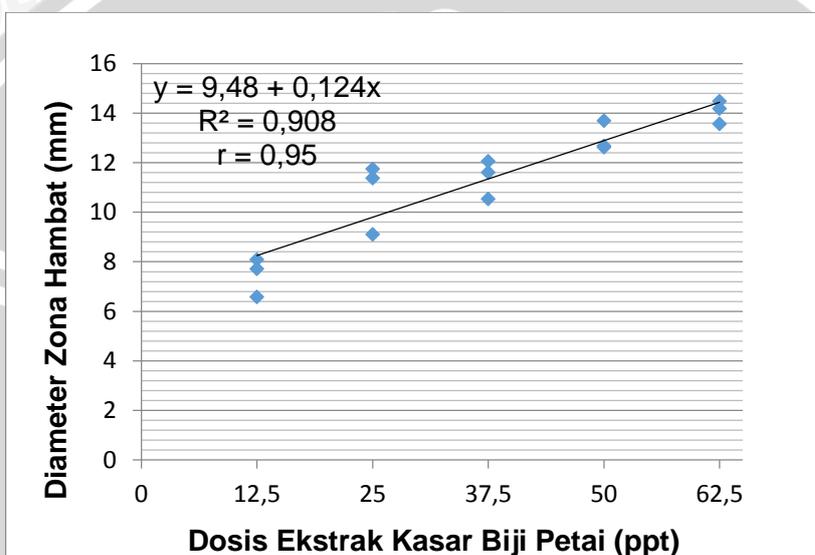
* : berbeda nyata

** : berbeda sangat nyata

Berdasarkan tabel Uji BNT diatas, perlakuan A tidak memberikan pengaruh yang signifikan terhadap semua perlakuan sehingga diberi notasi a. Perlakuan B memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A maka diberi notasi b. Perlakuan C memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A namun tidak berbeda nyata terhadap perlakuan B sehingga diberi notasi b. Perlakuan D memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A dan B namun memberikan pengaruh yang berbeda nyata terhadap perlakuan C maka diberi notasi c sedangkan perlakuan E memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A, B dan C namun tidak berbeda nyata terhadap perlakuan D maka diberi notasi c. Munculnya zona hambat tersebut muncul dikarenakan ekstrak kasar biji petai memiliki kandungan senyawa antioksidan yaitu saponin, flavonoid dan tanin. Menurut Hasim *et al.* (2015), pada uji fitokimia menggunakan N-heksana, petai terbukti mengandung saponin, flavonoid, tanin, dan steroid. Sedangkan pada uji fitokimia menggunakan etil asetat, senyawa yang terkandung adalah alkaloid,

saponin, flavonoid, tanin, dan triterpenoid, serta pada uji fitokimia menggunakan etanol 70%, senyawa yang terkandung adalah alkaloid, saponin, tanin, dan triterpenoid.

Selanjutnya dilakukan uji polinomial orthogonal untuk mengetahui bentuk hubungan (regresi) antar perlakuan dengan diameter zona hambat. Hasil perhitungan uji polinomial orthogonal berupa grafik disajikan pada Gambar 6, untuk perhitungan selengkapnya disajikan pada Lampiran 6.



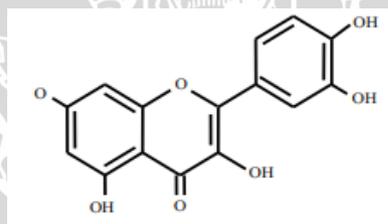
Gambar 6. Grafik Hubungan Antara Dosis Ekstrak Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Diameter Zona Hambat Bakteri *P. fluorescens*

Berdasarkan hasil uji polinomial orthogonal yang ditunjukkan pada Gambar 6, grafik hubungan antara dosis perlakuan ekstrak kasar biji petai terhadap bakteri *P. fluorescens* menunjukkan perpotongan garis secara linier dengan persamaan $y = 9,48 + 0,124x$ dengan nilai koefisien determinasi (R^2) sebesar 0,908 dan koefisien relasi (r) sebesar 0,95. Terlihat pada dosis 12,5 ppt hingga 62,5 ppt grafik mengalami peningkatan. Hal ini diduga disebabkan oleh kandungan senyawa aktif yang terkandung pada ekstrak semakin tinggi oleh karena itu zona hambat yang dihasilkan semakin besar. Sesuai dengan pernyataan Katno, Haryanti dan Triyono (2009), diameter zona hambat yang

dihasilkan suatu ekstrak berbanding lurus dengan jumlah konsentrasi ekstrak yang digunakan sehingga perbedaan besar kecilnya zona hambat yang dihasilkan masing - masing konsentrasi sebanding dengan jumlah bahan aktif yang digunakan.

Selanjutnya untuk mengetahui sifat antibakteri ekstrak kasar biji petai, maka dilakukan pengamatan setelah inkubasi 48 jam dan didapatkan hasil bahwa diameter rata – rata zona hambat pada masing – masing perlakuan mengalami peningkatan dibandingkan dengan hasil pengamatan yang dilakukan pada 24 jam. Hasil rata – rata pengamatan pada 24 jam pada perlakuan A (12,5 ppt) sebesar 3,64 mm; B (25 ppt) sebesar 8,03 mm; C (37,5 ppt) sebesar 9,22 mm, D (50 ppt) sebesar 10,81 dan E (62,5) sebesar 11,98 mm sementara itu pada pengamatan setelah 48 jam pada perlakuan A (12,5 ppt) sebesar 7,47 mm, B (25 ppt) sebesar 10,75 mm, C (32,5 ppt) sebesar 11,41 mm; D (50 ppt) sebesar 11,41 mm dan perlakuan E (62,5 ppt) sebesar 14,09 mm sehingga dapat dikatakan bahwa ekstrak kasar biji petai mampu membunuh bakteri atau bersifat bakteriosidal. Sesuai pendapat Anita, Khotimah dan Yanti (2014) bahwa sifat antibakteri mempunyai efek bakteriosidal yang ditandai dengan adanya peningkatan diameter zona hambat. Ditambahkan oleh Amin (2014), secara umum, aktivitas antibiotik dibagi menjadi dua bagian besar, yaitu bakteriostatik (menghambat pertumbuhan mikroba) dan bakteriosidal (membunuh mikroba). Contoh antibiotik yang bersifat bakteriosidal antara lain *aminoglycoside*, *beta-lactam*, *metronidazole*, *kuinolon*, *rifampicin*, *pirazinamide*, *vancomycin*, *isoniazide*, dan *bacitracin*. Sedangkan antibiotik yang memiliki sifat bakteriostatik antara lain *chloramphenicol*, *clindamycin*, *ethambutol*, *macrolide*, *sulfonamide*, *tetracycline* dan *trimethoprim*. Namun sifat bakteriostatik dan bakteriosidal dari antimikroba tidak mutlak karena antibiotik dengan sifat bakteriostatik dapat pula bersifat bakteriosidal bila kadarnya ditingkatkan.

