

**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI (*Loligo* sp.)
DENGAN PELARUT n-HEKSAN TERHADAP BAKTERI *Vibrio harveyi*
SECARA *IN VITRO***

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

Oleh :
**NURVIANA WULANDARI
NIM. 125080500111004**



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



**UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI (*Loligo* sp.)
DENGAN PELARUT n-HEKSAN TERHADAP BAKTERI *Vibrio harveyi*
SECARA *IN VITRO***

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

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

Oleh :

**NURVIANA WULANDARI
NIM. 125080500111004**



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

SKRIPSI

UJI DAYA HAMBAT EKSTRAK TINTA CUMI-CUMI (*Loligo sp.*)
DENGAN PELARUT n-HEKSAN TERHADAP BAKTERI *Vibrio harveyi*
SECARA *IN VITRO*

Oleh :

NURVIANA WULANDARI
NIM. 125080500111004

Dosen Penguji I

Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS
NIP. 19611106 198602 2 001
TANGGAL :

Menyetujui,

Dosen Pembimbing I

Dr. Ir. M. Fadjar, Msc
NIP. 19621014 198701 1 001
TANGGAL :

Dosen Pembimbing II

Dr. Ir. Maftuch, M.Si
NIP: 19660825 199203 1 001
TANGGAL :

Mengetahui,
Ketua Jurusan

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

PERNYATAAN ORISINALITAS

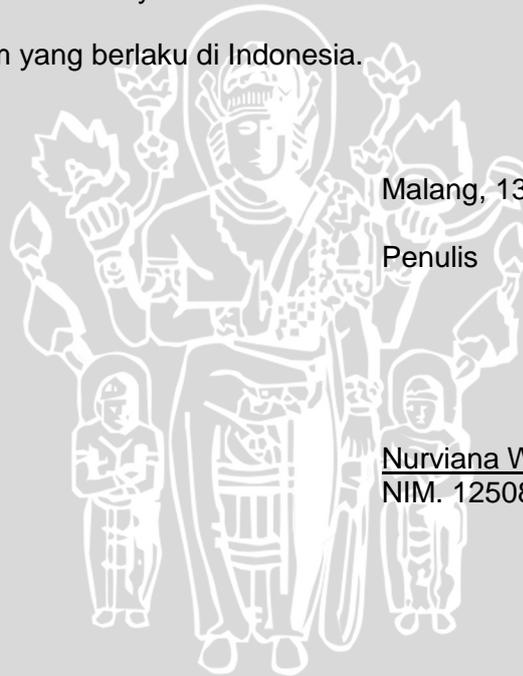
Dengan ini saya menyatakan bahwa skripsi yang saya tulis ini hasil karya saya sendiri dibawah payung penelitian Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc yang dibiayai oleh Direktorat Jenderal Pendidikan Tinggi, Kementrian Pendidikan dan Kebudayaan, Melalui DIPA Universitas Brawijaya. Nomor 023. 04.2. 414989/2014, Tanggal 5 Desember 2013 dan berdasarkan SK Rektor Universitas Brawijaya Nomor 157 Tahun 2014 Tanggal 10 April 2014.

Apabila dikemudian 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, 13 April 2016

Penulis

Nurviana Wulandari
NIM. 125080500111004



UCAPAN TERIMA KASIH

Pembuatan laporan skripsi dengan judul “Uji Daya Hambat Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp) dengan Pelarut n-Heksan terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* secara *In Vitro*” ini tidak luput dari bantuan semua pihak. Oleh karena itu, penulis menyampaikan terima kasih kepada:

1. Allah swt yang telah memberikan kemudahan, kelancaran dan kesuksesan untuk penulis dalam menyelesaikan skripsi.
2. Orang-orang terkasih; Bapak Imam Supi'i (Bapak), Ibu Sri Harmami (Ibu), Mba Retno Ayu Septianti (Kakak), Mas Anjar Septianto (Kakak), dan Adik Astuti Catur Lestari Ningsih yang selalu mengirimkan doa dan dukungan baik moril maupun materil kepada penulis.
3. Bapak Dr. Ir. Muhammad Fadjar, M.Sc (Dosen Pembimbing I) dan Bapak Dr. Ir. Maftuch, M.Si (Dosen Pembimbing II) yang senantiasa membimbing dan mengarahkan penulis dalam penyusunan tugas akhir.
4. Ibu Prof. Dr. Ir. Sri Andayani, MS selaku dosen penguji I yang telah memberikan masukan dan saran dalam penyelesaian laporan skripsi.
5. Ibu Titin selaku laboran Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan yang senantiasa selalu memberikan bantuan dengan ikhlas serta arahan dan saran kepada penulis selama kegiatan penelitian berlangsung.
6. Tim Skripsi Tinta Cumi-Cumi yang tak lelah berjuang bersama yaitu Retno Wulandari, Jefri Anjaini, Wahyu Kurniallah dan Deeda Amaliya Hidayati
7. Mas Kadi Mey Ismail dan mas Bondan yang selalu membimbing dan mengarahkan saya dalam penulisan dan penyusunan skripsi.
8. Sahabat-sahabat saya “As ha” yaitu Tia Nur Desviani, Hartaningtyas AR, Nuraini Farida, Immaria Fransira, Annisa Farhana Dewi, Deeda Amaliya

Hidayati, Sherly Anindya Putri yang selalu memberikan semangat dan dukungan dalam bentuk doa.

9. Sahabat-sahabat "Moon Choco" saya yaitu Frentina Murti dan Syafira Theana Putri yang selalu memberikan semangat dan dukungan dalam bentuk doa serta memberikan arahan dan masukan dalam penyusunan skripsi.
10. Sahabat-sahabat saya dari SMAN 58 Jakarta hingga sekarang yaitu Rahmi Hayatunnufus, Alvira Devi Kirana, Siti Annisa, Nurul, Riskya Prima, Ana Wijayanti, Anggita Wijayanti dan Gracety yang selalu memberikan semangat dan dukungan dalam bentuk doa.
11. Rekan-rekan asisten biologi perikanan, pemupukan dan kesuburan perairan, biokimia ikan dan rekayasa akuakultur yang selalu memberikan semangat dan dukungan dalam bentuk doa.
12. Teman-teman Aquasean 2012 yang selalu memberikan semangat dan dukungan dalam bentuk doa.
13. Semua pihak yang telah membantu dalam penyusunan skripsi.

Malang, 13 April 2016

Penulis

RINGKASAN

NURVIANA WULANDARI. Uji Daya Hambat Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo* sp) Dengan Pelarut n-Heksan Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In Vitro*. Di bawah bimbingan **Dr. Ir. M. Fadjar, M.Sc** dan **Dr. Ir. Maftuch, M.Si**

Pemanfaatan dan pengembangan potensi sumberdaya perairan laut menjadi paradigma baru pembangunan di masa sekarang yang harus dilaksanakan secara rasional dan berkelanjutan. Kebijakan ini sangat realistis karena didukung oleh fakta adanya potensi sumberdaya laut yang masih cukup besar peluangnya untuk pengembangan eksploitasi di bidang perikanan baik khususnya budidaya tambak. Kecenderungan yang terjadi dalam budidaya tambak, khususnya pada tambak yang menerapkan teknologi semi intensif dan intensif adalah memburuknya keadaan lingkungan tambak sejalan dengan berlangsungnya masa pemeliharaan. Dampaknya adalah stress yang akan memperlambat kondisi udang dan ikan, sehingga mudah terserang penyakit.

Penyakit yang sering menyerang biota laut diantaranya virus, jamur, parasit dan bakteri tetapi salah satu spesies yang paling banyak menyebabkan penyakit pada budidaya ikan air laut khususnya krustasea adalah *Vibrio harveyi*. Serangan bakteri *vibrio* dapat menyebabkan mortalitas lebih dari 50% pada biota budidaya. Penyakit pada ikan dapat ditanggulangi dengan berbagai cara, salah satunya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Pemakaian zat kimia atau antibiotik ini sangat beresiko tinggi karena dapat menimbulkan resistensi bakteri, terjadinya akumulasi residu antibiotik tersebut dalam tubuh ikan serta berdampak terhadap pencemaran lingkungan. Oleh karena itu, untuk menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* diperlukan pengembangan alternatif bahan antibakteri untuk mengganti antibiotik, yaitu seperti diketahui bahwa tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) memiliki kemampuan membunuh sel kanker, meningkatkan nilai leukosit, antioksidan, antiradiasi, antivirus, dan antiakteri.

Penelitian ini dilakukan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan Universitas Brawijaya Malang, pada bulan November 2015 sampai dengan Januari 2016. Tujuan penelitian ini yakni untuk mengetahui daya hambat yang dihasilkan oleh ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan terhadap bakteri *V. harveyi* secara *In vitro*.

Metode penelitian ini yaitu menggunakan metode eksperimen yaitu mengadakan percobaan untuk melihat suatu hasil dan rancangan percobaan yang digunakan adalah Rancangan Acak Lengkap (RAL), menggunakan 4 perlakuan ekstrak kasar ekstrak n-Heksan tinta cumi (*Loligo* sp.) yaitu: (A) 6 ppm; (B) 8 ppm; (C) 10 ppm dan (D) 12 ppm. Masing-masing perlakuan diulang sebanyak 3 kali. Hasil penelitian menunjukkan bahwa perlakuan pemberian ekstrak n-Heksan tinta cumi (*Loligo* spp) memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap pertumbuhan bakteri *V. harveyi* dengan dosis tertinggi yaitu 12 ppm memiliki nilai rata-rata diameter zona bening yaitu 10,54 mm sedangkan dosis terendah yaitu 6 ppm memiliki nilai rata-rata diameter zona bening yaitu 7,06 mm. Hubungan antara dosis ekstrak n-Heksan tinta cumi (*Loligo* sp.) dengan diameter zona hambat yang terbentuk adalah berpola linier, dengan persamaan $y = 1,5078 + 0,0151x$ dengan nilai $R^2 = 0,9774$

Kesimpulan dari penelitian ini yaitu ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V.harveyi* dimana dosis terendah pada 6 ppm dan dosis tertinggi yaitu 12 ppm.

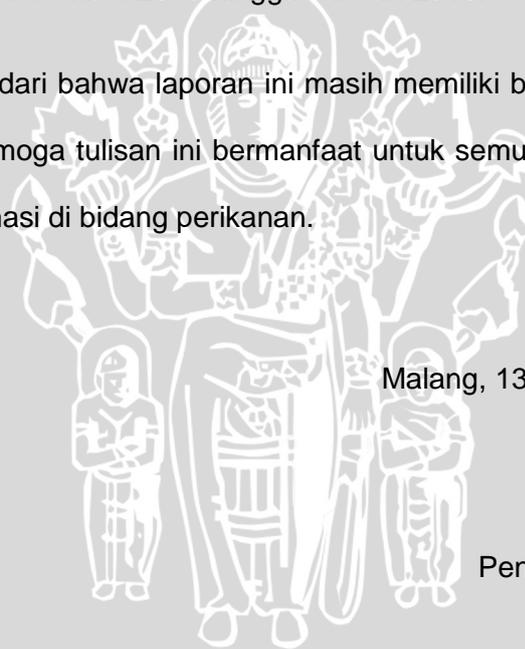
KATA PENGANTAR

Puji syukur penulis panjatkan ke hadirat Allah SWT, karena atas limpahan nikmat serta karunia-Nya, sehingga penulis dapat menyelesaikan skripsi mengenai Uji Daya Hambat Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp*) Dengan Pelarutan-Heksan Terhadap Bakteri *Vibrio harveyi* Secara *In Vitro* yang disusun sebagai salah satu syarat untuk memperoleh gelar Sarjana Perikanan pada Program Studi Budidaya Perairan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang. Laporan ini disusun berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan pada bulan November 2015 hingga Januari 2016.

Penulis menyadari bahwa laporan ini masih memiliki banyak kekurangan dan keterbatasan. Semoga tulisan ini bermanfaat untuk semua pihak dan dapat dijadikan bahan informasi di bidang perikanan.

