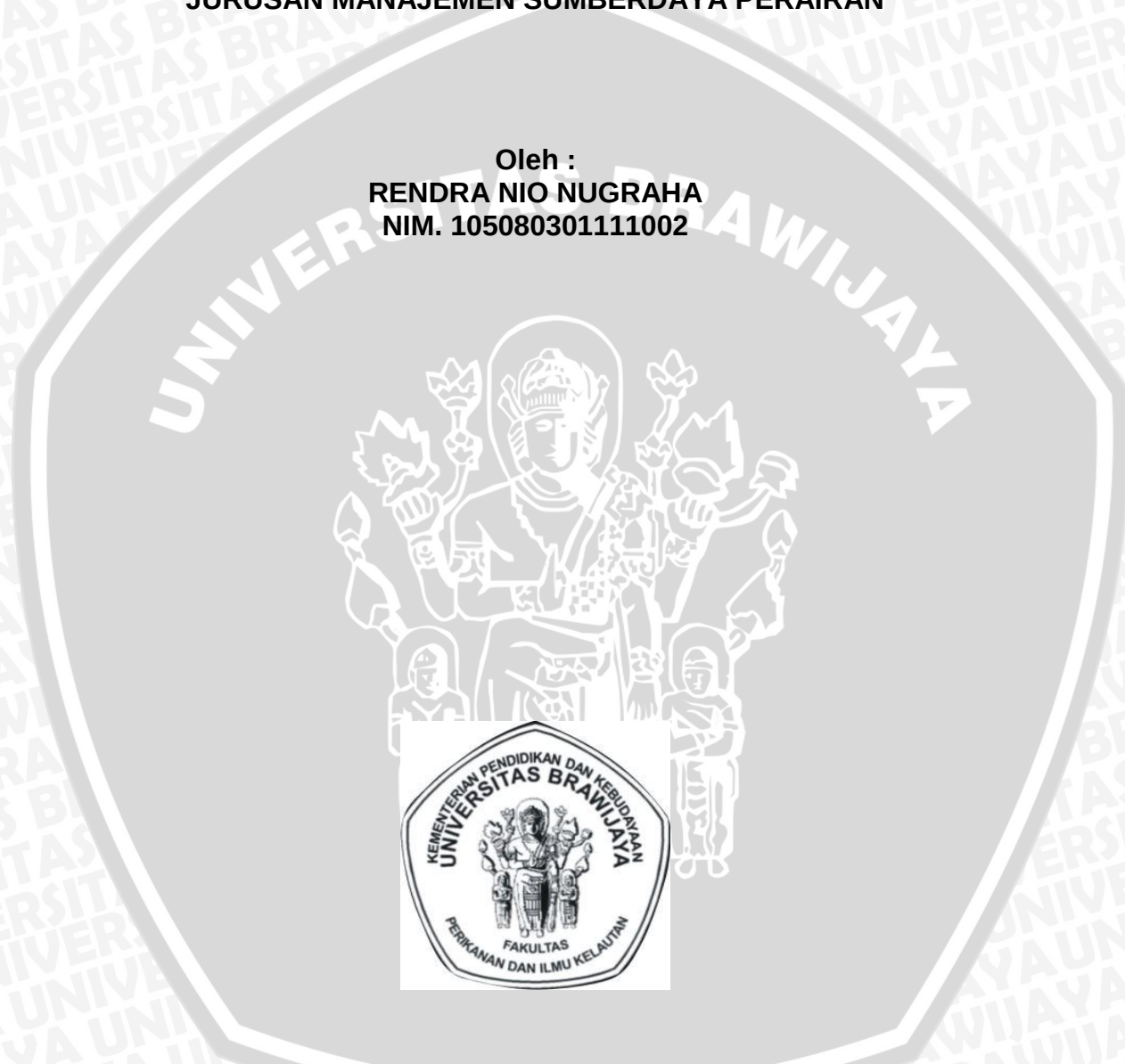


**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK TEPUNG CACING TANAH
(*Lumbricus rubellus*) DENGAN KONSENTRASI BERBEDA TERHADAP
Aeromonas salmonicida DAN *Streptococcus pyogenes***

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

Oleh :
RENDRA NIO NUGRAHA
NIM. 105080301111002



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA
MALANG
2014**

**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK TEPUNG CACING TANAH
(*Lumbricus rubellus*) DENGAN KONSENTRASI BERBEDA TERHADAP
Aeromonas salmonicida DAN *Streptococcus pyogenes***

**LAPORAN SKRIPSI
PROGRAM STUDI TEKNOLOGI HASIL PERIKANAN
JURUSAN MANAJEMEN SUMBERDAYA PERAIRAN**

***Sebagai Salah Satu Syarat Untuk Memperoleh Gelar
Sarjana Perikanan Pada Fakultas Perikanan Dan Ilmu Kelautan
Universitas Brawijaya***

**Oleh :
RENDRA NIO NUGRAHA
NIM. 105080301111002**



**FAKULTAS PERIKANAN DAN ILMU KELAUTAN
UNIVERSITAS BRAWIJAYA**

MALANG

2014

**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK TEPUNG CACING TANAH
(*Lumbricus rubellus*) DENGAN KONSENTRASI BERBEDA TERHADAP
Aeromonas salmonicida DAN *Streptococcus pyogenes***

Oleh :

RENDRA NIO NUGRAHA

NIM. 105080301111002

Telah dipertahankan didepan penguji
pada tanggal 29 September 2014
dan dinyatakan telah memenuhi syarat

SK Dekan No.:

Tanggal :

Menyetujui,

Dosen Penguji I

Dr. Ir. Hardoko, MS

NIP: 19620108 1998802 1 001

Tanggal :

Dosen Penguji II

Dr. Ir. Yahya, MP

NIP: 19630706 199003 1 003

Tanggal :

Dosen Pembimbing I

Ir. Darius M. Biotech

NIP. 19500531 198103 1 003

Tanggal :

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Hartati K., MS

NIP. 19640726 198903 2 004

Tanggal :

**Mengetahui,
Ketua Jurusan MSP**

Dr. Ir. Arning Wiluijeng Ekawati, MP

NIP. 19600322 198601 1 001

Tanggal:

PERNYATAAN ORISINALITAS

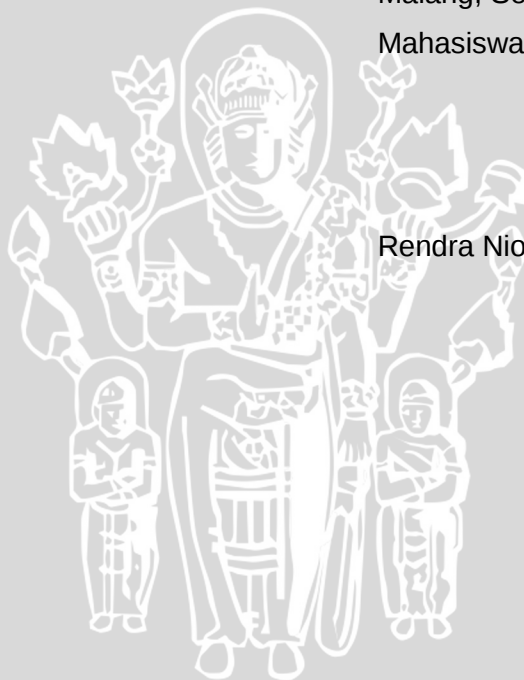
Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam skripsi yang saya tulis ini benar-benar merupakan hasil karya saya sendiri, dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain kecuali yang tertulis dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar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

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

Malang, September 2014

Mahasiswa

Rendra Nio N.



UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji syukur penulis ucapkan kepada Tuhan YME atas berkah, rahmat-Nya, penulis bisa menyelesaikan Laporan Skripsi ini. Laporan Skripsi ini merupakan salah satu syarat untuk memperoleh gelar sarjana di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang.

Dalam penyusunan Laporan Skripsi ini tidak lepas dari dukungan dan bantuan berbagai pihak. Ucapan terimakasih sebesar-besarnya penulis sampaikan kepada:

1. Bapak Ir. Darius M. Biotech selaku Dosen Pembimbing I yang telah banyak membantu dalam mengarahkan dan membimbing dalam pembuatan laporan skripsi sampai terselesaikannya laporan ini.
2. Ibu Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS selaku Dosen Pembimbing II yang telah banyak membantu dalam mengarahkan dan membimbing dalam pembuatan laporan skripsi sampai terselesaikannya laporan ini.
3. Bapak Dr. Ir. Hardoko, MS dan Dr. Ir. Yahya, MP selaku dosen penguji yang telah banyak memberikan saran dalam penyelesaian laporan skripsi ini.
4. Kedua orang tuaku dan segenap anggota keluarga yang telah memberikan dorongan semangat dan doa.
5. Penyemangat dan masa depanku yang selalu menjadi orang terhebat dalam setiap langkahku
6. Teman-teman THP 2010 yang telah membantu dengan sepenuh hati, memberi semangat, berbagi informasi, dan berjuang bersama dalam suka dan duka.

Laporan Skripsi ini masih jauh dari kesempurnaan, sehingga kritik dan saran yang membangun sangat penulis harapkan. Penulis berharap juga Laporan skripsi ini bermanfaat dan dapat memberikan informasi bagi pihak yang membutuhkan.

Malang, September 2014

Penulis

RENDRA NIO NUGRAHA (NIM. 105080301111002). Laporan Skripsi dengan judul Uji Daya Hambat Ekstrak Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) Dengan Konsentrasi Berbeda Terhadap *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. (Di Bawah Bimbingan : **Ir. Darius, M. Biotech** dan **Dr. Ir. Hartati Kartikaningsih, MS**)

Penyakit pada ikan dapat disebabkan karena bakteri, virus atau parasit, baik ektoparasit maupun endoparasit. Salah satu penyakit bakterial pada ikan yang disebabkan oleh bakteri adalah *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Pengobatan yang efektif dan bersifat alami dapat diperoleh dari bahan alami antara lain cacing tanah *Lumbricus rubellus*. Cacing tanah jenis ini telah lama digunakan sebagai obat untuk menyembuhkan penyakit yang disebabkan *Salmonella thyposa*.

Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan konsentrasi ekstrak *Lumbricus rubellus* terbaik untuk menghambat *A. salmonicida* dan *S. Pyogenes* serta mengetahui senyawa-senyawa bioaktif pada *L. rubellus*. Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Mikrobiologi, Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang dan Laboratorium LIPI Serpong Tangerang pada Mei - Juli 2014.

Metode yang digunakan dalam penelitian ini adalah metode eksperimen dengan variabel bebas yaitu perbedaan konsentrasi yang digunakan pada ekstrak cacing tanah dan ampicilin serta variabel terikat yaitu perbedaan lebar diameter daya hambat antibakteri (mm) dengan 3 kali ulangan. Penelitian ini menggunakan rancangan Acak Lengkap (RAL) dengan 2 faktorial dengan 3 ulangan.

Ekstrak *Lumbricus rubellus* menghasilkan daya antibakteri terbaik dari konsentrasi 20% dengan zona bening pada *Aeromonas salmonicida* sebesar 3,77 mm dan pada *Streptococcus pyogenes* sebesar 4,76 mm. Hasil analisa bioaktif dengan metode LC-MS, didapatkan 2 puncak tertinggi yang termasuk bioaktif antibakteri yang terkandung dalam ekstrak tepung *Lumbricus rubellus*, antara lain *Opipramol* dan *Oleandomycin*.

Disarankan pada penelitian selanjutnya agar lebih hati – hati dalam proses pembuatan tepung *Lumbricus rubellus* agar tepung yang dihasilkan tidak merusak kandungan bioaktif di dalamnya, serta dapat juga dilakukan untuk pengujian lanjutan bioaktif ini sebagai antifungi.

KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan kehadirat Tuhan YME atas rahmat dan karuniaNya sehingga penulis dapat menyelesaikan Laporan Skripsi dengan judul “Uji Daya Ekstrak Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*) dengan Konsentrasi Berbeda Terhadap *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*”. Laporan Skripsi ini disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh izin untuk mengerjakan Skripsi di Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya.

Penulis menyadari sepenuhnya bahwa laporan ini tidak akan tersusun tanpa bantuan dari berbagai pihak. Penulis menyadari bahwa dalam laporan skripsi ini masih terdapat banyak kekurangan, sehingga adanya kritik dan saran dari pembaca nantinya kami harapkan dapat menambah kesempurnaan laporan ini.

Malang, September 2014

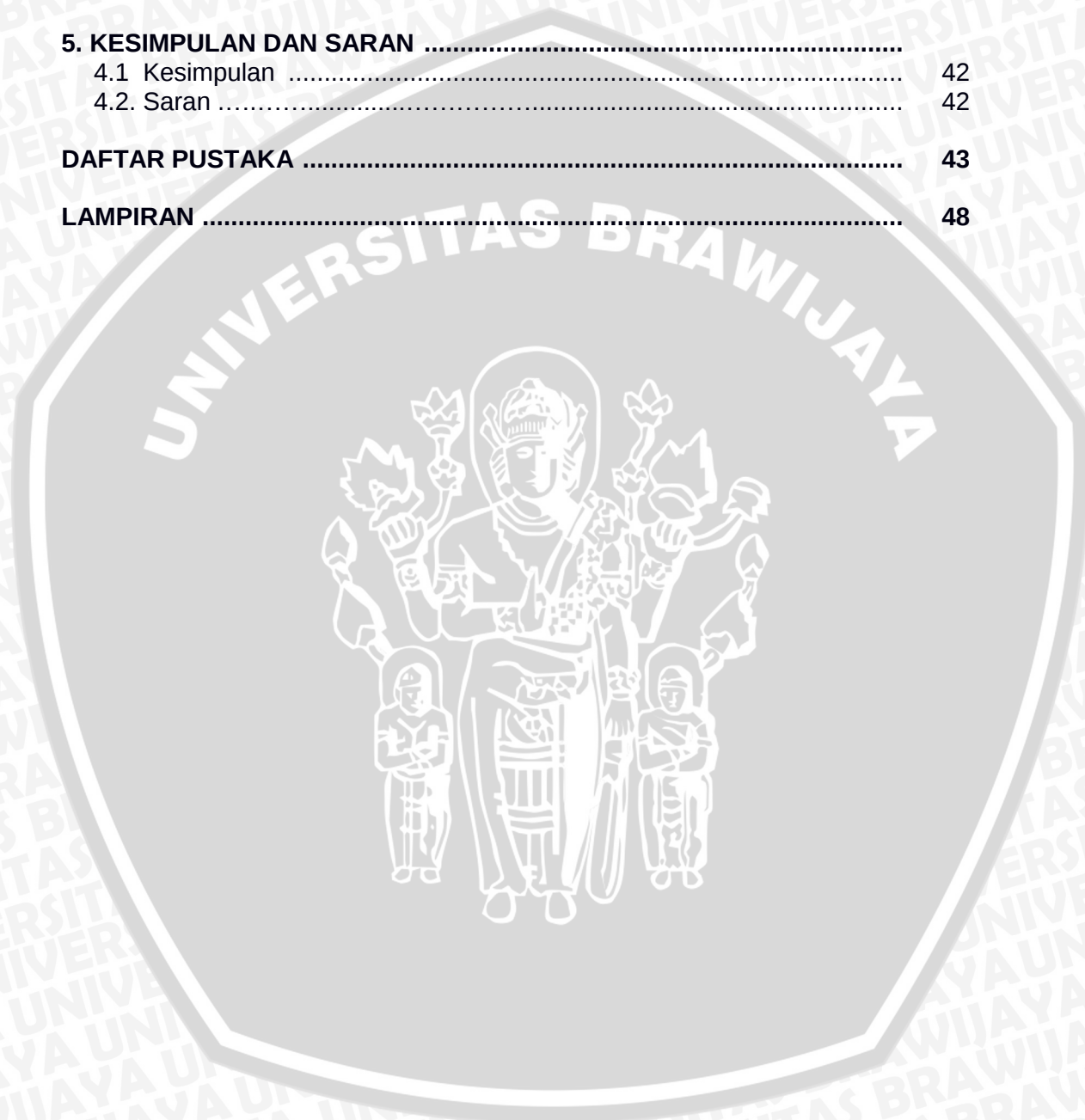
Penulis



DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN JUDUL.....	i
LEMBAR PENGESAHAN	ii
PERNYATAAN ORISINALITAS.....	iii
UCAPAN TERIMA KASIH.....	iv
RINGKASAN.....	v
KATA PENGANTAR	vi
DAFTAR ISI	vii
DAFTAR GAMBAR.....	ix
DAFTAR TABEL.....	x
DAFTAR LAMPIRAN.....	xi
1. PENDAHULUAN	
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Rumusan Masalah	4
1.3 Tujuan penelitian.....	4
1.4 Hipotesis	4
1.5 Kegunaan Penelitian.....	5
1.6 Tempat dan Waktu.....	5
2. TINJAUAN PUSTAKA	
2.1 Cacing Tanah (<i>Lumbricus rubellus</i>).....	6
2.2 Pelarut.....	8
2.2.1 Air	8
2.3 Ekstraksi	8
2.4 Senyawa Bioaktif	9
2.5 Antibakteri	13
2.5.1 Mekanisme Kerja Antibakteri	14
2.5.2 Uji Aktivitas Antibakteri (Uji Cakram)	16
2.6 Bakteri Uji	17
2.6.1 <i>Aeromonas salmonicida</i>	17
2.6.2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	19
2.7 Identifikasi Senyawa Bioaktif	21
2.7.1 Uji Cakram	21
2.7.2 Uji LC-MS.....	21
3. METODE PENELITIAN	
3.1 Materi Penelitian	23
3.1.1 Bahan Penelitian	23
3.1.2 Alat Penelitian	23
3.2. Metode Penelitian	24
3.2.1 Parameter Uji	25
3.2.2 Analisis Data	27
3.3 Prosedur Penelitian	27
3.3.1 Uji Cakram.....	28
3.3.2 Uji LC-MS.....	30

4. HASIL DAN PEMBAHASAN	
4.1 Penelitian Pendahuluan	32
4.2. Penelitian Utama	33
4.2.1 Uji Aktivitas Antibakteri	34
4.2.1.1 <i>Aeromonas salmonicida</i>	34
4.2.1.2 <i>Streptococcus pyogenes</i>	36
4.2.2 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji LCMS.....	38
5. KESIMPULAN DAN SARAN	
4.1 Kesimpulan	42
4.2. Saran	42
DAFTAR PUSTAKA	43
LAMPIRAN	48



DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. <i>Lumbricus rubellus</i>	7
2. Struktur cDNA Lumbricin I (Cho et al., 1998)	11
3. . Struktur Kimia Prolin	12
4. Struktur Kimia 3,5-Diiodo-tyrosine.....	13
5. Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Negatif.....	15
6. <i>Aeromonas salmonicida</i>	18
7. <i>Streptococcus pyogenes</i>	20
8. Rancangan Posisi Uji Cakram	28
9. Skema Kerja Penelitian	29
10. Ekstraksi <i>Lumbricus rubellus</i> setelah disentrifuse.....	32
11. <i>Aeromonas salmonicida</i> dan <i>Streptococcus pyogenes</i>	33
12. Grafik Perbedaan Zona Hambat dari Konsentrasi Ekstrak Tepung <i>L. rubellus</i> dan ampicilin terhadap <i>Aeromonas salmonicida</i>	34
13. Perbandingan Zona Hambat Tepung <i>L. rubellus</i> dengan Kontrol Ampicilin dengan Konsentrasi 10%, 20%, dan 30% untuk Ulangan 1 (a), Ulangan 2 (b), dan Ulangan 3 (c)	35
14. Grafik Perbedaan Zona Hambat dari Konsentrasi Ekstrak Tepung <i>L. rubellus</i> dan ampicilin terhadap <i>Streptococcus pyogenes</i>	36
15. Perbandingan Zona Hambat Tepung <i>L. rubellus</i> dengan Kontrol Ampicilin dengan Konsentrasi 10%, 20%, dan 30% untuk Ulangan 1 (a), Ulangan 2 (b), dan Ulangan 3 (c)	37
16. Hasil Analisis Uji LC-MS Tepung <i>L. rubellus</i>	39
17. Struktur Kimia Opipramol.....	40
18. Struktur Kimia Oleandomycin	41

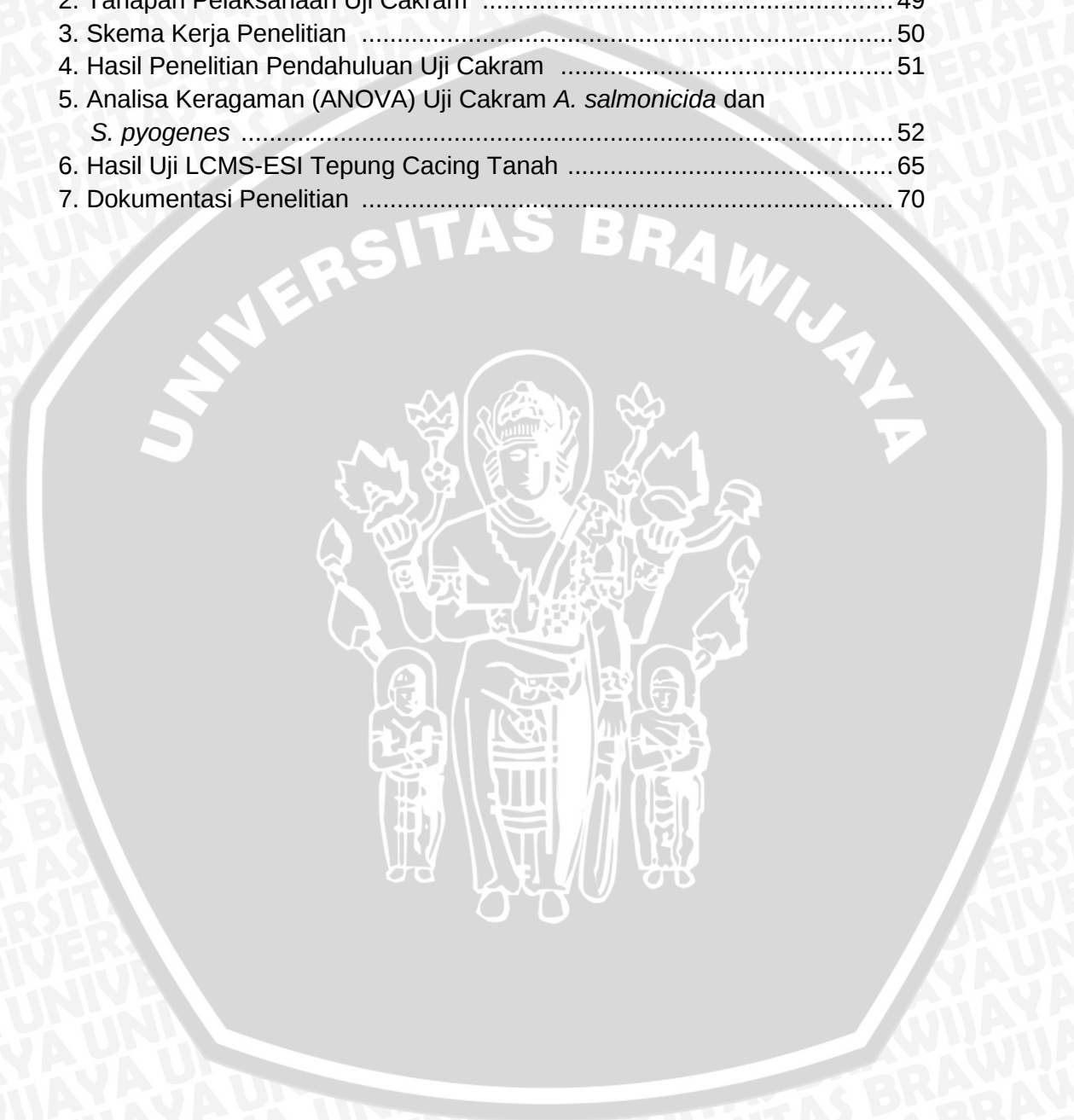
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Rancangan Acak Lengkap Dua Faktorial	25
2. Klasifikasi Respon Hambatan	26
3. Pecahan ion molekul senyawa bioaktif pada <i>Lumbricus rubellus</i>	40



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Prosedur Pembuatan Media TSA.....	48
2. Tahapan Pelaksanaan Uji Cakram	49
3. Skema Kerja Penelitian	50
4. Hasil Penelitian Pendahuluan Uji Cakram	51
5. Analisa Keragaman (ANOVA) Uji Cakram <i>A. salmonicida</i> dan <i>S. pyogenes</i>	52
6. Hasil Uji LCMS-ESI Tepung Cacing Tanah	65
7. Dokumentasi Penelitian	70



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Keberhasilan penanggulangan penyakit pada budidaya sangat ditentukan oleh ketepatan diagnosis maupun pengetahuan tentang agen penyebabnya. Kordi (2004), menyatakan bahwa dalam melakukan identifikasi atau diagnosis penyakit ikan, nama penyakit dan gejala klinisnya penting diketahui karena dapat membantu dalam menentukan kepastian penyebabnya. Nama penyakit sering dihubungkan dengan gejala-gejala klinis, seperti penyakit bercak-bercak putih, penyakit bintik putih, penyakit bercak-bercak hitam, dan sebagainya. Tetapi, gejala-gejala tersebut tidak selalu merupakan tanda - tanda khusus penyakit tertentu. Oleh karena itu diagnosis penyebab penyakit sangat penting dilakukan untuk dapat melakukan tindakan pengendalian secara tepat dan efisien. Sampai saat ini, penanggulangan penyakit bakterial lebih banyak dilakukan melalui aplikasi antibiotik atau bahan kimia sehingga berdampak pada resistensi bakteri dan pencemaran lingkungan.

