

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Alga Merah (*Gracilaria verrucosa*)
Terhadap Daya Hambat Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In vitro**

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

Oleh :
NUR AINI
NIM. 0810850053



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

**Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Alga Merah (*Gracilaria verrucosa*)
Terhadap Daya Hambat Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In vitro**

**LAPORAN 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:
NUR AINI
NIM. 0810850053**



FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN

UNIVERSITAS BRAWIJAYA

MALANG

2015

LAPORAN SKRIPSI

Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Alga Merah (*Gracilaria verrucosa*)
Terhadap Daya Hambat Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In vitro

Oleh :
NUR AINI
NIM. 0810850053

telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 26 Januari 2015
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

Menyetujui,

Dosen Penguji I

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

TANGGAL :

Dosen Pembimbing I

(Dr. Ir. Maftuch, MSi)
NIP. 19660825 199203 1 001

TANGGAL :

Dosen Pembimbing II

(Ir. Heny Suprastyani, MS)
NIP.19620904 198701 2 001

TANGGAL :

Mengetahui,

Ketua Jurusan

Dr. Ir. Arning Wilujeng Ekawati, MS
NIP.19620805 198603 2 001

TANGGAL :

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, 26 Januari 2015

Mahasiswa

NUR AINI



UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis menyampaikan ucapan terima kasih yang sebesar-besarnya kepada:

1. Bapak Dr. Ir. Maftuch, MSi dan Ibu Ir. Heny Suprastyani, MS selaku dosen pembimbing.
2. Bapak Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc dan Ibu Ir. Ellana Sanoesi, MP selaku dosen penguji.
3. Laboran Parasit dan Penyakit ikan dan Laboran Reproduksi dan Pemuliaan ikan yang banyak membantu demi terselesainya penelitian ini.
4. Direktorat Jendral Pendidikan Tinggi atas Pendanaan Dalam Penelitian Hibah Bersaing Institusi Batch I Tahun Anggaran 2012, melalui DIPA UB No.0636/023-04.2.16/15/2012, tanggal 9 Desember 2011 dan SK REKTOR UB No.366/SK/2012, tanggal 13 Agustus 2012.

Malang, 26 Januari 2015

Penulis

LEMBAR PERSEMBAHAN

Karya kecil ini saya persembahkan sebagai wujud rasa syukur atas nikmat yang tanpa henti diberikan oleh Allah SWT.

Kepada keluarga, kedua orang tua khususnya terima kasih atas dukungan, do'a, cinta dan kasih sayang yang menjadi motivasi tersendiri bagi saya untuk memberikan yang terbaik.

Bapak Dr. Ir. Maftuch, MSi dan Ibu Ir. Heny Suprastyani, MS selaku dosen pembimbing. Atas kesabaran untuk membimbing ditengah kesibukan Bapak dan Ibu, atas waktu yang telah diberikan hanya untuk membantu saya untuk menghasilkan karya yang lebih baik. Semoga keikhlasan Bapak dan Ibu dibalas oleh Allah SWT. Amin.

Teman-teman BJT "08 bangga menjadi bagian dari kalian. Melewati suka dan duka bersama-sama, saling menguatkan. Bagi saya, tiada kesan tanpa kehadiran kalian, Semoga kelak, apa yang menjadi tujuan kita bersama akan dapat menjadi kenyataan. Amin.

Teman-teman G.V, mengenal kalian semua adalah sebuah keberuntungan. Atas pompaan semangat yang telah diberikan, kebersamaan yang telah dijalani tidak akan didapatkan ditempat manapun.

Special buat Mas Anggara Purwa Widyantara terima kasih atas do'a, support dan kasih sayangmu selama ini.

Pihak-pihak yang banyak membantu demi kelancaran proses studi, tak dapat saya sebutkan satu per satu. Hanya Allah SWT yang mampu membalas keikhlasan kalian. Semoga laporan ini banyak membawa manfaat. Amin.

RINGKASAN

Nur Aini. Skripsi Tentang Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Alga Merah (*Gracilaria verrucosa*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In vitro (dibawah bimbingan Dr. Ir. Maftuch, Msi dan Ir. Heny Suprastyani, MS).

Penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Gangguan terhadap ikan dapat disebabkan oleh organism lain, pakan maupun kondisi lingkungan yang kurang menunjang kehidupan ikan.

Tujuan penelitian ini adalah Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verucossa* terhadap daya hambat bakteri *Vibrio harveyi*.

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Desember 2012 sampai Juni 2014.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan tiga perlakuan, dan kontrol. Masing-masing diulang sebanyak tiga kali. Perlakuan yang digunakan adalah pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* pada dosis (1 ppt), dosis (1,5 ppt), dosis (2 ppt) dan Kontrol sebagai pembanding. Parameter utama pada penelitian ini adalah daerah hambatan bakteri *Vibrio harveyi*. Sedangkan parameter penunjang adalah pH, dan suhu inkubasi.

Penelitian pendahuluan dilakukan untuk mengetahui pelarut yang terbaik dan menentukan dosis yang digunakan untuk penelitian inti, dilanjutkan dengan uji cakram. Hasil penelitian pendahuluan menunjukkan bahwa jenis pelarut terbaik adalah pelarut etanol 96%. Hasil tersebut didapatkan dari nilai rendemen. Selanjutnya dilakukan uji MIC untuk menentukan dosis. Dari hasil uji MIC didapatkan kisaran dosis 1ppt, 1,5ppt, dan 2 ppt.

Hasil penelitian nilai rendemen *Gracilaria verrucosa* menggunakan etanol 96% yaitu sebesar 1,95%. Hasil tersebut dipengaruhi oleh jenis pelarut. Jenis pelarut etanol adalah jenis pelarut universal yang mampu menarik senyawa polar. Sehingga ada kemungkinan senyawa fenol yang diinginkan tidak dapat ditarik secara maksimal karena banyaknya senyawa polar lain yang ikut tertarik.

Parameter penelitian terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama dari penelitian ini adalah Besarnya daerah hambat. Sedangkan parameter penunjang yaitu suhu inkubasi sebesar 30°C.

Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan dosis yang optimal serta mengetahui kemampuan antimikroba dari ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap bakteri patogen lainnya.

KATA PENGANTAR

Puji syukur ke hadirat Allah SWT atas segala rahmat dan hidayah-Nya, shalawat dan salam senantiasa tercurah kepada Rasulullah SAW, sehingga penulis dapat menyelesaikan penelitian skripsi ini.

Laporan ini disusun berdasarkan hasil penelitian skripsi tentang Pengaruh Pemberian Ekstrak Kasar Alga Merah (*Gracilaria verrucosa*) Terhadap Daya Hambat Bakteri *Vibrio harveyi* Secara In vitro.

Penulis menyadari bahwa penulisan laporan ini masih belum sempurna. Oleh karena itu, penulis megharapkan kritik dan saran demi kesempurnaan laporan ini. Namun demikian, penulis berharap semoga laporan ini dapat bermanfaat bagi pihak-pihak yang berminat dan memerlukannya.

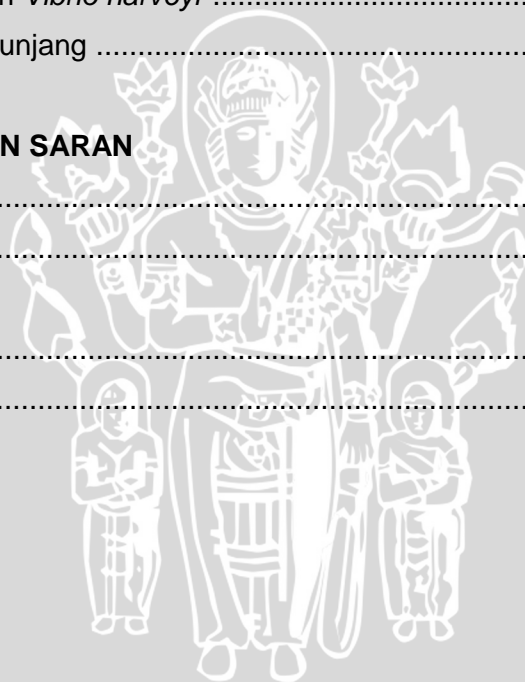
Malang, 26 Januari 2015

Penulis

DAFTAR ISI

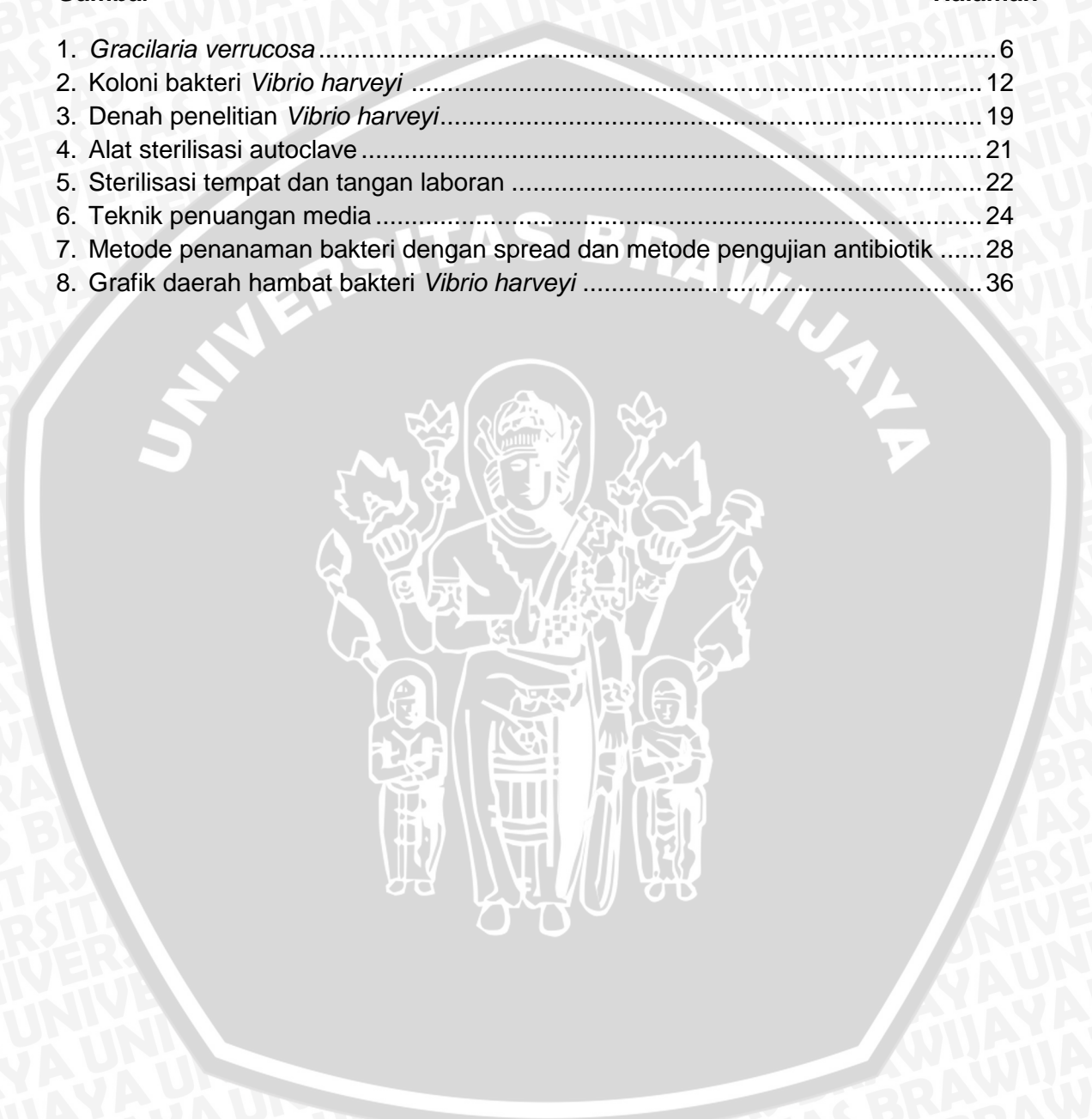
	Halaman
RINGKASAN	i
KATA PENGANTAR	ii
DAFTAR ISI	iii
DAFTAR GAMBAR	iv
DAFTAR TABEL	v
DAFTAR LAMPIRAN	vi
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan Masalah	3
1.3 Tujuan Penelitian	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Kegunaan	4
1.6 Tempat dan Waktu	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 <i>Gracilaria verrucosa</i>	5
2.1.1 Morfologi dan Klasifikasi	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran	6
2.1.3 Manfaat dan Kegunaan	6
2.1.4 Bahan Aktif	7
2.1.5 Ekstrak Kasar	9
2.1.6 Daya Hambat	9
2.2 Bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	10
2.3 Ekstraksi	12
2.4 Uji Aktivitas Antibakteri	13
3. MATERI DAN METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	16
3.1.1 Peralatan Penelitian	16
3.1.2 Bahan Penelitian	16
3.2 Metode dan Rancangan Penelitian	16
3.2.1 Metode Penelitian	16
3.2.2 Uji Aktivitas Antimikroba (In vitro)	17
3.2.3 Rancangan Penelitian	18