Malang, 13 April 2016

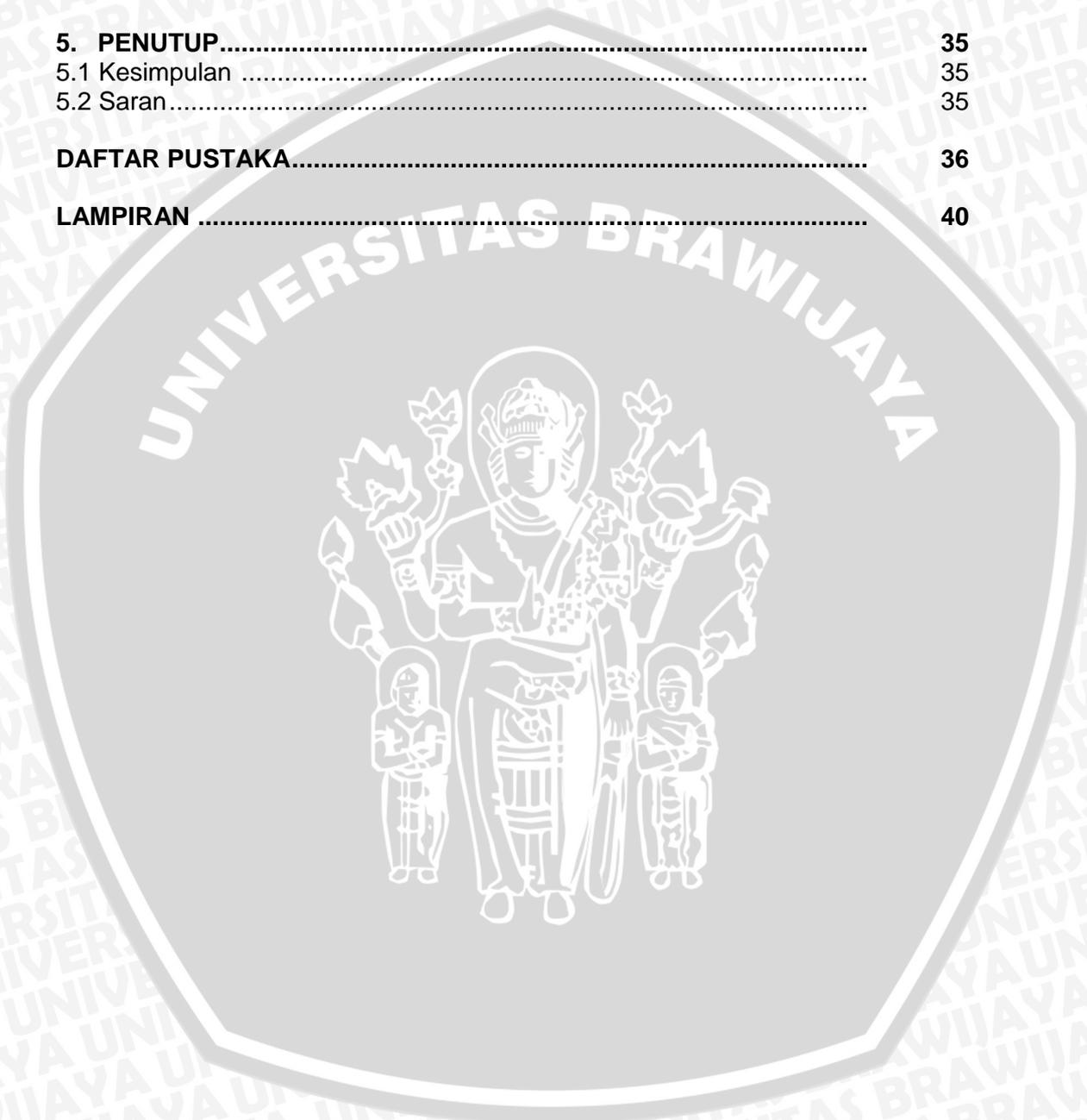
Penulis



DAFTAR ISI

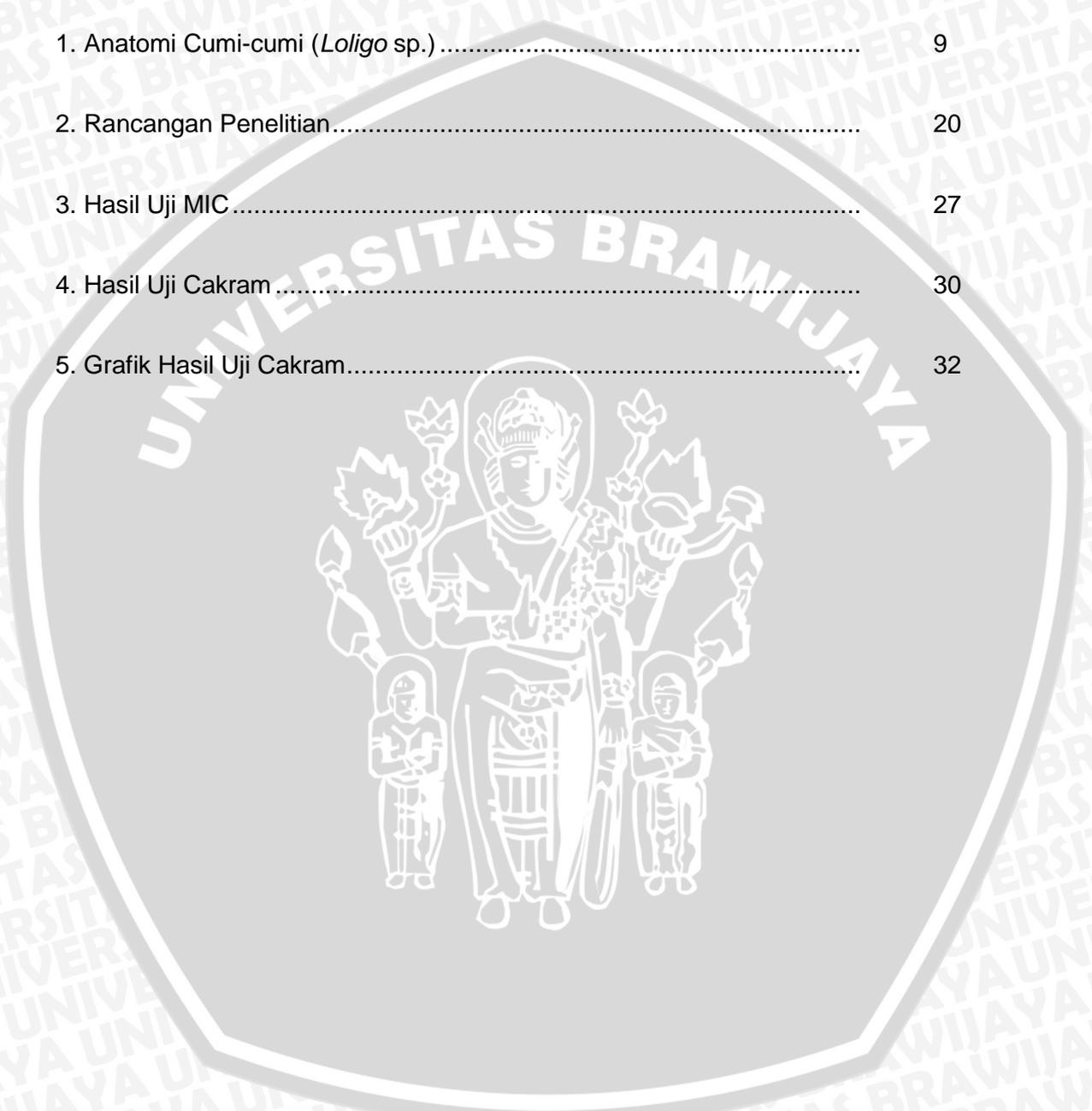
	Halaman
RINGKASAN	iv
KATA PENGANTAR	v
DAFTAR ISI	vi
DAFTAR GAMBAR	vii
DAFTAR TABEL	viii
DAFTAR LAMPIRAN	ix
1. PENDAHULUAN	1
1.1 Latar Belakang.....	1
1.2 Perumusan Masalah	3
1.3 Tujuan.....	4
1.4 Hipotesis.....	4
1.5 Waktu dan Tempat.....	4
2. TINJAUAN PUSTAKA	5
2.1 Biologi Bakteri <i>Vibrio harveyi</i>	5
2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi Bakteri <i>V. harveyi</i>	5
2.1.2 Habitat dan Penyebaran <i>V. harveyi</i>	5
2.1.3 Infeksi dan Gejala	6
2.1.4 Media Biakan Bakteri <i>V. harveyi</i>	7
2.2 Biologi Tinta Cumi-cumi (<i>Loligo sp.</i>).....	8
2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Cumi-cumi (<i>Loligo sp.</i>)	8
2.2.2 Kandungan Tinta Cumi-cumi (<i>Loligo sp.</i>)	9
2.3 Pelarut n-Heksan	10
2.4 Ekstraksi	10
2.5 Sterilisasi	11
2.6 Antibakteri.....	12
2.7 Uji MIC.....	14
2.8 Uji Daya Hambat Bakteri secara <i>In vitro</i> dengan Uji Cakram	15
3. METODE PENELITIAN	16
3.1 Materi Penelitian	16
3.1.1 Alat Penelitian.....	16
3.1.2 Bahan Penelitian	17
3.2 Metode Penelitian	18
3.3 Rancangan Penelitian	19
3.4 Prosedur Penelitian.....	20
3.4.1 Persiapan dan Pengambilan Tinta Cumi (<i>Loligo sp.</i>)	20
3.4.2 Ekstraksi Tinta Cumi-cumi (<i>Loligo sp.</i>).....	21
3.4.3 Sterilisasi	21
3.4.4 Pembuatan Media	22
3.4.5 Kultur Bakteri <i>V.harveyi</i>	24

3.4.6 Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>).....	24
3.4.7 Uji Cakram.....	25
4. HASIL DAN PEMBAHASAN.....	26
4.1 Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>)	26
4.2 Uji Cakram.....	28
4.3 Parameter Penunjang.....	34
5. PENUTUP.....	35
5.1 Kesimpulan	35
5.2 Saran.....	35
DAFTAR PUSTAKA.....	36
LAMPIRAN	40



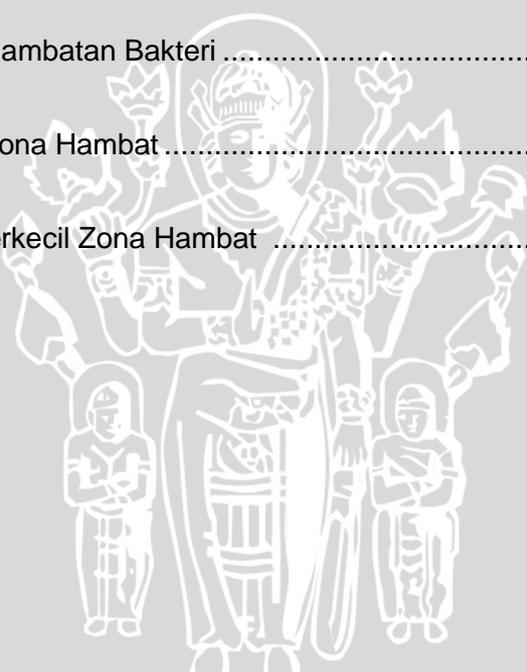
DAFTAR GAMBAR

Gambar	Halaman
1. Anatomi Cumi-cumi (<i>Loligo</i> sp.)	9
2. Rancangan Penelitian	20
3. Hasil Uji MIC	27
4. Hasil Uji Cakram	30
5. Grafik Hasil Uji Cakram	32



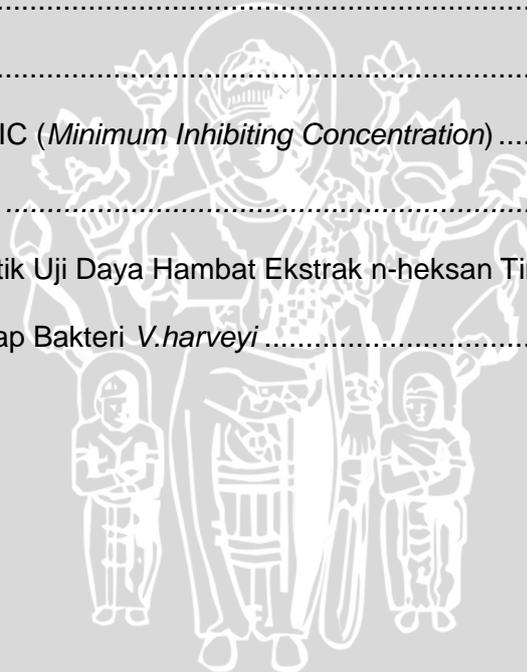
DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
1. Alat Penelitian.....	16
2. Bahan Penelitian.....	17
3. Hasil Uji MIC.....	26
4. Hasil Uji Daya Hambat.....	28
5. Klasifikasi Respon Hambatan Bakteri.....	29
6. Hasil Sidik Ragam Zona Hambat.....	31
7. Hasil Beda Nyata Terkecil Zona Hambat.....	31



DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Alat Penelitian.....	40
2. Bahan Penelitian.....	43
3. Proses Ekstraksi Tinta Cumi (<i>Loligo sp.</i>).....	45
4. Hasil Uji Bakteri <i>V. harveyi</i>	46
5. Perhitungan Media.....	47
6. Perhitungan Dosis.....	49
7. Komposisi Media.....	50
8. Skema Kerja Uji MIC (<i>Minimum Inhibiting Concentration</i>).....	51
9. Proses Uji Cakram.....	52
10. Perhitungan Statistik Uji Daya Hambat Ekstrak n-heksan Tinta Cumi (<i>Loligo sp.</i>) terhadap Bakteri <i>V.harveyi</i>	53



1. PENDAHULUAN

1.1 Latar Belakang

Indonesia merupakan salah satu negara kepulauan yang mempunyai garis pantai terbesar yang ke dua setelah Kanada yaitu sebesar 81.000 km dengan luas laut sekitar 5,8 juta km² yang kaya akan keaneka ragaman hayati. Dilihat dari letaknya yang strategis, yaitu diantara Samudera Pasifik dan Samudera Hindia, dan di antara Benua Asia dan Australia dengan kandungan sumberdaya perikanan yang melimpah didalamnya, mendorong Indonesia menjadi salah satu penghasil ikan untuk memenuhi kebutuhan protein ikan di dunia (Sitorus, 2013).

Pemanfaatan dan pengembangan potensi sumberdaya perairan laut menjadi paradigma baru pembangunan di masa sekarang yang harus dilaksanakan secara rasional dan berkelanjutan. Kebijakan ini sangat realistis karena didukung oleh fakta adanya potensi sumberdaya laut yang masih cukup besar peluangnya untuk pengembangan eksploitasi di bidang perikanan baik penangkapan maupun usaha budidaya ikan khususnya budidaya tambak (Maulina *et al.*, 2012).

Kecenderungan yang terjadi dalam budidaya tambak, khususnya pada tambak yang menerapkan teknologi semi intensif dan intensif adalah memburuknya keadaan lingkungan tambak sejalan dengan berlangsungnya masa pemeliharaan. Dampaknya adalah stress yang akan memperlemah kondisi udang dan ikan, sehingga mudah terserang penyakit (Maulina *et al.*, 2012) dan menurut pendapat Hatmanti (2003), bahwa timbulnya penyakit dapat disebabkan karena kualitas lingkungan perairan yang kurang baik. Selain itu penggunaan teknik budidaya yang kurang tepat dan kontaminasi dari alat – alat budidaya maupun pekerjaanya juga dapat menyebabkan timbulnya penyakit.

Penyakit merupakan salah satu kendala yang harus dihadapi oleh pelaku usaha yang bergerak dalam bidang perikanan. Penyakit yang sering menyerang biota laut diantaranya virus, jamur, parasit dan bakteri (Sari *et al.*, 2015) dan menurut Hatmanti (2003), salah satu spesies yang paling banyak menyebabkan penyakit dan kematian pada budidaya ikan air laut khususnya krustasea adalah *Vibrio harveyi*. Bakteri ini merupakan penyebab penyakit kunang-kunang atau penyakit berpendar, karena krustasea yang terinfeksi akan terlihat terang dalam keadaan gelap (malam hari). Bakteri ini merupakan penyebab utama terhadap tingginya tingkat kematian pada larva krustasea.

Serangan bakteri *vibrio* dapat menyebabkan mortalitas lebih dari 50% pada biota budidaya. Tanda – tanda *vibriosis* mirip dengan penyakit infeksi lainnya. Pada umumnya dimulai antara lain dengan kehilangan nafsu makan. Selanjutnya kulit akan mengalami pemucatan atau perubahan warna (Irianto, 2005)

Penyakit pada ikan dapat ditanggulangi dengan berbagai cara, antara lain dengan perbaikan lingkungan, karena penyakit biasanya berkembang pada lingkungan yang tidak bagus sehingga ikan menjadi stress. Selain itu perbaikan nutrisi juga memegang peran penting untuk meningkatkan ketahanan tubuh terhadap penyakit. Sampai saat ini metode yang umum digunakan untuk menanggulangi penyakit pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik. Pemakaian zat kimia atau antibiotik ini sangat beresiko tinggi karena dapat menimbulkan resistensi bakteri, terjadinya akumulasi residu antibiotik tersebut dalam tubuh ikan serta berdampak terhadap pencemaran lingkungan. Oleh karena itu dibutuhkan obat alternatif yang tidak menimbulkan efek resisten terhadap bakteri dan lebih aman bagi lingkungan serta lebih aman bagi tubuh udang itu sendiri (Roza *et al.*, 2010).

Oleh karena itu, untuk menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* diperlukan pengembangan alternatif bahan antibakteri untuk mengganti antibiotik,

seperti diketahui bahwa tinta cumi-cumi memiliki kemampuan membunuh sel kanker, meningkatkan nilai leukosit, antioksidan, antiradiasi, antivirus, dan antibakteri (Zhong *et al.*, 2009) sedangkan pada penelitian Girija *et al.*, (2012), bahwa ekstraksi tinta cumi-cumi pada konsentrasi rendah dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aerus* dan dengan menggunakan pelarut n-Heksan mampu melawan produksi ESBL strain *Escherichia coli* dengan diameter daya hambat 18 mm dan *Klebsiella pneumoniae* dengan diameter daya hambat 22 mm.

Berdasarkan informasi mengenai manfaat tinta cumi-cumi yang memiliki sifat antibakteri, maka perlu dilakukan penelitian lanjutan tentang kemampuan ekstrak tinta cumi-cumi yang berpotensi terhadap penghambatan pertumbuhan bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*.

1.2 Perumusan Masalah

Permasalahan yang ada saat ini yaitu metode yang umum digunakan untuk menanggulangi penyakit pada ikan budidaya adalah pengobatan dengan zat kimia atau antibiotik, namun pemakaian zat kimia atau antibiotik ini sangat beresiko tinggi dikarenakan dapat menimbulkan resistensi bakteri, terjadinya akumulasi residu antibiotik tersebut dalam tubuh ikan serta berdampak terhadap pencemaran lingkungan. Oleh karena itu, diperlukan bahan alternatif lain yang mampu digunakan sebagai antibakteri. Berdasarkan latar belakang di atas, masalah yang dihadapi yaitu belum diketahuinya pengaruh pemberian dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) terhadap daya hambat *V. harveyi*. Berkaitan dengan hal tersebut, maka rumusan masalah dalam penelitian ini adalah: apakah pemberian dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) berpengaruh terhadap daya hambat dari bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*?

1.3 Tujuan

Tujuan dari penelitian ini adalah untuk mengetahui pengaruh penggunaan dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*.

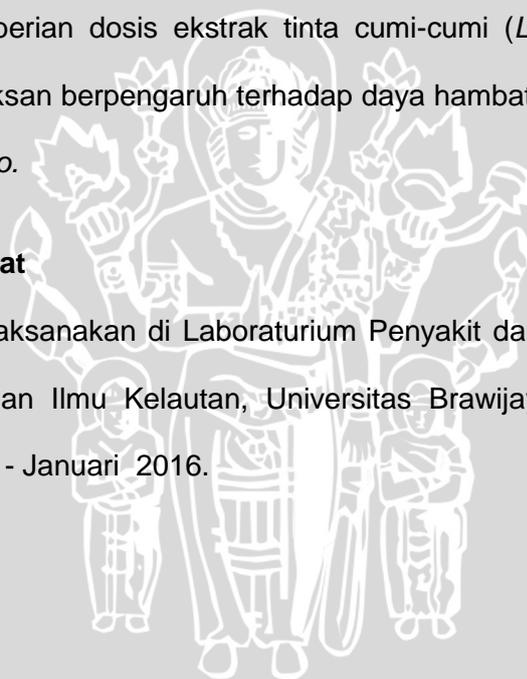
1.4 Hipotesis

H0 : Diduga pemberian dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan tidak berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *V. Harveyi* secara *in vitro*.