Berbagai cara telah dilakukan dalam budidaya perikanan untuk mengendalikan serangan bakteri patogen, di antaranya dengan pemakaian antibiotik sintetik yang bersifat bakteriostatik atau bakterisida. Penggunaan antibiotik kimiawi dalam pengendalian penyakit dapat menimbulkan efek samping yang tidak diinginkan, bahkan dapat menimbulkan resistensi. Beberapa bakteri mulai resisten terhadap bakterisida kimiawi yang dipergunakan, harga antibiotik yang cukup mahal, daya beli yang rendah dan kesulitan dalam pengiriman oleh produsen. Oleh karena itu perlu dilakukan pencarian senyawa baru sebagai alternatif bakterisida yang bersifat efektif dan aman untuk mengobati penyakit infeksi oleh bakteri pada organisme budidaya tanpa efek samping.

Penyakit pada ikan dapat disebabkan karena bakteri, virus atau parasit, baik ektoparasit maupun endoparasit. Salah satu penyakit bakterial pada ikan adalah yang disebabkan oleh bakteri dari genus *Aeromonas*, diantaranya *Aeromonas hydrophila* dan *Aeromonas salmonicida*. *Aeromonas salmonicida* umumnya menyebabkan furunculosis pada ikan salmon. Furunculosis adalah salah satu dari sekelompok penyakit septicemia (Richards dan Robert, 1978) ditambahkan oleh Eidman *et al.*, (1981), motil *Aeromonas* Septicemia ini menyerang semua jenis ikan air tawar, misalnya ikan mas (*Cyprinus carpio*), gurame (*Osphronemus gouramy Lac*), lele (*Clarias batrachus L*), dari segala umur maupun ukuran dan penyebarannya ada di seluruh dunia. Angka kematian cukup tinggi, bahkan dapat mencapai lebih dari 90%.

Bakteri *Aeromonas salmonicida* banyak dijumpai di perairan tawar dan lautserta mempunyai kisaran inang yang luas mulai dari ikan-ikan air tawar dan laut. Bakteri ini dapat bertahan hidup dalam air atau sedimen selama beberapa hari atau beberapa minggu tetapi tidak dapat berbiak, dan bersifat obligat (Nitimulyo *et al.*,1993). *Aeromonas salmonicida* dapat bertahan dalam air pada periode waktu yang lama. Lamanya waktu tergantung pada kandungan mineral, pH dan temperatur air. Dengan meningkatnya suhu, virulensinya juga bertambah tinggi (Inglis *et al.*, 1993).

Selain disebabkan oleh bakteri gram negatif, ternyata penyakit yang menyerang ikan budidaya juga dapat disebabkan oleh bakteri gram positif. Salah satu contoh bakteri gram positif yaitu *Streptococcus spp.* Penyakit yang disebabkan oleh *Streptococcus spp.* ini adalah penyakit *Streptococciosis* yang disebabkan oleh *Streptococcus pyogenes*.

Pada penelitian Evans *et al.*, (2006), menunjukkan hasil pengamatan bahwa *S. Pyogenes* mirip dengan *S. Agalactiae* menyebabkan 90% kematian dalam 6 hari setelah injeksi. Gejala tingkah laku ikan nila sebelum mati terlihat

seperti berenang lemah dan berada di dasar akuarium, respon terhadap pakan lemah, berenang *whirling* (mengelepar), tubuh membentuk huruf C, perubahan pada warna tubuh, dan bukaan operkulum menjadi lebih cepat.

Vaksinasi menjadi cara yang paling efektif untuk pencegahan penyakit. Keberhasilan vaksinasi pada ikan dapat dibuktikan pada tahun 1993 di Norwegia, vaksin *A. salmonicida* yang digunakan mampu menurunkan wabah penyakit *furunculosis* dan penggunaan antibiotik yang semula mencapai puluhan ton per tahun menjadi hanya beberapa ratus kilogram saja (Soeripto, 2002). Penelitian sebelumnya menunjukkan bahwa vaksin *A. salmonicida* yang diinaktivasi menggunakan 1% formalin memiliki imunogenesitas yang cukup tinggi pada ikan mas (*Cyprinus carpio*) yang ditunjukkan dengan reaksi titer antibodi mencapai 27 (Setyawan *et al.*, 2012). Namun kelemahan antibakteri yang menggunakan bahan kimia buatan cenderung lebih menghabiskan biaya yang tidak sedikit pula. Oleh karena itu, dicari alternatif antibakteri alami yang lebih hemat biaya, salah satunya berasal dari cacing tanah (*Lumbricus rubellus*).

Pada tubuh cacing tanah mengandung protein, asam amino dan bermacam-macam enzim. Beberapa penelitian juga telah membuktikan adanya daya antibakteri ekstrak protein cacing tanah *Lumbricus rubellus* dan *Pheretima sp.* yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri Gram negatif dan positif (Affandi, 1996). Cho *et al.*, (1998) mengemukakan bahwa peptida antimikroba dari cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) telah berhasil diisolasi dan dikarakterisasi disebut *lumbricin I*. *Lumbricin I* merupakan peptida antimikroba yang mengandung prolin 15% dari total berat kering, dan tersusun dari 62 macam asam amino serta mempunyai berat molekul 7,231 kDa.

Walaupun telah ada penelitian sebelumnya mengenai kandungan *Lumbricin* dalam cacing tanah (*L. rubellus*), namun masih sedikit informasi mengenai pemanfaatan cacing tanah ini sebagai antibakteri pada budidaya

perikanan. Oleh sebab itu, penelitian ini sangat penting dilakukan untuk mendapatkan konsentrasi yang tepat pada ekstrak cacing tanah (*L. rubellus*) sehingga dapat dikembangkan lebih lanjut sebagai antibakteri pada pertumbuhan bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*.

1.2 Rumusan Masalah

Dalam budidaya perikanan tentu tak lepas dari masalah penyakit, terutama penyakit yang disebabkan bakteri dan virus. Salah satu bakteri yang sering menyerang pada budidaya adalah *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Dibutuhkan antibakteri alami yang dapat menghambat pertumbuhan *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Antibakteri alami salah satunya didapatkan dari cacing tanah *Lumbricus rubellus*. Dari uraian tersebut, pemanfaatan *L. rubellus* masih memerlukan kajian yang yaitu :

- Berapa konsentrasi tepung cacing tanah yang dapat menghasilkan antibakteri terbaik terhadap *A. Salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*

1.3 Tujuan Penelitian

Tujuan penelitian ini adalah untuk memanfaatkan senyawa *Lumbricin* yang terkandung dalam tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) sebagai antibakteri. Serta mendapatkan konsentrasi antibakteri yang tepat dari tepung *Lumbricus rubellus* terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*.

1.4 Hipotesis

Hipotesis yang mendasari penelitian ini adalah :

- Semakin tinggi konsentrasi tepung *Lumbricus rubellus* dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*.

1.5 Kegunaan Penelitian

Kegunaan dari penelitian ini adalah memberikan informasi kepada masyarakat umum dan lembaga pemerintahan mengenai manfaat dari *L. rubellus*. Serta masyarakat dapat memanfaatkan *L. rubellus* sebagai antibakteri alami.

1.6 Tempat dan Waktu

Penelitian ini dilaksanakan pada bulan Juni 2014 di Laboratorium Teknologi Hasil Perikanan dan Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang serta pengujian LCMS pada bulan Juli 2014 di Laboratorium Kimia LIPI Serpong Tangerang Selatan.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)

Cacing tanah telah lama dikenal oleh manusia. Hewan ini hidup di tempat atau tanah yang terlindung dari sinar matahari lembab, gembur dan serasah. Habitat ini sangat spesifik bagi cacing tanah untuk tumbuh dan berkembang biak dengan baik, tubuh cacing tanah banyak mengandung lendir sehingga seringkali orang menganggapnya menjijikan (Ovianto, 2004).

Beberapa jenis cacing tanah yang kini banyak ditenakkan antara lain: *Pheretima*, *Periony* dan *Lumbricus*. Ketiga jenis cacing tanah ini menyukai bahan organik yang berasal dari pupuk kandang dan sisa-sisa tumbuhan. Cacing tanah jenis *Lumbricus* mempunyai bentuk tubuh pipih. Jumlah segmen yang dimiliki sekitar 90-195 dan klitelum yang terletak pada segmen 27-32. Biasanya jenis ini kalah bersaing dengan jenis yang lain sehingga tubuhnya lebih kecil. Tetapi bila ditenakkan besar tubuhnya bisa menyamai atau melebihi jenis lain. Cacing jenis *Lumbricus rubellus* memiliki keunggulan lebih dibanding kedua jenis yang lain di atas, karena produktivitasnya tinggi (penambahan berat badan, produksi telur/anakan dan produksi bekas cacing) serta tidak banyak bergerak (Menegristek, 2000).

Cacing tanah termasuk dalam kelas Oligochaeta yang mempunyai banyak suku (*famili*). Terdapat 4 spesies cacing tanah yang sudah dibudidayakan dan diproduksi secara komersial, yaitu *Lumbricus rubellus*, *Eisenia foetida*, *Pheretima asiatica*, dan *Eudrilus eugeuniae*. Berbagai hasil penelitian menunjukkan cacing tanah mengandung protein yang sangat tinggi, yaitu 65-84,5%. Protein cacing tanah terdiri dari asam-asam amino esensial yang lengkap dan kadarnya cukup tinggi. Komposisi asam amino dalam cacing tanah

adalah: arginin, sistin, glisin, histidin, isoleusin, leusin, lisin, metionin, fenionin, fenilalanin, serin, treonin, tirosin, dan valin (Palungkun, 1999).

Penggunaan imbuhan pakan dari bahan alami merupakan cara alternatif untuk mencegah penyakit dan meningkatkan performa ternak. Tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) merupakan salah satu bahan alami yang berpotensi untuk dijadikan imbuhan pakan. Beberapa jenis cacing tanah telah dilaporkan mempunyai senyawa bioaktif dan terbukti dapat menghambat bakteri patogen. Zat-zat aktif itu antara lain berupa *gliko-lipoprotein G-90* dan *fetidin* dari cacing *Eisenia foetida* (Annelida, Lumbricidae) (Liu et al., 2004). Ditambahkan oleh Gates (1972) dalam Haryono (2003), klasifikasi cacing *Lumbricus rubellus* adalah sebagai berikut :

Kingdom	: Animalia
Phylum	: Annelida
Class	: Clitellata
Order	: Haplotaxida
Family	: Lumbricidae
Genus	: Lumbricus
Species	: <i>Lumbricus rubellus</i>



(Sumber : foto dokumentasi)

Gambar 1. Cacing *Lumbricus rubellus*

2.2 Pelarut

2.2.1 Air

Pelarut adalah benda cair atau gas yang melarutkan benda padat, cair, atau gas, yang menghasilkan larutan. Pelarut yang paling umum digunakan dalam kehidupan sehari-hari adalah air. Pelarut lain yang juga umum digunakan adalah bahan kimia organik (mengandung karbon) yang juga disebut pelarut organik. Pelarut biasanya memiliki titik didih rendah dan lebih mudah menguap, meninggalkan substansi terlarut yang didapatkan. Untuk membedakan antara pelarut dengan zat yang dilarutkan, pelarut biasanya terdapat dalam jumlah yang lebih besar (Andrea, 2011).

Ditambahkan oleh Vogel (1987), bahwa pelarut yang baik untuk ekstraksi adalah pelarut yang mempunyai daya melarutkan yang tinggi terhadap zat yang diekstraksi. Daya melarutkan yang tinggi tersebut berhubungan dengan kepolaran pelarut dan kepolaran senyawa yang diekstraksi. Terdapat kecenderungan kuat bagi senyawa polar larut ke dalam pelarut polar, dan bagi senyawa non polar larut ke dalam pelarut non polar.

Menurut Suyanti (2008), secara umum, tujuan ekstraksi ialah memisahkan suatu komponen dari campurannya dengan menggunakan pelarut (air). Teknik ekstraksi sangat berguna untuk pemisahan secara cepat dan “bersih” baik untuk zat organik maupun zat anorganik. Cara ini dapat digunakan untuk analisis makro maupun mikro. Melalui proses ekstraksi, ion logam dalam pelarut air ditarik keluar dengan suatu pelarut organik (fase organik).

2.3 Ekstraksi

Proses ekstraksi senyawa antibakteri dapat dilakukan dengan dua cara, yaitu *aqueous phase* dan *organic phase*. Ekstraksi *aqueous phase* dilakukan dengan pelarut air, sedangkan ekstraksi *organic phase* menggunakan pelarut

organik. Prinsip kelarutan yaitu polar melarutkan senyawa polar, pelarut semi polar melarutkan senyawa semi polar, dan pelarut non polar melarutkan senyawa non polar (Harborne, 1978).

Ekstraksi adalah suatu proses pemisahan dari bahan padat maupun cair dengan bantuan pelarut. Pelarut yang digunakan harus dapat mengekstrak substansi yang diinginkan tanpa melarutkan material lainnya. Ekstraksi merupakan proses pemisahan suatu bahan dari campurannya, ekstraksi dapat dilakukan dengan berbagai cara. Ekstraksi menggunakan pelarut didasarkan pada kelarutan komponen terhadap komponen lain dalam campuran (Suyitno *et al.*, 1989).

Menurut Hayati (2011), dalam bidang pengobatan, bahan-bahan alam digunakan dalam bentuk ekstrak karena lebih spesifik mengandung zat-zat hasil ekstraksi, dalam hal ini adalah protein. Cacing tanah diekstraksi ke dalam bentuk ekstrak air dengan metode dekokta. Dekokta adalah metode ekstraksi dengan air pada suhu 90°C selama 30 menit. Metode dekokta dipilih karena zat aktif yang dituju bersifat relatif polar (larut air).

Air adalah pelarut yang kuat, melarutkan banyak jenis zat kimia. Zat - zat yang bercampur dan larut dengan baik dalam air (misalnya garam - garam) disebut sebagai zat “hidrofilik” (larut air), dan zat - zat yang tidak mudah larut air (misalnya lemak dan minyak), disebut dengan zat “hidrofobik”. Kelarutan suatu zat dalam air ditentukan oleh dapat tidaknya zat tersebut menandingi kekuatan gaya tarik menarik listrik (gaya intermolekul dipol – dipol) antara molekul - molekul air (Azis, 2009).

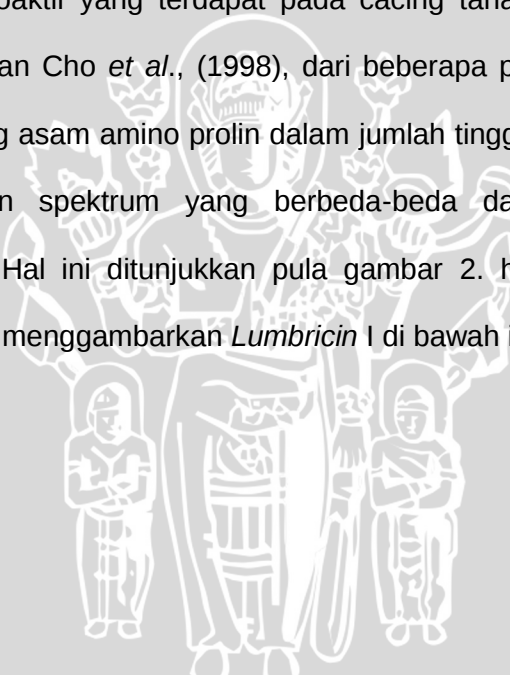
2.4 Senyawa Bioaktif

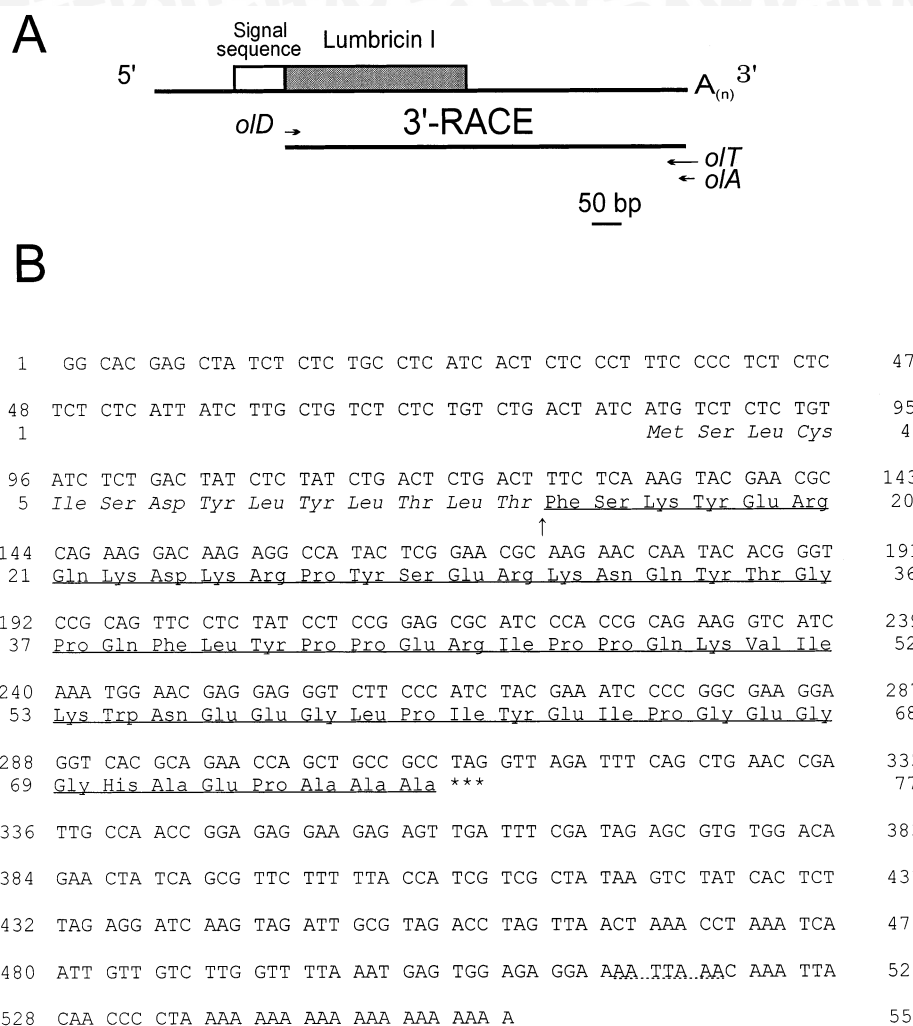
Cacing tanah *Lumbricus rubellus* (dalam kondisi kering) memiliki kandungan protein tinggi (64-76%), lemak (7-10%), kalsium (0,55%), fosfor (1%),

serat kasar (1,08%), dan auxin sebagai zat perangsang tumbuh untuk tanaman. Protein yang sangat tinggi terdiri dari setidaknya sembilan macam asam amino esensial dan empat macam asam amino non-esensial (Wulandari, 2010).

Berbagai penelitian menunjukkan bahwa cacing tanah *Lumbricus rubellus* mengandung enzim fibrinolitik (*lumbrokinase*), *lumbrofebrin*, *lumbricin I*, peroksidase, katalase, dan selulose, yang mana enzim-enzim ini berguna dalam pengobatan. Selain itu, kandungan asam arakhidonat dalam *lumbrofebrin* dapat menurunkan panas tubuh yang disebabkan infeksi (Mihara *et al.*, 1991).

Senyawa-senyawa asam amino yang dapat diidentifikasi termasuk senyawa penyusun bioaktif yang terdapat pada cacing tanah yaitu *Lumbricin*. Didukung oleh penelitian Cho *et al.*, (1998), dari beberapa peptida antimikroba yang juga mengandung asam amino prolin dalam jumlah tinggi, juga mempunyai mekanisme kerja dan spektrum yang berbeda-beda dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Hal ini ditunjukkan pula gambar 2. hasil sekuen asam amino dari cDNA yang menggambarkan *Lumbricin I* di bawah ini.



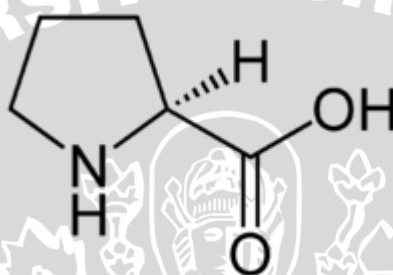


Gambar 2. Struktur cDNA Lumbricin I (Cho *et al.*, 1998)

Senyawa – senyawa yang dapat diidentifikasi dari hasil penelitian Cho *et al.*, (1998) antara lain : venilalanin (3,2%), serin (3,2%), lisin (9,7%), tirosin (8,1%), asam glutamat (12,9%), arginin (6,4%), glutamin (6,4%), asam aspartat (1,6%), prolin (14,5%), asparagin (3,2%), treonin (1,6%), glisin (8,1%), leusin (3,2%), isoleusin (6,4%), valin (1,6%), triptofan (1,6%), histidin (1,6%), dan alanin (6,4%). Di mana senyawa prolin merupakan senyawa yang paling banyak terdapat dalam Lumbricin I.

Prolin termasuk dalam golongan asam amino yang memiliki susunan α heliks yang dapat bersifat amfipatik. Hal ini didukung Sari (2007), bahwa meskipun sering terdapat pada permukaan protein, α heliks dapat pula terbenam

seluruhnya atau sebagian dalam bagian interior protein. Heliks yang bersifat amfipatik suatu kasus yang istimewa di mana residu bergeser antara hidrofobik dan hidrofilik sekitar setiap tiga atau empat residu, terdapat pula keadaan di mana α heliks berhadapan dengan lingkungan polar atau nonpolar. Heliks yang amfipatik terdapat dalam lipoprotein plasma samping dalam hormon polipeptida tertentu, seperti di dalam bisa (venom), antibiotik, glikoprotein virus HIV dan protein kinase yang diregulasi oleh kalmodulin. Struktur kimia prolin dapat dilihat pada gambar 3. di bawah ini.

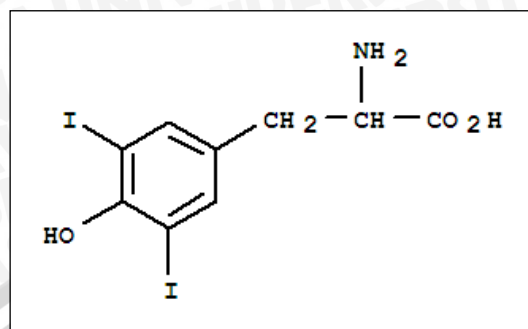


(Googleimage^a, 2014)

Gambar 3. Struktur Kimia Prolin

Senyawa - senyawa golongan alkanol atau fenolik dalam asam amino juga diduga memiliki peran sebagai antibakteri. Senyawa yang termasuk dalam golongan fenolik ini adalah 3,5 - *Diiodo-tyrosine*. Hal ini karena senyawa fenol bekerja dengan cara meracuni protoplasma, merusak dan menembus dinding sel, serta mengendapkan protein sel mikroba. Didukung oleh Yulianti (2009), menyatakan bahwa komponen fenol dapat mendenaturasi enzim yang bertanggung jawab terhadap germinasi spora atau berpengaruh terhadap asam amino yang terlibat dalam proses germinasi. Senyawa fenolik bermolekul besar mampu menginaktifkan enzim esensial di dalam sel mikroba meskipun pada konsentrasi yang sangat rendah. Senyawa fenol mampu memutuskan ikatan peptidoglikan saat menerobos dinding sel. Ikatan peptidoglikan ini secara

mekanis memberi kekuatan pada sel bakteri. Struktur kimia 3,5-Diiodo-tyrosine dapat dilihat pada Gambar 4. di bawah ini.