3.3	Prosedur Penelitian.....	20
3.3.1	Persiapan Penelitian.....	20
3.3.2	Pelaksanaan Penelitian	22
3.4	Parameter Uji.....	28
3.5	Analisa Data	29
4.	HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1	Rendemen dan kadar air ekstrak kasar <i>Gracilaria verrucosa</i>	30
4.2	Hasil pelarut yang terbaik.....	31
4.3	Hasil uji MIC.....	32
4.4	Hasil daya hambat	33
	Hasil rata-rata jumlah daya hambat bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	33
4.5	Mekanisme penghambatan ekstrak kasar <i>Gracilaria verrucosa</i> terhadap bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	36
4.6	Parameter penunjang	37
5.	KESIMPULAN DAN SARAN	
5.1	Kesimpulan	38
5.2	Saran	38
	DAFTAR PUSTAKA	39
	LAMPIRAN	43



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Gracilaria verrucosa</i>	6
2. Koloni bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	12
3. Denah penelitian <i>Vibrio harveyi</i>	19
4. Alat sterilisasi autoclave	21
5. Sterilisasi tempat dan tangan laboran	22
6. Teknik penuangan media	24
7. Metode penanaman bakteri dengan spread dan metode pengujian antibiotik	28
8. Grafik daerah hambat bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	36



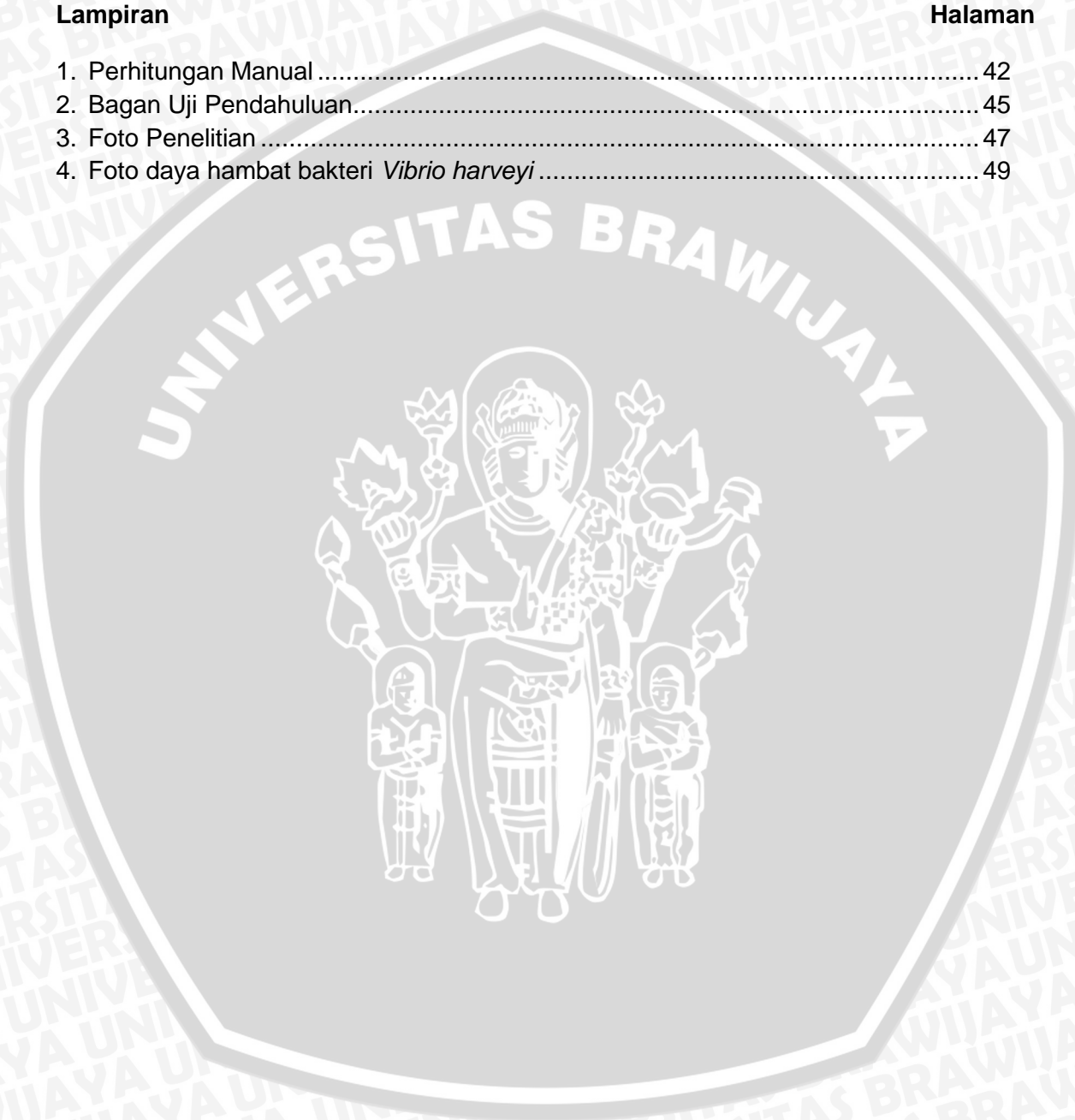
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Klasifikasi respon hambatan	10
2. Standart Mc. Farland	17
3. Rancangan perlakuan penelitian	19
4. Pengamatan uji MIC	27
5. Data jumlah daya hambat pada uji cakram	33
6. Analisa sidik ragam	34
7. Uji BNT daya hambat bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	35
8. Sidik ragam regresi	35



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Perhitungan Manual	42
2. Bagan Uji Pendahuluan.....	45
3. Foto Penelitian	47
4. Foto daya hambat bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	49



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia memiliki laut seluas 5,8 juta km² yang terdiri dari 2,8 juta km² perairan laut nusantara, 0,3 km² laut teritorial dan 2,7 juta km² adalah zona ekonomi eksklusif. Selain itu, Indonesia memiliki perairan terbuka lainnya seperti sungai, danau, rawa, persawahan dan estuaria tempat hidup dan berkembangnya berbagai jenis ikan, hal tersebut merupakan habitat hidupnya berbagai jenis biota termasuk ikan yang dapat dimanfaatkan sebagai bahan pangan untuk mencukupi kebutuhan protein masyarakat Indonesia. Total potensi produksi lestari sumber daya perikanan laut Indonesia adalah 6,4 juta ton pertahun. Untuk mewujudkan Indonesia sebagai negara penghasil produk kelautan dan perikanan terbesar di dunia tahun 2015, Kementerian Kelautan dan Perikanan sesuai dengan RPJMN 2010-2014 telah menargetkan peningkatan produksi perikanan budidaya hingga 353 %, yaitu dari 5,37 juta ton pada tahun 2010 menjadi 16,9 juta ton pada tahun 2014 (Anonymous^a, 2011).

Penyakit ikan adalah segala sesuatu yang dapat menimbulkan gangguan pada ikan, baik secara langsung maupun tidak langsung. Gangguan terhadap ikan dapat disebabkan oleh organisme lain, pakan maupun kondisi lingkungan yang kurang menunjang kehidupan ikan. Dengan demikian timbulnya serangan penyakit ikan di kolam merupakan hasil interaksi yang tidak serasi antara ikan, kondisi lingkungan dan organism penyakit. Interaksi yang tidak sesuai ini dapat menyebabkan ikan stres, sehingga mekanisme pertahanan diri yang dimilikinya menjadi lemah dan akhirnya mudah terserang penyakit (Prajitno, 2005).

Penanggulangan hama dan penyakit ikan selama ini tertumpu pada penggunaan antibiotik dan disinfektan. Hal ini dapat dimengerti karena antibiotik mudah didapat, praktis dan apabila tepat penggunaannya cukup efektif, sehingga pada

saat yang mendesak pengobatan sering tidak dapat dihindarkan. Penggunaan antibiotik secara terus menerus dapat menimbulkan masalah, yaitu timbulnya patogen yang resisten, terakumulasi residu antibiotik di dalam tubuh ikan, maupun pencemaran lingkungan yang akhirnya dapat mempengaruhi organisme perairan yang berguna (Kamiso, Triyanto, *et al.*, 1996).

Penanggulangan penyakit pada ikan dapat dilakukan dengan tiga cara, yaitu dengan melakukan pemberian obat-obatan secara kimia dan secara alami, pemberian imunostimulan dan pemberian vaksinasi, pada penelitian ini untuk menanggulangi penyakit pada ikan dapat dilakukan dengan cara menggunakan obat-obatan secara alami, yaitu dengan menggunakan ekstrak rumput laut. Rumput laut selama ini dimanfaatkan sebagai makanan untuk manusia. Akan tetapi, dengan semakin banyaknya kemajuan ilmu pengetahuan, pemanfaatan rumput laut sudah digunakan juga sebagai bahan baku pada industri obat-obatan, tekstil, minuman, kosmetik, pasta gigi dan sebagainya (Indriani, Heti, *et al.*, 2003).

Cara umum untuk pengendalian bakteri *Vibrio harveyi* umumnya menggunakan bahan kimia maupun antibiotik tetapi kurang efektif karena tingkat keberhasilannya masih sangat rendah. Untuk itu, perlu dicari metode lain yang lebih efektif serta berwawasan lingkungan. Alternatif pengendalian yang dapat dilakukan dengan cara biologis yaitu memanfaatkan potensi dari *Gracilaria verucosa* sebagai antibakteri. Ganggang merupakan salah satu sumber makanan yang mengandung senyawa antioksidan. Jenis ganggang di Indonesia yang mempunyai nilai ekonomis dan yang sering digunakan adalah ganggang merah karena komposisinya sangat kompleks, yaitu : agar-agar, karagenan, furcellaran, klorofil, karoten, fikobilin yang terdiri dari fikosianin dan fikoeritrin, protein, lemak, klor, kalium, natrium, magnesium, belerang, silikon, fosfor, kalsium, besi, iodium, dan brom (Lestario, sugiarto, *et al.*, 2008).

Menurut penelitian, alga merah memiliki kandungan kimia karagenan dan senyawa fenol, terutama flavonoid (Suptijah, 2003). Karagenan, senyawa polisakarida yang dihasilkan dari beberapa jenis alga merah memiliki sifat antimikroba, antiinflamasi, antipiretik, antikoagulan dan aktivitas biologis lainnya. Dimana telah diteliti aktivitas antibakteri pada karagenan yang dihasilkan oleh alga merah. Selain karagenan yang merupakan senyawa metabolit primer rumput laut tersebut diperkirakan senyawa metabolit sekundernya juga dapat menghasilkan aktivitas antibakteri (Shanmugam dan Mody, 2002).

1.2 Rumusan Masalah

Vibrio harveyi adalah bakteri gram negatif. Bakteri tersebut terdapat di air payau. Bakteri *Vibrio harveyi* adalah penyebab vibriosis yang mampu menginfeksi berbagai macam hewan air termasuk udang (Julian, Laland, *et al.*, 2012).

Munculnya penyakit disebabkan oleh bakteri yang sering menginfeksi. Bakteri tersebut sangat merugikan bagi pembudidaya karena menyebabkan kematian masal organisme budidaya. Bakteri *Vibrio harveyi* terdapat pada perairan payau. Penggunaan antibiotik secara terus menerus dapat menimbulkan masalah, yaitu timbulnya patogen yang resisten, pencemaran lingkungan yang akhirnya dapat mempengaruhi organisme perairan. Oleh karena itu, diperlukan cara alternatif yaitu produk alam dengan memanfaatkan bahan aktif yang terkandung pada tanaman dan buah. Pemanfaatan *Gracilaria verrucosa* dengan alasan diketahui memiliki fungsi sebagai antibakteri.

Salah satu contoh senyawa yang terkandung dalam *Gracilaria verrucosa* adalah senyawa fenolik. Senyawa-senyawa yang diisolasi dari rumput laut diketahui memiliki fungsi sebagai antibakterial (bakterisidal). Senyawa-senyawa tersebut antara lain asam amino, terpenoids, phlorotanin, asam acrylic, senyawa phenol,

steroid, hlogenated keton dan alkanes, cyclic polysulphida dan asam lemak (Mtolera dan Semesi, 1996).

Berdasarkan uraian di atas, rumusan masalah dalam penelitian ini adalah:

- Apakah pemberian ekstrak kasar dari *Gracilaria verrucosa* dapat menghambat bakteri *Vibrio harveyi* ?

1.3 Tujuan Penelitian

Untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verucossa* terhadap daya hambat bakteri *Vibrio harveyi*.

1.4 Hipotesis

- H_0 : Diduga Pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* tidak mempengaruhi daya hambat bakteri *Vibrio harveyi*.
 H_1 : Diduga Pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* dapat mempengaruhi daya hambat bakteri *Vibrio harveyi*.

1.5 Kegunaan

Penelitian ini diharapkan dapat memberikan informasi tentang kemampuan ekstrak kasar dari *Gracilaria verucossa* terhadap daya hambat bakteri *Vibrio harveyi*, sehingga dapat dipakai sebagai dasar dalam penelitian selanjutnya untuk menanggulangi penyakit yang diakibatkan oleh bakteri patogen.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan di Labolatorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang pada bulan Desember 2012 - Juni 2014.

2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 *Gracilaria verrucosa*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi

Klasifikasi alga merah *Gracilaria verucossa* menurut Anonymous^b (2012), sebagai berikut :

Filum : Rhodophyta

Kelas : Florideophyceae

Ordo : Gracilariales

Famili : Gracilariaceae

Genus : *Gracilaria*

Spesies : *Gracilaria verucossa*

Rumput laut (*seaweed*) merupakan tanaman makro alga yang hidup di laut, tidak memiliki akar, batang, daun sejati dan umumnya hidup di dasar perairan. Fungsi akar, batang dan daun yang tidak dimiliki rumput laut tersebut digantikan oleh thallus. Rumput laut disebut tanaman karena memiliki klorofil (zat hijau daun) sehingga bisa berfotosintesis (Juneidi, 2004).