H1 : Diduga pemberian dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan berpengaruh terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*.

1.5 Waktu dan Tempat

Penelitian ini dilaksanakan di Laboratorium Penyakit dan Kesehatan Ikan, Fakultas Perikanan dan Ilmu Kelautan, Universitas Brawijaya, Malang, pada bulan November 2015 - Januari 2016.



2. TINJAUAN PUSTAKA

2.1 Biologi Bakteri *V. harveyi*

2.1.1 Klasifikasi dan Morfologi *V. harveyi*

Menurut Holt *et al.*, (1994), klasifikasi bakteri *V. harveyi* adalah sebagai berikut:

Kingdom: Prokaryota

Divisi : Bacteria

Ordo : Eubacteriales

Family : Vibrionaceae

Genus : *Vibrio*

Spesies: *Vibrio harveyi*

Menurut Saptiani *et al.*, (2012), *V. harveyi* adalah golongan bakteri gram negatif yang ada di perairan laut yang menyebabkan timbulnya penyakit vibriosis. Bakteri ini memiliki dinding sel yang mengandung peptidoglikan dan juga lipopolisakarida, yang fungsinya melindungi sel. Pada penelitian Ajitama *et al.*, (2014), morfologi pada bakteri *V. harveyi* ditemukan memiliki bentuk batang dan berwarna kuning.

V. harveyi mempunyai ciri koloni berwarna kuning pada media TCBS, serta menurut Kabata (1985) dalam Prajitno (2007), bahwa ciri bakteri *Vibrio* adalah bentuknya seperti batang pendek, tidak membentuk spora, sumbu melengkung atau lurus, ukurannya $0,51 \mu\text{m} \times 1,0\text{-}2,0 \mu\text{m}$, bersifat gram negatif, tumbuh baik pada kadar NaCl 1-1,5 %, terdapat tunggal atau kadang-kadang bersatu dalam bentuk s atau spiral (Felix *et al.*, 2011).

2.1.2 Habitat dan Penyebaran *V. harveyi*

V. harveyi umumnya hidup di air laut dan payau, hal ini sesuai dengan pendapat Prajitno (2007) bahwa bakteri *Vibrio* sp. termasuk ke dalam kelompok bakteri halofit yaitu bakteri yang dapat hidup di perairan berkadar garam tinggi. Bakteri ini dapat tumbuh pada salinitas optimum 20-30 ppt dan dapat tumbuh dengan baik pada kondisi alkali yaitu pada pH optimum 7,5-8,5. Salinitas rata-rata di sepanjang Pantai Utara Jawa, mulai dari Pantai Tuban (Bulu, Bancar, Jenu, Palang), Gresik (Sedayu, Manyar), Sidoarjo, Bangil (Raci), Probolinggo, Karang Tekok (Situbondo), Banyuwangi (Suri Tani Pemuka) adalah 25 ppt yang mana pada keadaan ini rentan terhadap kemunculan *V.harveyi*.

Bakteri *V. harveyi* pada umumnya menyerang larva udang pada stadia zoea, mysis dan awal post larva, sehingga merupakan kendala dalam penyediaan benih udang yang sehat dalam jumlah besar (Prajitno, 2007) dan menurut Evan (2009), *V. harveyi* bersifat patogen oportunistik, yaitu organisme yang dalam keadaan normal ada di lingkungan pemeliharaan yang bersifat saprofitik dan berkembang patogenik apabila kondisi lingkungan dan inangnya memburuk. Selain itu, bakteri ini bersifat anaerobik fakultatif, yaitu dapat hidup baik dengan atau tanpa adanya oksigen.

2.1.3 Infeksi dan Gejala

Menurut Prasetyo (2014), salah satu bakteri patogen yang umum dijumpai pada budidaya udang adalah bakteri *V. harveyi* dimana bakteri ini menyerang organ dalam tubuh udang, ditambahkan pula oleh Prajitno (2005), bahwa penyakit *Vibriosis* merupakan masalah yang serius di seluruh usaha budidaya ikan di laut dan air payau di dunia.

Menurut Evan (2009), bahwa organ target yang terinfeksi *V.harveyi* adalah hepatopankreas, terlihat peradangan yang menyebar disemua bagian hepatopankreas. Hepatopankreas merupakan kelenjar pencernaan yang berfungsi untuk memproduksi enzim pencernaan dan mengasimilasi nutrisi,

termasuk pula dalam menyerap makanan, sekresi dari enzim pencernaan serta menyimpan lemak, glikogen dan beberapa mineral. Jika organ hepatopankreas terganggu maka akan mengganggu sistem fisiologis larva udang sehingga akhirnya dapat menyebabkan kematian.

Udang yang terserang vibriosis menunjukkan gejala klinis sebagai berikut bagian hepatopankreas yang berwarna merah kecoklatan, tubuh terdapat bercak merah, bagian ekor gepis dan berwarna merah kecoklatan (Nasi *et al.*, 2007) dan menurut Reed dan Floyd (1996), bahwa tanda-tanda udang yang terserang vibriosis sama halnya dengan penyakit bakteri lainnya. Biasanya, udang yang terserang bakteri ini mengalami lesu dan kehilangan nafsu makan. Warna kulit berubah pucat dan merah. Terdapat luka pada tubuh dan terbuka lebar. Terdapat bercak darah di bagian sirip dan mulut.

2.1.4 Media Biakan Bakteri *V. harveyi*

Media untuk menumbuhkan bakteri *V. harveyi* yakni dapat menggunakan media selektif TCBSA (*Thiosulphate Citrate Bile Salt Sucrose Agar*) hal ini sesuai dengan yang dikemukakan oleh Kobayashi *et al.*, (1963), bahwa TCBSA adalah media agar selektif untuk *Vibrio*. *Vibrio* sp. akan tumbuh pada media yang mengandung konsentrasi garam yang tinggi dan beberapa ada yang bersifat halofilik. Media TCBSA memiliki keselectifan tinggi untuk menumbuhkan dan mengisolasi bakteri dari genus *Vibrio*. TCBSA mengandung sodium citrate, sodium thiosulfate, sodium cholate sebagai media selektif, membuat pH menjadi basa untuk menghambat pertumbuhan bakteri gram positif dan menekan bakteri coliform. Media ini mengandung sukrosa sebagai bahan fermentasi untuk metabolisme bakteri *Vibrio* sp., karena bakteri ini dapat memfermentasi sukrosa. Media ini mengandung sodium chloride untuk menstimulasi pertumbuhan bakteri dan menjaga keseimbangan tekanan osmotik dan sodium thiosulfate juga merupakan sumber sulfur.

Media TCBSA ini harus berada pada pH di rentang basa yaitu sekitar 8,6 hal ini bertujuan agar bakteri *Vibrio* sp. dapat tumbuh dengan baik karena bakteri ini memiliki sensitifitas terhadap pH asam dan menghambat pertumbuhan bakteri lain. Media TCBSA tidak boleh disterilisasi dengan autoklaf karena dapat merusak bahan yang terkandung dalam media dan dapat menyebabkan media ini tidak bagus untuk digunakan. Media ini tidak boleh dipanaskan terlalu lama melainkan hingga larut saja karena bahan yang terkandung dalam media ini tidak tahan panas terlalu tinggi (Soemarno, 2000).

2.2 Biologi Tinta Cumi-cumi

2.2.1 Klasifikasi dan Morfologi Cumi-cumi

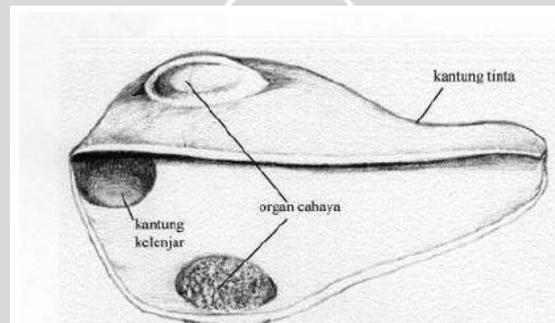
Menurut Saanin (1984), klasifikasi tinta cumi-cumi adalah sebagai berikut:

Kingdom	: Animalia
Filum	: Moluska
Kelas	: Cephalopoda
Subkelas	: Coleoidea
Ordo	: Teuthoidea
Family	: Loligonidae
Genus	: Loligo
Spesies	: <i>Loligo</i> sp.



Cumi-cumi merupakan salah satu hasil perikanan penting di dunia, menurut Rudiana dan Pringgenies (2004), bentuk tubuh cumi-cumi adalah simetri bilateral dan dapat dibedakan atas kepala, leher dan mantel/badan. Pada bagian kepala terdapat mulut yang dikelilingi oleh dua tangan panjang (tentakel) dan delapan tangan pendek. Lebar kepala cumi-cumi hampir sama dengan lebarnya mantel. Pada sisi kanan dan kiri bagian dorsal mantel terdapat sirip yang menyatu dengan mantel dan menempati kurang lebih sepertiga bagian posterior

mantel. Mata terdapat pada sisi kiri dan kanan kepala. Bagian dorsal leher cumi-cumi tampak jelas, sedang bagian ventral leher tidak jelas karena tertutup oleh corong atau sifon yang keluar dari mantel. Cumi-cumi jantan dan betina dapat dibedakan dari bentuk tubuhnya, jantan berukuran lebih panjang dan lebih langsing dibandingkan dengan betina. Di dalam rongga mantel (tampak dorsal) terdapat organ dalaman yaitu: insang, lambung, gonad, pankreas, sekum, rektum, kantung tinta. Pada kantung tinta terdapat sepasang organ, berbentuk bulat lonjong menempel pada bagian latero-dorsal kantung tinta. Kantung tinta cumi-cumi melekat dan bermuara pada saluran pencernaan dekat anus, sehingga cairan tinta dari kantung tinta.



Gambar.1 Anatomi Cumi-cumi

Rudiana dan Pringgenies (2004)

2.2.2 Kandungan Tinta Cumi-cumi

Beberapa penelitian mengenai tinta cumi-cumi (*Loligo* sp) menunjukkan bahwa adanya senyawa fitokimia tertentu yang memiliki khasiat untuk mencegah berbagai penyakit. Menurut Girija *et al.*, (2011), ekstrak tinta mentah dari berbagai spesies cumi-cumi (*Loligo* sp) telah dipelajari untuk potensi antimikroba terhadap bakteri *Staphylococcus aureus*, isolat bakteri klinis dan anti jamur, pengawet, dan antioksidan. Tinta cumi-cumi (*Loligo* sp) juga memiliki berbagai protein bioaktif yang memiliki cytolytic, fraksi antitumor dan potensi antimikroba.

Berlanjut pada penelitian selanjutnya, menurut Girija *et al.*, (2012), pada konsentrasi tertentu tinta cumi-cumi (*Loligo* sp) telah terbukti dapat menghambat pertumbuhan *Staphylococcus aureus*.

Berdasarkan hasil uji GC-MS oleh Fadjar *et al.*, (2015), bahwa senyawa yang terkandung dalam tinta cumi-cumi (*Loligo* sp) dengan menggunakan pelarut n-Heksan yaitu terdiri dari Eicosane (4,14%); pentacosane (3,85%); Tetracosane (2,79%); Pentadecane (2,71%); 9-Tricosane (2,63%); 2,6-Diisopropylnaphthalena (2,16%); Bicosane (2,12%); Fumaric acid (1,61%); Octadecane (1,35%); Phenol 2,4-bis(1,1-dimethylethyl) (1,32%); Triacontane (1,28%); 2-Bromo dodecane (1,25%); Tetrapentacontane (1,24%); Cyclopentane (1,22%); 26-Nor-5-Cholesten- β (1,22%); Tert-Hexadecanethiol (1,13%); Pentacosene (1,11%); Piridine-3-carboxamide (1,11%); Hentriaconrane (1,08%); 5-Fluoro-3-trifluoromethylbenzoic (1,04%); Tricyclo (1,03%).

2.3 Pelarut n-Heksan

Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} . Awalan *heks-* merujuk pada enam karbon atom yang terdapat pada Heksana dan akhiran *-ana* berasal dari *alkana*, yang merujuk pada ikatan tunggal yang menghubungkan atom-atom karbon tersebut. Dalam keadaan standar senyawa ini merupakan cairan tak berwarna yang tidak larut dalam air (Munawaroh dan Handayani, 2010).

Hadi (2012), menyampaikan bahwa Heksana adalah sebuah senyawa hidrokarbon alkana dengan rumus kimia C_6H_{14} . Heksana mempunyai sifat stabil dan bersifat mudah menguap, sehingga pelarut tersebut sangat baik digunakan dalam proses ekstraksi. Menggunakan pelarut ini sangat menguntungkan, karena bersifat selektif dalam melarutkan zat.

2.4 Ekstraksi

Kusuma *et al.*, (2014), menyampaikan bahwa ekstraksi didasarkan pada prinsip perpindahan massa komponen zat ke dalam pelarut, dimana perpindahan mulai terjadi pada lapisan antar muka kemudian berdifusi masuk ke dalam pelarut, selain itu menurut Sampurno (2000) dalam Hudaya (2010), bahwa ekstraksi adalah suatu kegiatan atau proses penarikan kandungan kimia yang dapat larut sehingga terpisah dari bahan yang tidak dapat larut dengan pelarut cair dan hasil dari ekstraksi adalah ekstrak. Ekstrak adalah suatu sediaan kental yang diperoleh dengan mengekstraksi senyawa aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai dengan sifat kepolarannya. Disampaikan pula oleh Kusuma *et al.*, (2014), bahwa ekstrak adalah sediaan pekat yang diperoleh dengan mengekstraksi zat aktif dari simplisia nabati atau hewani menggunakan pelarut yang sesuai, dimana tujuan dari ekstraksi adalah memisahkan bahan padat dan bahan cair suatu zat dengan bantuan pelarut. Ekstraksi dapat memisahkan campuran senyawa dengan berbagai sifat kimia yang berbeda. Ekstraksi bahan alam umumnya dilakukan untuk menarik komponen kimia yang terdapat pada bahan alam.

Salah satu metode ekstraksi yang paling sederhana menurut Mukhriani (2014), adalah dengan cara maserasi. Maserasi merupakan suatu cara yang sesuai dilakukan untuk skala kecil maupun besar, metode ini dilakukan dengan memasukkan serbuk simplisia dan pelarut yang sesuai ke dalam wadah yang tertutup rapat pada suhu kamar. Setelah proses ekstraksi, pelarut dipisahkan dari sampel dengan penyaringan. Menurut Tantrayana dan Zubaidah (2015), prinsip dari metode maserasi ini adalah merendam bubuk simplisia dengan menggunakan pelarut tertentu pada temperatur ruang dan terlindungi dari cahaya.

2.5 Sterilisasi

Sterilisasi adalah suatu proses untuk menghilangkan atau menginaktivasi mikroorganisme hidup (bakteri, jamur, virus dan organisme bersel satu lainnya) yang terdapat pada suatu produk, sedangkan istilah steril secara umum dapat diartikan bebas dari mikroorganisme hidup (Darwis, 2006). Disampaikan pula oleh Adji *et al.*, (2007), bahwa sterilisasi merupakan proses yang menghancurkan semua bentuk kehidupan. Suatu benda yang steril dipandang dari sudut mikrobiologi artinya bebas dari mikroorganisme hidup.

Proses sterilisasi umumnya dilakukan dengan pemanasan basah yaitu menggunakan autoklaf dan pemanasan kering melalui oven. Autoklaf merupakan alat sterilisasi yang dapat ditutup, yang diisi dengan uap panas dan tekanan tinggi. Suhu didalamnya dapat mencapai 115°C hingga 125°C dan tekanan uapnya mencapai 2 sampai 4 atm. Kondisi yang baik digunakan untuk sterilisasi adalah pada temperatur 121°C selama 15 menit (Adji *et al.*, 2007) dan menurut Meliawaty (2012), penggunaan oven sebagai alat sterilisasi jauh lebih murah dibandingkan dengan menggunakan autoklaf, pemanasan dalam oven hanya dilakukan selama 15 menit dalam temperatur 125°C. Secara teoritis sterilisasi melalui pemanasan dalam oven dilaksanakan pada temperatur 160°C selama 2 jam atau pada temperatur 180°C selama 1 jam.