(Googleimage^b, 2014)

Gambar 4. Struktur Kimia 3,5-Diiodo-tyrosine

2.5 Antibakteri

Penggunaan senyawa antibakteri khususnya yang alami, secara umum meningkat dari tahun ke tahun. Senyawa antibakteri merupakan senyawa yang mempunyai kemampuan menghambat pertumbuhan mikroba. Senyawa antibakteri yang terkandung dalam berbagai jenis ekstrak diketahui mampu menghambat beberapa jenis mikroba patogen (Branen dan Davidson, 1993).

Antibakteri adalah suatu bahan yang mematikan bentuk-bentuk vegetatif bakteri (Pelczar dan Chan, 1988). Antibakteri adalah suatu zat yang dapat mencegah terjadinya pertumbuhan dan reproduksi bakteri. Antibakteri merupakan senyawa yang berfungsi sebagai bahan pengawet makanan untuk memperpanjang umur simpan suatu makanan dengan cara menghambat pertumbuhan mikroba (Supardi dan Sukanto, 1999).

Ditambahkan oleh Inayati (2007), senyawa antimikroba adalah zat yang dapat menghambat pertumbuhan mikroorganisme dan dapat digunakan untuk penelitian pengobatan infeksi pada manusia, hewan, dan tumbuhan. Antimikroba meliputi antifungi, antibakteri, antiprotozoa dan antivirus.

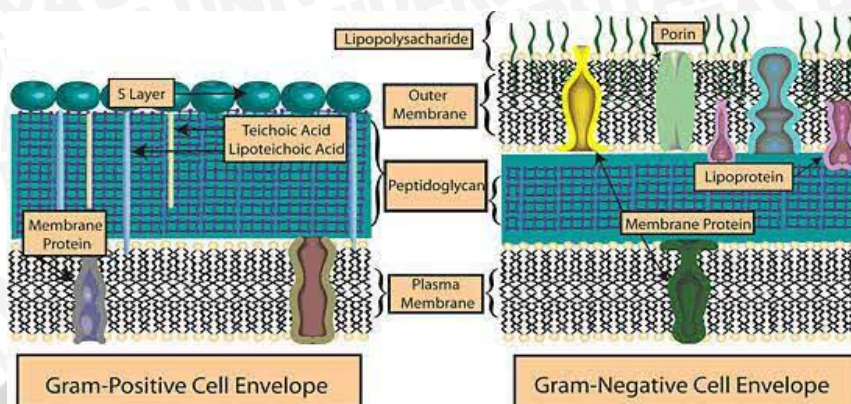
2.5.1 Mekanisme Kerja Antibakteri

Obat atau senyawa yang digunakan untuk membunuh bakteri merupakan antibakteri, khusus bakteri yang merugikan manusia. Definisi ini berkembang bahwa antibakteri merupakan senyawa kimia yang dalam konsentrasi kecil mampu menghambat bahkan membunuh suatu mikroorganisme. Antimikroba yang ideal menunjukkan sifat toksisitas selektif, toksisitas yang selektif merupakan fungsi reseptor yang spesifik yang dibutuhkan untuk melekatnya obat atau karena hambatan biokimia yang terjadi bagi organisme namun tidak bagi inang (Ganiswara, 1995).

Mekanisme kerja antibakteri dalam menghambat ataupun membunuh bakteri antara lain sebagai berikut; (1) menghambat sintesis dinding sel, (2) merusak permeabilitas membran sel, (3) menghambat sintesis RNA (proses transkripsi), serta (4) menghambat sintesis protein (proses translasi) dan replikasi DNA (Pradhika, 2008).

Tepung *Lumbricus rubellus* memiliki aktivitas antibakteri terhadap *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*, hal ini dapat dilihat dari diameter zona hambat pada uji cakram. Adanya perbedaan hambatan pertumbuhan *Streptococcus pyogenes* dan *Aeromonas salmonicida* kemungkinan disebabkan oleh perbedaan komponen penyusun dinding sel antara bakteri gram positif dan gram negatif. Penelitian oleh Sareong (2000) menyatakan dinding sel bakteri gram positif banyak mengandung teikoat dan asam teikoronat dan ada beberapa bakteri gram positif mengandung molekul polisakarida, sedangkan dinding sel bakteri gram negatif berisi tiga komponen yaitu lipoprotein membran terluar yang mengandung molekul protein yang disebut porin dan lipopolisakarida. Porin pada membran terluar dinding sel bakteri gram negatif tersebut bersifat hidrofilik. Kemungkinan porin yang terkandung pada membran terluar tersebut menyebabkan molekul - molekul

komponen ekstrak lebih sukar masuk ke dalam sel bakteri. Di bawah ini gambar 5. merupakan gambar struktur dinding sel gram positif dan gram negatif.



(Googleimage^c, 2014)

Gambar 5. Perbedaan Dinding Sel Bakteri Gram Positif dan Negatif

Protein yang dimiliki oleh cacing tanah memiliki mekanisme antimikroba yang berbeda dengan mekanisme antibiotik. Antibiotik membunuh mikroorganisme tanpa merusak jaringan tubuh. Antibiotik membunuh mikroorganisme biasanya dengan dua cara, yaitu dengan menghentikan jalur metabolik yang dapat menghasilkan nutrient yang dibutuhkan oleh mikroorganisme atau menghambat enzim spesifik yang dibutuhkan untuk membantu menyusun dinding sel bakteri. Sedangkan, mekanisme yang dilakukan oleh protein yang dimiliki oleh cacing tanah adalah dengan membuat pori di dinding sel bakteri. Hal ini menyebabkan sitoplasma sel bakteri menjadi terpapar dengan lingkungan luar yang dapat mengganggu aktivitas dalam sel bakteri dan menyebabkan kematian. Dengan cara ini, bakteri menjadi lebih susah untuk menjadi resisten karena yang dirusak adalah struktur sel milik bakteri itu sendiri.

Proses perakitan dinding sel mikroba diawali dengan pembentukan rantai peptida yang akan membentuk jembatan silang peptida yang menggabungkan rantai glikan dari peptidoglikan pada rantai yang lain sehingga menyebabkan dinding sel terakit sempurna. Jika ada kerusakan pada dinding sel atau ada

hambatan dalam pembentukannya dapat terjadi lisis pada sel mikroba sehingga mikroba segera kehilangan kemampuan membentuk koloni dan diikuti dengan kematian sel mikroba (Ajizah *et al*, 2007). Pemberian antimikroba dari tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dapat menghambat perakitan dinding sel dan mengakibatkan lubang pada peptidoglikan dinding sel menuju suatu struktur yang lemah dan menyebabkan sitoplasma sel bakteri menjadi terpapar dengan lingkungan luar yang dapat mengganggu aktivitas dalam sel bakteri.

2.5.2 Uji Aktivitas Antibakteri (Uji Cakram)

Semakin besar diameternya maka semakin terhambat pertumbuhannya, sehingga diperlukan standar acuan untuk menentukan apakah bakteri itu resisten atau peka terhadap suatu antibiotik. Faktor yang mempengaruhi metode Kirby-Bauer (1996) antara lain: (1) konsentrasi mikroba uji, (2) konsentrasi antibiotik yang terdapat dalam cakram, (3) jenis antibiotik, serta (4) pH medium (Jawetz *et al.*, 1995).

Di dalam Kusmiyati dan Agustini (2006), pengukuran aktivitas antibakteri dapat dilakukan dengan metode difusi dan metode pengenceran. Metode difusi merupakan salah satu metode yang sering digunakan, metode difusi dapat dilakukan 3 cara yaitu metode silinder, lubang dan cakram kertas. Metode pengenceran yaitu mengencerkan zat antibakteri dan dimasukkan ke dalam tabung - tabung reaksi steril. Ke dalam masing - masing tabung itu ditambahkan sejumlah bakteri uji yang telah diketahui jumlahnya. Pada interval waktu tertentu, dilakukan pemindahan dari tabung reaksi ke dalam tabung – tabung berisi media steril yang lalu diinkubasi dan diamati penghambatan pertumbuhan.

Sensitivitas suatu antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Kertas cakram yang berisi zat antimikroba diletakkan di atas lempengan agar yang telah ditanam dengan mikroba uji. Penghambatan pertumbuhan mikroba oleh zat antimikroba terlihat sebagai wilayah yang jernih

sekitar pertumbuhan mikroba. Lebar daerah hambatan ini tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan. Cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu sensitif (S) dan resisten (R), intermediate (I). Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh ada pergeseran sedikitpun dan pengukuran diameter daerah hambatan dalam milimeter. Adapun cara peletakkan kertas cakram dengan petridis minimal 15 mm dan jika jumlah cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram minimal 24 mm (Lay, 1994).

2.6 Bakteri Uji

Menurut Dwidjoseputro (1998), berdasarkan perbedaannya dalam penyerapan warna, bakteri terbagi menjadi dua jenis golongan yaitu bakteri gram positif dan gram negatif. Bakteri gram positif menyerap zat warna pertama yaitu kristal violet yang menyebabkan bakteri tersebut berwarna ungu, sedangkan bakteri gram negatif menyerap zat warna kedua yaitu safranin dan menyebabkan warna merah.

2.6.1 *Aeromonas salmonicida*

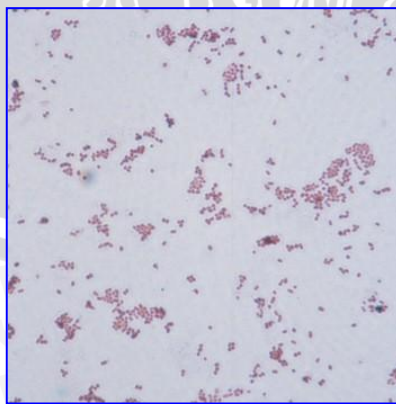
Aeromonas salmonicida umumnya menyebabkan *furunculosis* pada ikan salmon. *Furunculosis* adalah salah satu dari sekelompok penyakit septicemia (Richards dan Robert, 1978), merupakan penyakit sistemik akut pada ikan yang ditandai oleh bakterimia (Wolke, 1975). Motil *Aeromonas Septicemia* ini menyerang semua jenis ikan air tawar, misalnya ikan mas (*Cyprinus carpio*), gurame (*Osphronemus gouramy Lac*), lele (*Clarias batrachus L*), dari segala umur maupun ukuran dan penyebarannya ada di seluruh dunia. Angka kematian cukup tinggi, bahkan dapat mencapai lebih dari 90% (Eidman *et al.*, 1981).

Bakteri *Aeromonas salmonicida* merupakan jenis bakteri *Aeromonas sp.*, yang diindikasikan mampu menyerang semua spesies ikan baik air tawar maupun air laut. Bakteri ini mampu menginfeksi spesies ikan air tawar golongan *cyprinid*

misalnya ikan mas (*Cyprinus carpio*) dan penyakit yang ditimbulkan yaitu *carp erythrodermatitis*. Dampak negatif serangan bakteri *A. salmonicida* terhadap sistem budidaya mengakibatkan menurunnya status kesehatan ikan sampai menyebabkan kematian (Irianto, 2005).

Aeromonas sp. merupakan bakteri heterotrophic unicellular, tergolong protista prokariot yang dicirikan dengan adanya membran yang memisahkan inti dengan sitoplasma. Bakteri ini biasanya berukuran $0,7-1,8 \times 1,0-1,5 \mu\text{m}$ dan bergerak menggunakan sebuah polar flagel (Kabata, 1985). Hal ini diperkuat oleh Holt *et al.*, (1994) yang menyatakan bahwa *Aeromonas sp.* bersifat motil dengan flagela tunggal di salah satu ujungnya. Bakteri ini berbentuk batang sampai dengan kokus dengan ujung membulat, fakultatif anaerob, dan bersifat mesofilik dengan suhu optimum $20 - 30 ^\circ\text{C}$. Bentuk bakteri *Aeromonas salmonicida* dapat dilihat pada Gambar 6. dan klasifikasi *Aeromonas salmonicida* menurut Handajani (2005) adalah :

Super Kingdom	: Bacteria
Phylum	: Proteobacteria
Class	: Gammaproteobacteria
Order	: Aeromonadales
Family	: Aeromonadaceae
Genus	: Aeromonas
Species	: <i>Aeromonas salmonicida</i>



(Googleimage^d, 2014)

Gambar 6. *Aeromonas salmonicida*

Menurut Kordi dan Gufron (2004), *Aeromonas salmonicida* merupakan penyebab penyakit *furunculosis*. Bakteri ini terutama menyerang ikan salmon dan menimbulkan kerugian yang sangat besar, sistemiknya ditunjukkan oleh ciri-ciri seperti : (1). Bentuk sangat akut (*per-acute*) pada ikan seukuran jari (*finger-lings*); ikan menjadi berwarna lebih gelap (*melanosis*) dan mengalami kematian dengan cepat tanda-tanda yang teramati sebelumnya. (2). Bentuk akut; tanda-tanda yang tampak sebelumnya yaitu anoreksia yang berlangsung 2-3 hari sebelum kematian. (3). Sub-akut; bentuk ini merupakan bentuk yang paling lambat dimulai dengan tanda-tanda klinik berupa haemoragik petekhial (*petechial haemorrhages*, pendarahan akibat pecahnya pembuluh kapiler) pada kulit dan sekitar sirip. Ikan akan menampilkan perubahan warna dan anoreksia, selanjutnya mengalami kematian 4-6 hari sejak tanda-tanda klinis awal muncul. (4). Kronik; bentuk ini teramati pada ikan-ikan yang mampu bertahan hidup pada serangan sub-akut dan ditunjukkan dengan sembuhnya borok dan luka.

2.6.2 *Streptococcus pyogenes*

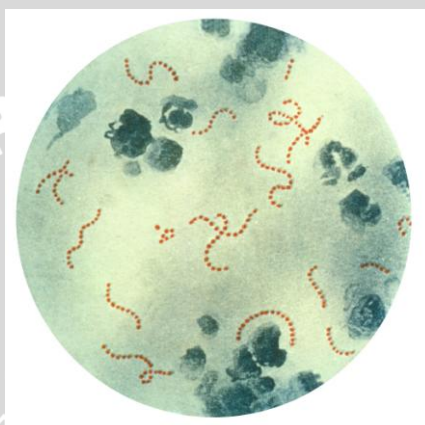
Pada penelitian Evans *et al.*, (2006), menunjukkan hasil pengamatan bahwa *S. pyogenes* mirip dengan *S. Agalactiae* menyebabkan 90% kematian dalam 6 hari setelah injeksi. Gejala tingkah laku ikan nila sebelum mati terlihat seperti berenang lemah dan berada di dasar akuarium, respon terhadap pakan lemah, berenang *whirling* (menggelepar), tubuh membentuk huruf C, perubahan pada warna tubuh, dan bukaan operkulum menjadi lebih cepat.

Menurut DKP (2009), *Streptococcus spp.* termasuk bakteri gram positif, berbentuk bulat kecil (*cocci*), bergabung menyerupai rantai, dan bersifat non motil. Target organ infeksi *Streptococcus spp.* banyak ditemukan di otak dan mata, sehingga disebut "*syndrome meningoencephalitis* dan *panophthalmitis*". Penyakit ini sering dilaporkan pada sistem budidaya intensif, lingkungan perairan tenang (*stagnant*) dan atau sistem resirkulasi. Bentuk bakteri *Streptococcus*

pyogenes dapat dilihat pada Gambar 7. di bawah ini, serta klasifikasi

Streptococcus pyogenes yaitu :

Kingdom	: Bacteria
Filum	: Firmicutes
Kelas	: Bacilli
Ordo	: Lactobacillales
Family	: Streptococcaceae
Genus	: Streptococcus
Spesies	: <i>Streptococcus pyogenes</i>



(Googleimage[®], 2014)

Gambar 7. *Streptococcus pyogenes*

Streptococcus pyogenes juga merupakan salah satu patogen yang banyak menginfeksi manusia. Diperkirakan 5-15% individu normal memiliki bakteri ini dan biasanya terdapat pada saluran pernafasan, namun tidak menimbulkan gejala penyakit. *S. pyogenes* dapat menginfeksi ketika pertahanan tubuh inang menurun atau ketika organisme tersebut mampu berpenetrasi melewati pertahanan inang yang ada. Bila bakteri ini tersebar sampai ke jaringan yang rentan, maka infeksi supuratif dapat terjadi. Infeksi ini dapat berupa faringitis, tonsilitis, impetigo dan demam scarlet. *Streptococcus pyogenes* juga dapat menyebabkan penyakit invasif seperti infeksi tulang, necrotizing fasciitis, radang otot, meningitis dan endokarditis (Cunningham, 2000).

2.7 Identifikasi Senyawa Bioaktif

Identifikasi golongan senyawa bioaktif bergantung pada pengukuran sifat dan ciri lain yang dibandingkan dengan data pustaka. Menurut Harborne (2006), senyawa yang pernah diketahui dapat diidentifikasi berdasarkan data spektrum, seperti UV, infrared (IR), resonansi magnet inti (RMI), dan spektrum massa (SM).

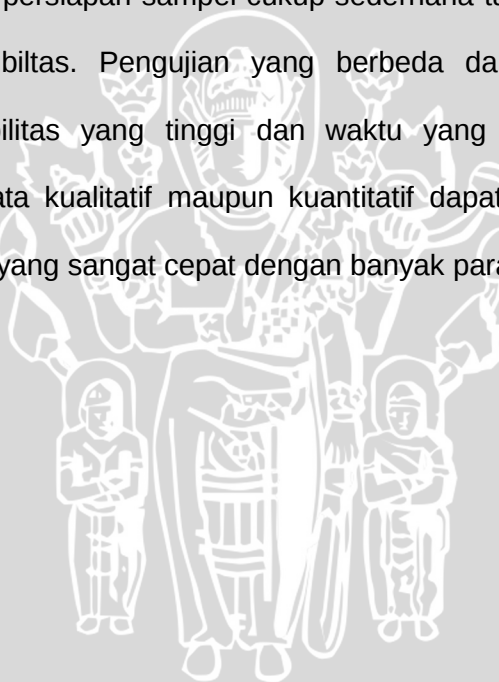
2.7.1 Uji Kertas Cakram

Prosedur difusi-kertas cakram-agar (metode Kirby-Bauer, 1996) yang distandarisasikan merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibakteri. Sensitivitas suatu antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. 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. Lebar daerah hambatan ini tergantung pada konsentrasi obat yang digunakan. Cakram ini bisa untuk menggolongkan pengaruh obat antimikroba yaitu sensitif (S) dan resisten (R), intermediate (I). Saat meletakkan kertas cakram tidak boleh ada pergeseran sedikitpun dan pengukuran diameter daerah hambatan dalam milimeter. Adapun cara peletakkan kertas cakram dengan petridis minimal 15 mm dan jika jumlah cakram lebih dari satu, maka jarak antar cakram minimal 24 mm (Lay, 1994).

2.7.2 Uji LC – MS

Kromatografi Cairan Spektroskopi Massa (LC-MS) adalah suatu metode pemisahan modern dalam analisa farmasi yang dapat digunakan sebagai uji identitas dan uji kemurnian. Yang menjadi titik beratnya yaitu untuk menganalisa senyawa-senyawa yang tidak mudah menguap dan tidak stabil pada suhu tinggi yang tidak dapat dianalisis dengan Kromatografi Gas (GC). Banyak senyawa yang dapat dianalisa menggunakan LC-MS mulai dari senyawa anorganik sampai senyawa organik makromolekul. (Lindsay, 1992).

Menurut Ginting (2008), *Liquid Chromatograph-tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS) merupakan satu-satunya teknik kromatografi cair dengan detektor spektrometer massa. Penggunaan LC-MS/MS untuk penelitian bioanalisis dimulai pada akhir tahun 1980an. Kelebihan dari teknologi LC-MS/MS antara lain : 1). Spesifitas. Hasil analisis yang khas dan spesifik diperoleh dari penggunaan spektrometer massa sebagai detektor. 2.) Aplikasi yang luas dengan sistem yang praktis. Berbeda dengan GC-MS sebagai spektrometer massa "klasik", penerapan LC-MS/MS tidak terbatas untuk molekul volatil (biasanya dengan berat molekul di bawah 500 Da). Mampu mengukur analit yang sangat polar, selain itu persiapan sampel cukup sederhana tanpa adanya teknik derivatisasi. 3.) Fleksibilitas. Pengujian yang berbeda dapat dikembangkan dengan tingkat fleksibilitas yang tinggi dan waktu yang singkat. 4.) Kaya informasi. Sejumlah data kualitatif maupun kuantitatif dapat diperoleh. Hal ini disebabkan seleksi ion yang sangat cepat dengan banyak parameter.



3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini meliputi bahan utama dan bahan kimia. Bahan utama yang digunakan adalah cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yang didapat dari peternak cacing tanah di desa Buring, Kab. Malang. Cacing tanah yang digunakan berusia 40 hari. Sedangkan biakan murni bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes* dengan kepadatan 10^6 koloni/mL yang merupakan koleksi bakteri dari Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang.

Bahan lain yang digunakan dalam penelitian ini antara lain : sebagai pelarut digunakan air/aquadest. Bahan-bahan pendukung yang digunakan adalah kertas cakram (*paper disc*) yang masing-masing berdiameter 6 mm, *cotton swap*, aquades, antibiotika *ampicilin*, media TSA (*Trypton Soy Agar*) dengan merek "Merck" untuk menumbuhkan *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*, kertas saring, tissue, kertas label, aluminium foil, NaFis 0,9%, tali, alkohol, spirtus dan plastik.

3.1.2 Alat Penelitian

Peralatan yang digunakan dalam penelitian ini terdiri dari peralatan untuk ekstraksi, peralatan untuk uji bakteri dan peralatan untuk analisa. Peralatan yang digunakan untuk ekstraksi antara lain timbangan digital, nampan, blender, tabung reaksi, vortex mixer, sentrifuse, cuvet, dan pipet tetes. Peralatan untuk uji bakteri antara lain erlenmeyer 250 ml, washing bottle, panci, autoklaf, jarum ose, cawan petri, triangle, pipet serologis, bola hisap, bunsen, dan jangka sorong. Peralatan yang digunakan untuk analisa adalah LC-MS (*Liquid Cromatography-Mass*

Spectrometry) Hitachi L 6200 Mariner Biospectrometry dengan sistem ESI (*Electrospray Ionisation*) yang terdapat pada Laboratorium Pusat Penelitian KIMIA LIPI Serpong Tangerang Selatan.

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan adalah metode eksperimen. Metode eksperimen bertujuan untuk mengetahui pengaruh dari penggunaan konsentrasi berbeda pada tepung *Lumbricus* terhadap kualitas antibakteri. Hipotesis ini dibuktikan dengan melakukan uji daya penghambatan antibakteri dari konsentrasi ekstrak yang berbeda terhadap pertumbuhan bakteri uji *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Indikator yang ingin dicapai adalah adanya perbedaan diameter zona bening (zona penghambatan bakteri) pada setiap konsentrasi yang diberikan dimana semakin lebar zona bening, maka semakin efektif senyawa kimia dari sampel yang berhasil diekstraksi.

Variabel bebas dalam penelitian ini adalah aquadest sebagai pelarut pengestrak cacing tanah (*Lumbricus rubellus*), penggunaan ampicilin sebagai antibiotik dan sebagai kontrol positif. Sedangkan variabel terikat pada penelitian ini adalah perbedaan lebar diameter daerah hambatan antibakteri yang terlihat sebagai zona bening di sekitar kertas cakram dan dinyatakan dalam satuan mm.

Rancangan penelitian yang digunakan yaitu Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktorial dengan 3 ulangan. Faktor pertama adalah penggunaan ekstrak tepung cacing tanah serta antibiotik ampicilin. Faktor dua adalah konsentrasi yang berbeda (0%, 10%, 20%, 30%) (b/v). Masing-masing perlakuan diuji daya hambatnya dengan bakteri uji *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes* secara duplo, dapat dilihat pada Tabel 1.

Tabel 1. Rancangan Acak Lengkap 2 Faktorial

Faktor 1	Faktor 2	<i>Aeromonas salmonicida</i> (X)			<i>Streptococcus pyogenes</i> (Y)		
		1	2	3	1	2	3
Ekstrak Cacing Tanah (A)	0 % (a)	XAa1-2	XAa1-2	XAa1-2	YAa1-2	YAa1-2	YAa1-2
	10%(b)	XAb1-2	XAb1-2	XAb1-2	YAb1-2	YAb1-2	YAb1-2
	20%(c)	XAc1-2	XAc1-2	XAc1-2	YAc1-2	YAc1-2	YAc1-2
	30%(d)	XAd1-2	XAd1-2	XAd1-2	YAd1-2	YAd1-2	YAd1-2
Ampicilin (B)	0% (a)	XBa1-2	XBa1-2	XBa1-2	YBa1-2	YBa1-2	YBa1-2
	10%(b)	XBb1-2	XBb1-2	XBb1-2	YBb1-2	YBb1-2	YBb1-2
	20%(c)	XBc1-2	XBc1-2	XBc1-2	YBc1-2	YBc1-2	YBc1-2
	30%(d)	XBd1-2	XBd1-2	XBd1-2	YBd1-2	YBd1-2	YBd1-2

Rancangan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL) 2 faktorial dimana setiap perlakuan dilakukan sebagai satuan tersendiri, tidak ada hubungan pengelompokan. Rumus dari model RAL adalah sebagai berikut :

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \varepsilon_{ij}; \quad i = 1, 2, \dots, t; \quad j = 1, 2, \dots, r$$

dimana :

- Y_{ij} = Nilai pengamatan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.
- μ = Nilai rata-rata
- α_i = Pengaruh perlakuan ke-i
- ε_{ij} = Galat percobaan dari perlakuan ke-i dan ulangan ke-j.