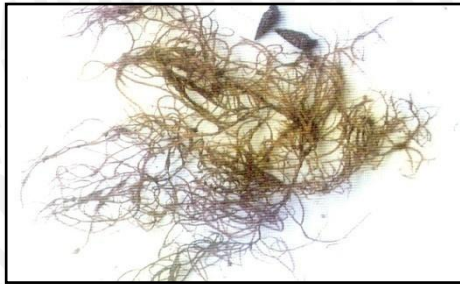
Gracilaria verrucosa berbentuk rumpun, dengan tipe percabangan tidak teratur, *dichotomous*, *alternate*, *pinnate*, ataupun bentuk-bentuk percabangan yang lain.

Thallus pada umumnya berbentuk silindris atau agak memipih, Ujung-ujung thallus umumnya meruncing, permukaan thallus halus atau berbintil-bintil.

Keadaan permukaan thallus yang berbintil, umumnya ditemukan pada tumbuhan dalam bentuk karposporofit. Panjang thallus sangat bervariasi, sampai mencapai lebih dari 60 cm (Sjafrie, 1990).

Ciri-ciri *Gracilaria verrucosa* adalah memiliki thallus silindris, licin, berwarna kuning-coklat atau kuning-hijau. Percabangan berselang seling tidak beraturan, kadang-kadang berulang-ulang memusat ke bagian pangkal. Cabang-cabang

lateral memanjang menyerupai rambut, ukuran panjang sekitar 250 mm dengan diameter thallus 0,5-1,5 mm (Atmadja, 1996). Gambar dari *Gracilaria verrucosa* dapat dilihat pada Gambar 1.



Gambar 1. *Gracilaria verrucosa* (Anonymous^c, 2013).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran

Sjafrie (1990), menyatakan bahwa *Gracilaria verrucosa* umumnya hidup sebagai fitobentos, melekat dengan bantuan cakram pelekat pada substrat padat. Terdiri dari kurang lebih 100 spesies yang menyebar luas dari perairan tropis sampai subtropis. Hal ini menyebabkan beberapa ilmuwan menyebutnya sebagai spesies yang kosmopolit. *Gracilaria verrucosa* hidup di daerah litoral dan sub litoral, sampai kedalaman tertentu, yang masih dapat dicapai oleh penetrasi cahaya matahari. Beberapa jenis hidup di perairan keruh, dekat muara sungai.

Rumput laut jenis *Gracilaria verrucosa* merupakan salah satu jenis alga merah (Rhodophyta) yang tumbuh di daerah tropik dan sub tropik yang tumbuh dominan di perairan laut dangkal (Komarawidjaja dan Kurniawan, 2008).

2.1.3 Manfaat dan Kegunaan

Pengembangan upaya menggali potensi laut sangat menarik perhatian, bukan saja terhadap pembudidayaannya tetapi juga terhadap kelestarian sediaan alaminya. Salah satu diantaranya adalah rumput laut, yang merupakan sumber bahan pangan dan sumber bahan obat – obatan maupun industri. Rumput laut selama ini dimanfaatkan sebagai makanan untuk manusia. Akan tetapi, dengan

semakin banyaknya kemajuan ilmu pengetahuan, pemanfaatan rumput laut sudah digunakan juga sebagai bahan baku pada industri obat-obatan, tekstil, minuman, kosmetik, pasta gigi dan sebagainya (Indriani, Heti, *et al.*, 2003).

Gracilaria verrucosa merupakan salah satu jenis rumput laut penghasil agar-agar yang tumbuh di Indonesia. Jenis *Gracilaria verrucosa* ini banyak dibudidayakan di Indonesia karena proses pemeliharaan yang mudah. *Gracilaria verrucosa* sebagai penghasil agar, banyak dimanfaatkan untuk pembuatan media tumbuh bakteri dan produk makanan (Teddy, 2009).

2.1.4 Bahan Aktif

Senyawa-senyawa yang diisolasi dari rumput laut diketahui memiliki fungsi sebagai antibakterial (bakterisidal). Senyawa-senyawa tersebut antara lain asam amino, terpenoids, phlorotannin, asam acrylic, senyawa phenol, steroid, halogenated keton dan alkanes, cyclic polysulphida dan asam lemak (Mtolera dan Semesi, 1996).

Alga merah juga mengandung senyawa phenol dari golongan florotannin yang memiliki kemampuan antibakteri dan antifungi (Chkhikvishvili dan Ramazanov, 2000). Ballantine, Gerwick, *et al.*, (1987) menyatakan bahwa *Gracilaria verrucosa* memiliki kemampuan antibakteri pada jenis *Bacillus subtilis* dan *Staphylococcus aureus*.

Kakita, Fukuoka, *et al.*, (1999) menyatakan bahwa *Gracilaria verrucosa* memiliki bahan aktif hemagglutinin. Terdapat 4 jenis hemagglutinin yang terkandung di dalam *G. verrucosa*. Pertama adalah GVA-1 yang merupakan protein atau glycoprotein dengan kandungan karbohidrat yang rendah. Kedua adalah proteoglycan dengan berat 49 kDa. Ketiga adalah H-GVH, polisakarida sulfat dengan berat molekul yang besar. Keempat adalah L-GVH dengan berat molekul yang rendah. Jenis yang pertama dan kedua, memiliki berat molekul rendah, struktur oligomer dan tidak memiliki ikatan disulfida. Selain sebagai bahan

antibakteri, rumput laut juga dapat digunakan sebagai salah satu bahan imunostimulan. Karagenan, substansi yang banyak terdapat pada alga merah (Rhodophyta) termasuk di dalamnya *Gracilaria verrucosa*, memiliki kandungan bahan aktif β -Glucan yang dapat digunakan sebagai imunostimulan untuk meningkatkan sistem kekebalan tubuh baik pada ikan maupun udang.

Prajitno (2006) mengatakan bahwa beberapa jenis rumput laut dari perairan pantai Indonesia mempunyai aktivitas sebagai zat antibakteri, antara lain *E. cottonii*, *E. spinosum*, *G. verrucosa*, *G. confervoides*, *Sargassum sp*, *H. opuntia* yang menunjukkan aktivitas antibakteri patogen pada *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* dan *Vibrio harveyi*.

Menurut Prajitno (2006) menyatakan bahwa pada *E. cottonii*, *Gracilaria verrucosa* maupun *H. opuntia* pada konsentrasi 3% mempunyai sifat bakteriostatik dan bakteriosidal terhadap bakteri *Vibrio harveyi*, pada ekstrak *H. opuntia* mengandung 52,25% fenolik (flavonoid). Pelczar, Roger, *et al.*, (1986), menyatakan bahwa persenyawaan fenolik sebagai antibakteri menghambat pertumbuhan dan metabolisme bakteri dengan cara merusak membran sitoplasmadan mendenaturasi protein sel.

Golongan senyawa kimia utama yang mempunyai sifat antibakteri adalah fenol, alkohol, halogen, logam berat, zat warna, deterjen, senyawa kuartar, asam dan basa. Senyawa fenol dapat berinteraksi dengan komponen dinding sel bakteri sehingga mengakibatkan permeabilitas pada sel bakteri dan dapat juga berdifusi kedalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat atau mati, selain itu senyawa ini juga dapat menembus membran dan berinteraksi dengan material genetik sehingga bakteri mengalami mutasi (Trisnawati dan Susanto, 2003).

2.1.5 Ekstrak Kasar

Menurut Ridlo dan Rini (2009) menyatakan bahwa ekstrak dapat dibagi dalam dua kategori, yaitu ekstrak kasar dan ekstrak murni. Ekstrak kasar artinya ekstrak yang mengandung semua bahan yang tersari dengan menggunakan pelarut organik, sedangkan ekstrak murni adalah ekstrak kasar yang telah dimurnikan dari senyawa senyawa melalui proses penghilangan lemak, penyaringan menggunakan resin atau adsorben.

Menurut Jasmanidar (2014) menyatakan bahwa dalam proses ekstraksi suatu bahan tanaman, banyak faktor yang dapat mempengaruhi kandungan senyawa hasil ekstraksi diantaranya: jenis pelarut, konsentrasi pelarut, metode ekstraksi dan suhu yang digunakan untuk ekstraksi. Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh variasi pelarut terhadap rendemen ekstrak.

2.1.6 Daya Hambat

Uji aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. Disc diffusion test atau uji difusi disk dilakukan dengan mengukur diameter zona bening (clear zone) yang merupakan petunjuk adanya respon penghambatan pertumbuhan bakteri oleh suatu senyawa antibakteri dalam ekstrak. Syarat jumlah bakteri untuk uji kepekaan/sensivitas yaitu 10⁵-10⁸ CFU/mL (Idris, 2013).

Diameter zona hambat atau daerah terang diukur dengan menggunakan jangka sorong. Perhitungan aktivitas dilakukan secara deskriptif dengan mengukur diameter zona hambat setelah 24 jam masa inkubasi. Tingkatan daya hambat ditentukan seperti yang tercantum dalam Tabel 1 di bawah ini (Zainuddin, 2006).

Tabel 1. Klasifikasi Respon Hambatan (Greenwood, (1995) dalam Riniwati (2012)

Diameter Zona Bening	Respon Hambatan Pertumbuhan
≤ 10 mm	Tidak ada
11 – 15 mm	Lemah
16 – 20 mm	Sedang
> 20 mm	Kuat

2.2 Bakteri *Vibrio harveyi*

Menurut Dwijoseputro (1990) bahwa klasifikasi *Vibrio harveyi* adalah sebagai berikut :

Devisio : Protophyta

Class : Schizomicetes

Ordo : Pseudomonadates

Sub ordo : Pseudomonadineae

Famili : Spirillaceae

Genus : *Vibrio*

Species : *Vibrio harveyi*

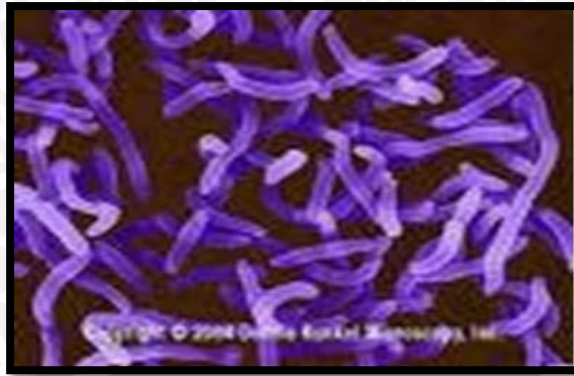
Volk and Wheeler (1993) bahwa ciri-ciri bakteri *Vibrio* adalah berbentuk koma, kadang-kadang tumbuh sebagai benang membelit atau berbentuk huruf S. Memiliki bulu cambuk yang terletak pada salah satu ujung batang, termasuk bakteri gram negatif yang bersifat anaerobik fakultatif dan tidak tahan dalam suasana asam.

Bakteri *Vibrio harveyi* termasuk genus *Vibrio*, memiliki ciri-ciri morfologi dan fisiologi sebagai berikut: bentuk koloni bulat, elevasi cembung, berwarna krem dengan diameter 2-3 mm pada media SWC-agar. Bakteri *Vibrio harveyi* bersifat gram negatif, sel tunggal berbentuk batang pendek yang bengkok (koma) atau lurus, motil, oksidase positif, sensitif terhadap uji vibriostatik 0/129, tidak membentuk H₂S, tidak membentuk gas dari fermentasi terhadap Dglukosa,

tumbuh pada media dengan penambahan 1-6 % NaCl, dan mempunyai flagella pada salah satu kutub selnya (Tepu, 2006).

Vibrio harveyi terlihat berpendar jika diamati di ruang gelap dan pendarannya dapat bertahan 2-3 hari pada media *Thiosulphate Citrate Bile-Salt Sucrose* (TCBS) (Lavilla-Pitogo *et al*, 1992). Kemampuan berpendar merupakan hasil aktivitas enzim luciferase yang dapat berfungsi sebagai katalisator dalam proses oksidasi reduksi. Proses oksidasi melibatkan flavin mononukleotida dan aldehid alifatik rantai panjang sebagai substratnya. Senyawa-senyawa tersebut masing-masing diubah menjadi flavin mononukleotida dan asam lemak disertai dengan pelepasan emisi cahaya dengan panjang gelombang sekitar 490 nm. Gen-gen yang mengkodekan fungsi berpendaran ini disandikan dalam suatu operon yang disebut dengan operon *lux* (Meighen, 1991).

Pada umumnya bakteri dapat tumbuh pada pH media 5,00-8,00 dengan pH optimal sekitar 7,00. Pada bakteri patogen akan tumbuh baik pada pH netral (7,00) atau sedikit basa (7,40). Apabila bakteri tersebut berada pada suasana asam, sedangkan kisarannya tidak memungkinkan maka pertumbuhannya akan terhambat. Bakteri juga peka terhadap pH basa, tetapi efek secara umum tidak terlalu merusak dibandingkan dengan pH asam. Aktifitas dan pertumbuhan bakteri juga dipengaruhi oleh faktor lingkungan yang lain yaitu faktor biotik yang terdiri dari faktor fisika dan kimia. Faktor fisika meliputi temperatur, kebasahan, nilai osmotik dan radiasi, sedangkan faktor kimia meliputi zat-zat kimia (Dwijoseputro, 1990). Gambar dari bakteri *Vibrio harveyi* dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Koloni bakteri *Vibrio harveyi* (Anonymous^d, 2013).