Sifat bakteriosidal disebabkan adanya kandungan senyawa aktif pada petai. Flavonoid merupakan salah satu kelompok senyawa metabolit sekunder yang paling banyak ditemukan didalam jaringan tanaman dan termasuk dalam golongan senyawa *phenolik* dengan struktur kimia C₆-C₃-C₆ (Gambar 7). Kerangka flavonoid terdiri atas satu cincin aromatik A, satu cincin aromatik B, dan cincin tengah berupa heterosiklik yang mengandung oksigen dan bentuk teroksidasi cincin ini dijadikan dasar pembagian flavonoid ke dalam sub - sub kelompoknya. Kandungan flavonoid sebagai salah satu kelompok antioksidan alami terdapat pada sereal, sayur - sayuran dan buah. Flavonoid berperan sebagai antioksidan dengan cara mendonasikan atom hidrogennya atau melalui kemampuannya mengkelat logam (Redha, 2010).

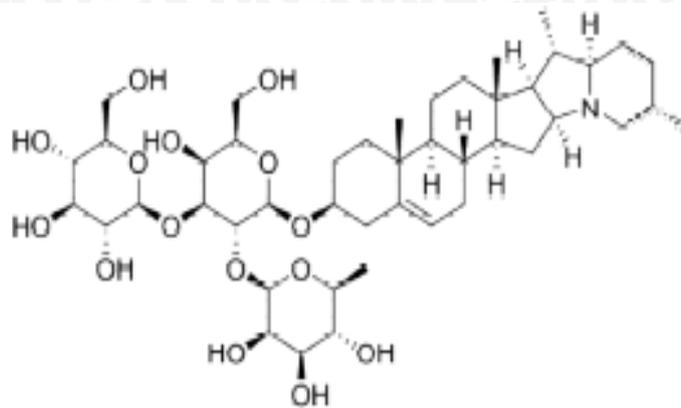


Gambar 7. Struktur Kimia Senyawa Flavonoid (Redha, 2010)

Ditambahkan pula oleh Roslizawaty, Ramadani, Fakhurrazi, dan Herrialfian (2013), flavonoid berperan langsung sebagai antibiotik dengan mengganggu fungsi dari mikroorganisme seperti bakteri atau virus. Mekanisme penghambatan flavonoid terhadap pertumbuhan bakteri karena kemampuan senyawa tersebut membentuk senyawa kompleks dengan protein ekstraseluler, mengaktivasi enzim, dan merusak membran sel. Pada umumnya senyawa flavonoid dapat menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan gram negatif.

Senyawa saponin juga terkandung dalam biji petai. Menurut Irwan, Komari dan Rusdiana (2007), saponin (Gambar 8) merupakan salah satu metabolit sekunder yang mempunyai aktivitas biologi, diantaranya bersifat sebagai antimikroba. Ditambahkan oleh Tenggara, Rizka dan Parisihni (2014),

saponin adalah glikosida triterpena dan sterol yang merupakan senyawa aktif yang dapat bekerja sebagai antimikroba sebagai surfaktan atau deterjen yang akan menyerang lapisan batas sel bakteri melalui ikatan gugus polar dan non polar.

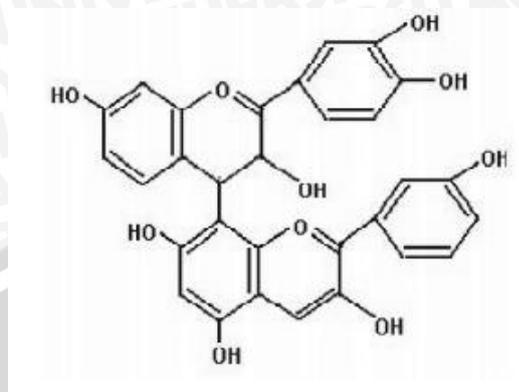


Gambar 8. Struktur Kimia Senyawa Saponin (Septiana dan Asnani, 2012).

Mekanisme kerja saponin sebagai antibakteri adalah menurunkan tegangan permukaan sehingga mengakibatkan naiknya permeabilitas atau kebocoran sel dan mengakibatkan senyawa intraseluler akan keluar (Nuria, Faizatul dan Sumantri, 2009). Ditambahkan oleh Wardhani dan Sulistyani (2012), saponin akan mengubah tegangan permukaan dan mengikat lipid pada sel bakteri yang menyebabkan lipid terekskresi dari dinding sel sehingga permeabilitas membran bakteri terganggu.

Senyawa aktif lain yang terkandung dalam biji petai adalah tanin. Menurut Ismarani (2012), senyawa tanin (Gambar 9) merupakan senyawa *astringent* yang memiliki rasa pahit dari gugus polifenolnya yang dapat mengikat dan mengendapkan atau menyusutkan protein. Zat *astringent* dari tanin menyebabkan rasa kering dan *puckery* (kerutan) didalam mulut setelah mengkonsumsi teh pekat, anggur merah atau buah yang mentah. Dekstruksi atau modifikasi tannin selama ini berperan penting dalam pengawet kayu, adsorben logam berat, obat - obatan, antimikroba dan lain - lain. Tanin

merupakan senyawa *phenol* yang larut dalam air dan memiliki berat molekul antara 500 dan 3000 dalton (Da).



Gambar 9. Struktur Kimia Senyawa Tanin (Septiana dan Asnani, 2012).