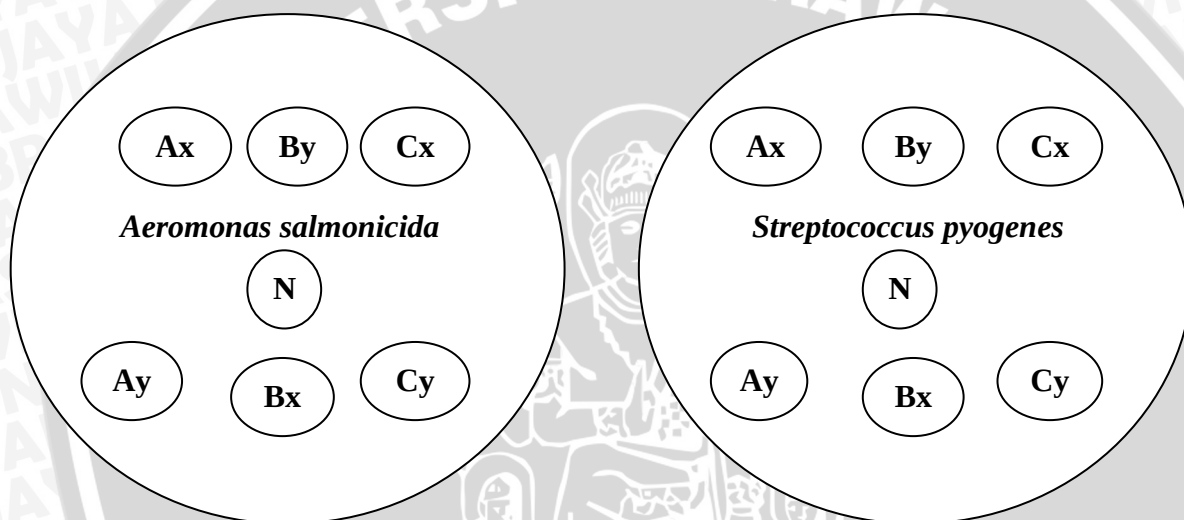
3.2.1 Parameter Uji

Parameter uji yang dilakukan adalah dengan parameter kuantitatif berdasarkan luas zona hambat yang dihasilkan. Untuk mengetahui perbandingan dengan kontrol dilakukan pengukuran zona hambat dari masing-masing konsentrasi yang berbeda, bertujuan untuk mengetahui zona hambat terbaik yang dihasilkan dari konsentrasi berbeda. Menurut Windarwati (2011), diameter penghambatan adalah selisih antara diameter areal bening yang terbentuk

dengan diameter sumur. Hasil zona bening yang terbentuk menurut Davis (2000), dapat diklasifikasikan sesuai dengan Tabel 2. Rancangan letak kertas cakram pada cawan petri ditunjukkan pada Gambar 8. di bawah ini.

Tabel 2. Klasifikasi Respon Hambatan

Daya hambat antibakteri	Kategori daya hambat antibakteri
≥ 20 mm	Sangat kuat
10 – 20 mm	Kuat
5 – 10 mm	Sedang
≤ 5 mm	Lemah



Gambar 8. Rancangan Posisi Uji Cakram

Keterangan : N = Konsentrasi 0% ampicilin/supernatan (b/v)
 Ax = Konsentrasi 10% supernatan T.C.T (b/v)
 Bx = Konsentrasi 20% supernatan T.C.T (b/v)
 Cx = Konsentrasi 30% supernatan T.C.T (b/v)
 Ay = Konsentrasi 10% ampicilin (b/v)
 By = Konsentrasi 20% ampicilin (b/v)
 Cy = Konsentrasi 30% ampicilin (b/v)

3.2.2 Analisa Data

Untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap respon parameter yang diukur dilakukan analisis keragaman (ANOVA) dengan uji F pada taraf 5% dan 1%. Jika terdapat hasil yang berbeda nyata maka dilakukan uji BNJ pada taraf 5% untuk mengetahui konsentrasi terbaik.

3.3 Prosedur Penelitian

Alur proses penelitian diawali dengan persiapan sampel dan dilanjutkan dengan ekstraksi. Proses pembuatan tepung cacing tanah dilakukan dengan cara : cacing tanah dibersihkan dari tanah dan kotoran lainnya yang menempel dengan menggunakan air yang mengalir. Cacing tanah kemudian dikeringkan dengan cara dijemur hingga kering. Cacing yang telah kering selanjutnya dihaluskan dengan blender hingga menjadi tepung cacing tanah.

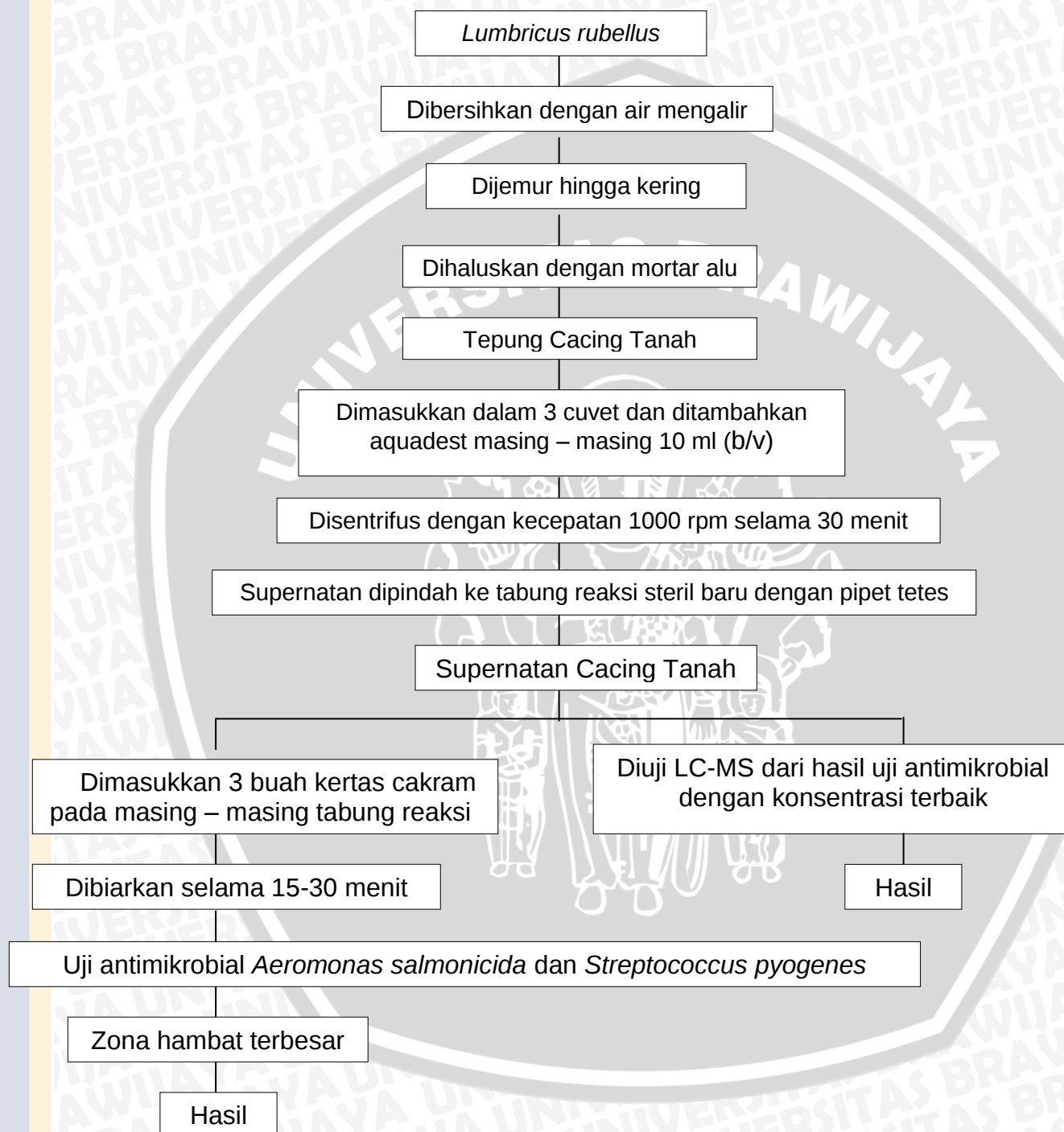
Pada tahap selanjutnya yaitu metode ekstraksi cair yang digunakan ialah metode dekokta. Menurut Julendra *et al.*, (2011), dekokta adalah metode ekstraksi dengan air pada suhu 90°C selama 30 menit. Metode dekokta dipilih karena zat aktif yang dituju bersifat relatif polar (larut air). Proses penyiapan larutan tepung cacing tanah dilakukan dengan cara : sebanyak 3 cuvet steril disiapkan dan diberi tanda dengan kertas label. Setiap cuvet diisi dengan 10 ml aquadest steril, kemudian ke dalam tabung nomor 1 sampai 3 secara berurutan ditambahkan tepung cacing tanah sebanyak 1 gram, 2 gram, dan 3 gram (%) (b/v). Kemudian campuran dihomogenkan dengan cara divortex, selanjutnya disentrifus dengan kecepatan 1000 rpm selama 30 menit. Dari proses ini endapan tepung cacing tanah akan terpisah dengan supernatan. Selanjutnya supernatan dimasukkan dalam botol sampel sehingga didapatkan ekstrak dari *Lumbricus rubellus*.

3.3.1 Uji Cakram

Menurut Wiyanto (2010), uji cakram yang distandarisasikan (Kirby-Bauer, 1966) merupakan cara untuk menentukan sensitivitas antibakteri. Sensitivitas suatu bakteri terhadap antibakteri ditentukan oleh diameter zona hambat yang terbentuk. Langkah awal yang dilakukan pada uji cakram yaitu menyiapkan media pertumbuhan bakteri uji. Alur kerja pembuatan media dapat dilihat pada lampiran 1. Media yang digunakan yaitu media TSA untuk menumbuhkan bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Biakan murni bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes* dengan kepadatan 10^8 koloni/mL koleksi milik Laboratorium Mikrobiologi Fakultas Kedokteran Universitas Brawijaya Malang. Peremajaan bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes* dilakukan dengan cara menanam pada media TSA miring. Kemudian hasil penanaman pada TSA miring dipanen dan diambil menggunakan kawat ose lalu dimasukkan ke dalam NaFis 10%. Kemudian campuran bakteri tadi dihomogenkan dalam Nafis 0,9% dan ditanam ke media TSA menggunakan pipet serologis sebanyak 0,1 ml. Diukur tingkat kekeruhan dengan menggunakan *McFarland* standar dan dijadikan patokan baku. Kemudian bakteri ditanam dengan metode tebar dan diperbanyak dengan menggunakan metode duplo.

Kertas cakram direndam dalam zat antimikroba dari ekstrak dengan berbagai konsentrasi supernatan cacing tanah (b/v) 10%, 20% dan 30% selama 15-30 menit. Kemudian kertas cakram tersebut ditempelkan pada TSA yang berisi bakteri dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam. Diamati dan diukur zona penghambatan yang terdapat pada masing-masing cakram. Pengukuran zona penghambatan dilakukan dengan mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong. Alur kerja uji cakram menurut Kirby Bauer (1966) dapat dilihat pada lampiran 2.

Penghambatan pertumbuhan bakteri penguji oleh ekstrak sampel yang memiliki kandungan antibakteri terlihat zona bening yang tidak ditumbuhi oleh bakteri penguji. Skema kerja dapat dilihat pada Gambar 9 dan Lampiran 3.



Gambar 9. Skema Kerja Penelitian

3.3.2 LC-MS (*Liquid Chromatography-Mass Spectrophotometry*)

Pengujian LC-MS dilakukan di Laboratorium Pusat Pengujian Kimia LIPI Serpong Tangerang Selatan. Uji LC-MS dilakukan untuk mengetahui senyawa daya antibakteri dari ekstrak terhadap bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*.

Pada uji LC-MS menurut Kazakevich dan Lubritto (2007), pemisahan sampel dimulai dari kromatografi (LC) berdasarkan sifat kepolaran sampel dengan kolom dan fase gerak dalam kolom. Komponen - komponen sampel yang telah terpisah mengalami ionisasi yang kemudian berat molekul sampel dapat diidentifikasi berdasarkan fragmentasi komponen oleh detektor pada spektrometer (MS). Secara umum prinsip dari spektrometer massa dalam menghasilkan spektrum massa melalui empat tahap, yaitu pengenalan sampel, ionisasi molekul sampel untuk mengubah molekul netral menjadi ion dalam fase gerak, menganalisis massa (memisahkan ion yang dihasilkan oleh rasio massa ke muatan) dan mendeteksi ion yang telah dipisahkan tadi.

Spektrometer massa bekerja dengan molekul pengion yang kemudian akan memilah dan mengidentifikasi ion menurut massa, sesuai rasio fragmentasi. Dua komponen kunci dalam proses ini adalah sumber ion (*ion source*) yang akan menghasilkan ion dan analisa massa (*mass analyzer*) yang menyeleksi ion. Sistem LC-MS/MS umumnya menggunakan beberapa jenis *ion source* dan *mass analyzer* yang dapat disesuaikan dengan kepolaran senyawa yang akan dianalisa. Masing-masing *ion source* dan *mass analyzer* memiliki kelebihan dan kekurangan sehingga harus disesuaikan dengan jenis informasi yang dibutuhkan (Agilent, 2001).

Menurut Maryam (2007), *Mass Spectrometer* (MS) merupakan alat yang dapat memberikan informasi mengenai bobot molekul dari struktur senyawa organik. Selain itu, alat ini juga dapat mengidentifikasi dan menentukan

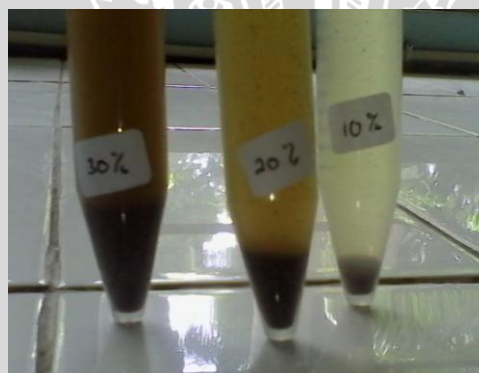
komponen – komponen suatu senyawa. Perpaduan MS dengan HPLC (LC-MS) membuat alat ini semakin populer untuk mendeteksi berbagai senyawa termasuk mikotoksin.



4. HASIL DAN PEMBAHASAN

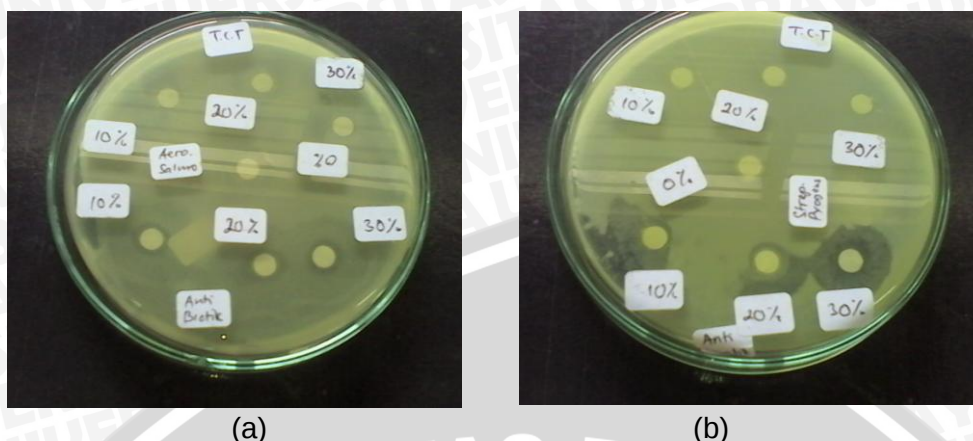
4.1 Penelitian Pendahuluan

Penelitian pendahuluan bertujuan untuk membuktikan kemampuan tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dalam menghambat bakteri gram positif dan gram negatif. Pada bakteri gram positif diwakili oleh *Streptococcus pyogenes* sedangkan bakteri gram negatif diwakili oleh *Aeromonas salmonicida*. Hasil penelitian pendahuluan memperlihatkan bahwa tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) dapat menghambat pertumbuhan bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Hal ini dibuktikan dengan adanya luasan diameter zona bening yang dihasilkan pada tepung cacing tanah. Hasil ekstraksi tepung cacing tanah dapat ditunjukkan pada gambar 10.



(a) (b) (c)
Gambar 10. Ekstraksi *Lumbricus rubellus* setelah disentrifuse dengan konsentrasi (a) 30% ; (b) 20% dan (c) 10%.

Konsentrasi tepung cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) memiliki daya hambat paling luas pada konsentrasi 20% (b/v) pada bakteri *Aeromonas salmonicida* yaitu 5,175 mm dan pada bakteri *Streptococcus pyogenes* sebesar 7,475 mm. Data hasil penelitian pendahuluan dapat dilihat pada lampiran 3. Aktivitas daya hambat tepung cacing tanah pada *A. salmonicida* dan *S. pyogenes* dapat dilihat pada gambar 11.



Gambar 11. a) *Aeromonas salmonicida* dan b) *Streptococcus pyogenes*

4.2 Penelitian Utama

Pada penelitian utama ini dilakukan uji daya hambat dengan tiga kali ulangan metode duplo. Untuk pelarut yang digunakan yaitu aquadest karena bioaktif yang terdapat pada cacing tanah (*Lumbricus rubellus*) yaitu Lumbricin I merupakan asam amino yang kaya akan prolin yang bersifat larut dalam air. Didukung oleh Hayati *et al.*, (2011), metode dekokta dipilih karena zat aktif yang dituju bersifat relatif polar (larut air).

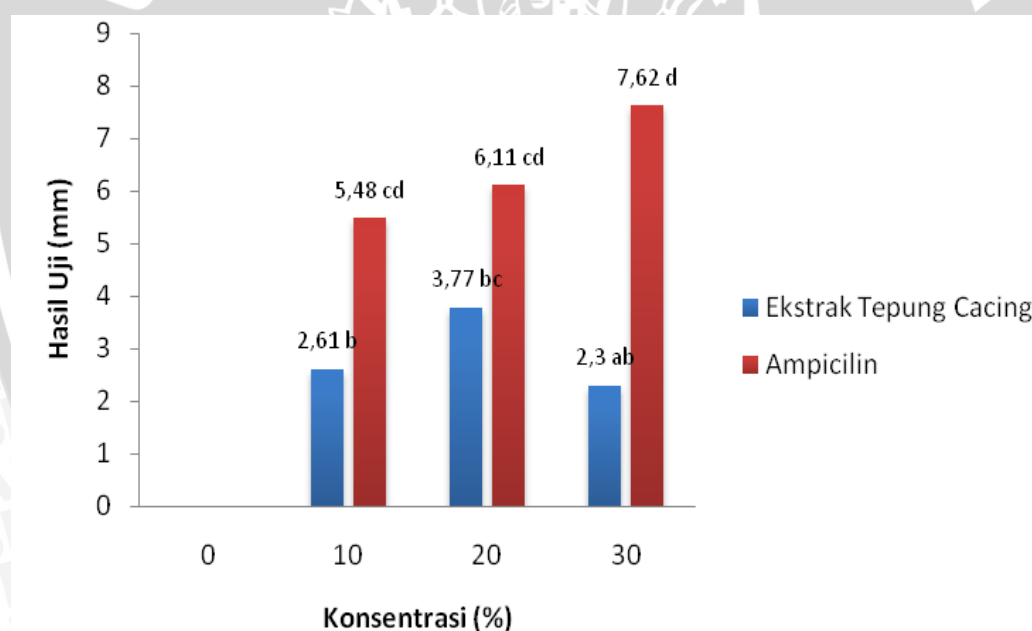
Hasil ekstraksi *Lumbricus rubellus* dijadikan sebagai konsentrasi (10%, 20%, dan 30%) yang mengalami kenaikan dan penurunan dari hasil konsentrasi terbaik dalam menghambat bakteri *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Hasil penelitian menunjukkan daya hambat pada *Streptococcus pyogenes* lebih luas daripada *Aeromonas salmonicida*. Hal ini karena *Aeromonas salmonicida* merupakan bakteri gram negatif yang memiliki komposisi membran sel yang lebih tipis dibandingkan dengan peptidoglikan. Sehingga *Aeromonas salmonicida* susah mengalami difusi pasif dari senyawa antibakteri. Hal ini didukung oleh penelitian Sareong (2000) menyatakan dinding sel bakteri gram positif banyak mengandung teikoat dan asam teikoronat dan ada beberapa bakteri gram positif mengandung molekul polisakarida, sedangkan dinding sel

bakteri gram negatif berisi tiga komponen yaitu lipoprotein membran terluar yang mengandung molekul protein yang disebut porin dan lipopolisakarida. Porin pada membran terluar dinding sel bakteri gram negatif tersebut bersifat hidrofilik. Kemungkinan porin yang terkandung pada membran terluar tersebut menyebabkan molekul - molekul komponen ekstrak lebih sukar masuk ke dalam sel bakteri. Oleh karena itu, bakteri *Aeromonas salmonicida* tahan terhadap tepung *Lumbricus rubellus* dibandingkan *Streptococcus pyogenes*.

4.2.1 Uji Aktivitas Antibakteri

4.2.1.1 *Aeromonas salmonicida*

Aktivitas antibakteri dilihat dari zona bening pada bakteri *Aeromonas salmonicida* yang dapat dilihat pada grafik Gambar 12. dan lampiran 5.

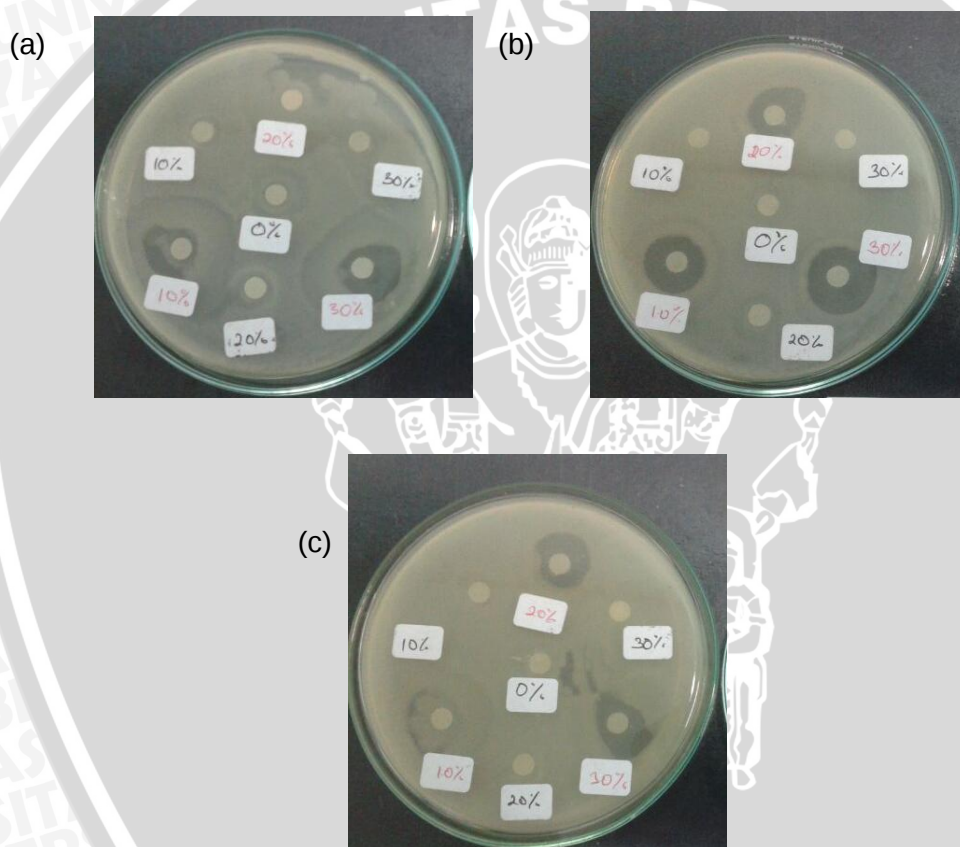


Gambar 12. Grafik Perbedaan Zona Hambat dari Konsentrasi Ekstrak Tepung *L. rubellus* dan Ampicilin terhadap *Aeromonas salmonicida*

Dari hasil analisis lampiran 5. daya hambat tepung cacing tanah *Lumbricus rubellus* terhadap *Aeromonas salmonicida* untuk konsentrasi 0% berbeda nyata terhadap konsentrasi 10%, 20%, dan 30%. Antara konsentrasi 10% dengan 20% berbeda nyata, sedangkan konsentrasi 10% dengan 30% tidak

berbeda nyata. Pada konsentrasi 20% dengan 30% tidak berbeda nyata, dan konsentrasi 30% tidak berbeda nyata dengan 10% dan 20%.