2.3 Ekstraksi

Ekstraksi merupakan salah satu proses pemisahan senyawa dari campurannya dengan menggunakan pelarut yang sesuai. Ragam ekstraksi yang tepat bergantung pada tekstur dan kandungan air bahan tumbuhan yang diekstraksi dan pada jenis senyawa yang diisolasi. Ekstraksi dibedakan menjadi 2 macam yaitu ekstraksi secara dingin dan ekstraksi secara panas (Samad, 2010).

a. Ekstraksi Secara Dingin

- **Metode maserasi** : Cara pengestrakan sederhana dengan cara merendam sampel dalam suatu solven selama beberapa hari pada suhu kamar dan terlindung dari cahaya. Metode ini digunakan jika sampel mempunyai sifat mudah larut dalam pelarut.
- **Metode soxhletasi** : Metode ekstraksi sampel secara berkesinambungan, cairan ekstrak dipanaskan hingga menguap, uap cairan ekstrak akan terkondensasi menjadi molekul-molekul air oleh pendingin balik dan turun mengekstrak sampel dalam kondensor dan selanjutnya masuk lagi ke dalam labu alas bulat setelah melewati pipa sifon.

- **Metode perklorasi** : Cara ekstraksi dengan mengalirkan sampel dalam bentuk serbuk yang telah dibasahi.

b. Ekstraksi Secara Panas

- **Metode refluks** : Metode ini banyak digunakan jika sampel yang akan diekstrak mempunyai tekstur kasar dan tahan terhadap pemanasan langsung.
- **Metode destilasi uap** : Metode yang digunakan untuk mengekstrak sampel yang mengandung minyak yang mudah menguap atau mengandung senyawa kimia yang mempunyai titik didih tinggi pada tekanan udara normal.

Metode yang digunakan untuk *Gracilaria verrucosa* adalah metode maserasi. Metode maserasi ialah proses pengekstrakan dengan menggunakan pelarut dengan beberapa kali pengocokan atau pengadukan pada temperatur ruangan kamar. Maserasi sampel dilakukan dengan menggunakan pelarut etanol 95 % karena sifatnya mampu melarutkan hampir semua zat, baik yang bersifat polar, semi polar, dan non polar. Alasan pemilihan metode maserasi karena mempunyai banyak keuntungan dibandingkan dengan metode lainnya. Keuntungan utama metode maserasi yaitu, prosedur dan peralatan yang digunakan sederhana, metode maserasi tidak dipanaskan sehingga bahan alam tidak menjadi terurai (Istiqomah, 2013).

2.4 Uji Aktivitas Antibakteri

Pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi. Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode silinder yaitu meletakkan beberapa silinder yang terbuat dari gelas atau besi

tahan karat di atas media agar yang telah diinokulasi dengan bakteri. Tiap silinder ditempatkan sedemikian rupa hingga berdiri di atas media agar, diisi dengan larutan yang akan diuji dan diinkubasi. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan di sekeliling silinder. Metode lubang yaitu membuat lubang pada agar padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Jumlah dan letak lubang disesuaikan dengan tujuan penelitian, kemudian lubang diisi dengan larutan yang akan diuji. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling lubang. Metode cakram kertas yaitu meletakkan cakram kertas yang telah direndam larutan uji di atas media padat yang telah diinokulasi dengan bakteri. Setelah diinkubasi, pertumbuhan bakteri diamati untuk melihat ada tidaknya daerah hambatan disekeliling cakram (Kusmiyati, 2006).

Menurut Pelczar, Roger, *et al.*, (1986), berdasarkan mekanisme kerjanya, antibakteri dibagi menjadi 5 kelompok, yaitu:

1. Merusak dinding sel yaitu dengan menghambat pembentukan dan mengubahnya setelah selesai terbentuk.
2. Mengganggu permeabilitas sel yaitu dengan merusak membran sel. Fungsi membran sel adalah mempertahankan bahan-bahan dalam sel serta mengatur aliran keluar masuknya bahan lain. Adanya kerusakan pada membran ini mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya.
3. Merubah molekul protein dan asam nukleat yaitu dengan mendenaturasikan protein dan asam nukleat sehingga kerusakan sel tidak dapat diperbaiki lagi karena hidup suatu sel tergantung pada molekul protein dan asam nukleat dalam keadaan alamiah.

4. Menghambat kerja enzim dengan mengganggu reaksi biokimiawi. Penghambatan ini dengan mengakibatkan terganggunya metabolisme sel.
5. Menghambat sintesis asam nukleat dan protein. Gangguan pada pembentukan atau fungsi-fungsi DNA, RNA dan protein dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel, karena zat-zat tersebut memegang peranan penting dalam proses kehidupan normal sel.



3. MATERI DAN METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Peralatan Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : gelas ukur, labu erlenmeyer, cawan petri, autoclave, inkubator, bunsen, tabung reaksi, beaker glass, triangle, pinset, rak tabung reaksi, jarum ose, gunting, mikro pipet, spatula, hot plate, lemari pendingin, sprayer dan mistar.

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan-bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah : Ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa*, biakan murni bakteri *Vibrio harveyi* kepadatan 10^7 sel/ml, diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran, Universitas Brawijaya dengan kepadatan awal 10^8 sel /ml, TCBSA, NB, kapas, tissue, kertas saring, kertas label, aluminium foil, kertas cakram steril, spirtus, aquadest dan alkohol 70%.

3.2 Metode dan Rancangan Penelitian

3.2.1 Metode Penelitian

Metode penelitian yang digunakan adalah metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil atau hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki (Nazir, 1998). Tujuan eksperimen adalah untuk menemukan hubungan sebab dan akibat antara variabel. Hasil yang diperoleh menegaskan bagaimana hubungan kausal antara variabel-variabel yang diselidiki dan seberapa besar hubungan sebab dan akibat tersebut, dengan cara memberikan perlakuan tertentu pada beberapa kelompok eksperimental dan menyediakan kontrol untuk perbandingan. Teknik pengumpulan data dilakukan

dengan observasi langsung atau dengan pengamatan secara langsung (Nazir, 1998).

3.2.2 Uji Aktivitas antimikroba (In-vitro)

a. MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) ini pada dasarnya adalah untuk menentukan secara kualitatif konsentrasi terkecil suatu obat yang dapat menghambat pertumbuhan kuman dalam perbenihan cair oleh suatu obat yang dicampurkan dalam perbenihan. Perbenihan yang dipakai harus merupakan perbenihan yang dapat membunuh kuman secara optimum dan tidak menetralkan obat yang digunakan (Lay, 1994).

b. Uji Pendahuluan

Uji pendahuluan dilakukan untuk mengetahui pelarut yang terbaik dan untuk memperoleh konsentrasi dari ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* sebagai antibakteri. Kemudian diuji cakram dengan menggunakan bakteri *Vibrio harveyi*.

Untuk mengetahui kepadatan bakteri dapat dilakukan dengan cara uji Mc Farland yaitu dengan Standar Mc Farland pada Tabel 2 sebagai berikut :

Tabel 2. Standar Mc Farland

Nomor Tabung	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
BaCl ₂ (ml) 1%	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
H ₂ SO ₄ (ml) 1%	9,9	9,8	9,7	9,6	9,5	9,4	9,3	9,2	9,1	9
Kepadatan E.Coli (x10 ⁸)	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

Parameter yang diamati yaitu besarnya daerah hambatan pada kertas cakram yang sudah direndam pada ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* lalu data yang diperoleh dianalisis dengan menggunakan uji BNT.

c. Metode Cakram

Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan diatas lempengan agar yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambatan pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme. Adapun cara peletakan kertas cakram yaitu kertas cakram dengan *petridisk* minimal 15 mm dan jika jumlah cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram minimal 24 mm (Lay, 1994).

Lebar daerah hambatan ini tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan. Cara cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu *sensitif* (S), *resisten* (R), *intermediate* (I). Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh ada pergeseran sedikitpun dan pengukuran diameter daerah hambatan dalam millimeter (Roihanah, 2011).

Uji cakram ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* terhadap daya hambat bakteri *Vibrio harveyi* dengan cara mengukur besar daya hambat yang ditampakkan pada kertas cakram.

3.2.3. Rancangan Penelitian

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

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

Keterangan:

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

μ : Nilai tengah umum

- T_i : Pengaruh perlakuan ke-i
- ϵ_{ij} : Pengaruh kesalahan (gallat) percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j
- i : 1, 2, 3 (perlakuan)
- j : 1, 2, 3 (ulangan)

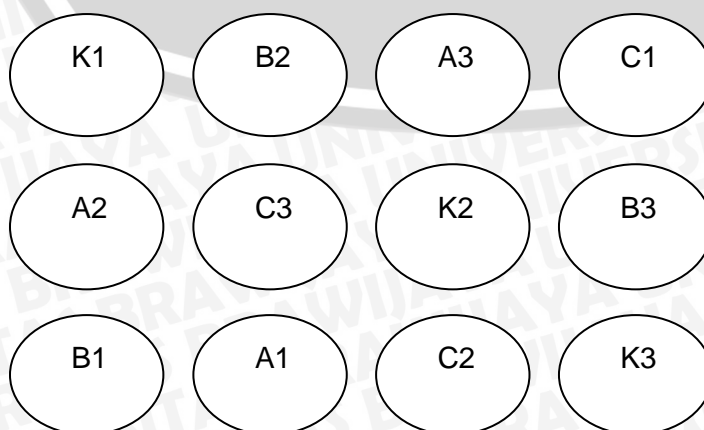
Dalam penelitian yang dilakukan, perlakuan yang diamati adalah pengaruh pemberian ekstrak kasar dari *Gracilaria verrucosa* dengan dosis yang berbeda terhadap daya hambat bakteri *Vibrio harveyi* pada petridisk. Pengamatan didasarkan pada besarnya daerah hambatan yang diukur dengan satuan milimeter (mm). Menggunakan perbandingan antara ekstrak kasar dengan pelarut, Dalam uji cakram terdapat ulangan sebanyak 3 kali, jumlah sampel yang diamati adalah sebanyak 12 termasuk kontrol. Rancangan perlakuan penelitian dapat dilihat pada Tabel 3.

Tabel 3. Rancangan perlakuan penelitian.

- Bakteri *Vibrio harveyi*

Perlakuan	Ulangan		
	1	2	3
K	K ₁	K ₂	K ₃
A	A ₁	A ₂	A ₃
B	B ₁	B ₂	B ₃
C	C ₁	C ₂	C ₃

Untuk denah penelitian yang digunakan dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Denah Penelitian *Vibrio harveyi*

Keterangan:

K: Pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa*

(Kontrol).

A : Pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* dengan dosis 1 ppt.

B : Pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* dengan dosis 1,5 ppt.

C : Pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* dengan dosis 2 ppt.

1, 2, 3 : Ulangan

3.3 Prosedur Penelitian

3.3.1 Persiapan Penelitian

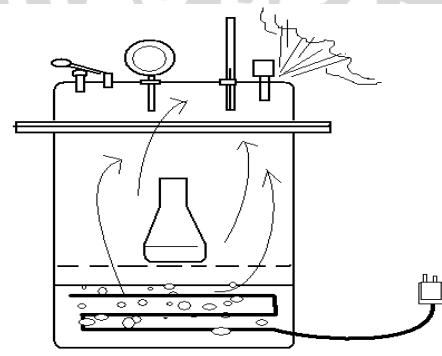
Persiapan penelitian yang akan dilakukan meliputi sterilisasi alat dan bahan, sterilisasi tempat perlakuan dan pelaksanaan penelitian.

a. Sterilisasi Alat dan Bahan

- Alat-alat yang akan digunakan dicuci menggunakan detergen, dikeringkan kemudian dibungkus dengan menggunakan kertas koran dan diikat menggunakan benang.
- Air secukupnya dituang ke dalam *autoclave* (Gambar 4), kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam *autoclave* dan ditutup rapat dengan mengencangkan baut secara simetris.
- Kompor pemanas dinyalakan, setelah mencapai suhu 121°C dan tekanan menunjukkan 1 atm, keadaan ini dipertahankan sampai 15-

20 menit dengan cara membuka dan atau menutup kran uap yang berada di bagian atas tutup *autoclave*