Tanin memiliki aktivitas antibakteri dengan cara masuk ke dalam sel bakteri dan mengkoagulasi protoplasma yang sebelumnya dinding sel bakteri tersebut telah lisis oleh senyawa saponin dan flavonoid sehingga menyebabkan senyawa tanin sangat mudah masuk ke dalam dinding sel bakteri (Majidah, Fatmawati dan Gunadi, 2014). Ditambahkan oleh Poeloengan dan Praptiwi, (2010), tanin dalam konsentrasi rendah mampu menghambat pertumbuhan kuman, sedangkan pada konsentrasi tinggi, tanin bekerja sebagai antimikroba dengan cara mengkoagulasi atau menggumpalkan protoplasma kuman, sehingga terbentuk ikatan yang stabil dengan protein kuman dan pada saluran pencernaan, tanin diketahui mampu mengeliminasi toksik.

4.3 Parameter Penunjang

Hasil parameter penunjang yang pertama yaitu suhu inkubasi sebesar 33°C. Dengan suhu tersebut, biakan bakteri *P. fluorescens* sudah dapat tumbuh dengan baik setelah diinkubasi selama 24 jam. Tanda bahwa bakteri *P. fluorescens* tumbuh yaitu pada media agar berwarna padat kekuningan. Suhu 33°C merupakan suhu optimal untuk pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*, sesuai dengan penelitian yang dilakukan Arwiyanto *et al.* (2007), semua isolat *P.*

fluorescens tumbuh baik pada kisaran pH antara 6 sampai 7 serta suhu antara 20°C - 41°C. Kebutuhan nutrisi *P. fluorescens* sangat sederhana, sehingga mereka dapat bertahan hidup dan berkembang biak selama berbulan – bulan pada lingkungan yang lembab. Kebanyakan strain hidup secara aerobik *kemoorganotroph* yaitu membutuhkan oksigen dan karbon organik untuk pertumbuhan.

Parameter penunjang kedua adalah lama perendaman kertas cakram pada ekstrak yaitu selama 15 menit. Dengan perendaman kertas cakram selama 15 menit pada masing – masing dosis, kertas cakram dapat menyerap ekstrak dengan sempurna sehingga hasil diameter zona hambat yang dihasilkan juga maksimal. Hal ini sesuai dengan pernyataan Noverita, Fitria dan Sinaga (2009), pengujian aktivitas antibakteri dilakukan dengan metode Kirby - Bauer yang dikenal dengan sebutan metode cakram kertas. Tiap – tiap cakram kertas kosong sebelumnya dipanaskan dalam oven pada suhu 70°C selama 15 menit, kemudian kertas cakram dicelupkan ke dalam larutan uji. Cakram yang telah berisi supernatan, kemudian didiamkan selama 15 menit sebelum diletakkan pada media uji. Kemudian secara aseptik, setelah kertas cakram menyerap supernatan tersebut, masing – masing diletakkan pada permukaan medium yang telah berisi mikroba uji.

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian tentang uji sensitivitas ekstrak kasar biji petai (*P. speciosa*) terhadap daya hambat bakteri *P. fluorescens* secara *in vitro* dengan uji cakram dapat disimpulkan bahwa ekstrak kasar biji petai berpengaruh sangat nyata terhadap daya hambat pertumbuhan bakteri *P. fluorescens* dengan nilai rata – rata zona hambat $7,47 \pm 0,79$ mm sampai $14,09 \pm 0,46$ mm dan bersifat bakteriosidal (membunuh pertumbuhan bakteri) setelah pengamatan setelah 48 jam.

5.2 Saran

Berdasarkan hasil penelitian, disarankan untuk menggunakan ekstrak biji petai (*P. speciosa*) untuk membunuh pertumbuhan bakteri *P. fluorescens*. Selain itu, disarankan untuk dilakukan penelitian lebih lanjut secara *in vivo* untuk menentukan dosis optimal ekstrak kasar biji petai dalam penyembuhan (kuratif) ikan yang diinfeksi bakteri *P. fluorescens*.

DAFTAR PUSTAKA

- Afrianto, E., E. Liviawaty., Z. Jamaris dan Hendi. 2015. Penyakit Ikan. Penebar Swadaya: Jakarta. 220 hlm
- Amin, L. Z. 2014. Pemilihan Antibiotik yang Rasional. *Scientific Journal of Pharmaceutical Development and Medical Application*. **27** (3): 40-45.
- Arwiyanto, T., YMS. Maryudani dan N. N. Azizah. 2007. Sifat-sifat Fenotipik *Pseudomonas fluoresen*, Agensia Pengendalian Hayati Penyakit Lincat Pada Tembakau Temanggung. *Biodiversitas*. **8** (2): 147-151
- Attia, A., S. Mesalhy, Y. A. Galil dan M. Fathi. 2012. Effect of Injection Vaccination against *Pseudomonas fluorescens* on Specific and Non-Specific Immune Response of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Using Different Prepared Antigens. *Open Acces Scientific Reports*. **1** (12): 1-7.
- Azizi, C. Y. Mohd., Z. Salman., N. A. N. Norulain dan A. K. M. Omar. 2010. Extraction and Identification Of Compounds From *Parkia speciosa* Seeds By Supercritical Carbondioxide. *Journal of Chemical and Natural Resources Engineering, Special Edition*. **2** (1): 153-163
- Darak, O dan R. D. Barde. 2015. *Pseudomonas fluorescens* associated with Bacterial Disease in *Catla catla* in Marathwada Region of Maharashtra. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research (IJBR)*. **6** (2): 189-195
- Dwidjoseputro. 1985. Dasar – Dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan. 207 hlm
- Dwipayana dan H.D. Ariesyady. 2009. Identifikasi Keberagaman Bakteri Pada Lumpur Hasil Pengolahan Limbah Cat dengan Teknik Konvensional. Fakultas Teknik Sipil dan Lingkungan, Institut Teknologi Bandung. 12 hlm
- Fitri, L. dan Y. Yasmin. 2011. Isolasi Dan Pengamatan Morfologi Koloni Bakteri Kitinolitik. *Jurnal Ilmiah Pendidikan Biologi, Biologi Edukasi*. **3** (2) : 20 – 25
- Hamastuti, H., Elysa D. O., S. R. Juliastuti dan N. Hendrianie. 2012. Peran Mikroorganisme *Azotobacter chroococcum*, *Pseudomonas fluorescens*, dan *Aspergillus niger* pada Pembuatan Kompos Limbah Sludge Industri Pengolahan Susu. *Jurnal Teknik Pomits*. **1** (1): 1-5
- Hasim., D. N. Faridah dan D. A. Kurniawati. 2015. Antibacterial Activity of *Parkia speciosa* Hassk. Peel to *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* Bacteria. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*. **7** (4): 239 - 243
- Hatmanti, A., R. Nuchsin dan Y. Darmayati. 2008. Studi Penyakit Bakterial Pada Budidaya Ikan Kerapu dan Bakteri Penghambatnya Di Perairan Teluk Lampung. *Jurnal Akuakultur Indonesia*. **7** (1) : 51 - 58