Pada Gambar 12. diatas dapat dilihat bahwa pada konsentrasi 20% pada ekstrak tepung cacing tanah merupakan konsentrasi terbaik dalam memberikan daya hambat karena memiliki daya hambat paling luas. Perbandingan diameter daya hambat pada tepung *Lumbricus rubellus* dengan kontrol positif (ampicilin) konsentrasi 10%, 20%, dan 30% dapat dilihat pada Gambar 13.



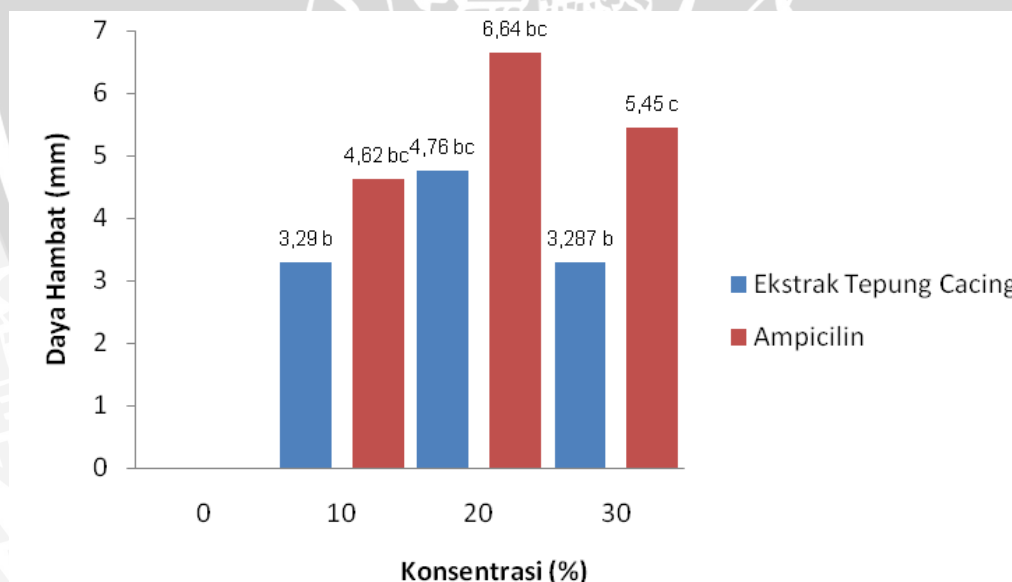
Gambar 13. Perbandingan Zona Hambat Tepung *Lumbricus rubellus* dengan kontrol Ampicilin dengan Konsentrasi 10%, 20% dan 30% untuk Ulangan 1 (a), Ulangan 2 (b), dan Ulangan 3 (c).

Hasil uji daya hambat yang tidak meningkat pada kenaikan konsentrasi diduga karena konsentrasi tinggi tidak berpengaruh terhadap daya hambat yang dihasilkan. Konsentrasi yang tinggi pada tepung cacing tanah justru memiliki kandungan asam amino yang tinggi pula, sehingga akan dimanfaatkan untuk

metabolisme mikroba. Akibatnya aktivitas senyawa antibakteri tidak dapat bekerja secara optimal dalam menghambat pertumbuhan bakteri. Ada jenis bakteri yang justru memanfaatkan protein untuk metabolismenya, seperti *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*. Ditambahkan oleh Nizet dan Arnold (2000), *Streptococcus pyogenes* menyerang bagian M protein dan protein pengikat fibrin pada lapisan kulit manusia untuk membuat infeksi sehingga membuat manusia itu terinfeksi pada sistem infeksi patogen. Dan juga oleh Gudmundsdottir (1998), *A. salmonicida* menginfeksi bagian kulit, insang, pankreas, ginjal, hati, dan otak pada ikan salmon atlantic. Bagian – bagian yang terinfeksi *A. salmonicida* akan lebih parah dan mengalami nekrosis bahkan sampai mati. Bagian yang diserang *A. salmonicida* tersebut mengandung protein.

4.2.1.2 *Streptococcus pyogenes*

Aktivitas antibakteri dilihat dari zona bening pada bakteri *Streptococcus pyogenes* yang dapat dilihat pada grafik gambar 14. dan Lampiran 5.

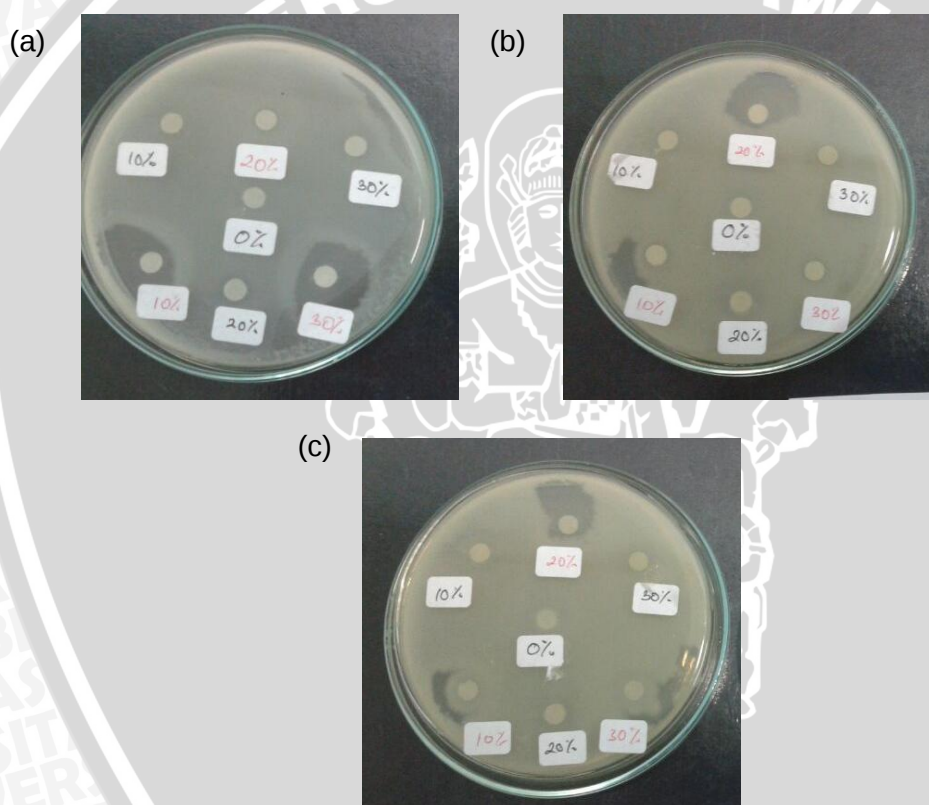


Gambar 14. Grafik Perbedaan Zona Hambat dari Konsentrasi Ekstrak Tepung *L. rubellus* dan Ampicilin terhadap *Streptococcus pyogenes*

Dari hasil analisis lampiran 5. daya hambat tepung cacing tanah *Lumbricus rubellus* terhadap *Streptococcus pyogenes* untuk konsentrasi 0% berbeda nyata terhadap konsentrasi 10%, 20%, dan 30%. Antara konsentrasi

10% dengan 20% berbeda nyata, sedangkan konsentrasi 10% dengan 30% tidak berbeda nyata. Pada konsentrasi 20% dengan 30% tidak berbeda nyata, dan konsentrasi 30% tidak berbeda nyata dengan 10% dan 20%.

Dari gambar 14. diatas dapat dilihat bahwa pada konsentrasi 20% merupakan konsentrasi terbaik dalam memberikan daya hambat karena nilai hasil zona hambat. Perbandingan diameter daya hambat pada tepung *Lumbricus rubellus* dengan kontrol positif (ampicilin) konsentrasi 10%, 20%, dan 30% dapat dilihat pada Gambar 15.



Gambar 15. Perbandingan Zona Hambat Tepung *Lumbricus rubellus* dengan kontrol Ampicilin dengan Konsentrasi 10%, 20% dan 30% untuk Ulangan 1 (a), Ulangan 2 (b), dan Ulangan 3 (c).

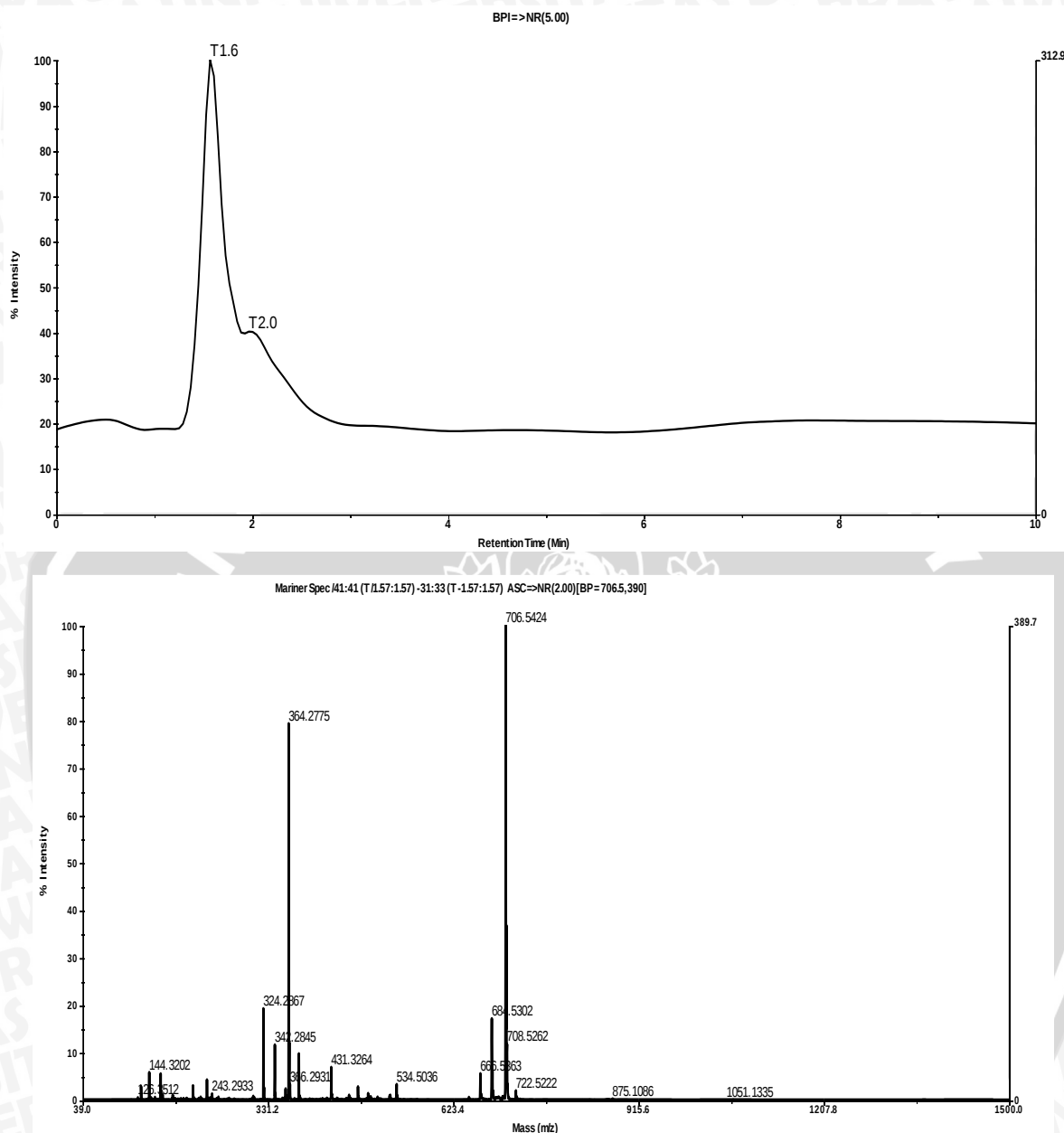
Respon hambatan mikroba gram positif lebih kuat dibandingkan mikroba gram negatif. Penelitian ini didukung oleh penelitian dari Iskandar *et al* (2009), kemungkinan disebabkan oleh perbedaan komponen penyusun dinding sel antara mikroba gram positif dan gram negatif. Dinding sel mikroba gram positif

banyak mengandung teikoat dan asam teikoronat serta molekul polisakarida. Karena menurut Irianto (2006), komponen kimia ini melindungi sel dari dari kegiatan lisis enzim, sedangkan zat-zat lain menentukan reaksi sel pada pengecatan gram dan ada pula yang menarik dan mengikat bakteriofage.

Faktor-faktor lain yang juga dianggap dapat mempengaruhi antara lain kepekaan pertumbuhan bakteri, reaksi antara bahan aktif dengan medium dan temperatur inkubasi. Beberapa faktor yang juga mempengaruhi hal ini antara lain adalah pH lingkungan, komponen media, stabilitas obat, ukuran inokulum, waktu inkubasi dan aktivitas metabolik mikroorganisme (Brooks, *et al.*, 2005).

4.2.2 Identifikasi Senyawa Bioaktif dengan Uji LC-MS

Uji LCMS – ESI (*Electrospray Ionisation*) ekstrak tepung *Lumbricus rubellus* dilakukan di Laboratorium Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI) Serpong Tangerang Selatan. Pengujian LCMS – ESI bertujuan untuk mengidentifikasi berat molekul dari bioaktif pada *Lumbricus rubellus*. Hasil pengujian LCMS menunjukkan dua retensi waktu yang diperoleh yaitu 1.60 dan 2.00. Senyawa yang diidentifikasi dari dua retensi waktu tersebut menghasilkan 2 puncak tertinggi. Analisis senyawa-senyawa antibakteri dengan metode uji LC-MS ditampilkan pada Gambar 16 dan Lampiran 7.



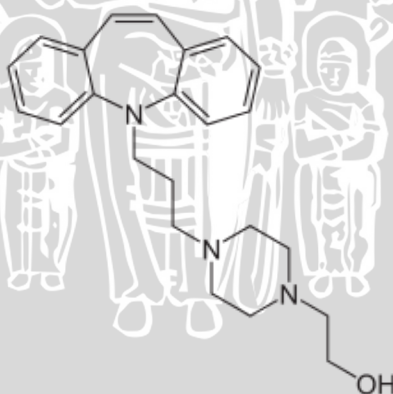
Gambar 16. Hasil Analisis Uji LC-MS Tepung *Lumbricus rubellus*

Uji LCMS ini menggunakan metode ionisasi *electrospray ionization* (ESI) modus positif dengan pelarut metanol (MeOH). Ionisasi metode ESI positif akan menghasilkan ion molekul dengan penambahan kation, misalnya $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ atau ion muatan ganda $[M+nH]^{n+}$. hasil penambahan ion pada uji LCMS *Lumbricus rubellus* dapat dilihat pada tabel 3. Di bawah ini.

Tabel 3. Pecahan ion molekul senyawa bioaktif pada *Lumbricus rubellus*

Massa ion (m/z)	Dugaan pecahan ion molekul
364.2775	$C_{23}H_{29}N_3O$
363.2311	$C_{23}H_{29}N_3O+H$
706.5424	$C_{35}H_{62}NO_{12}$
688.858	$C_{35}H_{62}NO_{12}+1/2O$

Dari gambar 16. hasil LCMS tersebut terdapat dua puncak tertinggi yaitu 364.2775 dan 706.5424. Di mana menurut massbank (2014), puncak 364.2775 memiliki kesamaan berat molekul dengan 363.23106 m/z yang dimiliki oleh Opipramol. Opipramol merupakan senyawa antidepresan dan *anxyolytic* yang biasa digunakan di Jerman dan negara negara Eropa. Senyawa ini biasanya digunakan dalam pengobatan gangguan kecemasan umum dan gangguan somatoform. Terapi dengan Opipramol menunjukkan terapi tambahan neuroleptik, hipnotik dan obat penenang (misalnya. Barbiturat , Benzodiazepin). Struktur kimia dari Opipramol yaitu $C_{23}H_{29}N_3O$ (Mohapatra, 2013). Gambar struktur Opipramol dapat dilihat pada gambar 17. di bawah ini.

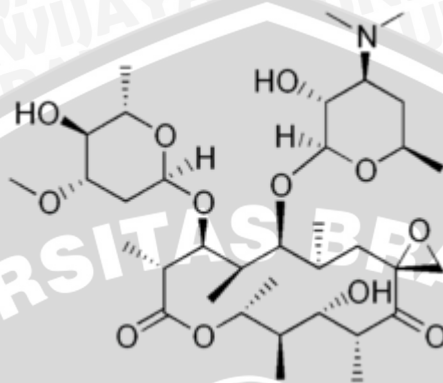


(Wikipedia^a, 2014)

Gambar 17. Struktur kimia opipramol

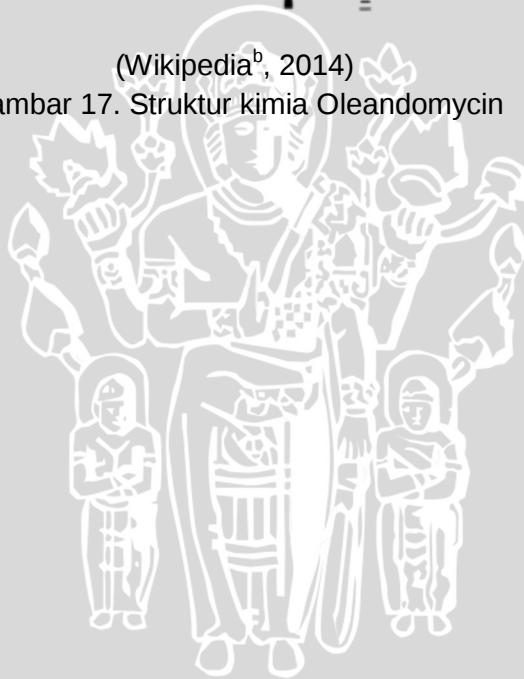
Pada puncak 706.5424 menurut massbank (2014) memiliki hubungan berat molekul yang dekat dengan 688.858 m/z yang dimiliki oleh Oleandomycin. Oleandomycin merupakan antibiotik makrolida yang dihasilkan oleh bakteri *Streptomyces antibioticus*. Senyawa ini berisi cincin macrolactone (oleandolide)

dimodifikasi dengan lampiran dari dua gula siklik, *oleandrose* dan α -*D*-*desosamine* (Encyclopedia, 2014). Oleandomycin memiliki rumus kimia $C_{35}H_{62}NO_{12}$ dan struktur kimia Oleandomycin dapat dilihat pada gambar 18. di bawah ini.



(Wikipedia^b, 2014)

Gambar 17. Struktur kimia Oleandomycin



5. KESIMPULAN DAN SARAN

5.1 Kesimpulan

Dari hasil penelitian dapat diambil beberapa kesimpulan antara lain :

- ✓ Tepung *Lumbricus rubellus* menghasilkan daya antibakteri terbaik dengan konsentrasi 20% pada *Aeromonas salmonicida* sebesar 3,77 mm, sedangkan pada *Streptococcus pyogenes* konsentrasi terbaik pada konsentrasi 20% yaitu sebesar 4,76 mm.
- ✓ Hasil analisa bioaktif dengan metode LC-MS, didapatkan bahwa bioaktif yang terkandung dalam *Lumbricus rubellus* didapat dua puncak tertinggi yaitu 364.2775 yang mirip dengan Opipramol dan 706.5424 yang mirip dengan Oleandomycin.

5.2 Saran

Disarankan pada penelitian selanjutnya agar lebih hati – hati dalam proses pembuatan tepung *Lumbricus rubellus* terutama membuat tepung cacing tanah agar tepung yang dihasilkan tidak merusak kandungan bioaktif di dalamnya, serta dapat dilakukan untuk pengujian lanjutan bioaktif ini sebagai antifungi.

DAFTAR PUSTAKA

- Afandi, D.; Sampurna, B.; Sutanto, I.; Marwoto, J.W.; Chairani, N.; Himawan, S. 1996. Autopsy findings in severe malaria – a case report. *Medical Journal Indonesia*; **17** : 210-5
- Agilent T. 2001. Agilent LC-MS Primer. U.S.A 5988-204 EN.
- Andrea, R.T.N.E. 2011. Uji Aktivitas Antibakteri *Aspergillus niger* Isolat dari Akar Mangrove (*Acanthus ilicifolius*) Terhadap *S. Aureus* dan *E. Coli*. Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan. FPIK UB. Malang. Skripsi.
- Azis, A. A. 2009. Penentuan Kadar Air dan Minyak Sawit Mentah (CPO) pada Tangki Penyimpan di Pabrik Kelapa Sawit PT. PN. IV Kebun Adolina. Program Diploma-3 Kimia Industri Fakultas MIPA Univ. Sumatera Utara. Medan. Karya Ilmiah.
- Brooks, G.F., S. B. Janet, dan A. M. Stephen, 2005. Mikrobiologi Kedokteran. Penerbit Salemba Medika. Jakarta.
- Cho, J. H., C. B. Park, Y. G. Yoon and S. C. Kim. 1998. Lumbricin I, a novel proline-rich antimicrobial peptide from the earthworm: purification, cDNA cloning and molecular characterization. *Biochemistry Biophys Acta*. **1408**: 67-76.
- Cunningham, M.W. 2000. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infection, *Clinical Microbiology Revition*, **13** (3), , 470-511.
- Davis, S. 2000. Antibacterial Activity Of Extracts Of Six Macroalgae From The Northeastern Brazilian Coast. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciencias Biologicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; Departamento de Biologia, Universidade Federal do Ceara, Fortaleza, CE, Brasil. *Brazilian Journal Of Microbiology*. **33** (3): 311-313.
- Darmayasa, I.B.C. 2008. Daya Hambat Fraksinasi Ekstrak Sembung Delan (*Sphaerantus indicus* L.) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* Dan *Staphylococcus aureus*. *Jurnal Biologi* **11** (2):74-77.
- Dewi, F. K. 2010. Aktivitas Antibakteri Ekstrak Etanol Buah Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) Terhadap Bakteri Pembusuk Daging Segar. Jurusan Biologi. Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam. Universitas Sebelas Maret. Surakarta. Skripsi.
- DKP. 2009. Pengendalian Penyakit Ikan. Buku Saku. Departemen Kelautan dan Perikanan. Jakarta.
- Dwidjoseputro, D. 1998. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Cetakan ke 13. Penerbit Djambatan. Jakarta
- _____. 2005. Dasar-Dasar Mikrobiologi. Penerbit Djambatan. Jakarta.