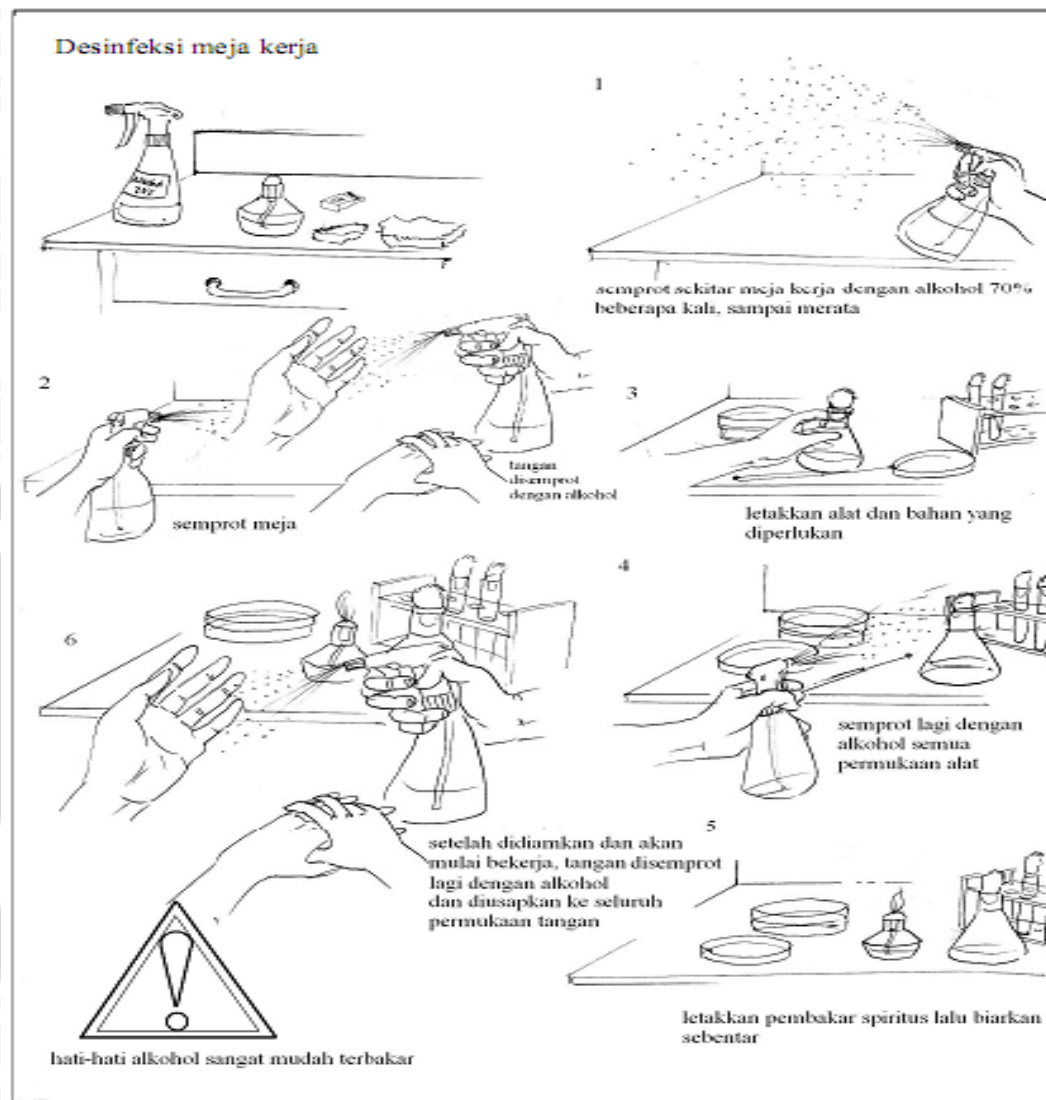
- Kompor dimatikan. Tunggu beberapa saat sampai termometer dan manometer menunjukkan angka 0 (nol), kemudian buka kran uap lalu buka penutup *autoclave* dengan cara simetris.
- Alat dan bahan yang sudah disterilkan diambil.
- Alat yang telah disterilkan disimpan dalam kotak penyimpanan, sedangkan bahan yang telah disterilkan disimpan dalam lemari pendingin.



Gambar 4. Alat Sterilisasi *Autoclave* (Anonymous^e, 2012).

b. Sterilisasi tempat perlakuan

Selain alat dan bahan, tempat dan laboran harus steril guna menghindari kontaminan. Tangan laboran yang bersinggungan, meja dan barang disekitar tempat perlakuan harus selalu dalam kondisi aseptis. Untuk menghindari kontaminasi, tangan laboran dilindungi dengan memakai sarung tangan. Sedangkan untuk penutup mulut, laboran menggunakan masker. Sterilisasi tempat dapat dilakukan dengan cara kimia menggunakan alkohol maupun cara fisika dengan pembakaran langsung menggunakan bunsen maupun dengan penyinaran dengan sinar UV. Sterilisasi dapat dilihat pada Gambar 5.



Gambar 5. Sterilisasi Tempat dan Tangan Laboran (Anonymous^f,2012).

3.3.2 Pelaksanaan penelitian

a. Pembuatan ekstrak *Gracilaria verrucosa*

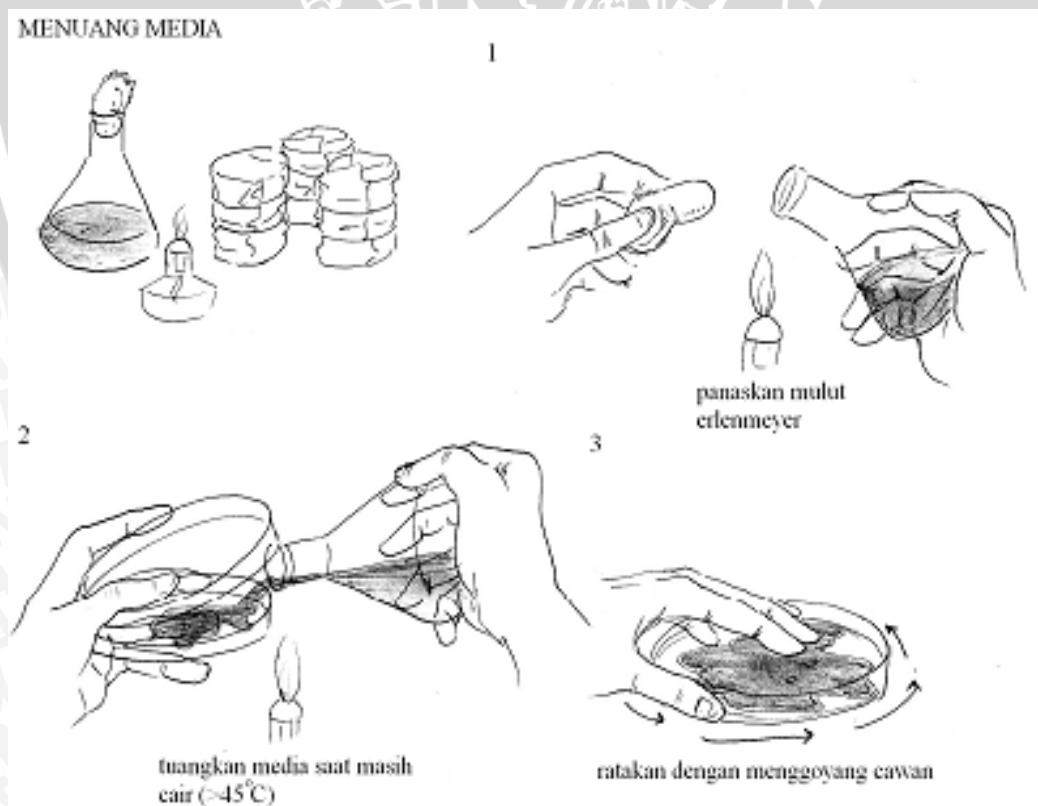
- Disiapkan bahan *G. verrucosa* dalam keadaan kering.
- Dibersihkan dan dipisahkan dari kotoran-kotoran yang menempel
- Dipotong kecil-kecil sampai halus
- Ditimbang sebanyak 200 gram

- Dimasukkan ke dalam plastik dan diberi kertas label
- Disiapkan 4 buah beaker glass
- Dimasukkan bahan ke dalam masing-masing beaker glass sebanyak 20 gram dan ditambahkan dengan pelarut yang berbeda yaitu akuades, aseton, etanol 80% dan etanol 96% sebanyak 60 ml
- Didiamkan selama 24 jam
- Disiapkan bahan *Gracilaria verrucosa* yang telah dimaserasi selama 24 jam
- Disaring bahan dengan menggunakan bantuan kertas saring dan corong ke dalam botol
- Ditutup botol dan diberi kertas label sebagai penanda
- Di evaporasi
- Didapatkan hasil ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa*
- Dimasukkan hasil ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* ke dalam cawan petri
- Di tambahkan aquadest
- Di waterbath dengan suhu 50°C, di tunggu sampai terbentuk gel
- Didapatkan hasilnya.

b. Pembuatan Media TCBSA (Thiosulfate Citrat Bilesalt Source Agar)

- Ditimbang 10,56 gram TCBSA
- Dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 120 mL aquadest
- Diaduk pada kondisi hangat diatas hotplate sampai tercampur rata

- Ditutup erlenmeyer dengan kapas dan alumunium foil, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Ditiriskan erlemeyer setelah disterilasi
- Dituangkan ke dalam cawan petri yang telah disterilasi sebelumnya sebanyak 12 cawan petri.
- Disterilasi dengan menggunakan bunsen saat penuangan (Gambar 6)
- Ditunggu sampai mengeras (menjadi agar)
- Dibalik cawan petri
- Diletakkan cawan petri ke dalam plastik dan dimasukkan ke dalam lemari pendingin



Gambar 6. Teknik Penuangan Media (Anonymous⁹, 2012)

c. Pembuatan NB (*Nutrient Broth*)

- Ditimbang 0,08 gram NB
- Dimasukkan ke dalam erlenmeyer yang berisi 10 ml aquadest
- Diaduk hingga larut sempurna dan berwarna kuning
- Ditungkat erlenmeyer menggunakan kapas dan aluminium foil, kemudian disterilkan dalam autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit.
- Ditiriskan erlenmeyer setelah disterilisasi
- Disimpan dalam lemari pendingin agar tahan lama

d. Pemiakan bakteri *V.harveyi*

- Larutan NB disiapkan dalam tabung reaksi sebanyak 10 ml.
- Jarum ose dipanaskan diatas bunsen sampai berpijar, setelah dingin jarum ose disentuh kebiakan murni *Vibrio harveyi* kemudian dicelupkan ke NB.
- Larutan NB dibiarkan 12-24 jam dalam inkubator pada suhu 35°C.
- Disiapkan petridisk yang berisi media TCBSA.
- Dituang bakteri ke dalam media TCBSA, diratakan dengan menggunakan triangle
- Media TCBSA di inkubasi dalam inkubator dengan suhu 35 °C selama 24 jam.

e. Pengenceran bakteri *V. harveyi*

Bakteri *V. harveyi* diperoleh dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran dengan kepadatan 10^8 sel/ml sebanyak 10 ml. Bakteri yang diinginkan yaitu dengan kepadatan 10^7 sel/ml, sehingga untuk mendapatkan kepadatan bakteri tersebut harus dilakukan perhitungan pengenceran dengan menggunakan rumus menurut Cappucino and Sherman (1988), sebagai berikut :

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

Dimana :

N_1 :Kepadatan populasi bakteri dalam media NB (sel/ml)

N_2 :Kepadatan populasi bakteri yang dikehendaki (sel/ml)

V_1 :Volume suspensi bakteri yang digunakan untuk menjadi kepadatan yang diinginkan

V_2 :Volume pengenceran yang dibutuhkan

Contoh perhitungan sebagai berikut :

$$N_1 \cdot V_1 = N_2 \cdot V_2$$

$$10^8 \cdot 1 = 10^7 \cdot V_2$$

$$10^8 = 10^7 \cdot V_2$$

$$V_2 = 10^8 / 10^7$$

$$V_2 = 10^1 \text{ ml}$$

$$V_2 = 10 \text{ ml}$$

f. Uji MIC

- 9 tabung reaksi steril disiapkan dan masing-masing diberi label 0 ppt; 0,5 ppt; 1 ppt; 1,5 ppt; 2 ppt; 2,5 ppt; 3 ppt; 4 ppt; 5 ppt; kemudian pada masing-masing tabung diisi dengan 5 ml media cair NB.
- Pada tabung pertama 50% adalah 5 ml ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* dan 5 ml media cair (NB) kemudian dihomogenkan, selanjutnya dilakukan pengenceran berseri dengan cara mengambil 5 ml dari tabung pertama dan diletakkan pada tabung kedua dan

hal ini dilakukan terus menerus hingga pada tabung yang terakhir terdapat 9 ml larutan.

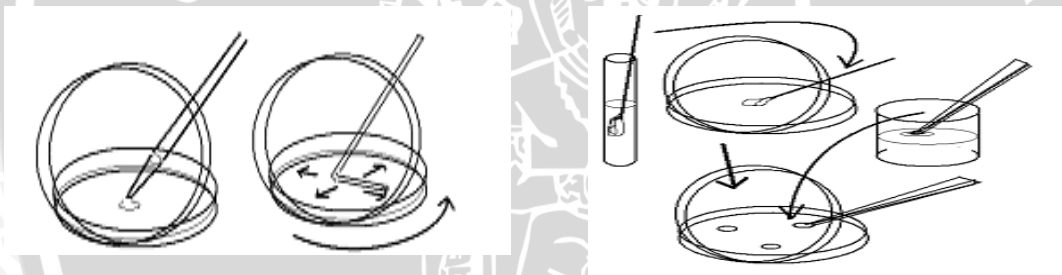
- Biakan murni *Vibrio harveyi* ditanam sebanyak 2 inokulum ke dalam masing-masing tabung sehingga pada tabung K+ hanya berisi NB saja, kemudian tabung tersebut diinkubasi pada suhu 35°C selama 24 jam. Setelah 24 jam masing-masing tabung dilihat kekeruhannya dengan menggunakan Mc Farland.
- Diambil hasil yang mendekati kontrol positif untuk konsentrasi terendah.
- Pertumbuhan bakteri diamati, apabila medium tampak keruh menandakan bahwa bakteri dapat tumbuh. Hal ini berarti bahwa dosis yang digunakan tidak mampu menghambat pertumbuhan bakteri dan sebaliknya.

g. Uji cakram daya hambat

- Disiapkan hasil ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* (Etanol 96%)
- Dicairkan dengan dosis (1ppt; 1,5 ppt; 2 ppt)
- Disiapkan kertas cakram steril
- Direndam kertas cakram steril ke dalam ekstrak *Gracilaria verrucosa* dengan dosis yang berbeda selama 15-30 menit
 - Disiapkan 12 petridisk yang telah terdapat media TCBSA
 - Diambil 100µL bakteri (10^7 sel/ml) dan dimasukkan ke dalam cawan petri yang telah berisi media agar dengan ketebalan \pm 6 mm.
 - Diratakan bakteri *Vibrio harveyi* dengan cara (triangle)
 - Ditumbuhkan selama 24 jam di inkubator
 - Disiapkan media TCBSA yang telah ditumbuhi bakteri
 - Diambil rendaman kertas cakram

- Diletakkan kertas cakram pada media TCBSA yang sudah diratakan menggunakan bakteri *Vibrio harveyi*
- Disimpan di dalam inkubator selama 24 jam
- Diukur diameter zona hambat bakteri *Vibrio harveyi*
- Didapatkan hasil zona hambat

Untuk mengetahui sifat dari setiap konsentrasi yang dilakukan, maka setelah pengukuran diameter zona hambat dilakukan inkubasi kembali selama 24 jam pada suhu 35°C. Apabila pada daerah bening terlihat adanya pertumbuhan bakteri, ini berarti dosis tersebut bersifat bakteriostatik; tetapi apabila sebaliknya, berarti dosis tersebut bersifat bakteriosidal.