2.6 Antibakteri

Antibakteri adalah senyawa yang digunakan untuk mengendalikan pertumbuhan bakteri yang bersifat merugikan. Pengendalian pertumbuhan mikroorganisme bertujuan untuk mencegah penyebaran penyakit dan infeksi, membasmi mikroorganisme pada inang yang terinfeksi, dan mencegah pembusukan serta kerusakan bahan oleh mikroorganisme (Sulistyo, 1971). Hal yang sama disampaikan pula oleh Kusuma *et al.*, (2014), bahwa antibakteri

adalah senyawa - senyawa kimia alami kadar rendah yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri. Antibakteri alamiah dapat dihasilkan dengan membuat suatu senyawa yang sifatnya mirip dengan aslinya didapatkan langsung dari organisme yang menghasilkan senyawa tersebut dengan melakukan proses pengekstrakan.

Jawetz *et al.*, (1966) dalam Deasywati (2011), menyatakan bahwa zat antibakteri mempengaruhi pertumbuhan bakteri dengan cara merusak dinding sel, merubah permeabilitas sel, menghambat kerja enzim dan sintesis asam nukleat. Pelczar dan Chan (1988), menyatakan bahwa kemampuan antibakteri dipengaruhi oleh tingkat konsentrasi zat uji, semakin tinggi konsentrasi yang digunakan semakin tinggi daya hambat antibakteri.

Mekanisme kerja antibakteri menurut Pelczar dan Chan (1986) adalah sebagai berikut:

a. Kerusakan pada dinding sel

Struktur pada dinding sel dapat dirusak dengan cara menghambat pembentukan atau mengubahnya setelah selesai dibentuk.

b. Perubahan permeabilitas membran sel

Membran sitoplasma mempertahankan bahan-bahan tertentu di dalam sel serta mengatur aliran keluar masuk bahan-bahan lain. Membran memelihara integritas komponen-komponen seluler. Kerusakan pada membran akan mengakibatkan terhambatnya pertumbuhan sel atau matinya sel.

c. Perubahan molekul protein asam nukleat

Hidupnya suatu sel tergantung pada terpeliharanya molekul-molekul protein pada asam nukleat dalam keadaan alamiahnya. Suatu kondisi atau substansi yang mengubah keadaan ini, yaitu mendenaturasikan protein dan asam-asam nukleat dapat merusak sel tanpa dapat diperbaiki kembali. Suhu

tinggi dan konsentrasi pekat beberapa zat kimia dapat mengakibatkan koagulasi (denaturasi), *irreversible* (tidak dapat kembali) komponen-komponen seluler.

d. Penghambatan kerja enzim

Setiap enzim dari beratus-ratus enzim yang berbeda-beda dan terdapat di dalam sel merupakan sasaran potensial bagi bekerjanya suatu penghambat, banyak zat kimia telah diketahui dapat mengganggu reaksi biokimiawi, penghambatan ini dapat mengakibatkan terganggunya metabolisme

e. Penghambatan sintesis asam nukleat dan protein

DNA, RNA dan protein memegang peranan penting di dalam proses kehidupan normal sel. Hal ini berarti bahwa gangguan apapun yang terjadi pada pembentukan atau pada fungsi zat-zat tersebut dapat mengakibatkan kerusakan total pada sel.

2.7 Uji MIC

Metode pengujian MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) adalah merupakan salah satu metode yang bertujuan untuk menguji aktivitas zat antibakteri secara *in vitro*. Dengan cara menentukan konsentrasi terendah dari zat tersebut yang dibutuhkan untuk menghambat pertumbuhan dari mikroorganisme yang diuji. Adanya aktivitas zat antibakteri ditentukan dengan kekeruhan yang terlihat pada tabung tersebut. MIC dipengaruhi oleh jenis organisme, ukuran, inoculum, komponen media kultur, waktu inkubasi, serta kondisi inkubasi berupa suhu, pH (Schegel and Schmidt, 1994 dalam Gunawan, 2007).

Faikoh *et al.*, (2013) menyatakan bahwa *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) merupakan salah suatu cara sederhana untuk pengujian antibakteri agar dapat diperoleh konsentrasi terendah. Uji MIC adalah konsentrasi terkecil obat yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri secara makroskopik. Hasil dari uji

MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) menurut Wardani *et al.* (2012), menyatakan bahwa dosis yang digunakan berbanding terbalik dengan nilai absorbansi yang dihasilkan atau semakin tinggi dosis yang digunakan maka nilai absorbansi semakin rendah. Namun Putri *et al.*, (2008), menyatakan bahwa nilai absorbansi yang berbanding lurus dengan dosis yang digunakan disebabkan karena spektrofotometer tidak mampu membedakan kekeruhan warna ekstrak dengan kekeruhan bakteri oleh karena itu pengamatan bisa dibantu dengan melihat warna dan membandingkan dengan kontrol.

2.8 Uji Daya Hambat Bakteri secara *In Vitro* dengan Uji Cakram

Uji cakram yaitu pengujian antibakteri dengan mengukur diameter daerah hambatan yang terjadi di sekitar kertas cakram yang sudah mengandung bahan antimikroba (Roihana *et al.*, 2011).

Metode difusi dikenal dengan sebutan metode cakram kertas. Tiap-tiap cakram kertas kosong sebelumnya dipanaskan dalam oven pada suhu 70°C selama 15 menit, kemudian kertas cakram dicelupkan ke dalam larutan uji. Cakram yang telah berisi supernatan, kemudian didiamkan selama 15 menit sebelum diletakkan pada media uji. Kemudian secara aseptik, setelah kertas cakram menyerap supernatan tersebut, masing-masing diletakkan pada permukaan medium yang telah berisi mikroba uji dan diinkubasi pada suhu 37°C selama 18-24 jam, dilakukan pengukuran diameter zona bening, yaitu zona bening yang terbentuk di sekitar cakram, dengan menggunakan penggaris milimeter (Noverita *et al.*, 2009). Pada metode uji cakram ini yang menjadi acuan adalah semakin besar diameter yang terbentuk maka semakin baik daya hambatnya (Darsana, 2012).

3. METODE PENELITIAN

3.1 Materi Penelitian

3.1.1 Alat Penelitian

Alat yang digunakan pada penelitian “Uji daya hambat ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan terhadap bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*” dapat dilihat pada Tabel 1 dan Lampiran 1.

Tabel 1 Alat dan Fungsi

No	Alat	Fungsi
1	Autoklaf	Sebagai alat untuk mensterilisasi peralatan dan bahan yang akan digunakan
2	Beaker Glass	Sebagai tempat alat yang akan disterilisasi
3	Botol Film	Sebagai tempat ekstrak
4	Bunsen	Sebagai alat untuk mencegah terjadinya kontaminasi pada saat penelitian
5	Cawan Petri	Sebagai tempat uji cakram
6	Erlenmeyer 50 ml	Sebagai tempat untuk kultur bakteri
7	Erlenmeyer 500 ml	Sebagai tempat untuk maserasi dan pembuatan media agar
8	Gelas Ukur 100 ml	Sebagai alat untuk mengukur larutan yang akan digunakan
9	Gunting	Sebagai alat untuk memotong tali, alumunium foil dan plastik wrap
10	Hotplate	Sebagai alat pemanas media
11	Inkubator	Sebagai alat untuk menginkubasi
12	Jangka Sorong Digital	Sebagai alat untuk mengukur diameter zona bening
13	Jarum Ose	Sebagai alat untuk mengambil bakteri
14	<i>Laminar Air Flow</i> (LAF)	Sebagai tempat dilakukannya perlakuan
15	Lemari Pendingin	Sebagai tempat penyimpanan bahan pada suhu dingin
15	Mikropipet 100-1000 μ	Sebagai alat untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan
17	Mikropipet 10-100 μ	Sebagai alat untuk mengambil bahan yang berbentuk cairan
18	Nampan	Sebagai tempat menyimpan alat
19	Pinset	Sebagai alat untuk membantu mengambil kertas cakram pada perlakuan
20	Rak Tabung Reaksi	Sebagai tempat tabung reaksi

Tabel 1. Lanjutan

No	Alat	Fungsi
21	Rotary Evaporator	Vacum Sebagai alat untuk mengevaporasi ekstrak tinta cumi (<i>Loligo sp.</i>)
22	Spektrofotometer	Sebagai alat untuk mengukur kekeruhan
23	Sprayer	Sebagai tempat menyimpan alkohol
24	Tabung Reaksi	Sebagai tempat untuk peremajaan bakteri dan uji MIC
25	Timbangan Digital	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-2}
26	Timbangan Analitik	Sebagai alat untuk menimbang bahan dengan ketelitian 10^{-3}
27	Triangle	Sebagai alat untuk meratakan bakteri pada media agar
28	Vortex Mixer	Sebagai alat untuk menghomogenkan larutan
29	Spatula	Sebagai alat untuk mengambil sampel
30	Oven	Sebagai alat untuk mengeringkan cawan petri

3.1.2 Bahan Penelitian

Bahan yang digunakan pada penelitian "Uji daya hambat ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan terhadap bakteri *V. harveyi* secara *in vitro*" dapat dilihat pada Tabel 2 dan Lampiran 2.

Tabel 2. Bahan dan Fungsi

No	Bahan	Fungsi
1	Alkohol 70%	Sebagai bahan sterilisasi
2	Alumunium foil	Sebagai bahan untuk menutupi seluruh bagian 17rlenmeyer pada saat maserasi
3	Aquades	Sebagai bahan pelarut
4	Bakteri <i>V.harveyi</i>	Sebagai bakteri yang digunakan untuk perlakuan
5	DMSO 10%	Sebagai pelarut ekstrak
6	Kapas	Sebagai bahan untuk menutupi alat yang disterilisasi
7	Kertas bekas	Sebagai bahan untuk membungkus peralatan yang akan disterilisasi
8	Blue tip	Sebagai bahan untuk mengambil larutan dalam volume tertentu
9	Yellow tip	Sebagai bahan untuk mengambil larutan dalam volume tertentu

Tabel 2.Lanjutan

No	Bahan	Fungsi
10	Kertas label	Sebagai bahan penanda
11	Kertas cakram	Sebagai bahan untuk mengetahui besar zona bening dari ekstrak kasar yang digunakan
12	NA (<i>Nutrient Agar</i>),	Sebagai media agar untuk peremajaan bakteri
13	NB (<i>Nutrient Broth</i>)	Sebagai media cair untuk kultur bakteri
14	n-Heksan	Sebagai bahan pelarut
15	Plastik <i>wrap</i>	Sebagai pembungkus cawan petri
16	Sarung tangan	Sebagai bahan untuk mencegah kontaminasi
17	Spirtus	Sebagai bahan bakar untuk Bunsen
18	Tali kasur	Sebagai bahan untuk mengikat peralatan yang akan disterilisasi
19	TCBSA (<i>Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar</i>)	Sebagai media agar pertumbuhan bakteri
20	Tinta cumi-cumi (<i>Loligo sp.</i>)	Sebagai bahan yang akan digunakan sebagai ekstraksi
21	Tisu	Sebagai bahan pembersih
22	TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>)	Sebagai media cair untuk uji MIC
23	Masker	Sebagai bahan untuk menutup bagian mulut dan hidung agar tidak terjadi kontaminasi pada saat perlakuan
24	Ekstrak tinta cumi-cumi (<i>Loligo sp.</i>)	Sebagai objek yang akan diteliti

3.2 Metode Penelitian

Metode yang digunakan dalam penelitian adalah metode eksperimen. Metode eksperimen menurut Nazir (1988), adalah penelitian yang dilakukan dengan mengadakan manipulasi terhadap obyek penelitian serta adanya kontrol. Tujuan penelitian eksperimental adalah untuk menyelidiki kemungkinan saling hubungan sebab-akibat dengan cara mengenakan kepada satu atau lebih kelompok eksperimen, satu atau lebih kondisi perlakuan dan membandingkan hasilnya dengan satu atau lebih kelompok kontrol yang tidak dikenai kondisi perlakuan. Sedangkan menurut Margono (2005), penelitian eksperimen

menggunakan suatu percobaan yang dirancang secara khusus guna membangkitkan data yang diperlukan untuk menjawab pertanyaan penelitian.

3.3 Rancangan Penelitian

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

$$Y = \mu + T + \varepsilon$$

Keterangan:

- Y_{ij} = respon atau nilai pengamatan dari perlakuan ke- i dan ulangan ke- j
- M = nilai rata-rata
- T_i = pengaruh perlakuan ke- i
- E_{ij} = pengaruh kesalahan (galat) percobaan dari perlakuan ke- i dan ulangan ke- j

Penelitian dengan menggunakan variabel bebas berupa perlakuan pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan, perlakuan yang diberikan adalah perbedaan dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan terhadap bakteri *V. harveyi*. Dasar penelitian ini adalah penelitian pendahuluan untuk mengetahui dosis daya hambat yang tepat dalam penggunaan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan. Dalam penelitian ini dilakukan pengulangan sebanyak 3 kali, sedangkan perlakuan tersebut diperoleh total sampel sebanyak 4 perlakuan dan 2 kontrol, kontrol positif dan kontrol negatif. Sehingga tiap perlakuan dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 2. Rancangan Penelitian

Keterangan :

- Perlakuan A : Bakteri *V. harveyi* ditanam dengan pemberian ekstraksi dosis 6 ppm.
- Perlakuan B : Bakteri *V. harveyi* ditanam dengan pemberian ekstraksi dosis 8 ppm.
- Perlakuan C : Bakteri *V. harveyi* ditanam dengan pemberian ekstraksi dosis 10 ppm.
- Perlakuan D : Bakteri *V. harveyi* ditanam dengan pemberian ekstraksi dosis 12 ppm.
- Kontrol positif : Bakteri *V. harveyi* ditanam dengan pemberian antibiotik *oxytetraxicyline* dengan dosis 30 μg .
- Kontrol negatif : Bakteri *V. harveyi* ditanam dengan pemberian pelarut DMSO.

3.4 Prosedur Penelitian

3.4.1 Persiapan dan Pengambilan Tinta Cumi

Tahap pertama yang harus dilakukan dalam penelitian ini adalah pengambilan tinta dari cumi-cumi (*Loligo* sp.). Cumi-cumi (*Loligo* sp.) yang digunakan berasal dari Pasuruan, Jawa Timur dalam keadaan segar. Pengambilan tinta diawali dengan pemotongan bagian mantel (bagian bawah tubuh cumi-cumi) secara vertikal atau membujur. Alat yang digunakan untuk mengambil tinta cumi-cumi adalah pinset. Pengambilan dilakukan dengan hati-hati untuk menghindari sobeknya kantong tinta. Kemudian kantong tinta cumi-cumi diletakkan pada wadah. Kantong tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dipotong-potong dengan menggunakan gunting dan diperas untuk diambil tintanya.

Komposisi tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) merupakan air yang berwarna hitam pekat. Kantong tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) yang sudah diambil diletakkan dalam botol yang steril kemudian dimasukkan kedalam lemari pendingin (kulkas) untuk mencegah tinta rusak.

3.4.2 Ekstraksi Tinta Cumi-cumi (*Loligo* sp.)

Proses ekstraksi diawali dengan melakukan maserasi (dapat dilihat pada Lampiran 3). Maserasi merupakan upaya perendaman tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut. Pada penelitian ini pelarut yang digunakan adalah pelarut n-Heksan. Metode maserasi merujuk pada penelitian Girija *et al.* (2012), dimana perbandingan pencampuran antara tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dan pelarut (n-Heksan) adalah 1:3 yaitu 100 ml tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan 300 ml n-Heksan. Pengambilan tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dilakukan dengan menggunakan gelas ukur sebanyak 100 ml dan n-Heksan sebanyak 300 ml lalu dituangkan ke dalam erlenmeyer 500 ml. Langkah selanjutnya yaitu pada mulut erlenmeyer ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil kemudian diikat menggunakan tali. Erlenmeyer 500 ml disimpan pada lemari pendingin selama 7 hari. Setelah 7 hari dilakukan evaporasi dengan menggunakan *rotary evaporator*.