- Eidman, M., K. Sumawidjaja, dan S.L.A.S. Hardjosworo, 1981. Wabah Penyakit Bercak Merah Ikan. Laporan Kelompok Kausal Team Crash Program Penanggulangan Epidemi Penyakit Ikan. Institut Pertanian Bogor.
- Evans, J.J.; P.H. Klesius, dan C.A. Shoemaker. 2006. An overview of *Streptococcus* in warmwater fish. *Aquaculture Health International*. 7 (5): 10-14.
- Ganiswara, G.S, 1995, Farmakologi dan Terapi, edisi 4, Penerbit Universitas Indonesia, Jakarta, hlm 517-518, 571-573, 651-656, 682-685.
- Ginting, J. 2008. Isolasi Bakteri dan Uji aktivitas Enzim Amilase Kasar Termofilik dari Sumber Air Panas Semangat Gunung Kabupaten Karo, Sumatera Utara. Universitas Sumatera Utara. Medan. Skripsi.
- Gudmundsdottir, B.K. 1998. Infections by atypical strains of the bacterium *Aeromonas salmonicida*. University of Iceland.
- Greenwood. 1995. Antibiotics, Susceptibility (Sensitivity) Test Antimicrobial And Chemoterapy. Mc. Graw Hill Company, USA.
- Googleimage^a. 2014. Prolin. <http://www.googleimage.com/prolin> diakses pada 14 Juli 2014 14.05 WIB
- Googleimage^b. 2014. *Streptococcus pyogenes*. [http://www.googleimage.com/streptococcus pyogenes](http://www.googleimage.com/streptococcus%20pyogenes) diakses pada 14 Juli 2014 14.05 WIB
- Googleimage^c. 2014. Dinding Sel Bakteri Gram Negatif dan Positif. http://www.googleimage.com/Dinding_sel_bakteri diakses pada 14 Juli 2014 14.05 WIB
- Googleimage^d. 2014. *Aeromonas salmonicida*. [http://www.googleimage.com/aeromonas salmonicida](http://www.googleimage.com/aeromonas%20salmonicida) diakses pada 14 Juli 2014 14.00 WIB.
- Googleimage^e. 2014. 3,5 – Diiodo - tyrosine. <http://www.googleimage.com/3,5-diiodo-tyrosine> diakses pada 14 Juli 2014 14.05 WIB
- Handajani H.S.S. 2005. Parasit dan Penyakit Ikan. Buku Pedoman. Universitas Muhamadiyah Malang. Malang.
- Harborne, J.B. 2006. Fitokimia. Penuntun Cara modern Menganalisis Tumbuhan Terbitan Kedua. Penerbit ITB, Bandung.
- Hayati. 2011. Uji Bioaktifitas Antibakteri Ekstrak dan Fraksi Lamun dari Kepulauan Spermonde. Kota Makassar. Universitas Hasanuddin. Makassar. Laporan Penelitian.
- Holt J.G.; N.R. Kreig; P.H.A Sneath; and J.T. Staley. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. United States of America Baltimore: Williams & wilkins Company
- Inayati, H. 2007. Potensi Antibakteri Ekstrak Daun Kedondong Bangkok. Departemen Biologi FMIPA. Institut Pertanian Bogor. Bogor. Skripsi.

- Inglis, V., R.J. Roberts dan N.R. Bromage. 1993. Bacterial Diseases of Fish. Institute of Aquaculture. Blackwell Scientific Publications. London. 135 p
- Irianto, A. 2005. Patologi Ikan Teleostei. Universitas Gajah Mada. Yogyakarta. 256 hlm.
- Iskandar, Y.; R. Dewi, dan R.D. Rini. 2009. Uji Aktivitas Antibakteri ekstrak Etanol Rumput Laut (*Eucheuma cottonii*) Terhadap Bakteri *Escherichia coli* dan *Bacillus cereus*. Jurusan Farmasi Fakultas MIPA Universitas Padjadjaran. Bandung. Skripsi.
- Jawetz, E., J.L. Melnick, and E. Adelberg. 1995. Medical Microbiology. Apleton and Lange. New York.
- Jawetz, M, dan Adelberg's. 2001. Mikrobiologi Kedokteran. Edisi 20. Judul asli Medical Microbiology Alih bahasa Edi Nugroho, Maulany R.F., Buku Kedokteran EGC, Jakarta, hal. 11-34 dan 317-371.
- Julendra, H. 2005. Pengaruh Penambahan Tepung Cacing Tanah (*L. rubellus*) sebagai Suplemen Pakan terhadap Aktivitas *Salmonella pullorum* dengan Uji secara In Vitro. **7** (4): 12-14.
- Kabata, Z. 1985. Parasites and Diseases of Fish Cultured in the Tropics. Taylor and Francis. London
- Kazakevich Y dan R. Lobrutto. 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. New Jersey : John Wiley & Sons, 282
- Kordi K dan Ghufon H. 2004. Penanggulangan Hama dan Penyakit Ikan. Rineka Cipta dan Bina Adiaksara. Jakarta.
- Kusmiyati dan N.W.S Agustini, 2006. Uji Aktivitas Senyawa Antibakteri Dari Mikroalga *Porphyridium cruentum*. Pusat Penelitian Bioteknologi, Lembaga Ilmu Pengetahuan Indonesia (LIPI). Cibinong.
- Lay, B.H. 1994. Analisis Mikroba di Laboratorium. PT. Raja Grafindo Persada. Jakarta.
- Lindsay, S. 1992. High Performance Liquid Chromatography second edition. New york, Chichester Brisbane. Toronto, Singapore : John Wiley & Sons, 157
- Liu, Y-Q., Z-J. Sun, C. Wang, S-J. Li, and Y-Z. 2004. Purification of a Novel Antibacterial Short Peptide in Earthworm *Eisenia foetida*. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **36** (4): 297-302
- Maryam, R. 2007. Metode Deteksi Mikotoksin. Jurnal Mikotoksin Indonesia **7** (1-2): 12-24
- Massbank. 2014. 364. <http://www.massbank.jp> diakses pada 8 Oktober 2014 19.00 WIB.
- _____. 2014. 706. <http://www.massbank.jp> diakses pada 8 Oktober 2014 19.10 WIB.

- Mihara, H.; Sumi, H.; Yoneta, T.; Mizumoto, H.; Ikeda, R.; Seiki M.; Maruyama M. 1991. A Novel Fibrinolytic Enzyme Extracted from the Earthworm, *Lumbricus rubellus*. *Japan J Physiol* **41** (2): 461-462-471.
- Menegristek. 2000. Cara Sukses Budidaya Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*). http://Cacing_Tanah_Pembawa_Keberuntungan.wordpress.com diakses pada 20 Juni 2014 18.00 WIB.
- Mohapatra, S; NM. Rath; A. Agrawal, dan J. Verma. 2013. Opipramol : A Novel Drug. *Delhi Psychiatry Journal* **16** (2): 409-411.
- Nizet, V. dan Arnold J.C. 2000. *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococcus). *Etiologic Agents of Infections Diseases*.
- Ovianto, E. 2004. Uji Aktifitas Fibrinolitik Tepung Cacing (*Lumbricus rubellus*) Secara Invitro dan Evaluasi Pengaruhnya Terhadap Beberapa Parameter Anteroskloresis Pada Monyet Ekor Panjang *Macaca fascicularis* Sehat. Fakultas Teknologi Pertanian Institut Pertanian Bogor: Bogor. Skripsi.
- Palungkun, R. 2008. Sukses Beternak Cacing Tanah *Lumbricus rubellus*. Penebar Swadaya. Jakarta. hal. 5-15.
- Pelczar, M. J. dan E. C. S. Chan. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi Jilid 2. Terjemahan dari *Elements of Microbiology*. oleh R.S. Hadioetomo, Teja Imas, S. Sutarmi Tjitrosomo, Sri Lestari Angka . UI Press, Jakarta.
- Pradhika, E. I. 2008. Daya Kerja Antimikroba dan .yanpusmeongblog.com. Diakses pada tanggal 7 Juni 2012.
- Richards, R.H. and R.J. Robert. 1978. *The Bacteriology Of Teleost Dalam Fish Pathology*. Edited by R.J. Robert. Bailliere Tindall - London. p. 190 - 197.
- Sari, M.I. 2007. Struktur Protein. Modul Kuliah. Fakultas Kedokteran USU.
- Setyawan, A., Hudaidah, S., Ranopati, Z.,Z., dan Sumino. 2012. Imunogenisitas Vaksin Inaktif Whole Cell *Aeromonas salmonicida* pada Ikan Mas (*Cyprinus carpio*). *Aquasains* **1** (1): 17-21.
- Suyanti. 2008. Ekstraksi Konsentrat Neodimium Memakai Asam di-2-etilheksilfosfat. *SDM Teknologi Nuklir*. Yogyakarta.
- Vogel, A.I. 1987. *Textbook of Practical Organic Chemistry*. Revised by Furries B.S. 4nd Edition. New York.
- Wikipedia^a.2014. Struktur Opipramol. <http://www.wikipedia.com/opipramol> diakses pada 8 Oktober 2014 20.00 WIB.
- Wikipedia^b. 2014. Struktur oleandomycin. <http://www.wikipedia.com/oleandomycin> diakses pada 8 Oktober 2014 2010 WIB.
- Wiyanto, D, B. 2010. Uji Aktivitas Antibakteri Ekstrak Rumput Laut *Kappaphycus Alvarezii* dan *Eucheuma Denticullatum* Terhadap Bakteri *Aeromonas Hydrophila* dan *Vibrio Harveyii*. *Jurnal Kelautan*, **3** (1) : 1-17

Wolke, R.E. 1975. Pathology Of Bacterial and Fungal Diseases Affecting Fish dalam The Pathology Of Fishes. Edited by W.E. Ribelin and G. Migaki. The University of Wisconsin Press. p. 51 - 63.

Wulandari, D. 2010. Pengaruh terapi kombinasi klorokuin dan serbuk *Lumbricus rubellus* terhadap ekspresi gen *tnf- α* pada mencit Swiss yang diinfeksi *Plasmodium berghei* anka. Univ. Sebelas Maret. Surakarta



Lampiran 1. Prosedur Pembuatan Media TSA**Komposisi Medium Tryptone Soya Agar (TSA)**

Formula	Gram per liter
Tryptone	15
Soya Peptone	5
Sodium Chloride	5
Agar	15

Sumber: Fardiaz (1993)

Prosedur Pembuatan :

1. Ditimbang 9,6 gram bubuk medium TSA.
2. Dimasukkan erlenmeyer 250 mL.
3. Ditambahkan aquades sedikit-sedikit sambil digoyang sampai 1 liter.
4. Dimasukkan dalam waterbath suhu 100°C selama 15 menit.
5. Selama pemanasan di waterbath sesekali erlenmeyer digoyang untuk membantu pelarutan (supaya homogen)
6. Jika sudah larut sempurna dengan tidak adanya agar yang menempel pada dinding erlenmeyer berarti media telah homogen.
7. Media didinginkan sampai suhu $\pm$ 45°C (hangat-hangat kuku).
8. Tutup cawan dibiarkan sedikit terbuka untuk mengeluarkan uap panas.
9. Jika sudah mengeras media dalam cawan tersebut diinkubasi pada suhu 37°C selama 24 jam untuk uji sterilisasi medium.
10. Jika melewati uji sterilisasi media sudah siap untuk digunakan.

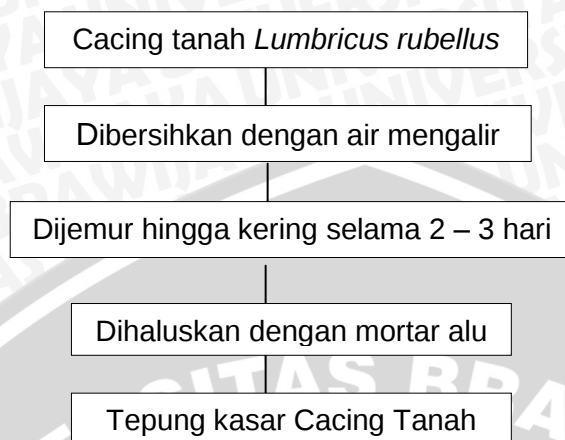
Lampiran 2. Tahapan Pelaksanaan Uji Cakram Metode Kirby-Bauer (1966)

Adapun tahapan-tahapan dalam pelaksanaan uji cakram metode Kirby-Bauer (1966) adalah sebagai berikut:

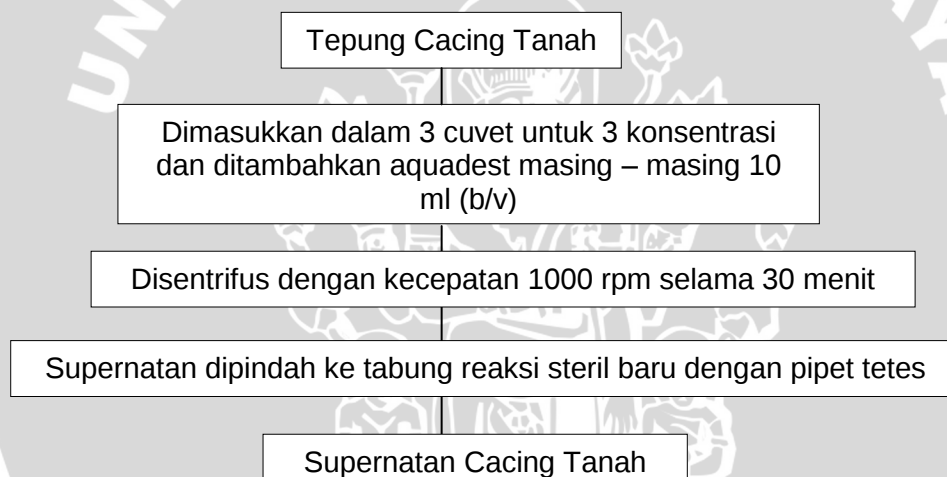
- Lempeng agar TSA ditandai dengan nama, tanggal dan mikroorganisme yang akan diuji.
- Kapas lidi (*cotton swab*) steril dicelupkan dalam suspensi biakan uji, dengan OD : 0,1 CFU/ml, kemudian kapas lidi diputar pada dinding tabung (diperas) agar cairan tidak menetes dari bagian kapas tersebut.
- Sebar mikroorganisme pada seluruh permukaan lempeng agar dengan cara dioleskan, untuk mendapatkan pertumbuhan yang merata, kapas lidi dioleskan secara mendatar, kemudian diputar lempeng agar 90°C dan dibuat olesan kedua, dengan lempeng agar diputar 45°C 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.
- Dalam 1 lempeng agar dapat digunakan 5-6 macam dosis perlakuan, jarak antara kertas cakram harus cukup luas, sehingga wilayah jernih tidak saling berhimpitan yang nantinya akan menyulitkan dalam proses pengukuran zona hambat.
- Kertas cakram ditekan dengan pinset, tidak perlu keras karena akan merusak permukaan agar.
- Lempeng yang sudah ditempelkan kertas cakram diinkubasi pada suhu optimal tumbuh dari bakteri patogen yang sedang diujikan.
- Setelah bakteri uji sudah tumbuh merata, dan terlihat adanya zona jernih dipermukaan agar, maka luas zona jernih dapat diukur dengan mengukur diameternya.

Lampiran 3. Skema Kerja Penelitian

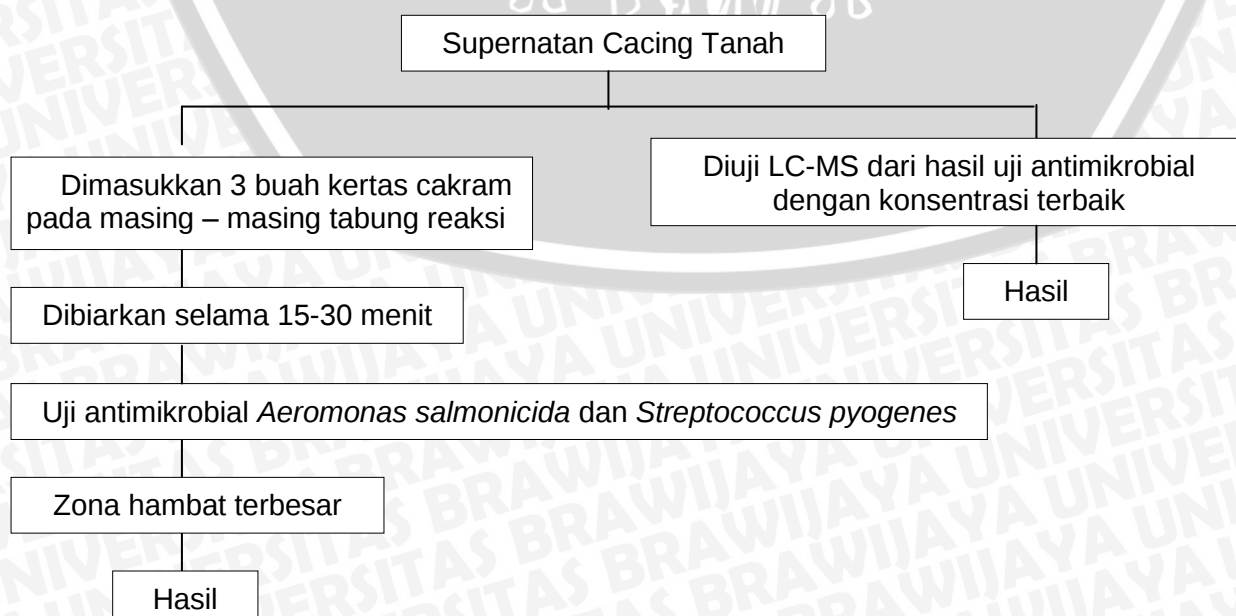
3.1 Pembuatan Tepung Cacing Tanah *Lumbricus rubellus*



3.2 Pembuatan Supernatan Cacing Tanah yang akan diuji Antibakteri



3.3 Pengujian Antibakteri dan LCMS *Lumbricus rubellus*



Lampiran 4. Hasil Penelitian Pendahuluan Uji Cakram *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*

Faktor 1	Faktor 2	<i>Aeromonas salmonicida</i>	<i>Streptococcus pyogenes</i>
E.T.C.T (A)	0 %	0	0
	10 %	3,4	5,5
	20%	5,175	7.475
	30%	2,275	2,4
Ampi cilin (B)	0 %	0	0
	10 %	15,05	12,4
	20%	16,425	15,05
	30%	20,05	16,425



Lampiran 5. Analisis Keragaman (ANOVA) Uji Cakram *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*

1. Data Diameter Zona Bening Antibakteri terhadap *Aeromonas salmonicida* dan *Streptococcus pyogenes*

1.1 Hasil Uji Cakram terhadap *Aeromonas salmonicida* Secara Duplo

Faktor 1	Faktor 2	<i>Aeromonas salmonicida</i>					
		I (mm)		II (mm)		III (mm)	
		a	b	a	b	a	b
Tepung Cacing Tanah	0 %	0	0	0	0	0	0
	10 %	3,4	2,475	2,475	3,4	2,475	1,425
	20 %	4,45	3,4	4,45	4,45	3,4	2,475
	30 %	2,475	1,425	2,475	2,475	2,475	2,475
Ampicilin	0 %	0	0	0	0	0	0
	10 %	5,5	4,45	5,5	4,45	5,5	7,475
	20 %	4,45	3,4	7,475	6,425	6,425	8,5
	30 %	6,425	6,425	8,5	7,475	7,475	9,45

1.2 Hasil Uji Cakram terhadap *Streptococcus pyogenes* Secara Duplo

Faktor 1	Faktor 2	<i>Streptococcus pyogenes</i>					
		I (mm)		II (mm)		III (mm)	
		a	b	a	b	a	b
Tepung Cacing Tanah	0 %	0	0	0	0	0	0
	10 %	3,4	3,4	2,475	2,475	2,475	5,5
	20 %	6,425	4,45	4,45	3,4	3,4	6,425
	30 %	4,45	3,4	2,475	1,425	2,475	5,5
Ampicilin	0 %	0	0	0	0	0	0
	10 %	5,5	4,45	4,45	4,45	4,45	4,45
	20 %	6,425	3,4	5,5	2,475	8,5	6,425
	30 %	6,425	5,5	5,5	5,5	9,45	7,475

1.3 Data Rancangan Acak Lengkap (RAL)

Faktor 1	Faktor 2	Aeromonas salmonicida (X)			Streptococcus pyogenes (Y)			Total	Rata - Rata
		1	2	3	1	2	3		
E.T.C. T (A)	0 %	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 %	2,94	2,94	1,95	3,4	2,47	3,99	17,69	2,95
	20%	3,92	4,45	2,94	5,44	3,92	4,91	25,58	4,26
	30%	1,95	2,47	2,47	3,92	1,95	3,99	16,75	2,79
Ampi cilin (B)	0 %	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 %	4,97	4,97	6,49	4,97	4,45	4,45	30,3	5,05
	20%	3,92	6,95	7,46	4,91	3,99	7,46	34,69	5,78
	30%	6,42	7,99	8,46	5,96	5,5	8,46	42,79	7,13
Total								167,8	27,97

2. Analisis Sidik Ragam (ANOVA)

2.1 Hipotesis :

H_0 = tidak ada hubungan antara ekstrak sampel dengan konsentrasi

H_1 = ada hubungan antara ekstrak sampel dengan konsentrasi

$f_{hitung} < f_{0,05} \rightarrow$ terima H_0 ; tidak ada perbedaan nyata

$f_{hitung} > f_{0,05} \rightarrow$ terima H_1 ; ada perbedaan nyata

2.2 Analysis of variance (ANOVA)

2.2.1 ANOVA pada *Aeromonas salmonicida*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: A. *salmonicida*

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	163.598 ^a	7	23.371	28.427	.000
Intercept	291.625	1	291.625	354.710	.000
Faktor_1	41.607	1	41.607	50.607	.000
Faktor_2	100.498	3	33.499	40.746	.000
Faktor_1 * Faktor_2	21.493	3	7.164	8.714	.001
Error	13.154	16	.822		
Total	468.377	24			
Corrected Total	176.752	23			

a. R Squared = ,926 (Adjusted R Squared = ,893)

Dapat dilihat bahwa F_{hitung} sebesar 8,714 sedangkan F_{tabel} sebesar 3,24, sehingga dapat disimpulkan $F_{hitung} > F_{tabel}$ ($8,714 > 3,24$) maka H_0 ditolak dan H_1 diterima, **ada beda nyata antara ekstrak tepung dengan konsentrasi**. Hal ini dapat juga dilihat dari P_{value} (0,001) lebih kecil dari taraf nyata (0,05).

2.2.2 Uji Lanjutan (Tukkey) pada Uji Daya Hambat A. *salmonicida*

Multiple Comparisons

Dependent Variable :

A. *salmonicida*

	(I) Faktor_2	(J) Faktor_2	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Konsentrasi 0%	Konsentrasi 10%	-4.0433 [*]	.52350	.000	-5.5411	-2.5456
		Konsentrasi 20%	-4.9400 [*]	.52350	.000	-6.4377	-3.4423
		Konsentrasi 30%	-4.9600 [*]	.52350	.000	-6.4577	-3.4623
	Konsentrasi 10%	Konsentrasi 0%	4.0433 [*]	.52350	.000	2.5456	5.5411
		Konsentrasi 20%	-.8967	.52350	.349	-2.3944	.6011
		Konsentrasi 30%	-.9167	.52350	.331	-2.4144	.5811
	Konsentrasi 20%	Konsentrasi 0%	4.9400 [*]	.52350	.000	3.4423	6.4377
		Konsentrasi 10%	.8967	.52350	.349	-.6011	2.3944
		Konsentrasi 30%	-.0200	.52350	1.000	-1.5177	1.4777
	Konsentrasi 30%	Konsentrasi 0%	4.9600 [*]	.52350	.000	3.4623	6.4577
		Konsentrasi 10%	.9167	.52350	.331	-.5811	2.4144
		Konsentrasi 20%	.0200	.52350	1.000	-1.4777	1.5177

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,822.