Gambar 7. Metode Penanaman Bakteri Dengan Spread dan Metode Pengujian Antibiotik Kirby- Bauer (Anonymous^h, 2012).

Cara peletakan kertas cakram dalam petridisk harus memenuhi kaidah – kaidah sebagai berikut :

- Jarak kertas cakram dengan tepi petridisk 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 sedikitpun bergeser, karena mengurangi validasi pengukuran.

- Pengukuran berdasarkan diameter daerah hambatan dalam milimeter.

Hambatan akan tampak sebagai daerah bening di sekeliling cakram yang menunjukkan bahwa pada daerah tersebut tidak ditumbuhi bakteri. Lebar daerah hambatan tergantung daya resap obat ke dalam agar dan tingkat resistensi bakteri terhadap dosis obat.

3.4 Parameter Uji

Parameter uji terdiri dari parameter utama dan parameter penunjang. Parameter utama yaitu pengukuran diameter kertas cakram yang dinyatakan dengan mm ditambah daerah bening yang ada di sekeliling kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong. Sedangkan parameter penunjangnya yaitu suhu inkubasi.

3.5 Analisis Data

Data yang diperoleh dilakukan analisis secara statistik dengan menggunakan analisis keragaman atau uji F (ANOVA) sesuai dengan rancangan yang dipergunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL). Ini dilakukan untuk mengetahui pengaruh perlakuan (variabel bebas) terhadap respon parameter yang diukur atau uji F. Apabila nilai uji F berbeda nyata atau berbeda sangat nyata maka dilanjutkan dengan uji Tukey (BNT) untuk menentukan perbedaan antar dua perlakuan. Untuk mengetahui hubungan antara perlakuan dilihat notasinya.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Rendemen dan kadar air ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa*

Rendemen hasil ekstraksi bergantung pada sifat kelarutan komponen bioaktifnya. Komponen bioaktif dari *Gracilaria verrucosa* cenderung bersifat polar. Pembuatan ekstrak dengan menggunakan etanol 96% dilakukan dengan metode maserasi, dengan cara menambahkan sampel *Gracilaria verrucosa* sebanyak 20 gr ke dalam 60 ml etanol 96% dan menghasilkan berat bahan maserasi sebanyak 80 gr. Nilai rendemen *Gracilaria verrucosa* sebesar 1,95%,

$$\begin{aligned} \text{diperoleh dari perhitungan sebagai berikut :} &= \frac{\text{Berat sampel (Berat evaporasi)}}{\text{Berat awal sampel}} \times 100\% \\ &= \frac{0,39}{20} \times 100\% \\ &= 1,95\% \end{aligned}$$

Nilai rendemen dipengaruhi oleh jenis pelarut yang digunakan, hasil dapat berbeda pada setiap jenis dan komponen senyawa aktifnya. Pelarut yang sesuai akan meningkatkan nilai rendemen. Menurut Harborne (1984), bahwa senyawa fenol cenderung larut dalam pelarut polar.

Pada dasarnya, nilai rendemen tidak dapat dibandingkan karena jenis dan karakteristik kelarutan senyawa yang berbeda. Hal tersebut bisa terjadi karena senyawa aktif pada masing-masing jenis rumput laut mempunyai spesifikasi yang berbeda dalam melarutkan bahan aktifnya. Menurut Julyasih (2009), penggunaan pelarut paling berpengaruh dalam mempengaruhi kepekatan atau penentuan pigmen yang terdeteksi. Aturan umum dari polaritas adalah polar menyukai yang polar sebaliknya yang tidak polar menyukai tidak polar.

Kadar air dari *Gracilaria verrucosa* sebesar 10% diperoleh dari perbandingan berat awal *Gracilaria verrucosa* sebelum dikeringkan (1kg) dikurangi berat akhir *Gracilaria verrucosa* setelah dikeringkan 800 gr. Range nilai kadar air tersebut

masih dalam range yang disarankan. Kandungan air rumput laut segar, sama seperti tanaman pada umumnya yaitu setelah pengeringan dengan udara menjadi 10-20% (Astawan *et al.*, 2001).

Kadar air pada rumput laut merupakan komponen yang penting karena berhubungan dengan mutu rumput laut. Tingginya kadar air pada rumput laut dapat mempercepat terjadinya kerusakan akibat adanya aktivitas mikroorganisme. Anwariyah (2011), menambahkan bahwa persentase kadar air ini dipengaruhi oleh habitat dan lingkungannya. Kandungan air dalam suatu bahan ikut menentukan *acceptability*, kesegaran dan daya tahan bahan tersebut. Sehingga dapat disimpulkan, semakin rendah kandungan kadar air pada suatu bahan, maka kualitas bahan tersebut akan semakin baik.

4.2 Hasil pelarut yang terbaik

Pada proses maserasi, dibutuhkan pelarut yang sesuai dengan tingkat kepolaran suatu bahan aktif yang terkandung pada rumput laut. Pemilihan jenis pelarut yang sesuai dilakukan untuk dapat mengikat senyawa aktif lebih banyak sehingga didapatkan rendemen yang tinggi. Pada penelitian ini digunakan berbagai bahan pelarut yang bersifat polar diantaranya etanol 80%, etanol 96% aseton dan akuades sebagai pembanding. Hal tersebut didasari oleh penelitian yang dilakukan oleh Zaheer *et al.* (2011), yang menggunakan pelarut polar chloroform, petroleum ether dan kloroform untuk maserasi rumput laut *Spathodea campalunata* dan menghasilkan kandungan senyawa fenol positif pada pelarut polar yang digunakan.

Berdasarkan penelitian pendahuluan yang telah dilakukan dengan cara menghitung nilai rendemen dari masing-masing pelarut yaitu untuk pelarut etanol 80 % nilai rendemen yang diperoleh sebesar 1,70%. Rendemen untuk pelarut etanol 96 % sebesar 1,95%. Kemudian nilai rendemen untuk pelarut aseton

sebesar 1,05%. Sedangkan nilai rendemen menggunakan aquadest yaitu sebesar 1,25% . Jadi, dari keempat pelarut hasil nilai rendemen yang terbaik yaitu menggunakan pelarut etanol 96 % yaitu sebesar 1,95%.

4.3 Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Hasil pengamatan dibandingkan dengan larutan pambanding (medium TSB 2% ditambahkan konsentrasi ekstrak tanpa suspensi bakteri) sehingga dapat diketahui adanya media yang mulai bening/ jernih yang menunjukkan nilai MIC. Nilai-nilai MIC ditafsirkan sebagai pengenceran tertinggi dan konsentrasi terendah dari sampel (Setiaji, 2009).

Hasil uji MIC dari penelitian mengenai pengaruh pemberian ekstrak kasar alga merah (*Gracilaria verrucosa*) terhadap daya hambat bakteri *Vibrio harveyi* secara In vitro terdapat pada Tabel 4.

Tabel 4. Pengamatan Uji MIC

Kosentrasi (ppt)	Pengukuran spektrofotometer	Indikator warna
0	2,301	Keruh
0,5	0,039	Keruh
1	0,037	Jernih
1,5	0,035	Jernih
2	0,030	Jernih
2,5	0,028	Jernih
3	0,024	Jernih
4	0,019	Jernih
5	0,017	Jernih
Kontrol +	0,584	
Kontrol -	2,371	

Keterangan : Kontrol (+) : Ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa*.

Kontrol (-) : Bakteri *Vibrio harveyi*.

Pengamatan Uji MIC menggunakan spektrofotometer yang dimiliki oleh laboratorium Reproduksi Ikan. Pengamatan tersebut dilakukan di Laboratorium Parasit dan Penyakit Ikan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas

Brawijaya, Malang. Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan, Pengamatan uji MIC didapatkan hasil dimana Kontrol (-) adanya pertumbuhan bakteri, sedangkan pada Kontrol (+) tidak adanya pertumbuhan bakteri. Pada dosis 1 ppt; 1,5 ppt; 2 ppt menunjukkan indikator warna yang bertambah jernih dan pada kondisi tersebut dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Maka, diambil dosis 1 ppt, 1,5 ppt, 2 ppt dengan pertimbangan efisiensi bahan dari penelitian mahfud (2010).

4.4 Hasil daya hambat

Uji daya hambat dengan metode disc atau cakram dengan menggunakan lempengan agar yang disemai dengan mikroorganisme penguji. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar/petridish yang telah disemai dengan mikroorganisme penguji. Penghambat pertumbuhan mikroorganisme oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah jernih sekitar pertumbuhan mikroorganisme (Lay, 1994).

➤ Hasil rata-rata jumlah daya hambat bakteri *Vibrio harveyi*

Hasil data rata-rata jumlah daya hambat bakteri *Vibrio harveyi* pada uji cakram dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Data Jumlah Daya Hambat Pada Uji Cakram Bakteri *Vibrio harveyi*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata-Rata	SD
	1	2	3			
Perlakuan K (Kontrol)	0	0	0	0	0	0
Perlakuan A (1 ppt)	10,34	10,34	9,67	30,35	10,12	0,39
Perlakuan B (1.5 ppt)	11,34	11,00	12,00	34,34	11,45	0,51
Perlakuan C (2 ppt)	12,67	13,00	13,67	39,34	13,11	0,51
Total	34,35	34,34	35,34	104,03	34,68	1,40

Berdasarkan hasil penelitian, jumlah rata-rata uji daya hambat bakteri *Vibrio harveyi* pengamatan 24 jam dapat dilihat dengan dosis 1 ppt diperoleh nilai rata-

rata 10,12; dosis 1.5 ppt diperoleh nilai rata-rata 11,45; dan pada dosis 2 ppt diperoleh nilai rata-rata 13,11. Pada pengamatan 48 jam daerah bening di sekeliling kertas cakram tidak ditumbuhi oleh bakteri *Vibrio harveyi* sehingga dapat disimpulkan bahwa dosis ekstrak *Gracilaria verrucosa* tersebut bersifat bakteriosid pada bakteri *Vibrio harveyi*. Untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap daya hambat bakteri *Vibrio harveyi* maka dilakukan analisa sidik ragam, tabel analisa sidik ragam dapat dilihat pada Tabel 6.

Tabel 6. Analisa Sidik Ragam

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	314,14	104,71	627,223	4,07	7,59
Acak	8	1,34	0,17	**		
Total	11	315,48				

Keterangan : ** berbeda sangat nyata

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah total daya hambat bakteri *Vibrio harveyi*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F1% ($627,223 > 7,59$) yang berarti dosis pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* berpengaruh terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *Vibrio harveyi*. Sehingga perlu dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui tingkat perbedaan antar perlakuan. Hasil uji BNT dapat dilihat pada Tabel 7.

Tabel 7. Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Daya Hambat Bakteri *Vibrio harveyi*

Rata-rata Perlakuan	K	A	B	C	Notasi
	0	10,12	11,45	13,11	
K=0	-	-	-	-	a
A=10,12	10,12**	-	-	-	b
B=11,45	11,45*	1,33 ^{ns}	-	-	bc
C=13,11	13,11*	3,00*	1,67 ^{ns}	-	cd

Keterangan : **) berbeda sangat nyata; *) berbeda nyata; ^{ns}) tidak berbeda nyata

Data di atas didapatkan hasil yaitu, perlakuan K berbeda sangat nyata dengan perlakuan A, B, dan C. Perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan B. Perlakuan B tidak berbeda nyata dengan perlakuan C. Untuk perlakuan C juga tidak berbeda nyata dengan perlakuan A.