3.4.3 Sterilisasi

Sterilisasi merupakan upaya pemusnahan bakteri-bakteri yang tidak diinginkan. Proses sterilisasi dilakukan dengan metode sebagai berikut:

1. Alat-alat yang akan disterilisasi dibungkus dengan menggunakan kertas koran, kemudian diikat dengan menggunakan tali (untuk tabung reaksi dan erlenmeyer bagian atas diberi kapas).
2. Aquades dituang secukupnya dalam autoklaf, kemudian alat yang telah dibungkus kertas koran dimasukkan ke dalam autoklaf dan tutup autoklaf secara diagonal.

3. Pastikan klep keluaranya uap pada posisi berdiri/tegak. Nyalakan autoklaf pada posisi ON, hingga lampu power menunjukkan warna kuning.
4. Temperatur diputar pada posisi maximal, sehingga warna lampu *heating* berwarna hijau. Biarkan hingga keluar uap air dari klep lalu tutup kearah samping.
5. Tunggu sampai jarum menunjukkan suhu sterilisasi (121°C), kemudian temperatur diturunkan sampai lampu pada *sterilizing* berwarna kuning.
6. Atur *timer* pada posisi 15 menit. Alarm berbunyi tanda sterilisasi berakhir.
7. Autoklaf dimatikan. Klep dibuka secara perlahan sampai jarum menunjukkan angka 0.
8. Lalu dibuka autoklaf secara diagonal dan diambil alat yang sudah disterilisasi lalu disimpan dalam inkubator, bahan yang telah disterilisasi disimpan dalam lemari pendingin.

3.4.4 Pembuatan Media

- NA (*Nutrient Agar*)

Media agar miring yang digunakan adalah NA (*Nutrient Agar*). Media miring digunakan sebagai media untuk peremajaan bakteri. Adapun proses pembuatan media miring agar adalah sebagai berikut:

1. Media NA (*Nutrient Agar*) ditimbang 0,2 gr dengan menggunakan timbangan digital.
2. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 ml.
3. Media dilarutkan dengan aquades sebanyak 10 ml dan dihomogenkan.
4. Media yang sudah dihomogenkan dimasukkan ke dalam 2 tabung reaksi masing-masing berisi 5 ml.
5. Tabung reaksi ditutup dengan menggunakan kapas dan dibungkus dengan alumunium foil serta diikat dengan tali.

6. Media disterilisasi dengan autoklaf pada suhu 121°C selama 15 menit dengan tekanan 1 atm.
7. Tabung reaksi yang berisi media steril dimiringkan dengan kemiringan 30°C.
8. Media ditunggu hingga menjadi padat.
9. Kemudian dilakukan strik secara zig-zag dengan keadaan steril.

- NB (*Nutrient Broth*)

Media NB adalah media cair yang digunakan untuk kultur bakteri. Proses pembuatan media NB adalah sebagai berikut:

1. Media NB ditimbang sebanyak 0,32 gram
2. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 ml
3. Media dilarutkan dengan menggunakan aquades sebanyak 40 ml.
4. Media yang sudah dihomogenkan ditutup dengan menggunakan kapas dan aluminium foil pada bagian mulut erlenmeyer 50 ml serta diikat tali.
5. Media disterilisasi dengan menggunakan autoklaf pada suhu 121°C dengan tekanan 1 atm selama 15 menit.

- TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar*)

Proses pembuatan media agar TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar*) yang digunakan untuk uji cakram adalah sebagai berikut:

1. Media TCBSA ditimbang sebanyak 23,76 gr.
2. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer 500 ml yang berisi aquades steril 270 ml.
3. Kemudian dihomogenkan di atas *hotplate* hingga larut.

- TSB (*Tryptic Soy Broth*)

Media TSB (*Tryptic Soy Broth*) digunakan sebagai media uji MIC. Berikut cara pembuatan media TSB:

1. Media TSB ditimbang 1,5 gr dengan timbangan digital.
 2. Media dimasukkan ke dalam erlenmeyer 50 ml
 3. Media dilarutkan dalam aquades 50 ml
 4. Media dimasukkan ke dalam tabung reaksi masing-masing 4 ml. Mulut tabung ditutup dengan kapas.
 5. Media disterilisasi dengan autoklaf.
- Perhitungan media dapat dilihat pada Lampiran 5.

3.4.5 Kultur Bakteri *V. harveyi*

Kultur bakteri *V. harveyi* dilakukan dengan cara sebagai berikut:

1. Biakan yang sudah diremajakan pada media agar miring diambil dengan menggunakan jarum ose sebanyak 1 gores.
2. Ose yang sudah terdapat bakteri dicelupkan pada media NB yang sudah disiapkan.
3. Media disimpan pada inkubator dengan suhu 33°C selama 1x24 jam.
4. Semua kegiatan pengkulturan dilakukan secara steril.

3.4.6 Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Adapun skema kerja uji MIC dapat dilihat pada Lampiran 8 dan prosedur melakukan uji MIC adalah sebagai berikut:

1. 10 tabung reaksi yang sudah berisi media TSB steril sebanyak 4 ml disiapkan terlebih dahulu.
2. Setiap tabung reaksi diberi bakteri 1 ose.
3. Ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan diberikan pada 8 tabung reaksi dengan dosis yang berbeda pada setiap tabungnya. Adapun dosisnya terdiri dari 100 ppm, 75 ppm, 50 ppm, 25 ppm, 10 ppm, 7,5 ppm, 5 ppm dan 2,5 ppm. Pada 2 tabung reaksi dijadikan kontrol positif dan kontrol negatif. Kontrol positif diberi antibiotik *oxytetracycline* 30 µg.
4. Media diinkubasi dengan suhu 33°C selama 24 jam.

5. Media dicek kekeruhannya dan diukur absorbansinya menggunakan spektrofotometer UV 1700 PharmaSpec UV-Vis spectrophotometry Simadzu dengan panjang gelombang 600 nm.
6. Nilai absorbansi yang tertera pada monitor spektrofotometer dicatat.

3.4.7 Uji Cakram

Uji cakram dilakukan untuk mengetahui daya hambat pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan yang dilihat dari zona bening yang berada disekeliling kertas cakram. Skema kerja uji cakram dapat dilihat pada Lampiran 9 dan prosedur untuk melakukan uji cakram adalah sebagai berikut:

1. Cawan petri yang telah terdapat media TCBSA disiapkan terlebih dahulu.
2. Kertas cakram steril direndam ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan pada dosis 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm dan 12 ppm. Perlakuan kontrol positif menggunakan antibiotik *oxytetracycline* 30 µg dan untuk kontrol negatif direndam pada DMSO.
3. Bakteri *V. harveyi* dengan kepadatan 1×10^9 CFU/ml diambil sebanyak 0,5 ml dengan menggunakan mikropipet.
4. Letakkan pada media TCBSA dibagian tengah, kemudian ratakan dengan menggunakan *triangle* dan ditunggu hingga kering.
5. Setelah 10-15 menit kertas cakram direndam, lalu diambil dengan hati-hati diletakkan pada media agar bagian tengah.
6. Kemudian media diinkubasi pada suhu 33°C selama 18-24 jam.
7. Media diamati dengan cara mengukur diameter zona bening yang terbentuk disekitar kertas cakram dengan menggunakan jangka sorong digital.

4. HASIL DAN PEMBAHASAN

4.1 Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) dilakukan dengan menggunakan berbagai macam dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan yang bertujuan untuk mengetahui dosis terkecil dalam menghambat bakteri *V. harveyi*. Pada penelitian pendahuluan dilakukan uji cakram dengan dosis yang berbeda-beda yaitu 1ppm, 10ppm, 100ppm dan 1000ppm dan didapatkan hasil yang berbeda-beda pada setiap dosisnya. Data yang diperoleh dalam penelitian pendahuluan yaitu pada dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan 10 ppm dan 100ppm memiliki daya hambat yang relatif besar dibandingkan dengan dosis 1ppm dan 1000ppm, maka dari itu dosis 100ppm digunakan untuk dilakukan uji MIC sebagai dosis tertinggi.

Hasil uji MIC menunjukkan adanya perbedaan setiap perlakuan setelah dilakukan pengamatan dengan menggunakan spektrofotometer UV 1700 UV 1700 PharmaSpec UV-Vis spectrophotometry Simadzu yang ditunjukkan pada Tabel 3 dibawah ini.

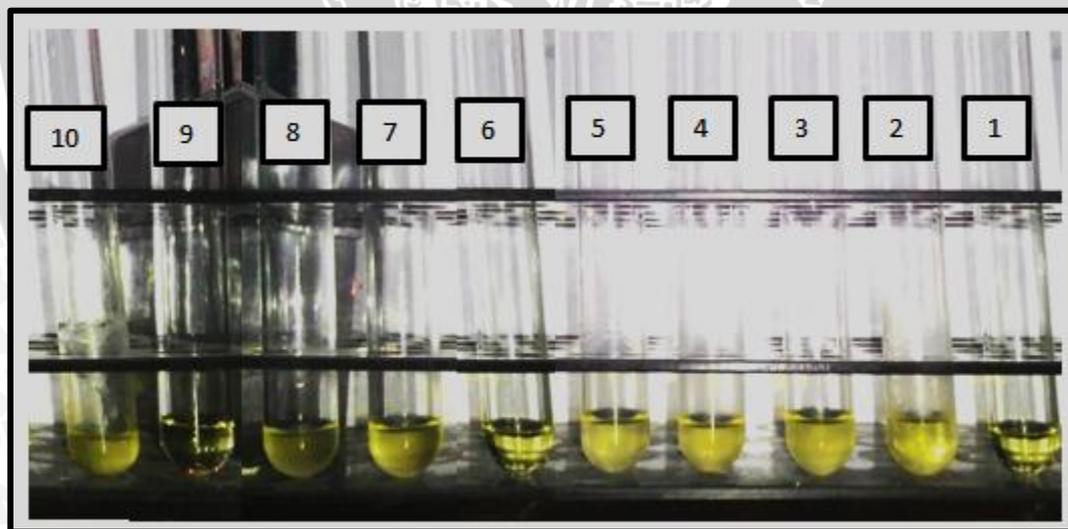
Tabel 3. Hasil Pengamatan Uji MIC Menggunakan Spektrofotometer

No	Konsentrasi (ppm)	Absorbansi	Warna
1.	100	1,4322	Bening
2.	75	1,4019	Bening
3.	50	1,3547	Bening
4.	25	1,3406	Bening
5.	10	1,3057	Bening
6.	7,5	1,2898	Bening
7.	5	1,4297	Bening
8.	2,5	1,6370	Keruh
9.	Kontrol +	1,2015	Bening
10.	Kontrol -	1,7777	Keruh

Keterangan :
 Tabung no. 6 = Konsentrasi 7,5 ppm yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V.harvey*
 Kontrol - = Perlakuan tidak ditambahkan antibakteri
 Kontrol + = Ditambahkan antibakteri

Hasil diatas menunjukkan bahwa tidak semua dosis yang tinggi memiliki nilai absorbansi yang rendah, sesuai dengan pernyataan Putri *et al.*, (2008), menyatakan bahwa nilai absorbansi yang berbanding lurus dengan dosis yang digunakan disebabkan karena spektrofotometer tidak mampu membedakan kekeruhan warna ekstrak dengan kekeruhan bakteri oleh karena itu pengamatan bisa dibantu dengan melihat warna dan membandingkan dengan kontrol.

Hasil spektrofotometer menunjukkan bahwa tabung no.6 memiliki nilai absorbansi dibawah kontrol negatif atau mendekati kontrol positif dan dilihat dari pengamatan warna, perlakuan pada tabung no. 6 menunjukkan kondisi bening pertama kali. Hasil uji MIC dapat dilihat pada Gambar 3.



Gambar 3. Hasil Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*) dari dosis terendah pada tabung nomor 8 sampai dosis tertinggi pada tabung nomor 1 kemudian tabung 10 sebagai kontrol negatif dan tabung 9 sebagai kontrol positif

Hasil uji MIC dengan melihat pada perubahan kondisi bening pertama kali dan pengukuran nilai absorbansi dengan menggunakan spektrofotometer maka nilai yang mendekati kontrol positif atau dibawah kontrol negatif yaitu pada dosis 7,5 ppm; dosis tersebut dapat menghambat pertumbuhan *V.harveyi*.

4.2 Uji Cakram

Untuk mengetahui kemampuan daya hambat ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan, maka diperlukan uji daya hambat dengan menggunakan kertas cakram. Uji cakram menurut Sommers (1994) ditandai dengan adanya zona hambat yang berbentuk bening atau zona yang tidak memperlihatkan pertumbuhan bakteri disekitar kertas cakram. Uji cakram dilakukan dengan menggunakan dosis 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm dan 12 ppm serta kontrol (negatif dan positif). Digunakan dosis dibawah 7,5 ppm dan diatas 7,5 ppm karena diyakini adanya kemungkinan pada dosis tersebut sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V.harveyi*

Hasil uji cakram dari ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan dengan 4 perlakuan dosis dan tiga kali ulangan yang dilakukan yaitu dengan dosis 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm dan 12 ppm didapatkan diameter zona bening setelah dilakukan pengamatan 24 jam dapat dilihat pada Tabel 4 dan perhitungan statistik dapat dilihat pada Lampiran 10.

Tabel 4. Hasil Rata-rata Uji Daya Hambat ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan terhadap Bakteri *V. harveyi*

Perlakuan	Diameter Zona Bening (mm)			Total (mm)	Rerata
	1	2	3		
A (6 ppm)	6,87	7,12	7,18	21,17	7,06
B (8 ppm)	7,65	8,15	8,23	24,03	8,01
C (10 ppm)	8,95	9,75	10,25	28,95	9,65
D (12 ppm)	10,53	10,47	10,61	31,61	10,54
				105,76	

Hasil yang diperoleh dari pengamatan zona bening dapat diklasifikasikan berdasarkan kekuatan respon hambatan ekstrak dalam menghambat bakteri. Klasifikasi didasari pada lebarnya zona bening yang terbentuk. Klasifikasi respon hambatan menurut Suriawiria (2005) dapat dilihat pada Tabel 5.

Tabel 5. Klasifikasi Respon Hambatan Pertumbuhan Bakteri

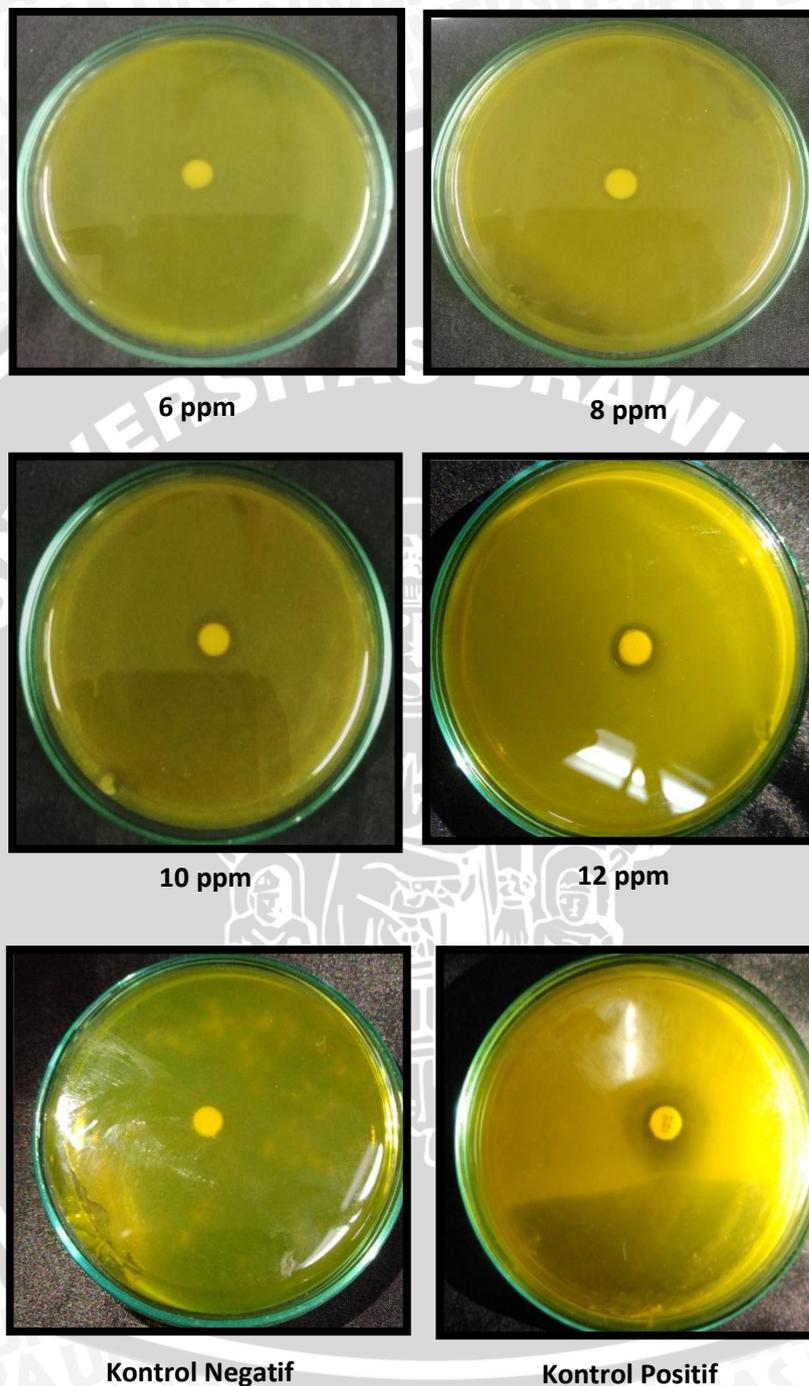
Diameter Zona Bening (mm)	Respon Hambatan Pertumbuhan
<5	Lemah
5-10	Sedang
10-19	Kuat
>20	Sangat kuat

Sumber : Suriawiria (2005)

Berdasarkan klasifikasi tersebut bahwa respon hambatan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan dengan dosis 6 ppm, 8 ppm, dan 10 ppm dikatakan sedang karena memiliki nilai diameter zona bening 5-10 mm sedangkan pada dosis 12 ppm dikatakan kuat karena memiliki nilai diameter zona bening 10-19 mm. Disampaikan pula oleh Rosida dan Afizia (2012), bahwa jika diameter zona hambat terbentuk lebih besar atau sama dengan 6 mm, maka ekstrak tersebut dikategorikan memiliki aktivitas antibakteri dan bila diameter zona hambat yang terbentuk lebih kecil dari 6 mm atau tidak terbentuk maka ekstrak tersebut dikategorikan tidak memiliki aktivitas antibakteri.