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

Dari uji Tukkey (lanjutan) dapat disimpulkan bahwa :

- Konsentrasi 0% terhadap konsentrasi 10%, 20%, dan 30% **berbeda nyata** (dilihat dari nilai $P_{\text{value}} 0,000 < 0,05$)
- Konsentrasi 10% terhadap konsentrasi 0% dan 20% **berbeda nyata**, sedangkan pada konsentrasi 30% **tidak berbeda nyata** (dilihat dari nilai $P_{\text{value}} 0,990 < 0,05$)
- Konsentrasi 20% terhadap konsentrasi 0% dan 10% **berbeda nyata**, sedangkan pada konsentrasi 30% **tidak berbeda nyata** (dilihat dari nilai $P_{\text{value}} 0,051 < 0,05$)
- Konsentrasi 30% terhadap konsentrasi 0% **berbeda nyata**, sedangkan pada konsentrasi 10% dan 20% **tidak berbeda nyata** (dilihat dari nilai $P_{\text{value}} 0,051 < 0,05$)

2.2.3 Notasi Keseragaman

<i>A.salmonicida</i>				
Faktor_2	N	Subset		
		1	2	3
Tukey HSD ^a Konsentrasi 0%	6	.0000		
konsentrasi 10%	6		4.0433	
konsentrasi 30%	6		4.2033	4.2033
konsentrasi 20%	6			5.6967
Sig.		1.000	.990	.051

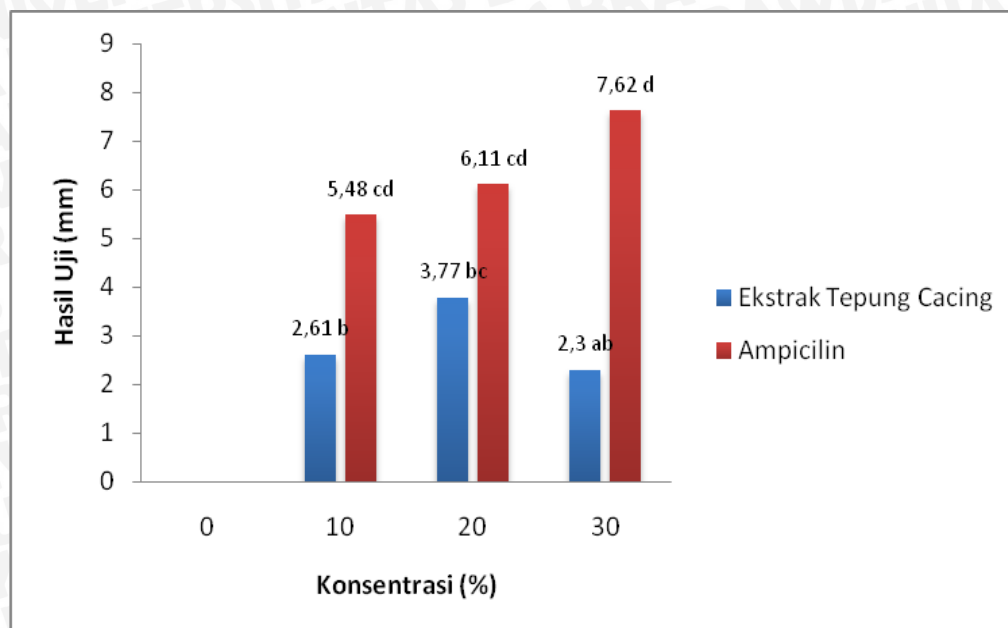
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = ,822.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000

Kesimpulan : **konsentrasi 20% merupakan konsentrasi terbaik karena nilai Sig. (0,051) mendekati nilai taraf nyata (0,05).**



2.2.4 ANOVA pada *Streptococcus pyogenes*

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: S._pyogenes

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	123.321 ^a	7	17.617	16.813	.000
Intercept	294.981	1	294.981	281.515	.000
Faktor_1	10.881	1	10.881	10.384	.005
Faktor_2	103.046	3	34.349	32.781	.000
Faktor_1 * Faktor_2	9.394	3	3.131	2.988	.062
Error	16.765	16	1.048		
Total	435.067	24			
Corrected Total	140.086	23			

a. R Squared = ,880 (Adjusted R Squared = ,828)

Dapat dilihat bahwa F_{hitung} sebesar 2,988 sedangkan F_{tabel} sebesar 3,24, sehingga dapat disimpulkan $F_{hitung} < F_{tabel}$ ($2,988 < 3,24$) maka H_1 ditolak dan H_0 diterima, **tidak ada beda nyata antara ekstrak tepung dengan konsentrasi**. Hal ini dapat juga dilihat dari P_{value} (0,301) lebih kecil dari taraf nyata (0,05).

2.2.5 Uji Lanjutan (Tukkey) pada Uji Daya Hambat *S. pyogenes*

Multiple Comparisons

Dependent
Variable: S_pyogenes

	(I) Faktor_2	(J) Faktor_2	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Tukey HSD	Konsentrasi 0%	Konsentrasi 10%	-3.9550*	.59100	.000	-5.6459	-2.2641
		Konsentrasi 20%	-5.1050*	.59100	.000	-6.7959	-3.4141
		Konsentrasi 30%	-4.9633*	.59100	.000	-6.6542	-3.2725
	Konsentrasi 10%	Konsentrasi 0%	3.9550*	.59100	.000	2.2641	5.6459
		Konsentrasi 20%	-1.1500	.59100	.249	-2.8409	.5409
		Konsentrasi 30%	-1.0083	.59100	.353	-2.6992	.6825
	Konsentrasi 20%	Konsentrasi 0%	5.1050*	.59100	.000	3.4141	6.7959
		Konsentrasi 10%	1.1500	.59100	.249	-.5409	2.8409
		Konsentrasi 30%	.1417	.59100	.995	-1.5492	1.8325
	Konsentrasi 30%	Konsentrasi 0%	4.9633*	.59100	.000	3.2725	6.6542
		Konsentrasi 10%	1.0083	.59100	.353	-.6825	2.6992
		Konsentrasi 20%	-.1417	.59100	.995	-1.8325	1.5492

Based on observed means.

The error term is Mean Square (Error) = 1,048

*. The mean difference is significant at the 0,05 level.

a. Dunnett t-tests treat one group as a control, and compare all other groups against it.

Dari uji Tukkey (lanjutan) dapat disimpulkan bahwa

- Konsentrasi 0% terhadap konsentrasi 10%, 20%, dan 30% ada **perbedaan nyata** (dilihat dari nilai $P_{\text{value}} 0,000 < 0,05$)
- Konsentrasi 10% terhadap konsentrasi 0% dan 20% **berbeda nyata**, sedangkan pada konsentrasi 30% **tidak berbeda nyata** (dilihat dari nilai $P_{\text{value}} 0,895 < 0,05$)
- Konsentrasi 20% terhadap konsentrasi 0% dan 10% **berbeda nyata**, sedangkan pada konsentrasi 30% **tidak berbeda nyata** (dilihat dari nilai $P_{\text{value}} 0,195 < 0,05$)
- Konsentrasi 30% terhadap konsentrasi 0% **berbeda nyata**, sedangkan 10% dan 20% **tidak berbeda nyata** (dilihat dari nilai $P_{\text{value}} 0,153 < 0,05$)

2.2.6 Notasi Keseragaman

S._pyogenes

Faktor_2	N	Subset	
		1	2
Tukey HSD ^a Konsentrasi 0%	6	.0000	
Konsentrasi 10%	6		3.9550
Konsentrasi 30%	6		4.9633
Konsentrasi 20%	6		5.1050
Sig.		1.000	.249

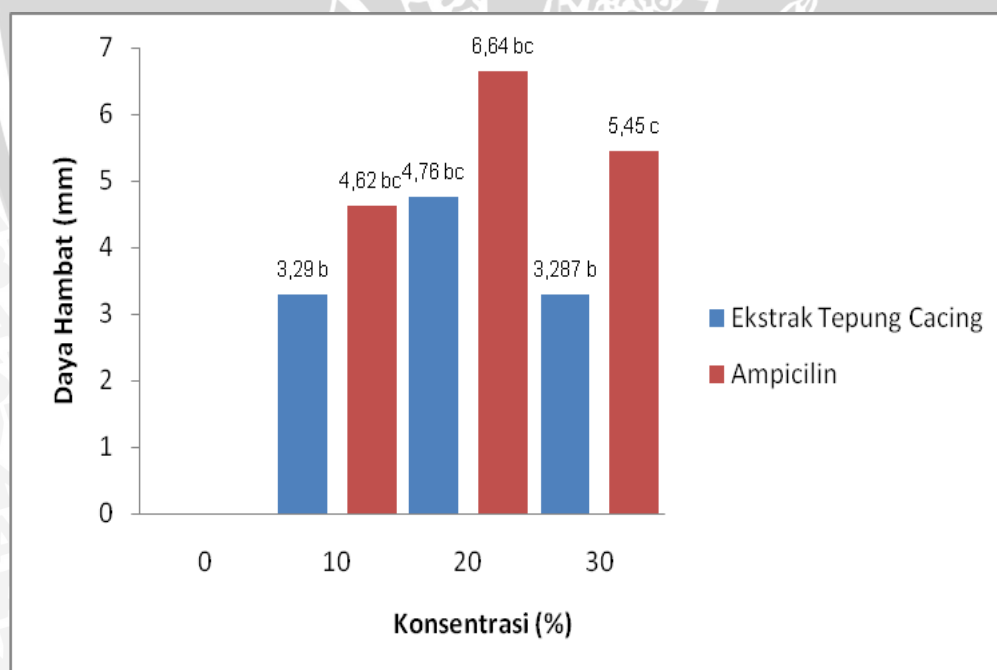
Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Based on observed means.

The error term is Mean Square(Error) = 1,048.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 6,000

Kesimpulan : **konsentrasi 20% merupakan konsentrasi terbaik karena nilai (0,153) mendekati nilai taraf nyata (0,05).**



2.3 Analysis of variance (ANOVA) Interaksi

2.3.1 ANOVA Interaksi pada *Aeromonas salmonicida*

ANOVA					
<i>A. salmonicida</i>					
		Sum of Squares	df	Mean Square	Sig.
Between Groups	(Combined)	163.598	7	23.371	28.427
	Linear Contrast	96.959	1	96.959	117.934
	Term Deviation	66.638	6	11.106	13.509
Within Groups		13.154	16	.822	
Total		176.752	23		

2.3.2 Uji Lanjutan (Tukkey) pada *Aeromonas salmonicida*

Multiple Comparisons						
<i>A. salmonicida</i>						
Tukey HSD						
(I) Interaksi	(J) Interaksi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
TCT - 0%	TCT - 10%	-2.61000*	.74034	.044	-5.1732	-.0468
	TCT - 20%	-3.77000*	.74034	.002	-6.3332	-1.2068
	TCT - 30%	-2.29667	.74034	.097	-4.8598	.2665
	Ampicilin - 0%	.00000	.74034	1.000	-2.5632	2.5632
	Ampicilin - 10%	-5.47667*	.74034	.000	-8.0398	-2.9135
	Ampicilin - 20%	-6.11000*	.74034	.000	-8.6732	-3.5468
	Ampicilin - 30%	-7.62333*	.74034	.000	-10.1865	-5.0602
TCT - 10%	TCT - 0%	2.61000*	.74034	.044	.0468	5.1732
	TCT - 20%	-1.16000	.74034	.762	-3.7232	1.4032
	TCT - 30%	.31333	.74034	1.000	-2.2498	2.8765
	Ampicilin - 0%	2.61000*	.74034	.044	.0468	5.1732
	Ampicilin - 10%	-2.86667*	.74034	.023	-5.4298	-.3035
	Ampicilin - 20%	-3.50000*	.74034	.004	-6.0632	-.9368
	Ampicilin - 30%	-5.01333*	.74034	.000	-7.5765	-2.4502
TCT - 20%	TCT - 0%	3.77000*	.74034	.002	1.2068	6.3332
	TCT - 10%	1.16000	.74034	.762	-1.4032	3.7232
	TCT - 30%	1.47333	.74034	.516	-1.0898	4.0365
	Ampicilin - 0%	3.77000*	.74034	.002	1.2068	6.3332
	Ampicilin - 10%	-1.70667	.74034	.348	-4.2698	.8565

	Ampicilin - 20%	-2.34000	.74034	.087	-4.9032	.2232
	Ampicilin - 30%	-3.85333*	.74034	.002	-6.4165	-1.2902
TCT - 30%	TCT - 0%	2.29667	.74034	.097	-.2665	4.8598
	TCT - 10%	-.31333	.74034	1.000	-2.8765	2.2498
	TCT - 20%	-1.47333	.74034	.516	-4.0365	1.0898
	Ampicilin - 0%	2.29667	.74034	.097	-.2665	4.8598
	Ampicilin - 10%	-3.18000*	.74034	.010	-5.7432	-.6168
	Ampicilin - 20%	-3.81333*	.74034	.002	-6.3765	-1.2502
	Ampicilin - 30%	-5.32667*	.74034	.000	-7.8898	-2.7635
Ampicilin - 0%	TCT - 0%	.00000	.74034	1.000	-2.5632	2.5632
	TCT - 10%	-2.61000*	.74034	.044	-5.1732	-.0468
	TCT - 20%	-3.77000*	.74034	.002	-6.3332	-1.2068
	TCT - 30%	-2.29667	.74034	.097	-4.8598	.2665
	Ampicilin - 10%	-5.47667*	.74034	.000	-8.0398	-2.9135
	Ampicilin - 20%	-6.11000*	.74034	.000	-8.6732	-3.5468
	Ampicilin - 30%	-7.62333*	.74034	.000	-10.1865	-5.0602
Ampicilin - 10%	TCT - 0%	5.47667*	.74034	.000	2.9135	8.0398
	TCT - 10%	2.86667*	.74034	.023	.3035	5.4298
	TCT - 20%	1.70667	.74034	.348	-.8565	4.2698
	TCT - 30%	3.18000*	.74034	.010	.6168	5.7432
	Ampicilin - 0%	5.47667*	.74034	.000	2.9135	8.0398
	Ampicilin - 20%	-.63333	.74034	.986	-3.1965	1.9298
	Ampicilin - 30%	-2.14667	.74034	.138	-4.7098	.4165
Ampicilin - 20%	TCT - 0%	6.11000*	.74034	.000	3.5468	8.6732
	TCT - 10%	3.50000*	.74034	.004	.9368	6.0632
	TCT - 20%	2.34000	.74034	.087	-.2232	4.9032
	TCT - 30%	3.81333*	.74034	.002	1.2502	6.3765
	Ampicilin - 0%	6.11000*	.74034	.000	3.5468	8.6732
	Ampicilin - 10%	.63333	.74034	.986	-1.9298	3.1965
	Ampicilin - 30%	-1.51333	.74034	.485	-4.0765	1.0498
Ampicilin - 30%	TCT - 0%	7.62333*	.74034	.000	5.0602	10.1865
	TCT - 10%	5.01333*	.74034	.000	2.4502	7.5765
	TCT - 20%	3.85333*	.74034	.002	1.2902	6.4165
	TCT - 30%	5.32667*	.74034	.000	2.7635	7.8898
	Ampicilin - 0%	7.62333*	.74034	.000	5.0602	10.1865
	Ampicilin - 10%	2.14667	.74034	.138	-.4165	4.7098
	Ampicilin - 20%	1.51333	.74034	.485	-1.0498	4.0765

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

2.3.3 Notasi Keseragaman pada *Aeromonas salmonicida*

A. salmonicida

Tukey HSD

Interaksi	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
TCT - 0%	3	.0000			
Ampicilin - 0%	3	.0000			
TCT - 30%	3	2.2967	2.2967		
TCT - 10%	3		2.6100		
TCT - 20%	3		3.7700	3.7700	
Ampicilin - 10%	3			5.4767	5.4767
Ampicilin - 20%	3			6.1100	6.1100
Ampicilin - 30%	3				7.6233
Sig.		.097	.516	.087	.138

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Interaksi	Notasi			
	a	b	c	d
TCT - 0%	V			
Ampicilin - 0%	V			
TCT - 30%	V	V		
TCT - 10%		V		
TCT - 20%		V	V	
Ampicilin - 10%			V	V
Ampicilin - 20%			V	V
Ampicilin - 30%				V

2.3.4 ANOVA Interaksi pada *Streptococcus pyogenes*

ANOVA

S. pyogenes

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Combined)	123.321	7	17.617	16.813	.000
Linear Contrast	51.354	1	51.354	49.010	.000
Term Deviation	71.967	6	11.994	11.447	.000
Within Groups	16.765	16	1.048		
Total	140.086	23			

2.3.5 Uji Lanjutan (Tukkey) pada *Streptococcus pyogenes*

Multiple Comparisons

S. pyogenes

Tukey HSD

(I) Interaksi	(J) Interaksi	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
TCT - 0%	TCT - 10%	-3.28667 [*]	.83580	.020	-6.1803	-.3930
	TCT - 20%	-4.75667 [*]	.83580	.001	-7.6503	-1.8630
	TCT - 30%	-3.28667 [*]	.83580	.020	-6.1803	-.3930
	Ampicilin - 0%	.00000	.83580	1.000	-2.8937	2.8937
	Ampicilin - 10%	-4.62333 [*]	.83580	.001	-7.5170	-1.7297
	Ampicilin - 20%	-5.45333 [*]	.83580	.000	-8.3470	-2.5597
	Ampicilin - 30%	-6.64000 [*]	.83580	.000	-9.5337	-3.7463
TCT - 10%	TCT - 0%	3.28667 [*]	.83580	.020	.3930	6.1803
	TCT - 20%	-1.47000	.83580	.653	-4.3637	1.4237
	TCT - 30%	.00000	.83580	1.000	-2.8937	2.8937
	Ampicilin - 0%	3.28667 [*]	.83580	.020	.3930	6.1803
	Ampicilin - 10%	-1.33667	.83580	.745	-4.2303	1.5570
	Ampicilin - 20%	-2.16667	.83580	.228	-5.0603	.7270
	Ampicilin - 30%	-3.35333 [*]	.83580	.017	-6.2470	-.4597
TCT - 20%	TCT - 0%	4.75667 [*]	.83580	.001	1.8630	7.6503
	TCT - 10%	1.47000	.83580	.653	-1.4237	4.3637
	TCT - 30%	1.47000	.83580	.653	-1.4237	4.3637
	Ampicilin - 0%	4.75667 [*]	.83580	.001	1.8630	7.6503
	Ampicilin - 10%	.13333	.83580	1.000	-2.7603	3.0270
	Ampicilin - 20%	-.69667	.83580	.988	-3.5903	2.1970
	Ampicilin - 30%	-1.88333	.83580	.373	-4.7770	1.0103
TCT - 30%	TCT - 0%	3.28667 [*]	.83580	.020	.3930	6.1803
	TCT - 10%	.00000	.83580	1.000	-2.8937	2.8937
	TCT - 20%	-1.47000	.83580	.653	-4.3637	1.4237
	Ampicilin - 0%	3.28667 [*]	.83580	.020	.3930	6.1803
	Ampicilin - 10%	-1.33667	.83580	.745	-4.2303	1.5570
	Ampicilin - 20%	-2.16667	.83580	.228	-5.0603	.7270
	Ampicilin - 30%	-3.35333 [*]	.83580	.017	-6.2470	-.4597
Ampicilin - 0%	TCT - 0%	.00000	.83580	1.000	-2.8937	2.8937
	TCT - 10%	-3.28667 [*]	.83580	.020	-6.1803	-.3930
	TCT - 20%	-4.75667 [*]	.83580	.001	-7.6503	-1.8630
	TCT - 30%	-3.28667 [*]	.83580	.020	-6.1803	-.3930
	Ampicilin - 10%	-4.62333 [*]	.83580	.001	-7.5170	-1.7297

	Ampicilin - 20%	-5.45333 [*]	.83580	.000	-8.3470	-2.5597
	Ampicilin - 30%	-6.64000 [*]	.83580	.000	-9.5337	-3.7463
Ampicilin - 10%	TCT - 0%	4.62333 [*]	.83580	.001	1.7297	7.5170
	TCT - 10%	1.33667	.83580	.745	-1.5570	4.2303
	TCT - 20%	-.13333	.83580	1.000	-3.0270	2.7603
	TCT - 30%	1.33667	.83580	.745	-1.5570	4.2303
	Ampicilin - 0%	4.62333 [*]	.83580	.001	1.7297	7.5170
	Ampicilin - 20%	-.83000	.83580	.969	-3.7237	2.0637
	Ampicilin - 30%	-2.01667	.83580	.298	-4.9103	.8770
Ampicilin - 20%	TCT - 0%	5.45333 [*]	.83580	.000	2.5597	8.3470
	TCT - 10%	2.16667	.83580	.228	-.7270	5.0603
	TCT - 20%	.69667	.83580	.988	-2.1970	3.5903
	TCT - 30%	2.16667	.83580	.228	-.7270	5.0603
	Ampicilin - 0%	5.45333 [*]	.83580	.000	2.5597	8.3470
	Ampicilin - 10%	.83000	.83580	.969	-2.0637	3.7237
	Ampicilin - 30%	-1.18667	.83580	.836	-4.0803	1.7070
Ampicilin - 30%	TCT - 0%	6.64000 [*]	.83580	.000	3.7463	9.5337
	TCT - 10%	3.35333 [*]	.83580	.017	.4597	6.2470
	TCT - 20%	1.88333	.83580	.373	-1.0103	4.7770
	TCT - 30%	3.35333 [*]	.83580	.017	.4597	6.2470
	Ampicilin - 0%	6.64000 [*]	.83580	.000	3.7463	9.5337
	Ampicilin - 10%	2.01667	.83580	.298	-.8770	4.9103
	Ampicilin - 20%	1.18667	.83580	.836	-1.7070	4.0803

*. The mean difference is significant at the 0.05 level.

2.3.6 Notasi Keseragaman pada *Streptococcus pyogenes*

S. pyogenes

Tukey HSD

Interaksi	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
TCT - 0%	3	.0000		
Ampicilin - 0%	3	.0000		
TCT - 10%	3		3.2867	
TCT - 30%	3		3.2867	
Ampicilin - 10%	3		4.6233	4.6233
TCT - 20%	3		4.7567	4.7567
Ampicilin - 20%	3		5.4533	5.4533
Ampicilin - 30%	3			6.6400
Sig.		1.000	.228	.298

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

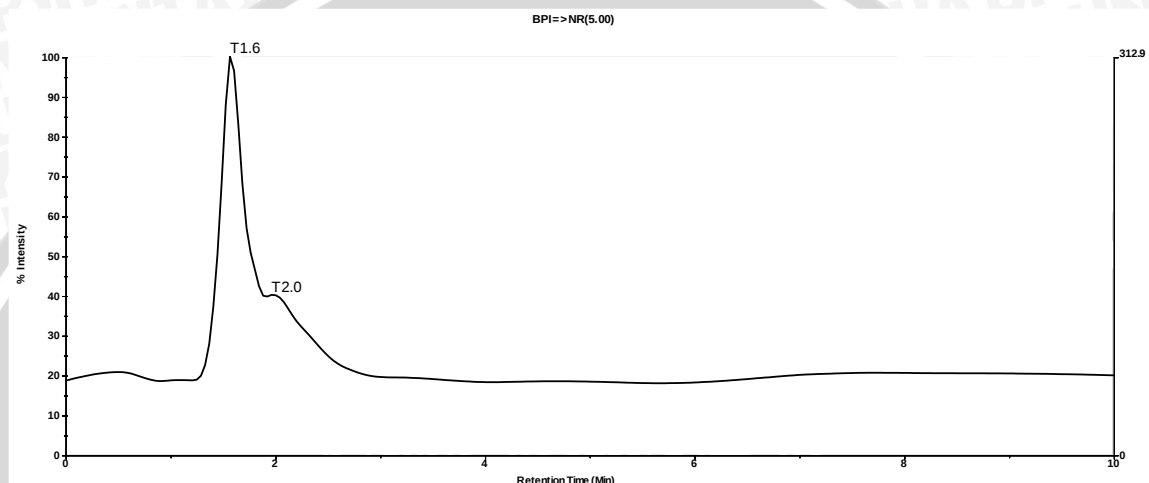
Interaksi	Notasi		
	a	b	c
TCT - 0%	V		
Ampicilin - 0%	V		
TCT - 10%		V	
TCT - 30%		V	
Ampicilin - 10%		V	V
TCT - 20%		V	V
Ampicilin - 20%		V	V
Ampicilin - 30%			V



Lampiran 6. Hasil Uji LC MS-ESI pada Tepung Cacing Tanah (*Lumbricus rubellus*)

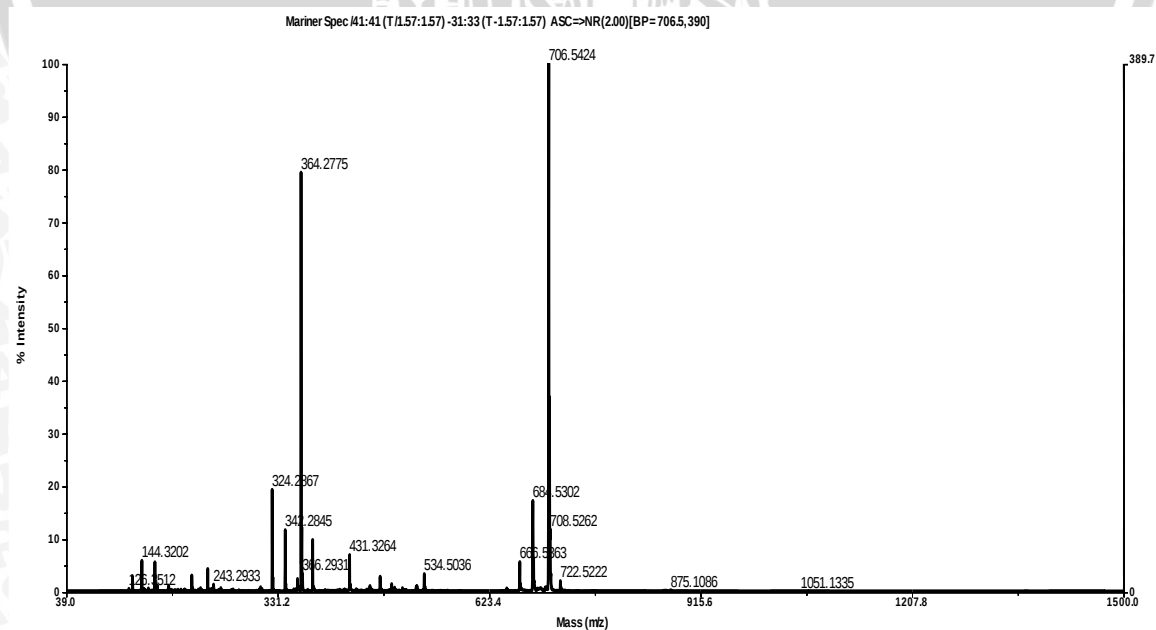
Tepung Cacing
Vol injection 20 ul
Flow 1 ml/min
Eluent MeOH
Operating by : Puspa D N Lotulung