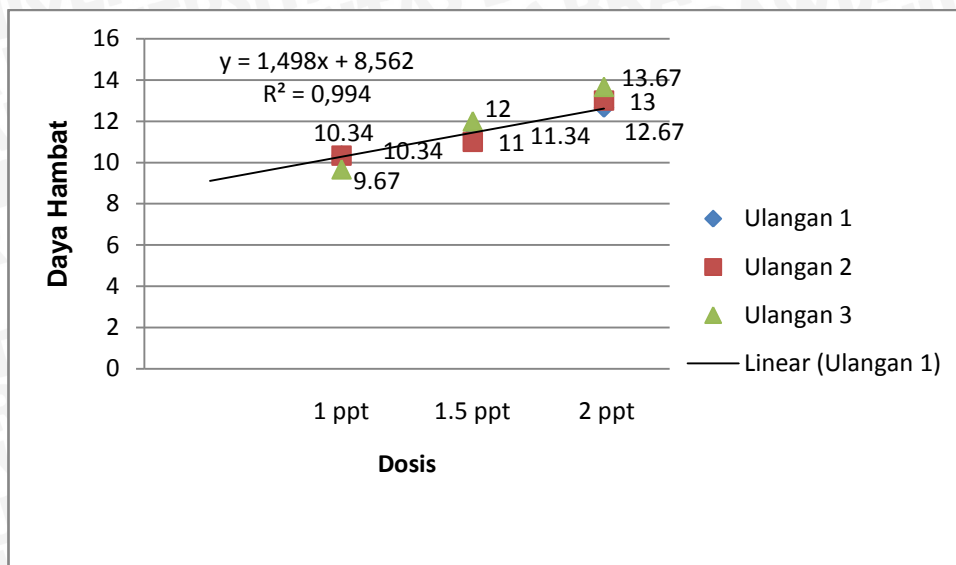
Hubungan antara perlakuan pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *Vibrio harveyi* diperlukan analisa regresi. Tabel sidik ragam regresi dapat dilihat pada Tabel 8.

Tabel 8. Sidik Ragam Regresi

Sidik Ragam	Db	JK	KT	F Hitung	F5%	F1%
Perlakuan	3	314,14	-	-	4,07	7,59
Linear	1	248,107335	248,107335	1486,11761	**	
Kuadratik	1	53,551875	53,551875	320,7659479	**	
Kubik	1	12,48528167	12,48528167	74,78455625	**	
Acak	8	1,34	0,16695			
Total	11	315,48				

Keterangan : **) berbeda sangat nyata

Hasil perhitungan menunjukkan bahwa regresi linear, kuadratik, dan kubik berbeda sangat nyata, maka bentuk regresi yang digunakan adalah linier, didapatkan persamaan $y = 1,498x + 8,562$ dan determinasi (R^2) adalah 0,994 dapat dilihat pada Gambar 8.



Gambar 8. Grafik daerah hambat bakteri *Vibrio harveyi*

Berdasarkan grafik diatas, didapatkan hasil yaitu daya hambat yang terbaik menggunakan dosis 2 ppt. Semakin tinggi dosis yang digunakan, semakin tinggi pula nilai daya hambatnya. Sehingga dapat disimpulkan bahwa pemberian ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* dapat mempengaruhi daya hambat bakteri *Vibrio harveyi*.

4.5 Mekanisme penghambatan ekstrak kasar *Gracilaria verrucosa* terhadap bakteri *Vibrio harveyi*

Senyawa fenol paling banyak digunakan karena senyawa tersebut tidak hanya terdapat pada antibiotik sintetik, namun pada senyawa alam yang dikenal sebagai polifenol. Apabila digunakan bekerja dengan merusak membran sitoplasma secara total dengan mengendapkan protein sel. Akan tetapi bila dalam konsentrasi rendah, fenol merusak membran sel yang menyebabkan kebocoran metabolit penting dan menginaktifkan bakteri. Membran sel berguna sebagai penghalang selektif terhadap zat terlarut dan menahan zat yang tidak larut. Beberapa zat diangkut secara aktif melalui membran, sehingga konsentrasinya dalam sel tinggi. Zat-zat yang terkonsentrasi pada permukaan sel

akan mengubah sifat-sifat fisiknya sehingga membunuh dan menghambat sel. Perubahan permeabilitas membran sel bakteri merupakan mekanisme kerja fenol. Terjadinya perubahan permeabilitas membran sel menyebabkan kebocoran konstituen sel yang esensial sehingga bakteri mengalami kematian. Senyawa kation aktif seperti klorheksidin dapat berinteraksi dengan gugus-gugus yang bermuatan negatif pada dinding sel bakteri. Interaksi ini menyebabkan kerusakan dinding sel bakteri. Selain itu, klorheksidin juga menyebabkan presipitasi protein plasma sel bakteri (Anonymous¹, 2011).

4.6 Parameter Penunjang

Berdasarkan hasil penelitian, suhu yang diterapkan selama masa inkubasi dapat mempengaruhi laju pertumbuhan bakteri, karena mempengaruhi laju semua reaksi seluler. Suhu yang diukur pada penelitian adalah suhu inkubator. Pada saat penelitian, suhu inkubator yang digunakan sebesar 30°C. Bakteri dapat bertahan hidup, tumbuh dan berkembang pada batas-batas suhu tertentu. Suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio* spp berkisar antara 30-35°C. Sedangkan pada suhu 4°C dan 45°C bakteri tidak dapat tumbuh dan pada suhu 55°C akan mati (Prajitno, 2005)

5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Berdasarkan hasil penelitian, maka kesimpulan yang didapatkan adalah sebagai berikut :

- Ekstrak Kasar *Gracilaria verrucosa* memberikan pengaruh terhadap daya hambat bakteri *Vibrio harveyi* dengan dosis terbaik yaitu 2 ppt.

5.2 Saran

Perlu adanya penelitian lebih lanjut untuk mendapatkan dosis yang optimal serta mengetahui kemampuan antimikroba dari ekstrak *Gracilaria verrucosa* terhadap bakteri patogen lainnya.



DAFTAR PUSTAKA

- Anonymous^a, 2011. **Strategi Pengembangan Infrastruktur Perikanan Dalam Mendukung Peningkatan Daya Saing**. Info Kajian BAPPENAS. Vol. 8 No.2. Hal. 10-17.
- Anonymous^b, 2011. **Klasifikasi alga merah *Gracilaria verucosa***. http://www.klasifikasi_alga.com. Diakses pada tanggal 20 Desember 2013.
- Anonymous^c, 2013. **Gambar *Gracilaria verrucosa***. Diakses pada tanggal 20 Desember 2013.
- Anonymous^d, 2013. **Gambar Koloni Bakteri *Vibrio harveyi***. Diakses pada tanggal 10 September 2014.
- Anonymous^e, 2012. **Gambar Alat Sterilisasi Autoclave**. Diakses pada tanggal 19 Juli 2012.
- Anonymous^f, 2012. **Gambar Sterilisasi Tempat dan Tangan Laboran**. Diakses pada tanggal 19 Juli 2012.
- Anonymous^g, 2012. **Gambar Teknik Penuangan Media**. Diakses pada tanggal 19 Juli 2012.
- Anonymous^h, 2012. **Gambar Metode Penanaman Bakteri Dengan Spread dan Metode Pengujian Antibiotik Kirby- Bauer**. Diakses pada tanggal 19 Juli 2012.
- Anonymousⁱ, 2011. **Antibakteri**. Diakses pada tanggal 26 Januari 2015
- Anwariyah, S. 2011. **Kandungan Fenol, Komponen Fitokimia dan Aktivitas Antioksidan *Cymodocea Rotundata***. Skripsi. 79 hal.
- Astawan M., Mughtadi dan Tutik. 2001. **Pemanfaatan rumput laut pada berbagai makanan jajanan untuk mencegah timbulnya defisiensi iodium dan penyakit degeneratif**. Skripsi. 83 hlm.
- Atmadja, W.S. 1996. **Pengenalan Jenis-Jenis alga Merah (*Rhodophyta*)**. Puslitbang Oseanologi-LIPI. Jakarta.
- Ballantine, D.L., W.H. Gerwick, S.M. Ve´lez, E. Alexander and P.Guevara. 1987. **Antibiotic activity of lipid-soluble extracts from Caribbean marine algae**. *Hydrobiologia* 151/152: 463–469.
- Buchanan, R.E. and N.E. Gibsons. 1974. **Determinative Bacteriology**. Eighty edition. Averly Press. Inc. USA. 126 hlm.
- Capuccino and Sherman, 1988. **Microbiology, A laboratory Manual**. Benjamin/Cumming Science Publishing. Menlo Park. California : 477

Chkhikvishvili, I. D and Z. M. Ramazanov. 2000. **Phenolic Substances of Brown Algae and Their Antioxidant Activity.** *Applied Biochemistry and Microbiology* Vol. 36No. 3 (2000) : 289-291.

Dwijoseputro. 1990. **Dasar-dasar Mikrobiologi.** Djambatan. Jakarta. 111 hal.

Harborne J. B. 1984. **Phytochemical Methods: A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis.** London.

Idris, 2013. **Daya hambat Vibrio.** <https://www.Wirsan.blogspot.com>. Diakses tanggal 28 November 2014.

Indriani, Heti dan E. Sumiarsih. 2003. **Rumput Laut Budidaya Pengolahan dan Pemasaran.** Penebar Swadaya. Jakarta. 12 hlm.

Istiqomah, 2013. **Perbandingan Metode Ekstraksi Maserasi Dan Sokletasi Terhadap Kadar Piperin Buah Cabe Jawa (*Piperis retrofracti fructus*).**

Jasmanidar, Y. 2009. **Penggunaan Ekstrak Gracilaria verrucosa untuk Meningkatkan Sistem Ketahanan Udang Vannamei (*Litopenaeus vannamei*).** Institut Pertanian Bogor.

Julian, Ransangan. T, M. Laland, Ahmed H.ALHarbi² **Characterization and experimental infection of *Vibrio harveyi* isolated from diseased Asian seabass (*Lates calcarifer*).** Malaysian Journal of Microbiology, Vol 8(2) 2012, pp. 104-115.

Julyasih, K. Sri., I.G.P. Wirawan., W.S Harijani dan W. Widajati. 2009. **Aktivitas Antioksidan Beberapa Jenis Rumput Laut (Seaweeds) Komersial Di Bali.** Disampaikan pada Seminar Nasional, Surabaya, 2 Desember 2009.

Juneidi, A.W. 2004. **Rumput Laut, Jenis dan Morfologinya.** PK.BRL.A.01.M. Direktorat Pendidikan Menengah dan Kejuruan, Ditjen Pendidikan Dasar dan Menengah, Departemen Pendidikan Nasional. Jakarta.

Kabata, Z., 1985. **Parasiter and Disease of Fish Cultured in the Tropic.** Taylor. In Francis Inc. 242. Chery St. Phidelphia. 318 hlm.

Kakita, H, S. Fukuoka, H. Obika and H. Kamishima. 1999. **Isolation and Characterisation of a Fourth Hemagglutinin From The Red Alga, *Gracilaria verrucosa*, from Japan.** *Journal of Applied Phycology* 11:49–56.

Kamiso, H.N., S. Triyanto, dan Hartati. 1996. **Uji Konsentrasi Penghambatan Minimal, Resistensi dan Penggunaan Antibiotik Untuk Menanggulangi Penyakit Motil Aeromonas Septisemia (MAS) Pada Lele Dumbo (*Clarias gariepinus*).** 5 hal.

Komarawidjaja, W. dan D.A Kurniawan. 2008. **Tingkat Filtrasi Rumput Laut (*Gracilariasp.*) Terhadap Kandungan Ortofosfat (P_2O_5).** *Jurnal Teknik Lingkungan*. 9 (2): 180-183.

Kusmiyati., N.W. S Agustini. 2006. **Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri dari Mikroalga *Porphyridium cruentum***. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI), Cibinong 16911. Vol.8 No.1 Hal. 48-53.

Lallier, R and P. Daegneult.1984. **Antigenic Differentiation Of Pili From Non Virulent and Fish Pathogenic Strains Of *Aeromonas hydrophila***. Journal Fish Of Diseases. P 509-512.

Lavilla-Pitogo, C.R., Albright, L.J., Paner, M.G. and Sunaz, N.A. 1992. **Studies on the sources of luminescent *Vibrio harveyi* in *Penaeus monodon* hatcheries**. In: M.Shariff,R.P. Subasinghe and J.R. Authur (eds.) Diseases in Asian Aquaculture 1.Fish Health Section, Asian Fisheries Society, Manila, Philippines. pp. 157-164.

Lay, B.W. 1994. **Analisis Mikroba di Laboratorium**. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta. 168 hal.

Lestario, L.N, S. Sugiarto dan K.H. Timotius. 2008. **Aktivitas Antioksidan dan Kadar Fenolik Total Dari Ganggang Merah (*Gracilaria verrucosa* L.)**. *Jurnal Teknologi dan Industri Pangan*. **19** (2): 132-133.

Meighen, E.A. 1991. **Molecular biology of bacterial bioluminescence**. *Microbiol Rev.*, 55:123-142.

Mtolera and AK. Semesi. 1996. **Antimicrobial Activity of Extracts from Six Green Algae from Tanzania**. University of Dar es Salaam. Tanzania.

Nazir. 1998. **Metode Penelitian**. Ghalia Indonesia. Jakarta.

Pelczar MJ, Roger DR, ECS Chan. 1986 **Dasar-dasar mikrobiologi 2**. Diterjemahkan oleh Hadioetomo RS, Imas T, Tjitrosomo SS, Angka SL. Jakarta: Penerbit Universitas Indonesia;. hal. 489-522.

Prajitno, A. 2005. **Diktat Kuliah Parasit dan Penyakit Ikan**. Universitas Brawijaya. Malang. 104 hal.