- Indriani, N. 2007. Aktivitas Antibakteri Daun Senggugu (*Clerodendrom serratum* L. Spr.). *Skripsi*. FMIPA Institut Pertanian Bogor.
- 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 Sains dan Teknologi*. **1** (1): 1-15.
- Irwan, A., N. Komari., dan Rusdiana. 2007. Uji Aktivitas Ekstrak Saponin Fraksi N-Butanol Darikulit Batang Kemiri (*Aleurites Moluccana*WILLD) Pada Larva Nyamuk *Aedes Aegypti*. *Sains dan Terapan Kimia*. **1** (2) : 93 – 101
- Ismarani. 2012. Potensi Senyawa Tannin Dalam Menunjang Produksi Ramah Lingkungan. *Jurnal Agribisnis dan Pengembangan Wilayah*. **3** (2) : 46 – 55
- Jawetz., Melnick dan Adelberg's. 2001. Mikrobiologi Kedokteran, jilid 2, diterjemahkan oleh Mudihardi, E., Kuntaman., Wasita, E. B., Mertaniasih, N. M., Harsono, S. & Alimsardjono, L, 417, Jakarta, Salemba Medika.
- Kamisah, Y., F. Othman., Hj M. S. Qodriyah dan K. Jaarin. 2013. *Parkia speciosa* Hassk.: A potential Phytomedicine. 9 hlm
- Karlina, C. Y., M. Ibrahim dan G. Trimulyono. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Krokot (*Portulaca oleracea* L.) Terhadap *Staphylococcus aureus* dan *Escherichia coli*. *LenteraBio*. **2** (1) 87-93
- Katno, S. Haryanti dan A. Triyono. 2009. Uji Daya Hambat Ekstrak Etanol Daun Sembung (*Blumea balsamifera* L.) Terhadap Pertumbuhan Mikroba *E. coli*, *S. aureus* dan *C. albicans*. *Jurnal Tanaman Obat Tradisional*. **2** (1) : 22 – 36
- Lemire, J., C. Auger., A. Bignucolo., V. P. Appanna dan V. D. Appanna. 2010. Metabolic Strategis Deployed By *Pseudomonas fluorescens* to Combat Metal Pollutants: Biotechnological Prospects. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology A. Méndez-Vilas (Ed.)*. 10 hlm
- Lesmana, D. S. Dan I. Dermawan. 2004. Budidaya Ikan Hias Air Tawar. Penerbit Swadaya: Jakarta. 160 hlm
- Majidah, D., D. W. A. Fatmawati dan A. Gunadi. 2014. Daya Antibakteri Ekstrak Daun Seledri (*Apium graveolens* L.) Terhadap Pertumbuhan *Streptococcus mutans* Sebagai Alternatif Obat Kumur. Artikel Ilmiah Hasil Penelitian Mahasiswa. 6 hlm
- Mangoting, D., I. Irawan dan S. Abdullah. 2006. Tanaman Lalap Berkhasiat Obat. Penebar Swadaya: Jakarta. 108 hlm
- Mania, S. 2008. *Observasi Sebagai Alat Evaluasi Dalam Dunia Pendidikan dan Pengajaran*. *Lentera Pendidikan*. **11** (2): 220-233.

- Miranti, M., Prasetyorini dan C. Suwary. 2013. Perbandingan Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol 30% dan 96% Kelopak Bunga Rosella (*Hibiscus sabdariffa* L) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus*. *Ekologia*. **13** (1): 9-18
- Moore, E. R. B., B. Tindall., V. A. P. M. D. Santos., D. H. Pieper., J. L. Ramos dan N. J. Palleroni. 2006. Nonmedical: *Pseudomonas*. *Prokaryotes*. **6** : 646-703
- Mulyadi, M., Wuryanti dan Purbowatiningrum R. S. 2013. Konsentrasi Hambat Minimum (KHM) Kadar Sampel Alang-alang (*Imperata cylindrica*) Dalam Etanol Melalui Metode Difusi Cakram. *Chem Info*. **1** (1): 35-42
- Noverita, D. Fitria dan E. Sinaga. 2009. Isolasi dan Uji Aktivitas Antibakteri Jamur Endofit dari Daun dan Rimpang *Zingiber ottensii* Val. *Jurnal Farmasi Indonesia*. **4** (4):171-176
- Nuria, M. C., A. Faizatun dan Sumantri. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Daun Jarak Pagar (*Jatropha curcas* L) Terhadap Bakteri *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, dan *Salmonella typhi* ATCC 1408. *Mediagro*. **5** (2) : 26 – 37
- Pelczar, M. J., & Chan E. C.S. 1986. Dasar - dasar mikrobiologi 2. Jakarta : Penerbit Universitas Indonesia.
- Pitojo, S dan Zumiati. 2006. Tanaman Bumbu dan Pewarna Nabati. Penerbit CV. Aneka Ilmu: Semarang. Hlm 106
- Poeloengan, M dan Praptiwi. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Kulit Buah Manggis (*Gardnia mangostana* Linn). *Media Litbang Kesehatan*. **XX** (2) : 65 – 69
- Prajitno, A. 2007. Uji Sensitifitas Flavonoid Rumput Laut (*Eucheuma cottoni*) Sebagai Bioaktif Alami Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi*. *The Sensitivity Test Of Flavonoid*. **15** (2) : 105 – 111
- Ramayanthi, T., D. Prasetyo dan H. Garna. 2013. Efektivitas Terapi Infeksi *Helicobacter pylori* pada Anak dengan Keluhan Sakit Perut Berulang Setelah Satu Tahun Terapi Eradikasi. *Sari Pediatri*. **15** (2):111-115
- Redha, A. Flavonoid: Struktur, Sifat Antioksidatif Dan Peranannya Dalam Sistem Biologis. *Jurnal Belian*. **9** (2) : 196 – 202
- Reksono, B., H. Hamdani dan Yuniarti MS. 2012. Pengaruh Padat Penebaran *Gracilaria* sp. Terhadap Pertumbuhan dan Kelangsungan Hidup Ikan Bandeng (*Chanos chanos*) Pada Budidaya Sistem Polikultur. *Jurnal Perikanan dan Kelautan*. **3** (3): 41-49
- Roihanah, S., Sukoso dan Andayani S. 2012. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Teripang *Holothuria* sp. Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In vitro*. *J.Exp.Life Sci*. **2** (1): 1-5