Hal ini menunjukkan bahwa dengan adanya luasan zona bening disekeliling kertas cakram dikarenakan bahan aktif ekstrak terserap pada kertas cakram sehingga bakteri tidak dapat tumbuh dicakram dan sekelilingnya serta menunjukkan bahwa ekstrak tersebut mengandung senyawa antibakteri yang dapat menghambat pertumbuhan bakteri, dimana Menurut Roihanah *et al.*, (2012), zona hambat pada lapisan agar terbentuk karena senyawa antibakteri berdifusi ke dalam lapisan tersebut dan menghambat bakteri, sedangkan lapisan agar yang ditumbuhi mikroorganisme akan tampak keruh.

Adapun gambar hasil uji daya hambat ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar. 4 Hasil Uji Cakram

Rata-rata diameter zona bening tertinggi yaitu pada perlakuan D dengan dosis 12 ppm (rata-rata diameter zona bening 10.54 mm) dan nilai terendah yaitu pada perlakuan A dengan dosis 6 ppm (rata-rata diameter zona bening yaitu 7.06 mm). Kemudian dilakukan analisis sidik ragam rata-rata diameter zona bening yang dihasilkan dari beberapa perlakuan (Tabel 6).

Tabel 6. Hasil Sidik Ragam Uji Daya Hambat ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan terhadap Bakteri *V. harveyi*.

Sumber Keragaman	Db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	22,20	7,40	52,79**	4,07	7,59
Acak	8	1,12	0,14			
Total	11					

Keterangan **: berbeda sangat nyata

Tabel sidik ragam menunjukkan bahwa dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan pelarut n-Heksan memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata terhadap daya hambat bakteri *V. harveyi*. Hal tersebut didasari oleh hasil F hitung yang menunjukkan nilai lebih besar dibandingkan dengan nilai F tabel 5% dan F tabel 1%. Hasil F hitung yaitu 52,79 dan F tabel 5% sebesar 4,07 serta F tabel 1% sebesar 7,59. Selanjutnya, dari hasil tersebut perlu dilanjutkan dengan perhitungan Uji Beda Nyata Terkecil (BNT) pada tiap perlakuan dengan taraf $p > 5\%$ (kepercayaan 95%) maupun taraf nyata 1% (kepercayaan 99%) (Tabel 7).

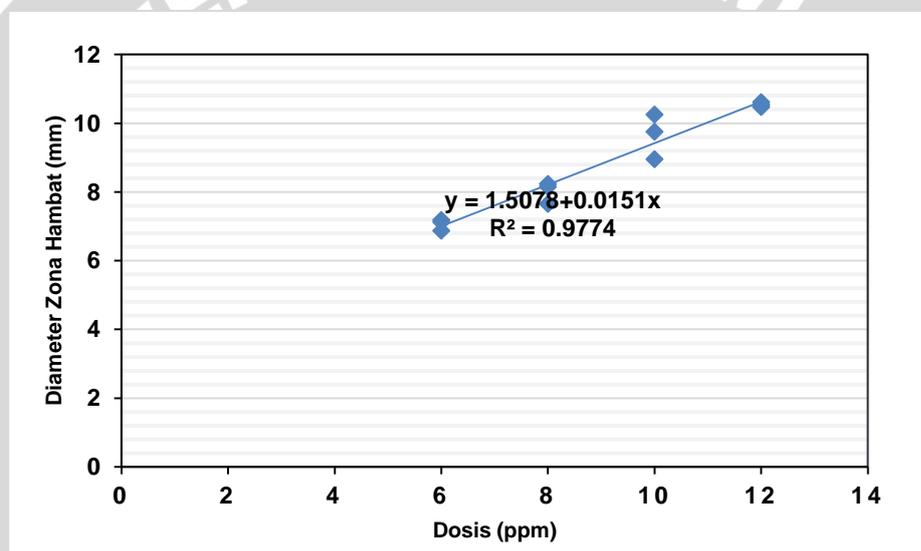
Tabel 7. Hasil Beda Nyata Terkecil (BNT) Uji Daya Hambat Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan Pelarut n-Heksan terhadap Bakteri *V. harveyi*

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	Notasi
		7,06	8,01	9,65	10,54	
A (6 ppm)	7,06	—				a
B (8 ppm)	8,01	0,95**	—			b
C (10 ppm)	9,65	2,59**	1,64**	—		c
D (12 ppm)	10,54	3,48**	2,53**	0,8**	—	d

Keterangan

** : berbeda sangat nyata

Pada Tabel 7 menunjukkan bahwa perlakuan A tidak memberikan nilai yang signifikan antara perlakuan dan diberi notasi a. Perlakuan B terhadap perlakuan A memberikan pengaruh berbeda sangat nyata sehingga diberi notasi b. Perlakuan C terhadap perlakuan A dan B memberikan pengaruh yang berbeda sangat nyata sehingga diberikan notasi c. Perlakuan D memberikan pengaruh berbeda sangat nyata terhadap perlakuan A, perlakuan B, dan perlakuan C sehingga diberi notasi d. Kemudian berdasarkan hasil penelitian didapatkan grafik regresi diameter zona hambat (bening) yang dihasilkan dengan perlakuan yang berbeda seperti pada Gambar 5.



Gambar 5. Hubungan Pengaruh Dosis Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan Pelarut n-Heksan pada Tiap Perlakuan dengan Diameter Zona Hambat

Berdasarkan Gambar 5 dapat dilihat bahwa hubungan antara penambahan dosis perlakuan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan terhadap diameter zona bening menunjukkan pola linier dengan persamaan $y = 1,5078 + 0,0151x$ dan koefisien $R^2 = 0,9774$. Hubungan antara pemberian ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V.harveyi* dengan rata-rata diameter zona bening yang dihasilkan menunjukkan respon yang meningkat seiring dengan

bertambahnya dosis ekstrak. Hal ini sesuai dengan pernyataan Katno dan Triyono (2009), bahwa kecenderungan diameter zona bening atau zona hambat pada pertumbuhan bakteri uji yang dihasilkan oleh suatu ekstrak berbanding lurus dengan peningkatan konsentrasi ekstrak yang digunakan karena perbedaan besarnya daerah zona hambatan masing-masing konsentrasi akibat perbedaan besarnya kandungan senyawa aktif. Hasil perhitungan statistik dapat dilihat pada Lampiran 10.

Berdasarkan penelitian yang telah dilakukan bahwa diameter zona hambat yang dihasilkan oleh ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan bersifat bakteriostatik. Menurut Kimball (2008) dalam Roihanah *et al.*, (2012), golongan bakteriostatik bekerja dengan jalan menghambat sintesis protein pada ribosom bakteri melalui proses difusi pasif melalui kanal hidrofilik dan sistem transportasi aktif. Setelah antibakteri masuk ke dalam ribosom, maka akan berikatan dengan ribosom dan menghalangi masuknya kompleks tRNA-asam amino pada lokasi asam amino, sehingga bakteri tidak dapat berkembang biak. Menurut Pelczar dan Chan (1988) dalam Roihana *et al.*, (2012), bahwa ekstrak kasar bersifat bakteriostatik karena ekstrak kasar hanya mampu menghambat pertumbuhan bakteri.

Pada ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) menggunakan pelarut n-Heksan dikarenakan n-Heksan merupakan pelarut non polar yang memiliki sifat stabil dan mudah menguap dan dari penelitian Girija *et al.*, (2008) dalam Girija *et al.*, (2014), menyatakan bahwa ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan menggunakan pelarut n-Heksan memiliki nilai aktivitas antibakteri yang tinggi.

Berdasarkan hasil uji MIC dan uji cakram telah terbukti bahwa ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan menggunakan pelarut n-Heksan dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*. Hal ini disebabkan karena ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) mengandung zat antibakteri yang berhasil

diikat oleh pelarut n-Heksan. Menurut Wiyanto (2010), bahwa senyawa antibakteri bekerja dengan cara berinteraksi dengan dinding sel dan berdifusi ke dalam sel sehingga mengakibatkan pertumbuhan bakteri terhambat atau mati.

Pada dasarnya mekanisme penghambatan bakteri oleh antibakteri dapat disebabkan oleh beberapa faktor diantaranya gangguan pada senyawa penyusun dinding sel, peningkatan permeabilitas membran sel yang dapat menyebabkan kehilangan komponen penyusun sel, menginaktivasi enzim dan merusak fungsi material genetik. Hal yang sama disampaikan pula oleh Retnowati *et al.*, (2011), bahwa rusaknya dinding sel akan menyebabkan terhambatnya pertumbuhan sel bakteri yang pada akhirnya bakteri akan mati. Secara umum adanya kerja suatu bahan kimia sebagai zat antibakteri dapat mengakibatkan terjadinya perubahan-perubahan yang mengarah pada kerusakan hingga terhambatnya pertumbuhan sel bakteri tersebut.

4.3 Parameter Penunjang

Parameter penunjang dari penelitian ini yaitu suhu inkubator dan kandungan nutrisi dari media biakan bakteri *V.harveyi*. Suhu merupakan salah satu parameter penting untuk pertumbuhan bakteri *V. harveyi*, hasil penelitian menunjukkan bahwa suhu inkubator yaitu 33°C, hal ini sesuai dengan pendapat Prajitno (2007) bahwa suhu optimum untuk pertumbuhan bakteri *Vibrio* sp. berkisar antara 30-35°C sedangkan pada suhu 4°C dan 45°C bakteri tidak dapat tumbuh dan pada suhu 55°C akan mati. Parameter lain yang mempengaruhi pertumbuhan bakteri *V. harveyi* yakni media pertumbuhan bakteri, dimana media tersebut harus mengandung nutrient untuk membiakkan bakteri. Media yang digunakan dalam penelitian ini yaitu media TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar*). Media TCBSA adalah media agar selektif untuk *Vibrio*. *Vibrio* sp. akan tumbuh pada media yang mengandung konsentrasi garam yang tinggi.

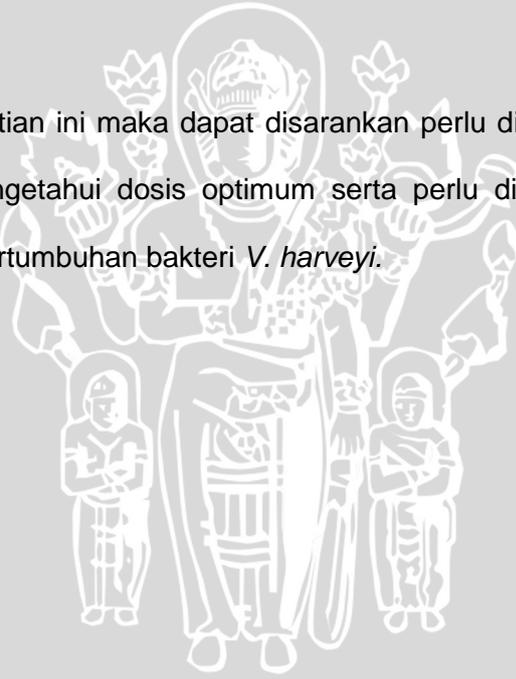
5. PENUTUP

5.1 Kesimpulan

Penelitian mengenai “Uji Daya Hambat Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo* sp.) dengan Pelarut n-Heksan terhadap Bakteri *V. harveyi* Secara *In Vitro*” diperoleh kesimpulan yaitu penggunaan ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo* sp.) dengan pelarut n-Heksan sudah dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi* pada dosis 6 ppm dengan ukuran diameter rata-rata zona hambat 7,06 mm dan bersifat bakteristatik karena hanya dapat menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.

5.2 Saran

Dari hasil penelitian ini maka dapat disarankan perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui dosis optimum serta perlu diuji secara *In vivo* dalam menghambat pertumbuhan bakteri *V. harveyi*.



DAFTAR PUSTAKA

- Adji, D., Zulyanti dan H. Larashanty. 2007. Perbandingan efektivitas sterilisasi alkohol 70%, inframerah, autoklaf dan ozon terhdap pertumbuhan bakteri *Bacillus subtilis*. **25** (1):17-24
- Ajitama, P., D. Suryanto dan Yunasfi. 2014. Jenis-jenis bakteri gram negatif potensial patogen pada ikan kerapu lumpur (*Epinephelus tauvina*) di keramba jaring apung perairan belawan. *Jurnal Aquacoastmarine*. **5**(4): 132-146.
- Darsana, I.G.O., dan I.N.K. Besung dan H. Mahatmi. 2012. Potensi daun binahong (*Anredera cordifolia*) dalam menghambat pertumbuhan bakteri *E. coli*. *Indonesia Medicus Veterinus*. **1**(3):337-351.
- Darwis, D. 2006. Sterilisasi Produk Kesehatan (*Health Care Products*) Dengan Radiasi Berkas Elektron. *Proseding Pertemuan dan Presentasi Ilmiah Teknologi Ahelerator dan Aplikasinya*. Pusat Pengembangan Teknologi Iso top dan Radiasi (PATIR)-Batan. 78-86.
- Deasywaty. 2011. *Aktivitas antimikroba dan identifikasi komponen aktif rimpang temulawak (Curcuma xanthorrhiza Roxb.)*. Tesis. Universitas Indonesia. 98 hlm.
- Evan, Y. 2009. *Uji ketahanan beberapa strain larva udang galah (Macrobrachium rosenbergii de Man) terhadap Bakteri Vibrio Harveyi*. Skripsi. Institut Pertanian Bogor: Bogor. 44 hlm.
- Fadjar, M., K. Zaelanie dan A.R. Faqih. 2015. Laporan Akhir Penelitian Unggulan Perguruan Tinggi. Universitas Brawijaya. Malang. 72 hlm.
- Faikoh, E.N., D.E Yuliana., S. Suhendriani dan H.Q Aini. 2013. Studi daya antibakteri ekstrak karang lunak (*Geodia* sp.) segar terhadap bakteri *Escherechia coli* dan *Vibrio parahaemolyticus* serta kandungan senyawa aktifnya. *Jurnal Teknologi Pertanian*. **14**(3): 201-208.
- Felix, F., T.T. Nugroho., S. Silalahi dan Y. Octavia. 2011. Skrining bakteri *Vibrio* sp asli Indonesia sebagai penyebab penyakit udang berbasis tehnik 16S ribosomal DNA. *Jurnal Ilmu dan Teknologi Kelautan Tropis*. **3**(2):85-99.
- Girija, A.S.S., V. Priyadharshini, P. Suba, Hariprasad and R. Raghuraman. 2011. Isolation and characterization of lolduvm-s: a novel antimicrobial protein from the ink of india squid *Loligo duvauceli*. *IJCRR*. **7**(3): 4-14.
- Girija, A.S.S., V. Priyadharshini, P. Suba, Hariprasad and R. Raghuraman. 2012. Antibacterial effect of squid ink on ESBL producing strains of *E. Coli* and *K. pneumoniae*. *Indian Journal of Geo Marine Science*. **4** (4): 338-343.
- Girija, A.S.S., K.P. Suba, G. Hariprasad and R. Raghuraman. 2014. A novel study on the antibacterial effect of the crude squid ink extracts from the

Indian squid four bacterial pathogens isolated from carious dentine. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci.* **3**(4): 904-911.