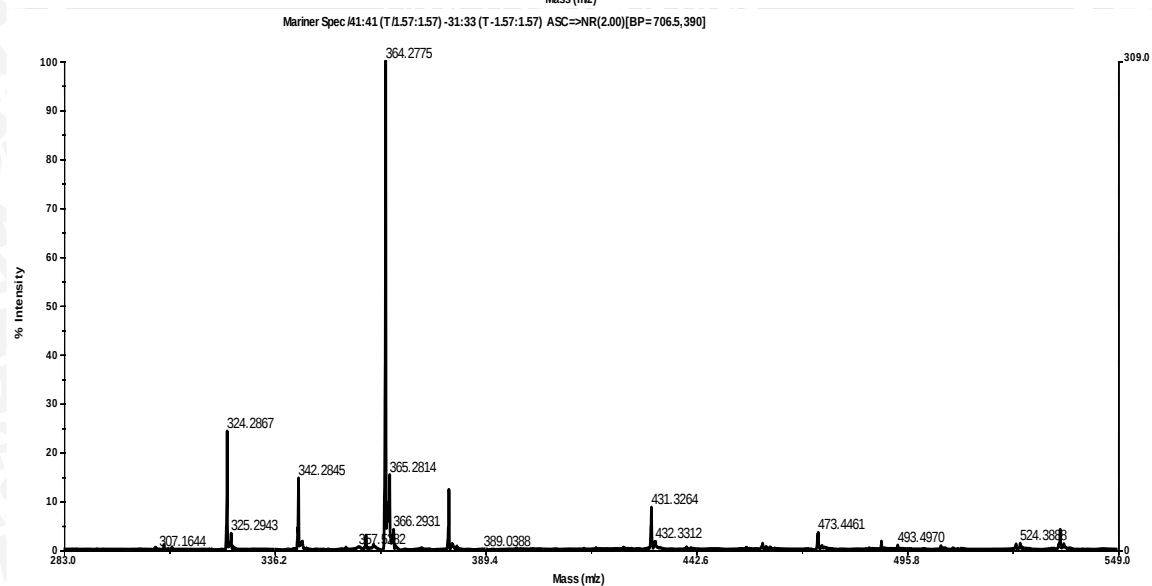
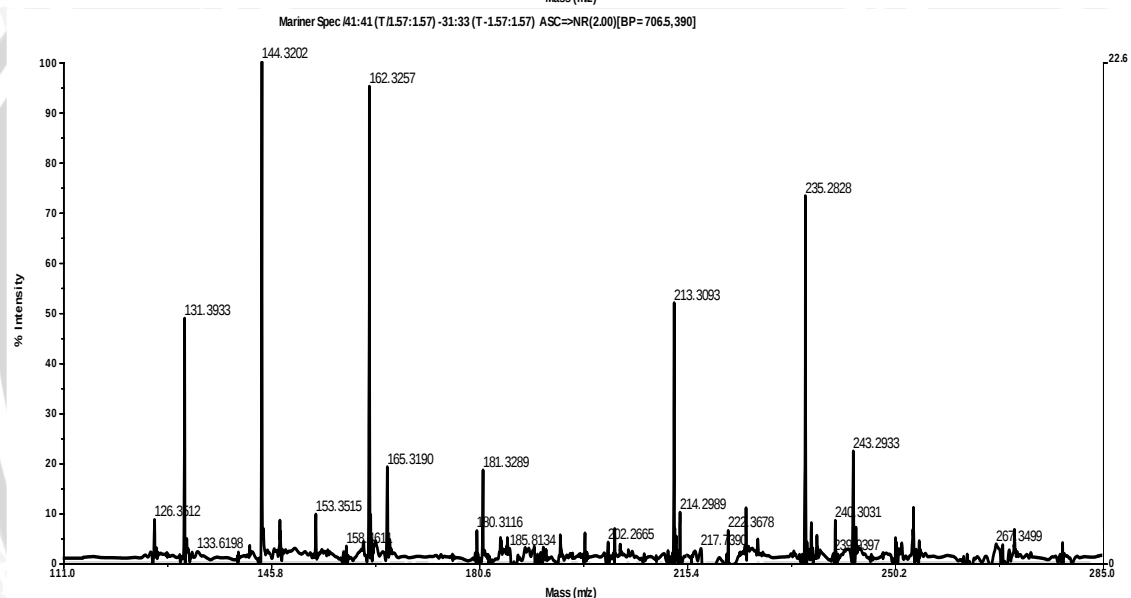
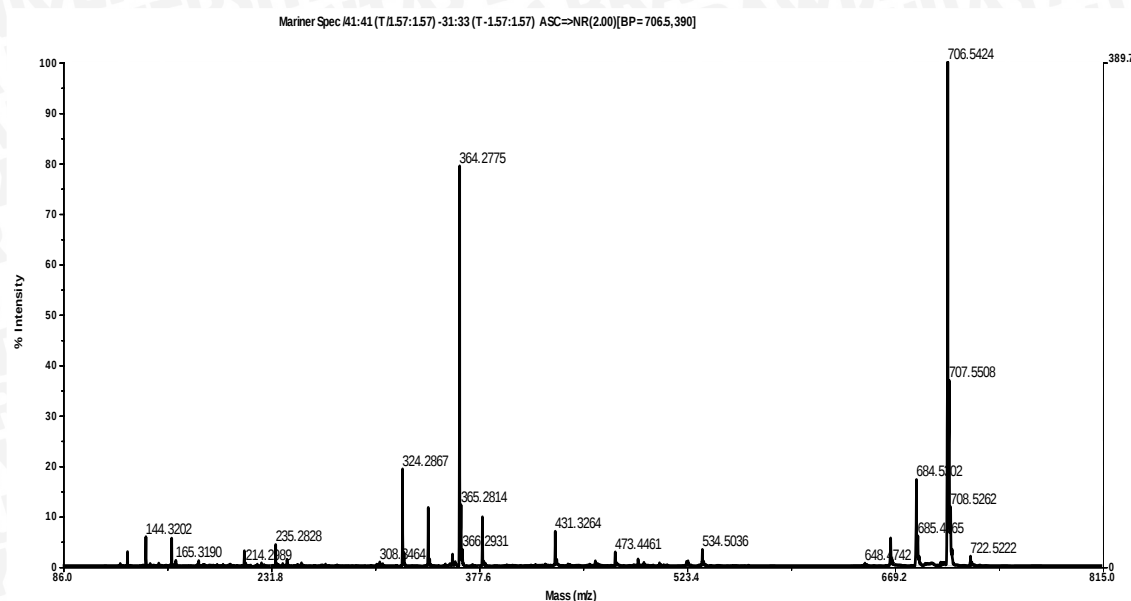
LC MS –ESI pos ion

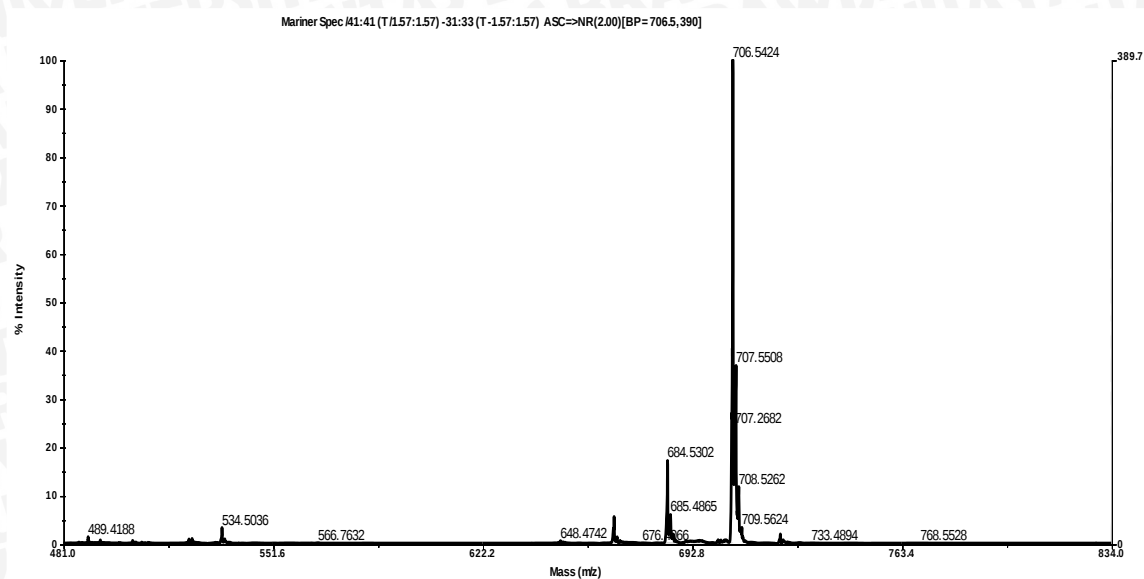


Index	Time	Lower Bound	Upper Bound	Height	Area
1	1.571583	1.255633	1.888717	313	1865.08
2	1.967817	1.888717	2.953400	126	792.58

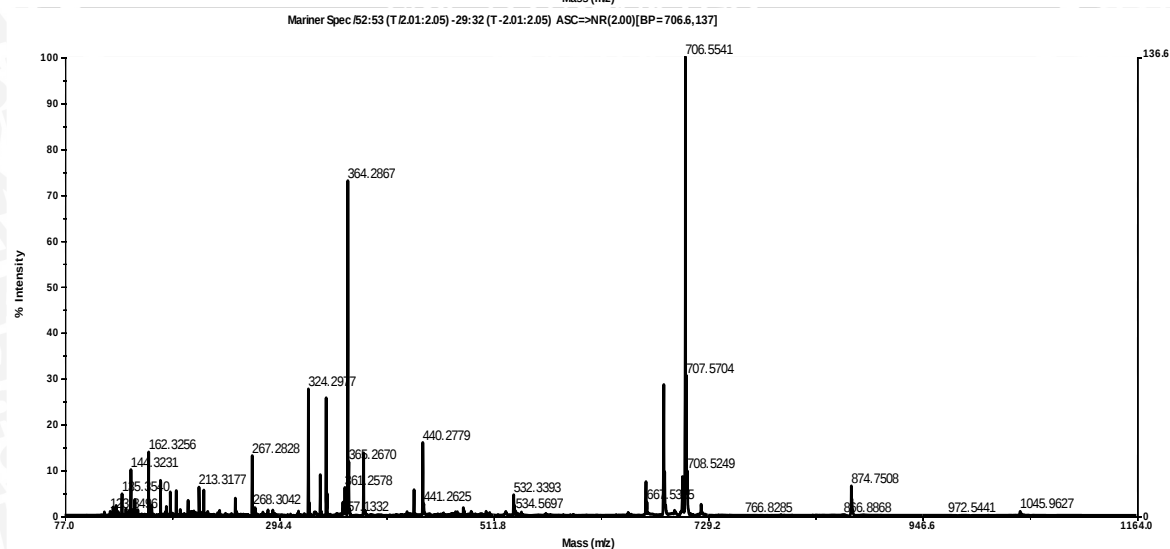
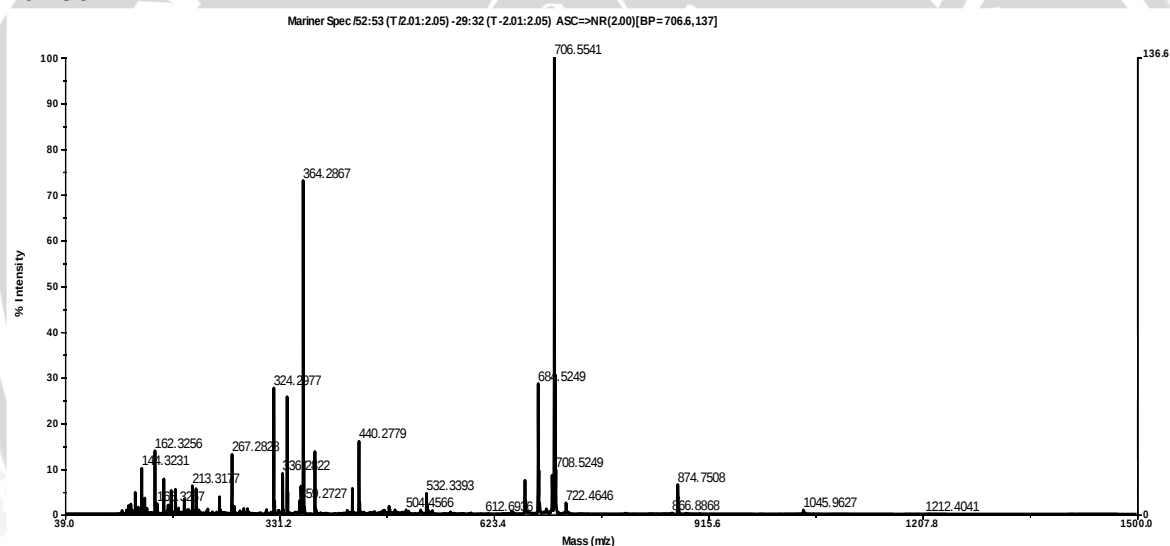
Rt 1.57

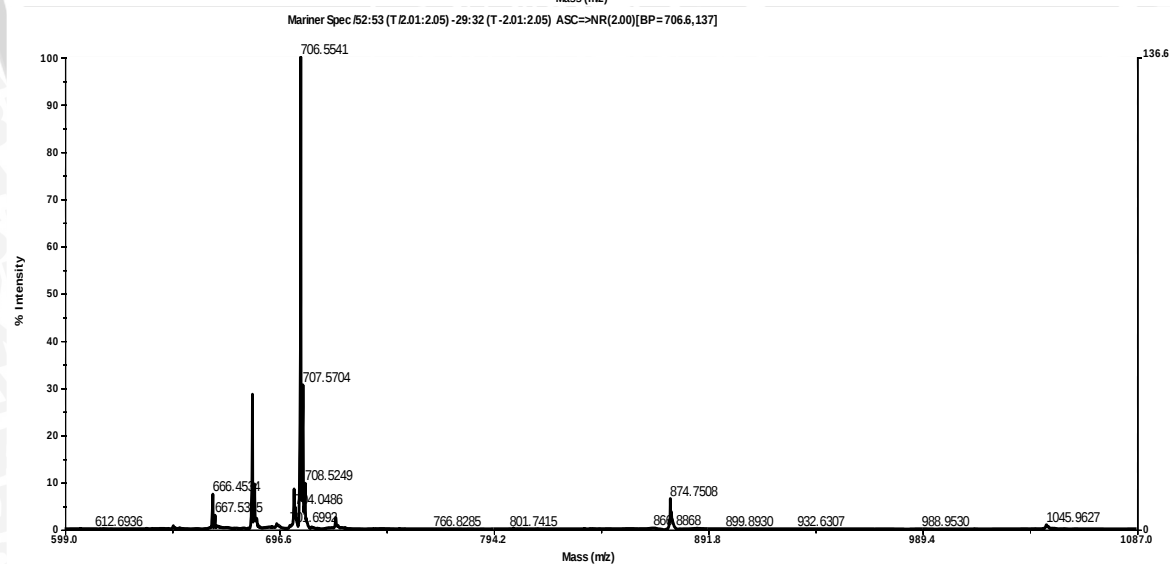
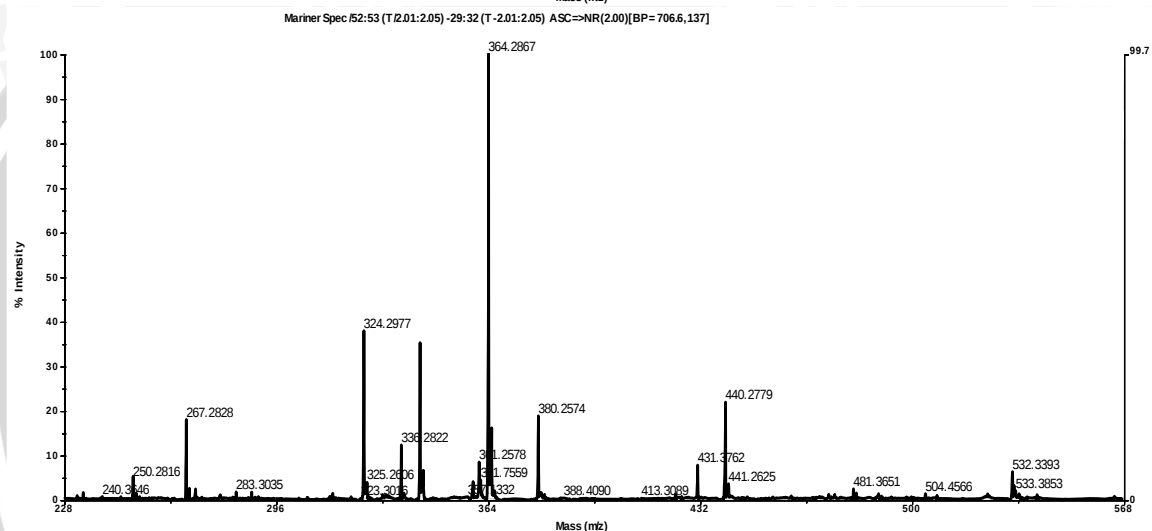
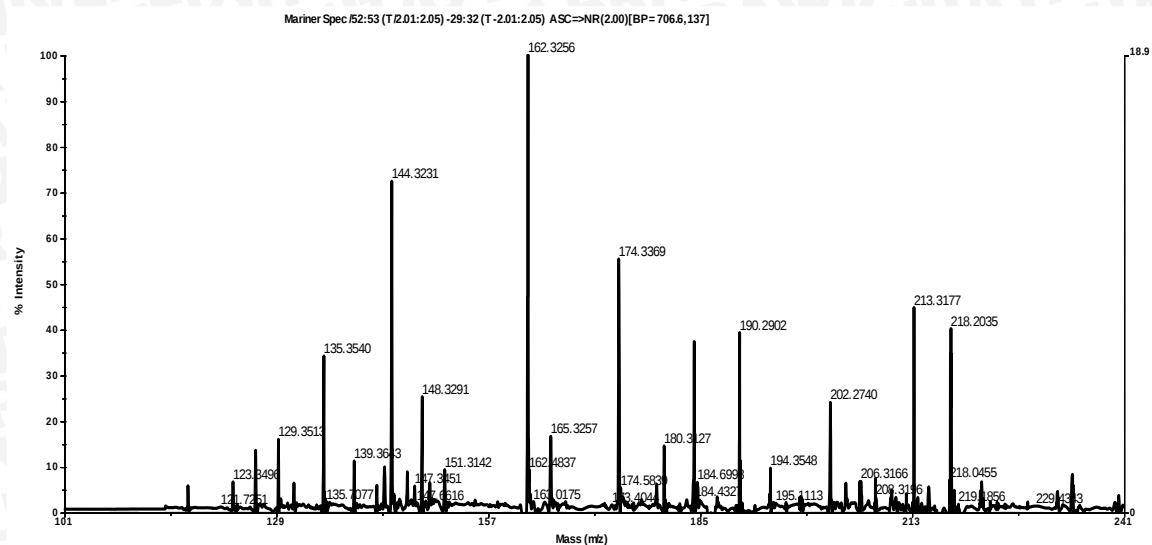


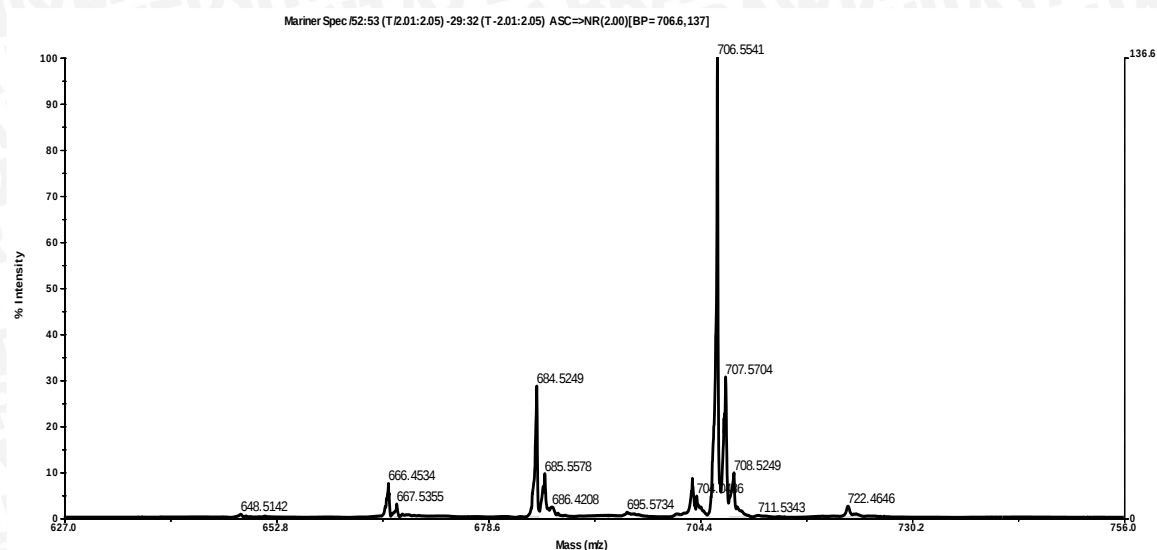




Rt 1.96







Sample
Vol injection 20 ul
Flow rate 0.5 ml/min
Eluent Methanol
LC-MS : Mariner Biospectrometry
LC: Hitachi L 6200
System ESI (Electrospray Ionisation)
Positive ion mode
Kolom C18 (RP 18) Phenomenex
Column length : 150 mm
ID : 2 mm
Particle size : 5 µm
Analysis by : Puspa .D. Lotulung, Pusat Penelitian Kimia – LIPI

BPI = Base Peak Intensity
BP = Base Peak
TIC = Total Ion Current
NR = NoiseRemoval
BC = Base Correction
MC = Mass Calibration
BP = Base Peak
CT = Centroiding
SM = Gaussian smooth

Temperatur kolom = temp ruangan ;
isokratik, Detector massa

Method : positive ion

LC-MS Analysis

LC-MS analysis was performed using an Mariner Biospectrometry equipped with a binary pump. The HPLC was interfaced with a Q-tof mass spectrometer fitted with an ESI source. Full-scan mode from m/z 100 to 1200 was performed with a source temperature of 140 °C. HPLC column (Phenomenex 5µ C18, 150 × 2 mm i.d.,) was used for the analysis. Solvent was Methanol with 0.3% acetic acid. Solvents were delivered at a total flow rate of 0.5 mL/min. The solvent running by isocratic elution

Lampiran 8. Dokumentasi Penelitian



1. *Lumbricus rubellus* segar



2. Dicuci hingga bersih



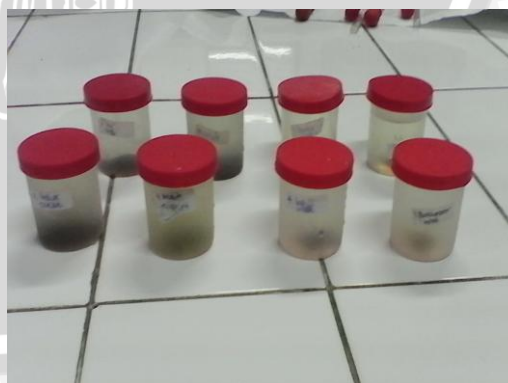
3. *L. Rubellus* dijemur di bawah sinar matahari



4. Dihaluskan dengan mortar dan alu



5. Sentifuse larutan *L. Rubellus*



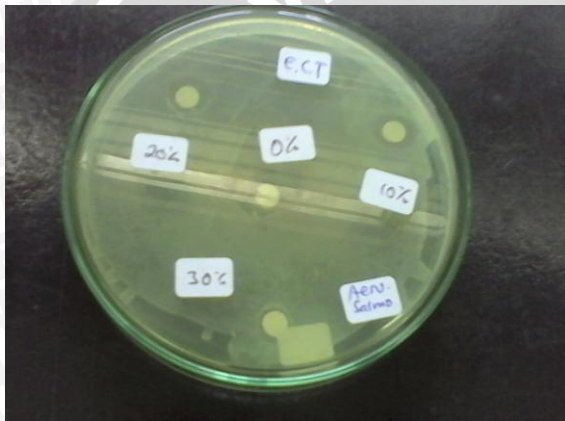
6. *L. Rubellus* hasil sentrifuse yang dimasukkan wadah



7. Uji cakram



8. Penyimpanan dengan inkubator suhu 37°C



9. Hasil Uji Cakram setelah inkubasi *Lumbricus rubellus*



10. Uji LC MS tepung *L. rubellus*