- Roslizawaty, N. Y. Ramadani, Fakhurrrazi dan Herrialfian. 2013. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol dan Rebusan Sarang Semut (*Myrmecodia* sp.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli*. *Jurnal Medika veterinaria*. **7** (2): 91-94
- Rostinawati, T. 2008. Skrining dan Identifikasi Bakteri Penghasil Enzim Kitinase Dari Air Laut di Perairan Pantai Pondok Bali. *Penelitian Mandiri*. Fakultas Farmasi. UNPAD : Jatinangor. 56 hlm.
- Rotty, L. M., Fatimawali dan H. Tjitrosantoso. 2015. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Umbi Bawang Putih (*Allium sativum* L.) Terhadap Bakteri *Klebsiella pneumoniae* Isolat Sputum Penderita Bronkitis Secara *In Vivo*. *Pharmacon Jurnal Ilmiah Farmasi*. **4** (3): 2302-2493
- Saskiawan, I dan N. Hasanah. 2015. Aktivitas Antimikroba dan Antioksidan Senyawa Polisakarida Jamur Tiram Putih (*Pleurotus ostreatus*). *Prosiding Seminar Nasional Masyarakat Biodiversitas Indonesia*. **1** (5): 1105-1109
- Sastrahidayat, I. R. 1990. Ilmu Penyakit Tumbuhan. Fakultas Pertanian Universitas Brawijaya Bekerjasama dengan "Usaha Nasional: Surabaya. 365 hlm
- Septiana, A. T. dan A. Asnani. 2012. Kajian Sifat Fisikokimia Ekstrak Rumput Laut Coklat (*Sargassum duplicatum*) Menggunakan Berbagai Pelarut dan Metode Ekstraksi. *Agrointek*. **6** (1) : 22 – 28
- Setyanto, A. E. 2005. Memperkenalkan Kembali Metode Eksperimen dalam Kajian Komunikasi. **3** (1): 37-38
- Siegrist, J. 2010. *Microbiology Focus. Pseudomonas a Communicative Bacteria*. **2** (4): 1-8
- Sumino., A. Supriyadi dan Wardiyanto. 2013. Efektivitas Ekstrak Daun Ketapang (*Terminalia cattapa* L.) untuk Pengobatan Infeksi *Aeromonas salmonicida* pada Ikan Patin (*Pangasioniodon hypophthalmus*). *Jurnal Sain Veteriner*. **31** (1) : 79 – 89
- Sunanto, H. 1992. Budidaya Petai dan Aspek Ekonominya. Penerbit Kanisius: Yogyakarta. Hlm 9-12
- Sunarjono, H. 2013. Bertanam 36 Jenis Sayur. Penerbit Penebar Swadaya: Jakarta. 204 hlm
- Susilo, J. 2012. Budidaya Petai Prospek Pasar Terbuka Lebar. Penerbit Pustaka Baru Press: Yogyakarta. 224 hlm
- Tenggara, F. S., Y. Rizka dan K. Parisihni. 2014. Daya Hambat Ekstrak Daun Sirsak (*Annona muricata*, Linn) Terhadap Pertumbuhan Bakteri *Mixed periodontopatogen*. *ISSN*. **8** (2): 7-15
- Waluyo. L. 2011. Mikrobiologi Umum Edisi Revisi. UM Press : Malang. 340 hlm.

Wardhani. L. K dan N. Sulistyani. 2012. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etil Asetat Daun Binahong (*Anredera Scandens L.*) Moq.) Terhadap *Shigella flexneri* beserta Profil Kromatografi Lapis Tipis. *Jurnal Ilmiah Kefarmasian*. 2 (1) : 1-16



Lampiran 1. Dokumentasi Alat Penelitian



Lemari pendingin



Inkubator



Autoclave



Hot plate



Laminar Air Flow



Oven



Jangka sorong

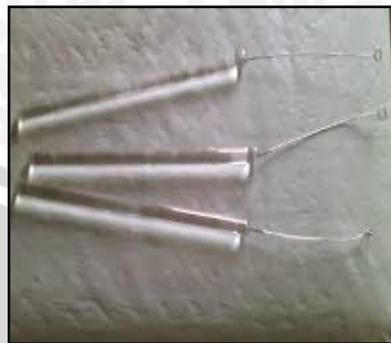


Timbangan digital

Lampiran 1. (lanjutan)



Blender



Jarum osse



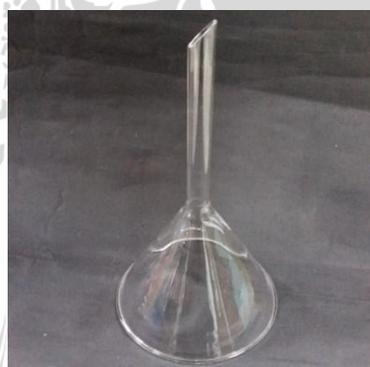
Rotary Vacuum Evaporator



Timbangan Sartorius



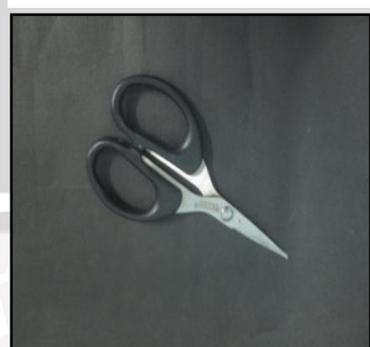
Vortex mixer



Corong



Pinset



Gunting

Lampiran 1. (lanjutan)