Gunawan, I. 2007. Penapisan awal ekstraksi senyawa bioaktif sebagai antibakteri serta uji toksisitas dan uji *minimum inhibitory* (MIC) dari karang lunak asal perairan Pulau Panggang, Kepulauan Seribu. *Skripsi*. Institut Pertanian Bogor. Bogor. 61 hlm.

Hatmanti, A. 2003. Penyakit bakterial pada budidaya krustacea serta cara penanganannya. LIPI. Jakarta. *Oseana*. **28**(3): 10 hlm.

Hadi, S. 2012. Pengambilan minyak atsiri bunga cengkeh (*Clove oil*) menggunakan pelarut n-Heksana dan Benzena. *Jurnal Bahan Alam Terbarukan*. **1**(2): 25-30.

Holt, J.G, N.R Krieg, P.H.A Sneath, J.T Staley and S.T Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Ninth Edition. Lippincott Williams & Wilkins. Baltimore. 754 pp.

Hudaya, A. 2010. *Uji antioksidan dan antibakteri ekstrak air bunga kecombrang (Etlingera elatior) sebagai pangan fungsional terhadap Staphylococcus aureus dan Escherichia coli*. *Skripsi*. Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta. 83 hlm.

Irianto, A. 2005. *Patologi Ikan Teleostei*. Gadjah Mada University Press. Yogyakarta. 256 hlm.

Katno, S. H. dan A. Triyono. 2009. Uji daya hambat ekstrak etanol daun sembung (*Blumea balsamifera* (L) DC.) terhadap pertumbuhan mikroba *E. coli*, *S. aureus* dan *C. albicans*. *Jurnal Tanaman Obat Tradisional*. **2** (1):22-36.

Kobayashi, T., S. Enomoto, R. Sakazaki, and S. Kuwahara. 1963. A new selective medium for pathogenic vibrios, TCBS (modified Nakanishi's agar). *J. Bacteriol.* **18**:387.

Kusuma, G.A., S.N.J. Longdong dan R.A. Tumbol. 2014. Uji daya hambat hambat dari ekstrak tanaman pacar air (*Impatiens balsamica* l) terhadap pertumbuhan bakteri *Aeromonas hydrophila*. *Jurnal Ilmiah PS. Agribisnis Perikanan Manado*. 1-8

Maulina, I., A.A Handaka dan I. Riyantini. 2012. Ananlisis prospek budidaya tambak udang di Kabupaten Garut. *Jurnal Akuatika*. **3**(1): 49-62.

Margono, S. 2005. *Metodologi Penelitian Pendidikan*. Jakarta: PT. Rineka Cipta.

Meliawaty, F. 2012. Efisiensi sterilisasi alat bedah mulut melalui inovasi oven dengan ozon dan *infrared*. **11**(2): 147-167.

Mukhriani. 2014. Ekstraksi, pemisahan senyawa dan identifikasi senyawa aktif. *Jurnal Kesehatan*. **7**(2): 361-367

- Munawaroh, S. dan P.A Handayani. 2010. Ekstraksi minyak daun jeruk purut (*Citrus hystrix* D.C) dengan pelarut etanol dan n-heksana. *Jurnal Kompetensi Teknik*. **2**(1): 73-78.
- Nasi, L., S.B. Prayitno dan Sardjito. 2007. Kajian bakteri vibriosis pada udang secara biomolekuler. *Jurnal Of Coastal Resources Management*. **3**(1)
- Nazir, M. 1988. Metode Penelitian. Ghalia Indonesia. Jakarta.
- Noverita, D. Fitria dan E. Sinaga. 2009. Isolasi dan uji aktivitas antibakteri jamur endofit dari daun dan rimpang *Zingiber ottensii* val. *Jurnal Farmasi Indonesia*. **4**(4): 173-174.
- Pelczar, M.J dan E. C. S. Chan. 1986. Dasar-dasar Mikrobiologi I. Universitas Indonesia. Jakarta. 443 hlm.
- Pelczar, M.J dan E. C. S. Chan. 1988. Dasar-dasar Mikrobiologi II. Universitas Indonesia. Jakarta.
- Prajitno, A. 2005. Parasit dan Penyakit Ikan. Diktat Kuliah. Universitas Brawijaya. Malang. 104 hlm.
- Prajitno, A. 2007. Uji sensitifitas flavonoid rumput laut (*Eucheuma cottoni*) sebagai bioaktif alami terhadap bakteri *Vibrio harveyi*. *Jurnal Protein*. **15**(2): 66-71.
- Putri, R,W., W, Tjajaningsih dan D, Handijatno. 2008. Daya antibakteri pigmen pyocyanin dari isolate *Pseudomonas aeruginosa* terhadap *Aeromonas hydrophila* secara in vitro. *Jurnal berkala ilmiah perikanan*. **3**(1): 65-73.
- Prasetyo, C.R. 2014. *Pengaruh ekstrak kasar biji mahoni (Swietenia macrophyla) terhadap daya hambat Vibrio harveyi secara In vitro*. Skripsi. Universitas Brawijaya. Malang. 51 Hlm.
- Reed, P.A and R.F Floyd. 1996. *Vibrio infection of Fish*. University of Florida.
- Retnowati, Y., N, Bialangi dan N W Posangi. 2011. Pertumbuhan bakteri *Staphylococcus aureus* pada media yang diekspos dengan infus daun sambiloto (*Andrographis paniculata*). *Jurnal Saintek*. **6**(2):1-9.
- Roihanah, S., Sukoso dan Andayani S. 2012. Aktivitas antibakteri ekstrak teripang *Holothuria* sp. terhadap bakteri *Vibrio harveyi* secara in vitro. *J.Exp. Life Sci*. **2**(1): 1-5.
- Rosidah dan W. M. Afizia. 2012. Potensi ekstrak daun jambu biji sebagai antibakterial untuk menanggulangi serangan bakteri *Aeromonas hydrophila* pada ikan gurame (*Osphronemus gourami lacepede*). Universitas Padjadjaran. Bandung. *Jurnal Akuatika*. **3**(1): 19-27.
- Roza, D., F. Johnny dan Zafran. 2010. Pengembangan vaksin bakteri untuk meningkatkan imunitas kerapu macan, *Epinephelus fuscoguttatus* terhadap penyakit infeksi. *Prosiding Forum Inovasi Teknologi Akuakultur*. Balai Besar Riset Perikanan Budidaya Laut. Bali. 939-944

- Rudiana, E. dan D. Pringgenies. 2004. Morfologi dan anatomi cumi-cumi *Loligo duvancell* yang memancarkan cahaya. *Jurnal Ilmu Kelautan*. **9**(2): 96-100.
- Saanin, H. 1984. Taksonomi dan Kunci Identifikasi Ikan. Binacipta. Jakarta.
- Saptiani, G., S.B. Prayitno dan S. Anggoro. 2012. Aktivitas antibakteri ekstrak jeruju (*Acanthus ilicifolius*) terhadap pertumbuhan *Vibrio harveyi* secara *in vitro*. *Jurnal Veteriner*. **13**(3): 257-262.
- Sari, R.R.B., Sarjito., dan A.H.C. Haditomo. 2015. Pengaruh penambahan serbuk daun binahong (*Anredera cordifolia*) dalam pakan terhadap kelulushidupan dan histopatologi hepatopankreas udang vaname (*Litopenaeus vannamei*) yang diinfeksi bakteri *Vibrio harveyi*. *Journal of Aquaculture Managemen and Technology*. **4**(1) : 26-32.
- Sastrosupadi, A. 2000. Rancangan Percobaan Praktis Bidang Pertanian. Kanisius. Malang. 267 Hlm.
- Sitorus, S.W. 2013. *Analisis keberlanjutan budidaya udang vaname (Litopenaeus vannamei) dalam pengembangan kawasan minapolitan di beberapa Desa Kecamatan Pantai Cermin Kabupaten Serdang Bedagai Provinsi Sumatera Utara*. Tesis. Universitas Diponegoro Semarang. 25 hlm.
- Soemarno. 2000. Isolasi dan Identifikasi Bakteri Klinik. Akademi Analisis Kesehatan. Akademi Analisis Kesehatan Yogyakarta Departemen Kesehatan Republik Indonesia: Yogyakarta.
- Sommers, H.M. 1994. Dasar Biologis dan Klinis Penyakit Infeksi. Gajah Mada University Press. Yogyakarta. 594 hlm.
- Sulistyo. 1971. Farmakologi dan Terapi. EKG. Yogyakarta.
- Suriawiria, U. 2005. Mikrobiologi Dasar. Papas Sinar Sinanti. Jakarta. 172 hlm.
- Tantrayana, P.B dan E. Zubaidah. 2015. Karakteristik fisik-kimia dari ekstrak salak gula pasir dengan metode maserasi. *Jurnal Pangan dan Agroindustri*. **3**(4): 1608-1619.
- Wardani, R,K., W, Tjahjaningsih dan B, S, Raharjda. 2012. Uji efektifitas ekstrak daun sirih merah (*Piper Rocatum*) terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* secara *In Vitro*. *Jurnal perikanan dan Kelautan*. **4**(1): 59-64.
- Wiyanto, D.B. 2010. Uji aktivitas antibakteri ekstrak rumput laut *Kappaphycus alvarezii* dan *Eucheuma denticullatum* terhadap bakteri *Aeromonas hydrophila* dan *V. harveyi*. Universitas Islam Madura. Madura. *Jurnal Kelautan*. **3**(1): 1-16.
- Zhong, J.P., G. Wang, J.H. Shang, J.Q. Pan, K. Li, Y. Huang and H.Z. Liu. 2009. Protective effects of squid ink extract towards hemopoietic injuries induced by cyclophosphamine. *Journal Marine Drugs*. **7**: 9-18

LAMPIRAN

Lampiran 1. Alat Penelitian



Timbangan Digital



Timbangan Analitik



Inkubator



Oven



Autoklaf



Kulkas



Hotplate



Vortex mixer



Laminary Air Flow



Bunsen



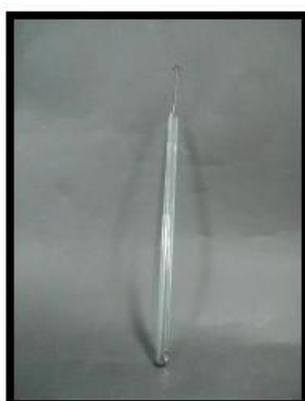
Cawan Petri



Jangka Sorong Digital



Tabung Reaksi



Jarum Ose



Erlenmeyer 50 ml



Spektrofotometer



Mikropipet 10-100 µl



Mikropipet 100-1000 µl



Gelas ukur 100 ml



Erlenmeyer 500 ml



Nampan



Triangle



Rotary evaporator



Gunting



Sprayer



Rak tabung reaksi



Pinset

Lampiran 2. Bahan Penelitian



Ekstrak Tinta Cumi-Cumi (*Loligo sp.*)



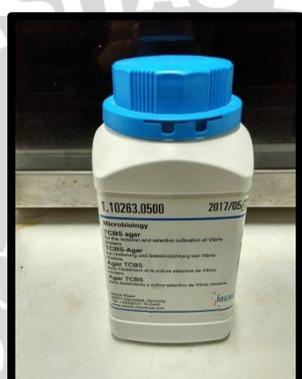
Akuades



Alkohol 70%



Bakteri *Vibrio harveyi*



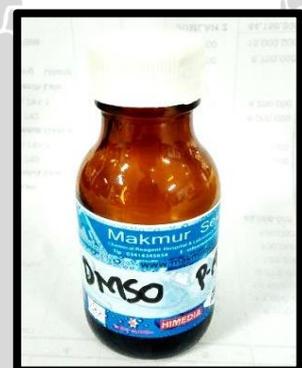
TCBSA



Aluminium Foil



Benang kasur dan kapas



DMSO



Spirtus



Kertas Label



n-Heksan



Masker



Plastik wrap



Tisu



Sarung tangan



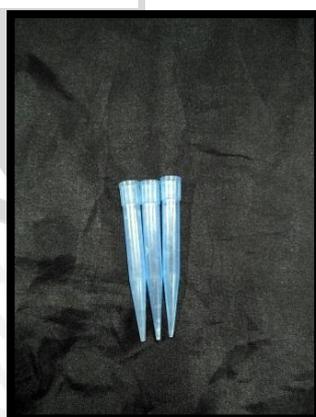
NB



NA



TSB



Blue tip



Yellow tip

Lampiran 3. Proses Ekstraksi Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*)



Pemisahan Kantung Tinta cumi



Penyaringan tinta cumi



Tinta cumi-cumi dimaserasi dengan perbandingan 1:3



Hasil



Dilakukan pemisahan pelarut dengan *Vaccum Rotary Evaporator*

Lampiran 4. Hasil Uji Biokimia Bakteri *V.harveyi*



KEMENTERIAN KELAUTAN DAN PERIKANAN
 DIREKTORAT JENDERAL PERIKANAN BUDIDAYA
 BALAI BESAR PERIKANAN BUDIDAYA AIR PAYAU
 LABORATORIUM UJI BBPAP JEPARA
 Alamat surat: PO Box 1 Jepara, Kantor: Jl. Cik Lanang – Bulu Jepara 59418
 Telp. : (0291) 591125, Faximili : (0291) 591724
 Email : bbbapjpr@rad.net.id Website : udang-bbbap.com



LAPORAN HASIL UJI

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

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



Lab. Mikrobiologi BBPAP Jepara

Penyelia

Sri Murti Astuti, SP.