Prajitno, A. 2006. **Pengendalian Penyakit *Vibrio harveyi* dengan Ekstrak Rumput laut (*Halimeda opuntia*) pada Udang Windu (*Penaeus monodon* Fab) PL-13**. Disertasi. Program Pascasarjana Universitas Brawijaya Malang.

Prajitno, A. 2007. **Penyakit Ikan – Udang Bakteri**. UM Press. Malang. 113 hlm.

Prajitno, A. 2008. **Penyakit ikan – Udang Virus**. Penerbit Universitas Negeri Malang Press. Malang. ISBN. 978 – 979 – 3506 – 91 – 3.106 hal

Ridlo, A dan Rini, P. 2009. **Aplikasi Ekstrak Rumput Laut sebagai Agen Imunostimulan Sistem Pertahanan Non Spesifik pada Udang (*Litopennaeus vannamei*)**. *Jurnal Ilmu Kelautan*. 14 (3): 133-137 hal.

Riniwati, N . 2012. **Daya Antibakteri Tumbuhan Majapahit (*Crescentia cujete* L.) Terhadap Bakteri *Vibrio alginolyticus***. <http://www.ITS-Undergraduate-13710-Paper-370813>. Diakses tanggal 1 November 2012.

- Roihanah, 2011. **Pengendalian *Vibrio harveyi* Secara Biologis Pada Larva Udang Windu : I Isolasi Bakteri Penghambat.** Jurnal Penelitian Perikanan Indonesia.Vol. III No. 4.
- Samad, M.S.F. 2010. **Pengaruh senyawa fenolik ubur-ubur (*Aurelia* sp.) terhadap hematologi dan aktivitas fagositosis ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang diinfeksi bakteri *Aeromonas hydrophila*.** Tesis. 109 hlm.
- Sastrosupadi, A. 2000. **Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian Edisi Revisi.** Kanisius. Yogyakarta. 276 hal.
- Setiaji, A. 2009. **Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*).** Fakultas Farmasi UMS Surakarta.
- Shanmugam, M. dan K.H. Mody. 2000. ***Heparinoid-active Sulphated Polisaccharides from Marine Algae as Potential Blood Anticoagulant Agents.*** Marine Algae & Marine Environment Discipline. Central Salt & Marine Chemicals Research Institute. Bhavnagar, 364002, India. <http://wwwias.ac.in/cuusci/dec252000/1672.pdf,05/04/05,10:19>.
- Sjafrie, N.D.M. 1990. **Beberapa Catatan Mengenai Rumpun Laut *Gracilaria*.** *Jurnal Oseana* 15 (4): 147-155.
- Suptijah, Pipih. 2003. ***Rumpun Laut: Prospek dan Tantangannya.*** <http://members.tripod.com/~ugm2/mti101.htm,28/03/05,21:10:08>.
- Teddy, M. 2009. **Pembuatan Nori Secara Tradisional Dari Rumpun Laut Jenis *Gracilaria* sp.** Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, ITB. Bogor. Skripsi. 36 hal.
- Tepu, I. 2006. **Seleksi bakteri probiotik untuk biokontrol vibriosis pada larva udang windu *Penaeus monodon* menggunakan cara kultur bersama.** Skripsi. Departemen Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Institut Pertanian Bogor, Bogor.
- Trisnawati, Y dan E. Susanto. 2003. **Pengolahan Propolis Sebagai Bahan Pangan Fungsional Antimikroba Untuk Kesehatan masyarakat.** Fakultas Peternakan. Universitas Brawijaya. Malang. 8 hal.
- Volk , W. dan M. Wheeler. 1993. **Mikrobiologi Dasar.** Penerbit Erlangga. Jakarta. 396 hlm.
- Zainuddin, E, N. 2006. **Chemical and biological investigations of selected cyanobacteria (Blue-Green Algae).** PhD Thesis, University Greifswald.

Lampiran 1. Analisis Keragaman Bakteri *Vibrio harveyi*.

Tabel. Data Jumlah Daya Hambat Pada Uji Cakram Bakteri *Vibrio harveyi*

Perlakuan	Ulangan			Total	Rata- Rata	SD
	1	2	3			
Perlakuan A (Kontrol)	0	0	0	0	0	0
Perlakuan B (1 ppt)	10,34	10,34	9,67	30,35	10,12	0,39
Perlakuan C (1.5 ppt)	11,34	11,00	12,00	34,34	11,45	0,51
Perlakuan D (2 ppt)	12,67	13,00	13,67	39,34	13,11	0,51
Total	34,35	34,34	35,34	104,03	34,68	1,40

Perhitungan :

$$FK = \frac{(104,03)^2}{12} = 901,8534083$$

$$JK \text{ total} = [(10,34)^2 + (11,34)^2 + (12,67)^2 + \dots + (13,67)^2] - 901,8534083 = 315,4800917$$

$$JK \text{ Perlakuan} = \frac{\{(30,35)^2 + (34,34)^2 + (39,34)^2\} / 3}{3} - 901,8534083 = 314,1444917$$

$$JK \text{ Acak} = 315,4800917 - 314,1444917 = 1,3356$$

Tabel. Analisis Keragaman Bakteri *Vibrio harveyi*

Sidik Ragam	db	JK	KT	F	H i t u n g F5%	F1%
Perlakuan	3	314,14	104,71	627,223	4.07	7.59
Acak	8	1,34	0.17	**		
Total	11	315,48				

Keterangan : ** = (berbeda sangat nyata)

Hasil sidik ragam menunjukkan bahwa pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap jumlah total daya hambat bakteri *Vibrio harveyi*. Hal ini ditunjukkan dengan nilai F hitung yang lebih besar dari F1% (627,223 > 7,59) yang berarti dosis pemberian ekstrak *Gracilaria verrucosa* berpengaruh terhadap jumlah total daya hambat terhadap bakteri *Vibrio harveyi*. Sehingga perlu dilakukan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) untuk mengetahui tingkat perbedaan antar perlakuan.

➤ **Perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Bakteri *Vibrio harveyi***

$$SED = \sqrt{(2 \times 0.17) / 3^{0.5}} = 0,333616546$$

$$BNT\ 5\% = 2.306 \times 0,333616546 = 0,77$$

$$BNT\ 1\% = 3.355 \times 0,333616546 = 1,12$$

Tabel Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) Daya Hambat Bakteri *Vibrio harveyi*

Rata-rata Perlakuan	K	A	B	C	Notasi
	0	10,12	11,45	13,11	
K=0	-	-	-	-	a
A=10,12	10,12**	-	-	-	b
B=11,45	11,45*	1,33 ^{ns}	-	-	bc
C=13,11	13,11*	3,00*	1,67 ^{ns}	-	cd

Keterangan : **) berbeda sangat nyata; *) berbeda nyata; ^{ns}) tidak berbeda nyata

Dari Data di atas didapatkan hasil yaitu, perlakuan K berbeda sangat nyata dengan perlakuan A, B, dan C. Perlakuan A tidak berbeda nyata dengan perlakuan B. Perlakuan B tidak berbeda nyata dengan perlakuan C. Untuk perlakuan C juga tidak berbeda nyata dengan perlakuan A.

➤ **Perhitungan penentuan pelarut yang terbaik**

$$1.)\ \text{Etanol } 80\% = \frac{\text{Berat sampel (Berat evaporasi)}}{\text{Berat awal sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,34}{20} \times 100\%$$

$$= 1,70\%$$

$$2.)\ \text{Etanol } 96\% = \frac{\text{Berat sampel (Berat evaporasi)}}{\text{Berat awal sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,39}{20} \times 100\%$$

$$= 1,95\%$$

$$3.)\ \text{Aseton} = \frac{\text{Berat sampel (Berat evaporasi)}}{\text{Berat awal sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,21}{20} \times 100\%$$

$$= 1,05\%$$

$$4.) \text{ Aquadest} = \frac{\text{Berat sampel (Berat evaporasi)}}{\text{Berat awal sampel}} \times 100\%$$

$$= \frac{0,25}{20} \times 100\%$$

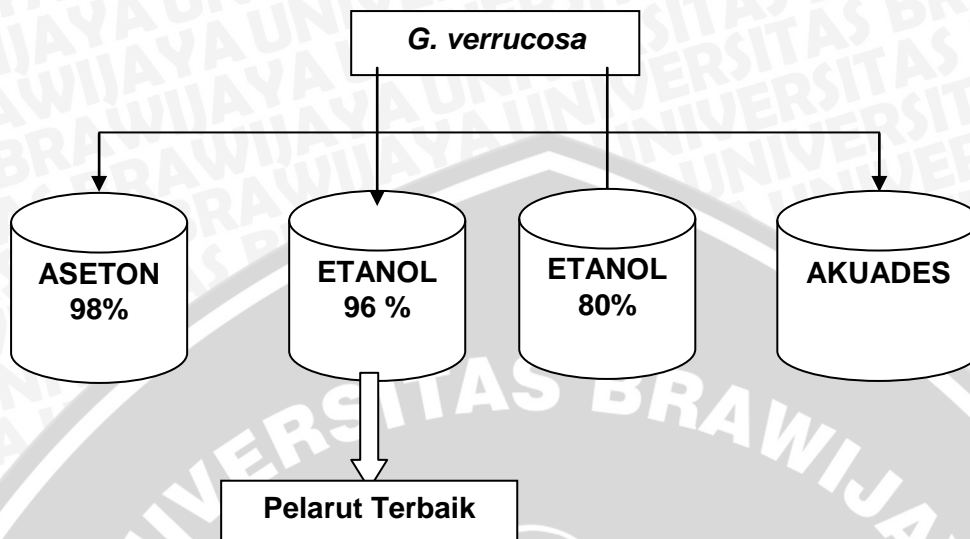
$$= 1,25\%$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 2. Bagan Uji Pendahuluan

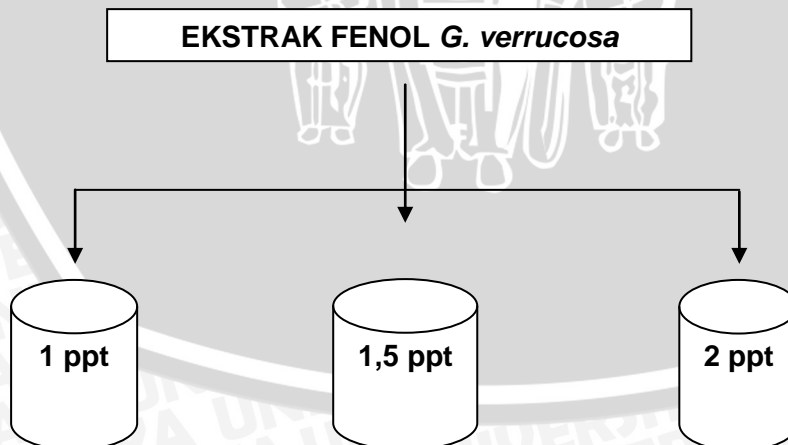
1) Penentuan Pelarut yang Terbaik



Nilai rendemen dari masing-masing pelarut yaitu untuk pelarut etanol 80 % nilai rendemen yang diperoleh sebesar 1,70%. Rendemen untuk pelarut etanol 96 % sebesar 1,95%. Kemudian rendemen untuk pelarut aseton sebesar 1,05%. Sedangkan nilai rendemen menggunakan aquadest yaitu sebesar 1,25% . Jadi, dari keempat pelarut hasil nilai rendemen yang terbaik yaitu menggunakan pelarut Etanol 96 % yaitu sebesar 1,95%

Lanjutan Lampiran 2.

2) Penentuan Dosis Antibakteri Menggunakan Ekstrak Fenol *G. verrucosa*



Pada penelitian sebelumnya diketahui bahwa range dosis kurang dari 1 ppt tidak optimum apabila digunakan untuk antibakteri, sedangkan apabila lebih 2 ppt akan bersifat *bactericidal* (membunuh bakteri). Sehingga dari hasil penelitian tersebut, disarankan penelitian lanjutan menggunakan range dosis 1 ppt, 1,5 ppt dan 2 ppt.

Lampiran 3. Foto Penelitian



Vortex



Inkubator



Autoclave



Pinset



Jangka sorong



Hot plate



Timbangan digital



Mikro pipet





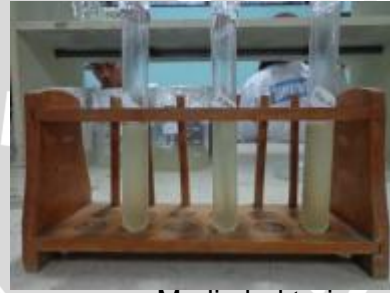
Alkohol 70%



Kertas cakram



Ekstrak *Gracilaria verrucosa*



Media bakteri



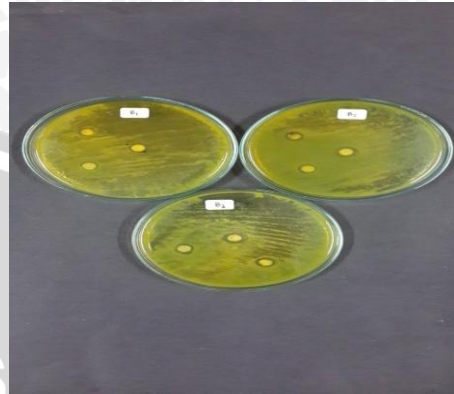
Aquades steril



Lampiran 4. Foto Daya Hambat Bakteri *Vibrio harveyi*



Kontrol



1 ppt



1.5 ppt



2 ppt