Cawan petri



Rak dan Tabung Reaksi



Gelas ukur



Nampan



Jarum Osse, spatula dan pinset



Botol film



Beaker glass

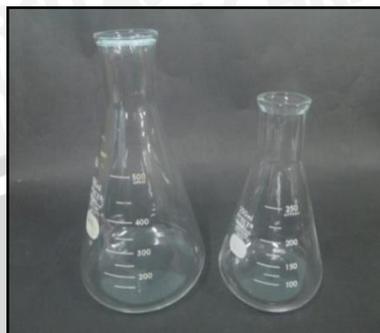


Micropipet dan blue tip

Lampiran 1. (lanjutan)



Bunsen dan korek api



Erlenmeyer



Sprayer



Biji Petai (*P. speiosa*)



Alkohol 70% dan Etanol 96%



Aquades



Tissue



Media TSB

Lampiran 1. (lanjutan)



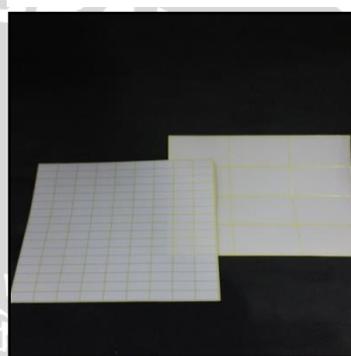
Tali



Kertas Saring



Alumunium Foil



Kertas Label



Kapas



Plastik Bening



DMSO 10%



Kertas Cakram

Lampiran 2. Dokumentasi Kegiatan Penelitian



Pembuatan media PSA



Penuangan PSA



Penuangan media ke cawan petri



Penghomogenan ekstrak



Peletakan kertas cakram



Pengukuran zona hambat

Lampiran 3. Penentuan Dosis Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) pada Uji Difusi Kertas Cakram

Persiapan perendaman (maserasi) yaitu serbuk biji petai sebanyak 250 gram (gr) dimaserasi dalam etanol 96% sebanyak 1 liter selama 1 x 24 jam pada suhu kamar, kemudian filtrat yang didapat disaring menggunakan kertas saring dan diuapkan dengan *rotary vacuum evaporator* sehingga dihasilkan ekstrak kental biji petai sebanyak 11,55 gr. Selanjutnya dilakukan pengukuran dosis (ppt) untuk menentukan dosis ekstrak biji petai (*P. speciosa*) dan ditambahkan larutan pengencer DMSO 10%.

a). 12,5 ppt

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

$$250 \times V \text{ ml} = 12,5 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 0,15 \text{ gr}$$

$$\text{DMSO} = 3 - 0,15 = 2,85 \text{ ml}$$

b). 25 ppt

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

$$250 \times V \text{ ml} = 25 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 0,3 \text{ gr}$$

$$\text{DMSO} = 3 - 0,3 = 2,7 \text{ ml}$$

c). 37,5 ppt

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

$$250 \times V \text{ ml} = 37,5 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 0,45 \text{ gr}$$

$$\text{DMSO} = 3 - 0,45 = 2,55 \text{ ml}$$

d). 50 ppt

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

$$250 \times V \text{ ml} = 50 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 0,6 \text{ gr}$$

$$\text{DMSO} = 3 - 0,6 = 2,4 \text{ ml}$$

e). 62,5 ppt

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

$$250 \times V \text{ ml} = 62,5 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 0,75$$

$$\text{DMSO} = 3 - 0,75 = 2,25 \text{ ml}$$

f). 250 ppt

$$N1 \times V1 = N2 \times V2$$

$$250 \times V \text{ ml} = 250 \times 3 \text{ ml}$$

$$V = 3 \text{ gr}$$

$$\text{DMSO} = 3 - 3 = 0 \text{ ml}$$

Lampiran 4. Laporan Hasil Uji Biokimia



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

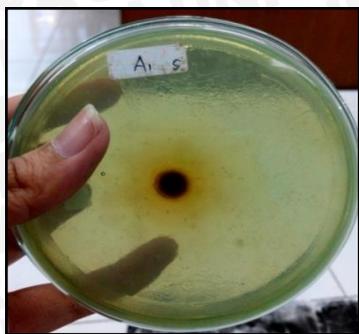
HASIL UJI BIOKIMIA

Uji Bio Kimia	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Gram	—
Bentuk	Batang
Katalase	+
Oksidase	+
H ₂ S	—
Indol	—
Citrate	+
OF medium	Oksidatif
VP	—
MR	—
Urea	—
Glukosa	+
Sukrosa	—
37 ^o C	+

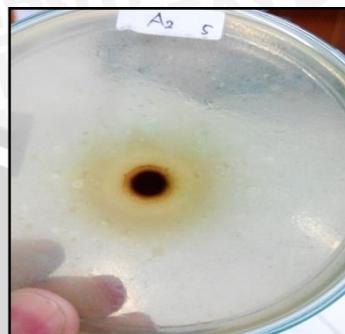
Lab. Mikrobiologi BBPBAP Jepara



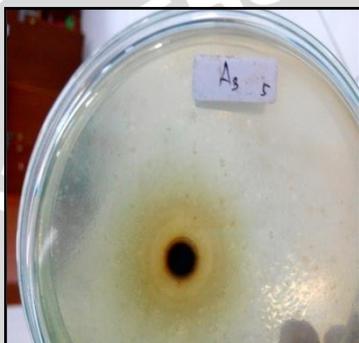
Lampiran 5. Hasil Uji Cakram Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *P. fluorescens* Pada Lima Perlakuan Dengan Tiga Ulangan