Lampiran 5. Perhitungan Mediaa. Pembuatan Media NA (*Nutrient Agar*)

Berdasarkan petunjuk penggunaan pada kemasan media NA (*Nutrient Agar*) tertera pembuatan media cair NA dalam 1 liter menggunakan 20 gram serbuk NA. Media juga ditambahkan dengan 3 garam yaitu NaCl, KCl dan MgSO₄. Pembuatan media yang diinginkan adalah 10 ml NA. Oleh karena itu, perhitungan sebagai berikut:

$$\begin{aligned}\text{NA (Nutrient Agar)} &= \frac{20 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} = \frac{x}{10 \text{ ml}} \\ &= 0,2 \text{ gram}\end{aligned}$$

b. Pembuatan Media NB (*Nutrient Broth*)

Berdasarkan petunjuk penggunaan pada kemasan media NB (*Nutrient Broth*) tertera pembuatan media cair NB dalam 1 liter menggunakan 8 gram serbuk NB. Media juga ditambahkan dengan 3 garam yaitu NaCl, KCl dan MgSO₄. Pembuatan media yang diinginkan adalah 40 ml NB. Oleh karena itu, perhitungan sebagai berikut:

$$\begin{aligned}\text{NB (Nutrient Broth)} &= \frac{8 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} = \frac{x}{40 \text{ ml}} \\ &= 0,32 \text{ gram}\end{aligned}$$

c. Pembuatan Media TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar*)

Berdasarkan petunjuk penggunaan pada kemasan media TCBSA (*Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose Agar*) tertera pembuatan media cair TCBSA dalam 1 liter menggunakan 88 gram serbuk TCBSA. Media juga ditambahkan dengan 3 garam yaitu NaCl, KCl dan MgSO₄. Pembuatan media yang diinginkan adalah 270 ml. Oleh karena itu, perhitungan sebagai berikut:

$$\begin{aligned}\text{TCBSA} &= \frac{88 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} = \frac{x}{270 \text{ ml}} \\ &= 23,76 \text{ gram}\end{aligned}$$

d. Pembuatan Media TSB (*Tryptic Soy Broth*)

Berdasarkan petunjuk penggunaan pada kemasan media TSB (*Tryptic Soy Broth*) tertera pembuatan media cair TSB dalam 1 liter menggunakan 30 gram serbuk TSB. Media juga ditambahkan dengan 3 garam yaitu NaCl, KCl dan $MgSO_4$. Pembuatan media yang diinginkan adalah 50 ml. Oleh karena itu, perhitungan sebagai berikut:

$$\begin{aligned} \text{TSB} &= \frac{30 \text{ gr}}{1000 \text{ ml}} = \frac{x}{50 \text{ ml}} \\ &= 1,5 \text{ gram} \end{aligned}$$

UNIVERSITAS BRAWIJAYA



Lampiran 6. Perhitungan Dosis

Dalam membuat dosis pada ekstrak n-heksan tinta cumi yaitu ekstrak kasar n-heksana tinta cumi dilarutkan dengan pelarut DMSO 10%. Adapun cara perhitungan dosis DMSO 10% dan ekstrak n-heksan tinta cumi yaitu:

- DMSO 10 %

$$V_1.N_1 = V_2.N_2$$

$$V_1. 100\% = 10 \text{ ml. } 10\%$$

$$V_1 = 1 \text{ ml DMSO } 100\%$$

Untuk mendapatkan DMSO 10% dengan volume 10 ml, maka 1 ml DMSO 100% dilarutkan dengan 9 ml Aquades

- Dosis Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*)

Untuk mendapatkan dosis ekstrak tinta cumi-cumi (*Loligo sp.*) 6 ppm, 8 ppm, 10 ppm dan 12 ppm yakni dengan cara terlebih dahulu membuat ekstrak n-heksan tinta cumi dengan dosis 1000 ppm

- 1000 ppm

$$1000 \text{ ppm} = 1000 \text{ mg/L}$$

$$= 1000 \text{ mg} / 1000 \text{ ml} = 10 \text{ mg} / 10 \text{ ml}$$

$$= 10 \text{ mg ekstrak dilarutkan dengan } 10 \text{ ml DMSO } 10\%$$

- 6 ppm

$$V_1.N_1 = V_2.N_2$$

$$V_1. 1000 \text{ ppm} = 2 \text{ ml. } 6 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,012 \text{ ml ekstrak}$$

- 8 ppm

$$V_1.N_1 = V_2.N_2$$

$$V_1. 1000 \text{ ppm} = 2 \text{ ml. } 8 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,016 \text{ ml ekstrak}$$

- 10 ppm

$$V_1.N_1 = V_2.N_2$$

$$V_1. 1000 \text{ ppm} = 2 \text{ ml. } 10 \text{ ppm}$$

$$V_1 = 0,02 \text{ ml ekstrak}$$

- 12 ppm

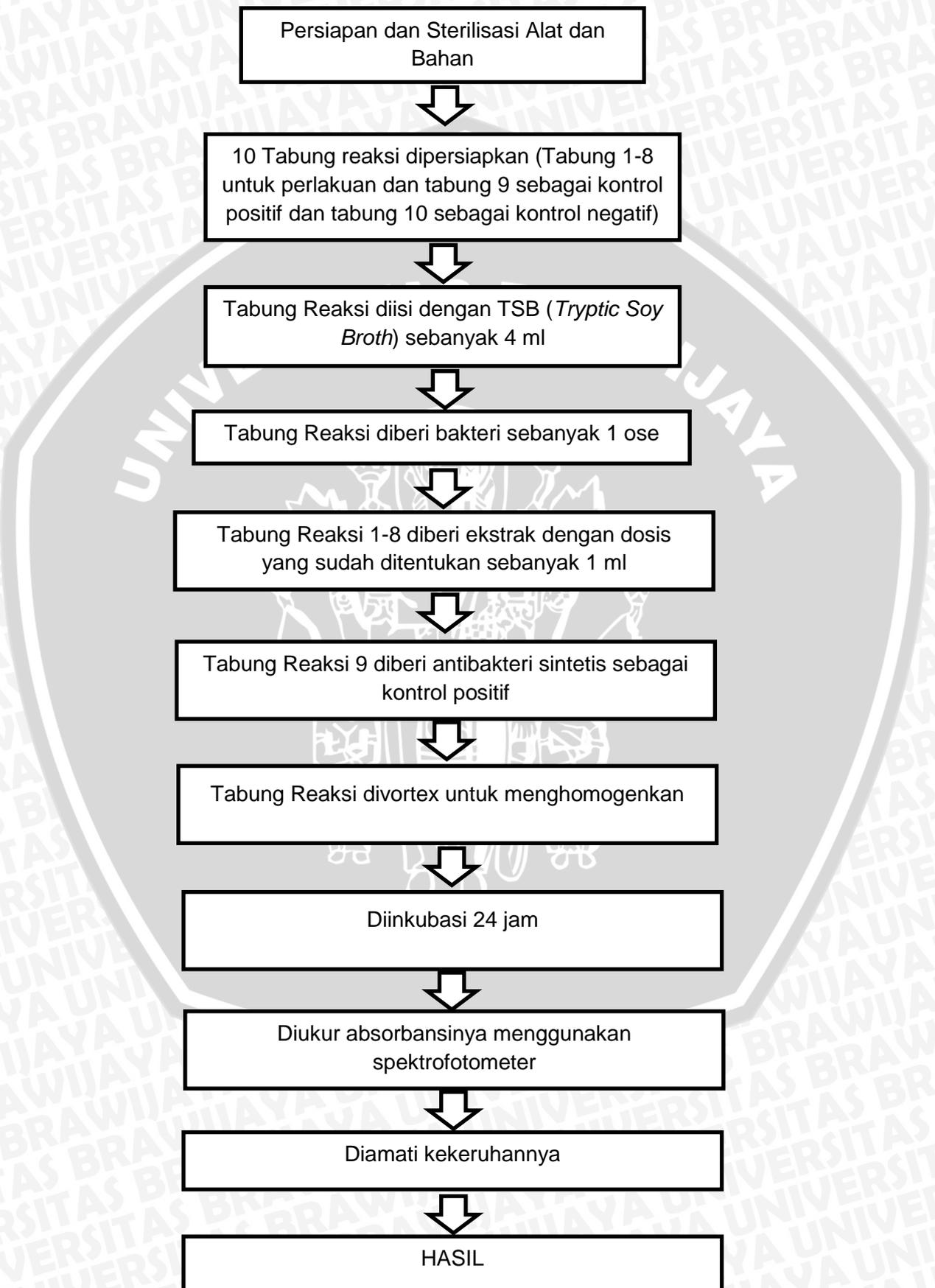
$$V_1.N_1 = V_2.N_2$$

$$V_1.1000 \text{ ppm} = 2 \text{ ml. } 12 \text{ ppm}$$

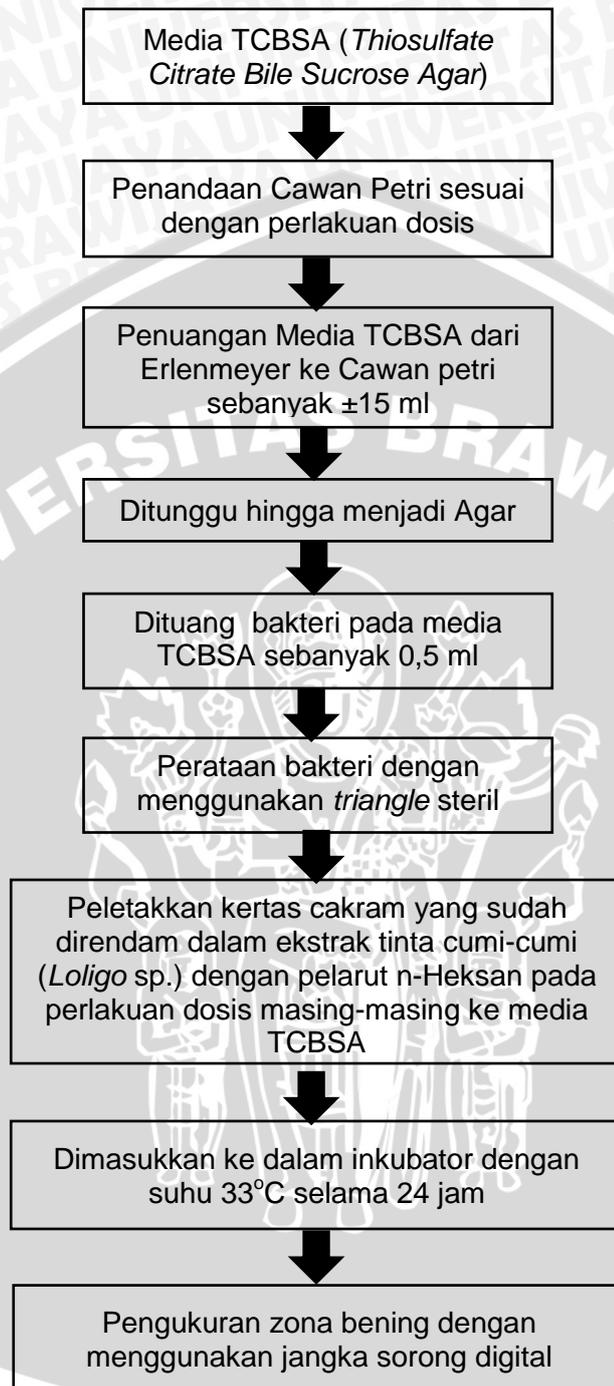
$$V_1 = 0,024 \text{ ml ekstrak}$$

Lampiran 7. Komposisi Media

No	Nama Media	Komposisi
1.	NA (<i>Nutrient Agar</i>)	Beef Extract 3,0 g/l Peptone 5,0 g/l Agar 15 g/l pH 6,8
2.	NB (<i>Nutrient Broth</i>)	Pepton from Meat 5 g/l Meat extract 3 g/l Pepton from Casein 15 g/l
3.	TSB (<i>Tryptic Soy Broth</i>)	Tryptone (Pancreatic Digest of Casein) 17 g/l Soytone (Peptic Digest of Soybean Meal) 3 g/l Glucose 2,5 g/l Sodium Chloride 5 g/l Dipotassium Hydrogen Phosphate 2,5 g/l
4.	TCBSA (<i>Thiosulfate Citrate Bile Sucrose Agar</i>)	Sodium Citrate 10 g/l Sodium Thiosulfate 10 g/l Oxbile 5 g/l Sodium Cholate 3 g/l Sucrose 20 g/l Sodium Chloride 10 g/l Ferric Citrate 1 g/l Bromothymol Blue 0,04 g/l Thymol Blue 0,04 g/l Agar 14 g/l

Lampiran 8. Skema Kerja Uji MIC (*Minimum Inhibiting Concentration*)

Lampiran 9. Proses Uji Cakram



Lampiran 10. Perhitungan Statistik Uji Daya Hambat Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan Pelarut n-Heksan terhadap Bakteri *V.harveyi* secara *In vitro*

Perlakuan	Zona Bening (mm)			Total (mm)	Rerata
	1	2	3		
A (6 ppm)	6,87	7,12	7,18	21,17	7,06
B (8 ppm)	7,65	8,15	8,23	24,03	8,01
C (10 ppm)	8,95	9,75	10,25	28,95	9,65
D (12 ppm)	10,53	10,47	10,61	31,61	10,54
				105,76	

➤ Perhitungan

FK	$\frac{105,76}{4 \times 3}$	932,10
JK TOTAL	$(A^2 + A^2 + A^3 + \dots + D^3) - FK$	23,32
JK PERLAKUAN	$\frac{(\sum A^2 + \sum B^2 + \sum C^2 + \sum D^2) - FK}{3}$	22,20
JK ACAK	JK Total – JK Perlakuan	1,12
KT	JK/db	

➤ Analisa Keragaman

Sumber Keragaman	db	JK	KT	F.Hit	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	22,20	7,40	52,79	4,07	7,59
Acak	8	1,12	0,14	**		
Total	11					

F 5% < F. hitung > F 1% =berbeda sangat nyata

Keterangan :

** : berbeda sangat nyata

➤ Uji BNT

SED	$\sqrt{\frac{2 \times KT \text{ acak}}{3}}$	0,31
BNT 5%	t table 5% (db acak) x SED	0,57
BNT 1%	t table 1 % (db acak) x SED	0,89

Tabel Uji BNT

Perlakuan	Rerata	A	B	C	D	Notasi
		7,06	8,01	9,65	10,54	
A (6 ppm)	7,06	—				a
B (8 ppm)	8,01	0,95**	—			b
C (10 ppm)	9,65	2,59**	1,64**	—		c
D (12 ppm)	10,54	3,48**	2,53**	0,89**	—	d

Keterangan

** : sangat berbeda nyata

➤ Uji polinomial orthogonal

Perlakuan	Total	Perbandingan (Ci)				
		Linier	Kuadratik	Kubik		
A (6 ppm)	21,17	-3	1	-1		
B (8 ppm)	24,03	-1	-1	3		
C (10 ppm)	28,95	1	-1	-3		
D (12 ppm)	31,61	3	1	1		
Q= $\sum ci \cdot Ti$		36,24	-0,2	-4,32		
Hasil Kuadrat		20	4	20		
Kr= $(\sum ci^2) \cdot r$		60	12	60		
JK= Q^2 / Kr		21,89	0,003	0,31		
JK Regresi	22,20					
Sumber Keragaman	db	JK	KT	F. Hitung	F 5%	F 1%
Perlakuan	3	22,20			4.07	7.59
Linier	1	21,89	21,89	156,14**	**	
Kuadratik	1	0,003	0,003	0,02	ns	
Kubik	1	0,31	0,31	2,22	ns	
Acak	8	1,12	0,14			
Total	12					

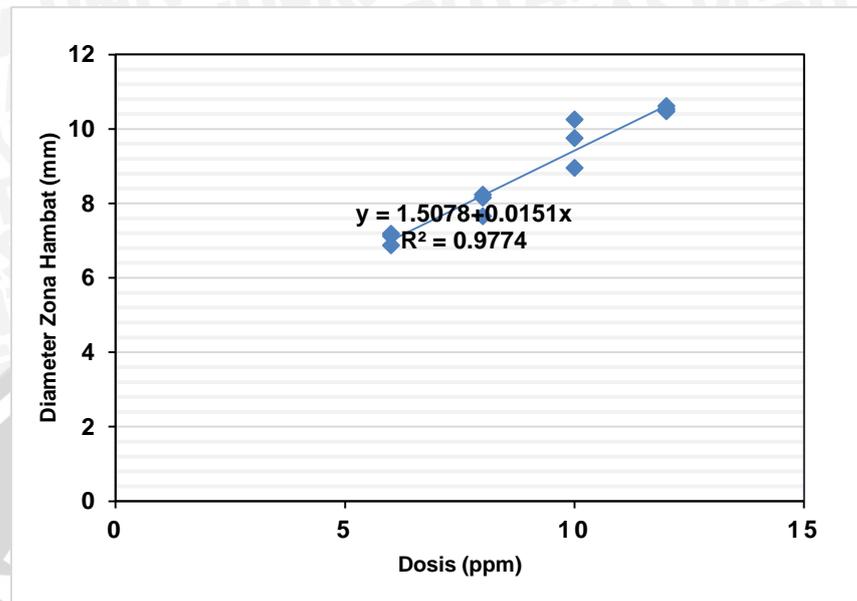
R^2 Linier = JK Linier/ (JK Linier+ JK Acak) = 0,95

R^2 Kuadratik = JK Kuadratik/ (JK Kuadratik+JK Acak)= 0,003

R^2 Kubik = JK Kubik / (JK Kubik +JK Acak) = 0,22

Nilai regresi linier lebih besar dari nilai regresi kuadratik dan kubik sehingga grafik yang dibuat adalah grafik linier.

- Grafik Uji Daya Hambat Ekstrak Tinta Cumi-cumi (*Loligo sp.*) dengan Pelarut n-Heksan terhadap Bakteri *V. harveyi* secara *In vitro*



X	y
6	7,06
8	8,01
10	9,65
12	10,54

Keterangan :

X : Dosis Ekstrak (ppm)

Y : Diameter Zona Hambat (mm)