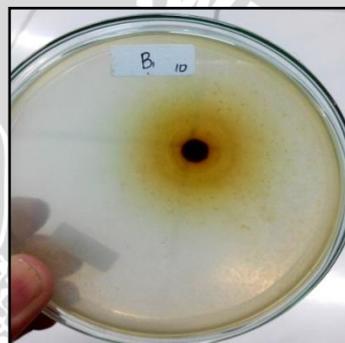
Perlakuan A₁



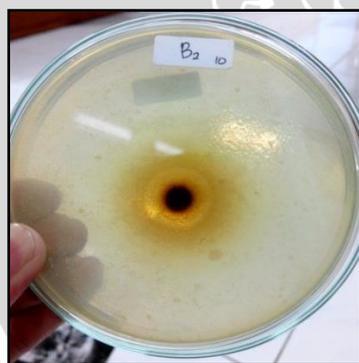
Perlakuan A₂



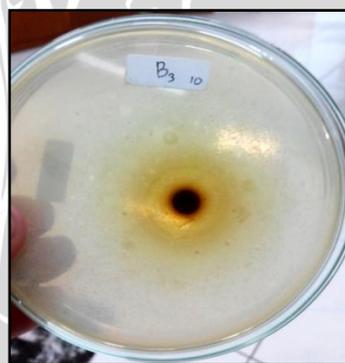
Perlakuan A₃



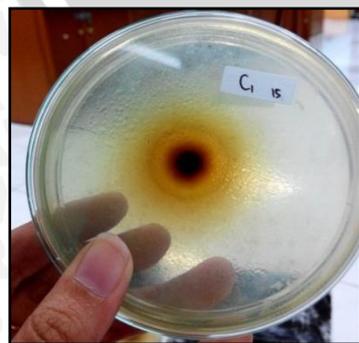
Perlakuan B₁



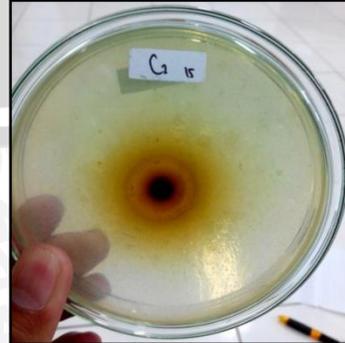
Perlakuan B₂



Perlakuan B₃

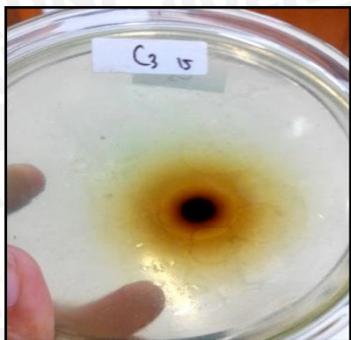


Perlakuan C₁

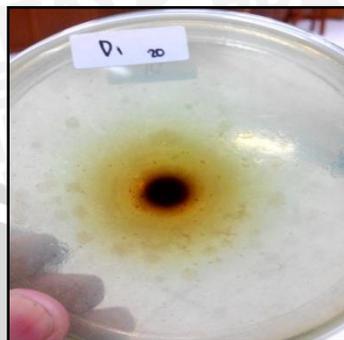


Perlakuan C₂

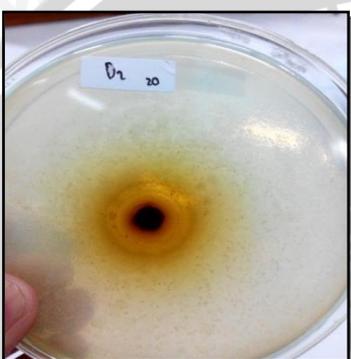
Lampiran 5. (lanjutan)



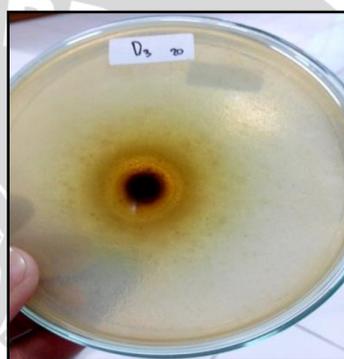
Perlakuan C₃



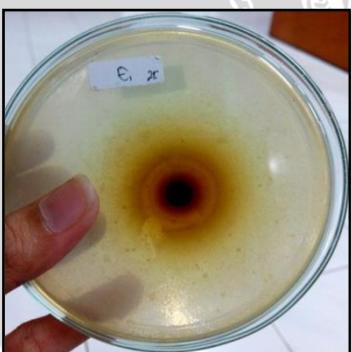
Perlakuan D₁



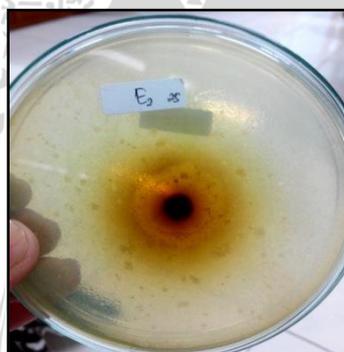
Perlakuan D₂



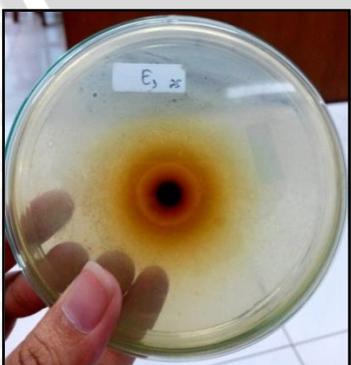
Perlakuan D₃



Perlakuan E₁



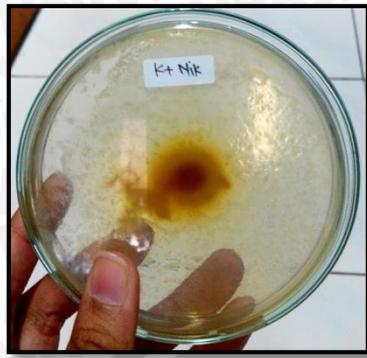
Perlakuan E₂



Perlakuan E₃



Lampiran 5. (lanjutan)



Kontrol +



Kontrol -



Lampiran 6. Analisa Data Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *P. fluorescens* Secara *In Vitro*

➤ Data Diameter Zona Hambat (mm) Bakteri *P. fluorescens*

n	Ulangan			Total	\bar{X}	Total			ΣR^2
	R1	R2	R3			R1 ²	R2 ²	R3 ²	
A	6,59	7,72	8,1	22,41	7,47	43,43	59,6	65,61	502,21
B	9,11	11,38	11,76	32,25	10,75	82,99	129,5	138,3	1040,06
C	10,54	11,61	12,07	34,22	11,41	111,09	134,79	145,68	1171,04
D	12,69	13,7	12,63	39,02	13,01	161,04	187,69	159,52	1522,56
E	14,49	13,58	14,19	42,26	14,09	209,96	184,42	201,26	1785,91
Σ				170,16					2007,25

Keterangan :

n : Perlakuan

Perhitungan:

1. Faktor Koreksi (FK)

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

$$= \frac{170,16^2}{15}$$

$$= 1930,29$$

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

$$= (A1^2 + A2^2 + A3^2 + \dots + E3^2) - FK$$

$$= (6,59^2 + 7,72^2 + 8,1^2 + \dots + 14,19^2) - 1930,29$$

$$= 84,68$$

3. JK Perlakuan

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

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

$$= \frac{22,41^2 + 32,25^2 + 34,22^2 + 39,02^2 + 42,26^2}{3} - 1930,29$$

$$= 76,95$$

Lampiran 6. (lanjutan)

$$\begin{aligned}
 4. \text{ JK galat} &= \text{JK Total} - \text{JK Perlakuan} \\
 &= 84,68 - 76,95 \\
 &= 7,73
 \end{aligned}$$

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

$$\begin{aligned}
 6. \text{ Db Perlakuan} &= n - 1 \\
 &= 5 - 1 \\
 &= 4
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 7. \text{ Db Galat} &= \text{Db Total} - \text{Db Perlakuan} \\
 &= 14 - 4 \\
 &= 10
 \end{aligned}$$

- Analisa Sidik Ragam dengan Uji F Tabel dalam Statistik Rancangan Percobaan Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *P. fluorescens* Secara *In Vitro*

Sumber Keragaman	Db	Jumlah Kuadrat	Kuadrat Tengah	F Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	76,95	19,238	24,88	3,48	5,99
Acak	10	7,73	0,773			
Total	14	123.404				

Berdasarkan hasil analisa sidik ragam di atas menunjukkan bahwa nilai F hitung (24,88) lebih besar dari F tabel 5% yaitu 3,48 maupun F tabel 1% sebesar 5,99 maka H_0 ditolak, hal ini berarti bahwa perbedaan perlakuan berpengaruh sangat nyata. Setelah H_0 ditolak, selanjutnya apabila ingin diketahui antar perlakuan (rata-rata) mana yang berbeda nyata, maka untuk mengetahui hal tersebut dilakukan uji Beda Nyata Terkecil (BNT).

Lampiran 6. (lanjutan)

- Hasil Uji BNT Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *P. fluorescens* Secara *In Vitro*

Rata-rata perlakuan	A (7,47)	B (10,75)	C (11,41)	D (13,01)	E (14,09)	Notasi
A (7,47)	-	-	-	-	-	a
B (10,75)	3,28**	-	-	-	-	b
C (11,41)	3,94**	0,66 ^{ns}	-	-	-	b
D (13,01)	5,54**	2,26**	1,6*	-	-	c
E (14,09)	6,62**	3,34**	2,68**	1,08 ^{ns}	-	c

Keterangan :

ns : *non significant* (tidak berbeda nyata)

* : berbeda nyata

** : berbeda sangat nyata

$$SED = \sqrt{\frac{2 \times KT \text{ acak}}{\text{ulangan}(r)}} = \sqrt{\frac{2 \times 0,773}{3}} = 0,513$$

$$BNT 5\% = t_{(0,05;dbG)} SED = 2,228 \times 0,513 = 1,142$$

$$BNT 1\% = t_{(0,01;dbG)} SED = 3,169 \times 0,513 = 1,625$$

- Tabel Uji Polinomial Orthogonal

Perlakuan	Data (Ti)	Perbandingan Ci			
		Linear	Kuadratik	Kubik	Kuartik
A	22,41	-2	2	-1	1
B	32,25	-1	-1	2	-4
C	34,22	0	-2	0	6
D	39,02	1	-1	-2	-4
E	42,26	2	2	1	1
Q=∑Ci*Ti		46,47	-10,37	6,31	-15,09
Kr=(∑Ci^2)*r		30	42	30	210
JK=Q^2/Kr		71,98	2,56	1,327	1,084

Lampiran 6. (lanjutan)

- Tabel Sidik Ragam Regresi Uji Sensitivitas Ekstrak Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *P. fluorescens* Secara *In vitro*

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	4	76,95	-	-	3,48	5,99
Linear	1	71,98	71,982	93,171**		
Kuadratik	1	2,56	2,56	3,314**		
Kubik	1	1,327	1,327	1,718 ^s		
Kuartik	1	1,084	1,084	1,404		
Acak	10	7,73	0,773			
Total	14	84,68				

** = berbeda sangat nyata

ns = tidak berbeda nyata

Hasil dari sidik ragam terlihat bahwa regresi linier berbeda sangat nyata, berarti regresi yang sesuai untuk kurva respon ini adalah regresi linier.

- Mencari persamaan linier $y = b_0 + b_1x$

x	y	xy	x ²
12,5	6,59	82,375	156,25
12,5	7,72	96,5	156,25
12,5	8,1	101,25	156,25
25	9,11	227,75	625
25	11,38	284,5	625
25	11,76	294	625
37,5	10,54	395,25	1406,25
37,5	11,61	435,375	1406,25
37,5	12,07	452,625	1406,25
50	12,69	634,5	2500
50	13,7	685	2500
50	12,63	631,5	2500
62,5	14,49	905,625	3906,25
62,5	13,58	848,75	3906,25
62,5	14,19	886,875	3906,25
$\Sigma = 562,5$	170,17	6961,88	25781,3
Rata - rata = 37,5	11,34		

Lampiran 6. (lanjutan)

$$\begin{aligned}
 B_1 &= \frac{\sum xy - (\sum x \cdot \sum y) / n}{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}} \\
 &= \frac{6961,88 - (562,5 \cdot 170,16) / 15}{25781,3 - \frac{(562,5)^2}{15}} \\
 &= \frac{6961,88 - 6381}{25781,3 - 21093,8} \\
 &= \frac{580,88}{4687,5} \\
 &= 0,124
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 B_0 &= \hat{y} - b_1x \\
 &= 11,34 - (0,124 \cdot 15) \\
 &= 11,34 - 1,86 = 9,48
 \end{aligned}$$

Persamaan linier : $y = b_0 + b_1x \rightarrow y = 9,48 + 0,124x$

$$\begin{aligned}
 R^2 &= \frac{JK \text{ regresi}}{JK \text{ total terkorelasi}} \\
 &= \frac{JK \text{ regresi}}{JK \text{ regresi} + JK \text{ acak}} \\
 &= \frac{76,95}{76,95 + 7,73} \\
 &= \frac{76,95}{84,68} \\
 &= 0,908
 \end{aligned}$$

➤ Grafik Uji Sensitivitas Ekstrak Kasar Biji Petai (*P. speciosa*) Terhadap Bakteri *P. fluorescens* Secara *In Vitro*

